



Préparation et caractérisation de microbulles et microgouttelettes par procédés membranaires pour des applications biomédicales ultrasonores

Romain Melich

► To cite this version:

Romain Melich. Préparation et caractérisation de microbulles et microgouttelettes par procédés membranaires pour des applications biomédicales ultrasonores. Pharmacologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1353 . tel-02025119

HAL Id: tel-02025119

<https://theses.hal.science/tel-02025119>

Submitted on 19 Feb 2019

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.



N° d'ordre NNT : xxx

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED206
Ecole doctorale Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Physico-Chimie - Génie Pharmacotechnique

Soutenue publiquement le 13/12/2018, par :

Romain MELICH

Préparation et caractérisation de microbulles et microgouttelettes par procédés membranaires pour des applications biomédicales ultrasonores

Devant le jury composé de :

Duval Hervé, Professeur, CentraleSupélec

Li Huai-Zhi, Professeur, Université de Lorraine

Cherkaoui Samir, Responsable de laboratoire, Bracco Suisse S.A.

Briançon Stéphanie, Professeure, Université Lyon 1

Charcosset Catherine, Directrice de Recherches, Université de Lyon 1

Frédéric Padilla, Directeur de Recherches, Université de Lyon 1

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Présidente

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Résumé

Le développement de différentes formes colloïdales pour la thérapie et le diagnostic médical ultrasonore connaît un intérêt croissant depuis de nombreuses années. En particulier, les microbulles de perfluorocarbone (PFC) sont des agents de contraste intéressants, car le gaz est un puissant réflecteur des ultrasons. Plus récemment, les gouttelettes de PFC ont été proposées pour de nouvelles applications acoustiques. Suite à une impulsion acoustique, les ultrasons induisent un changement de phase de l'état liquide à l'état gazeux. Ce phénomène est appelé la vaporisation acoustique de gouttelettes. Pour toutes ces nouvelles applications, le développement de nouvelles techniques de préparation offrant un contrôle précis de la taille des particules formées lors de la production reste un enjeu primordial. Ainsi, de nouvelles méthodes de préparation basées sur des dispositifs membranaires sont particulièrement intéressantes. L'objectif de la thèse porte donc sur le développement de nouvelles techniques à membrane pour la formulation de microbulles et de microgouttelettes de taille contrôlée, en vue d'applications en imagerie et thérapie ultrasonore. Dans ce travail, l'émulsification membranaire directe avec un module membranaire de type cross-flow a été utilisée pour la préparation de microbulles stabilisées par des tensioactifs solubles, tandis qu'un module de type microkit a permis l'obtention de microbulles stabilisées par des phospholipides. Dans un second temps, l'émulsification membranaire par prémix a permis de formuler des microgouttelettes de PFC monodispersées. Pour les différentes formes colloïdales préparées, nous avons documenté l'influence des paramètres du procédé (pression, débit et contrainte de cisaillement), des paramètres de formulation (molécules stabilisatrices, type de PFC de la phase dispersée) et des paramètres de la membrane (taille des pores) sur la formation des microbulles et microgouttelettes. Nous avons finalement démontré la fonctionnalité des microbulles et microgouttelettes formées, par leur caractérisation acoustique, et montré qu'elles présentent des propriétés compatibles pour les applications biomédicales.

Abstract

The development of various colloidal forms for therapy and diagnosis in medical ultrasound is of great interest since many years. In particular, microbubbles of perfluorocarbon (PFC) are interesting as contrast agents because their gas core is a strong ultrasound reflector. More recently, PFC droplets have been proposed for novel acoustic applications. Indeed, after an acoustic pulse, the ultrasound waves induce a phase change from the liquid state to the gaseous state. This phenomenon is called the acoustic vaporization of droplets. For all these new applications, the development of new techniques of preparation offering a precise control of the particle size is of great necessity. Novel methods of preparation based on membrane devices are particularly interesting for this purpose. The aim of the thesis is the development of new membrane process for the formulation of microbubbles and droplets with tight control of their size, to meet requirements for ultrasound applications in imaging and therapy. In this work, the direct membrane emulsification with a cross-flow membrane module was used for the preparation of microbubbles stabilized by soluble surfactants, while a microkit module was used to fabricate microbubbles stabilized by phospholipids. In a second step, the membrane emulsification by premix was used to formulate monodispersed droplets of PFC. For the various colloidal forms prepared, we documented the influence of the process parameters (pressure, flow rate and shear stress), the formulation parameters (surfactants, type of PFC of the dispersed phase) and the membrane parameters (pore size) on the formation of microbubbles and droplets. Finally, we demonstrated the functionality of microbubbles and droplets, by an acoustic characterization, and showed that they have properties that could be compatible for biomedical applications.

Remerciements

Avant toute chose je tiens à remercier les membres du jury Hervé Duval et Huai-Zhi Li d'avoir accepté d'être rapporteurs, à Samir Cherkaoui d'avoir accepté d'être examinateur, ainsi qu'à Stéphanie Briançon de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Merci pour notre échange et l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Ce travail de thèse a été réalisé en grande partie au sein du Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de génie Pharmaceutique (LAGEPP). Je remercie les directeurs successifs Hatem Fessi et Stéphanie Briançon, pour leur accueil. Une partie de la thèse a également été réalisée pour un certain nombre d'expériences acoustiques au Laboratory of Therapeutic Applications of Ultrasound (LabTAU) dirigé par Cyril Lafon. Merci Cyril pour ton accueil dans l'univers des biophysiciens.

Bien sûr, je tiens également à dire un grand merci à mes encadrants de thèse : Catherine Charcosset et Frédéric Padilla. Merci à tous les deux pour m'avoir confié ce sujet de thèse. Catherine, merci pour ton soutien, ta grande disponibilité, et merci de m'avoir fait confiance tout au long de la thèse. Frédéric, merci pour toutes les discussions, ta sympathie et ton savoir que tu partages avec nous.

Je voudrais remercier également le personnel du LAGEPP, qui ont rendu ce travail plus agréable grâce à leur aide et leur sympathie au quotidien. Merci Nadia Chapel, pour m'avoir facilité les démarches administratives et pour ta grande gentillesse. Cette thèse faisant partie d'un projet multidisciplinaire, toutes les expériences réalisées sur la préparation des agents de contraste n'auraient pu être menées à bien sans l'expertise de Jean-Pierre Valour et Sébastien Urbaniak. Merci pour vos disponibilités et tout ce que vous m'avez appris. Je remercie également le service technique analyse et instrumentation, Géraldine Agusti Moret et Quentin Lelong, pour la mise en place d'équipements scientifiques performants afin d'être dans les meilleures conditions pour réaliser les expériences.

Mes remerciements s'adressent également à Noureddine Lebaz pour avoir consacré du temps pour me former au logiciel Latex ainsi que pour tes conseils et nos discussions scientifiques et humoristiques. Nina Papaya, tu as été une super stagiaire et je te remercie pour le travail que tu as fourni et pour l'expérience d'encadrement que tu m'as apportée.

Je n'oublie pas, bien sûr, mes collègues avec qui j'ai passé d'agréables moments au laboratoire comme à l'extérieur : Laura Birba, Flavia Carton, Gheghiani Manis, Gonzalez Francisco, Khadem Behnam, Magnano Greta, Mesnier Aline, Michaud Aline, Rosso Annalisa, Tarnowska Malgorzata, Zitte Bertrand, Pierre Verlhac, Alexandre Terrand-Jeanne, Louis Lefebvre, Alexis Zenner, Marc-Aurèle Lagache, et Alexandre Hiver.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du Labtau : Cécile Fant, Teymour Kangot et Jennifer Wischhusen, et particulièrement Ali Zorgani, pour son investissement pour m'aider à la caractérisation acoustique des agents de contrastes ultrasonores.

Au cours de cette thèse, j'ai également eu la chance d'obtenir un contrat d'ACE pour l'encadrement de travaux pratiques pour les étudiants en licence et Master. Je remercie chaleureusement

les jeunes maîtres de conférence pour vos précieux conseils dans le monde de l'enseignement ; Emilie Gagnière, Elodie Chabanon, Giovanna Lollo, Stéphane Labouret et Claudia Cogne.

Je garderai un souvenir mémorable de cette période grâce aux personnes qui ont rendu l'ambiance agréable au laboratoire, en particulier Joris Arnault, Océane Alliod, Joëlle Balegamire et Camille Dumont. Tous nos fous rires et nos délires resteront à jamais gravés (QPUC, Déguisement, Basket, Jeux, Chasse au trésor, Randonnée...).

Je tiens à remercier tous mes amis et toutes les personnes qui m'ont encouragé tout au long de mon parcours : Benjamin, Ewan, Jules, Elodie, Teddy, Margot, Cyril, Fatema, Alexandra, Yann, Matthieu, Patrick, Geoffrey...

Cette thèse n'aurait pu être menée à bien sans le soutien et les encouragements de ma famille. Merci pour vos conseils, votre amour et votre force que vous savez me transmettre depuis toujours afin de me dépasser et d'atteindre mes objectifs. Maman, merci pour m'avoir toujours encouragé et d'avoir toujours essayé de comprendre ce que je faisais. Papa, merci pour ton envie de vouloir toujours faire plaisir et me m'avoir permis d'être dans les meilleures conditions pour réaliser cette thèse. Une fois de plus merci à vous deux pour m'avoir soutenu tout au long de mes longues études, et de s'être toujours sacrifié pour que mon frère et moi puissions réaliser nos rêves.

Je tiens à dédier ce travail à mon frère, Victor. Je suis fier d'avoir été un modèle pour toi mais sache que tu as accompli bien plus que moi et sache que je serai toujours présent pour être à tes côtés pour continuer à nous surpasser pour atteindre nos objectifs. La complicité qui nous unit nous permet de rester liés malgré les centaines de kilomètres qui nous séparent.

Pour terminer, Elodie, je n'ai pas assez de mots pour te remercier de m'avoir tant soutenu, durant ces trois années. Merci d'avoir été la personne me permettant de toujours garder la motivation, l'esprit positif, de t'être intéressé à mon travail, de m'avoir patiemment écouté, soutenu, aidé et encouragé.

Une nouvelle page va enfin pouvoir commencer...

Préambule

Le travail décrit dans cette thèse a été réalisé au laboratoire d'automatique, génie des procédés et génie pharmaceutique (LAGEPP) à l'Université Claude Bernard Lyon 1. En tant que doctorant contractuel, j'ai eu l'opportunité de pouvoir exercer une activité complémentaire d'enseignement (ACE) en plus de la réalisation de mes travaux de recherches. Le manuscrit est basé sur deux publications en anglais, qui forment le chapitre 3 et le chapitre 5. Chaque publication scientifique est introduite par un préambule mais le contenu des publications reste inchangé.

Publications scientifiques :

1. R. Melich, J-P. Valour, S. Urbaniak, F. Padilla and C. Charcosset *Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes*, Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, *Article accepté le 19 septembre 2018*
2. R. Melich, F. Padilla, A. Zorgani and C. Charcosset *Preparation of perfluorocarbon emulsions by premix membrane emulsification for acoustic droplet vaporization in biomedical applications*, Journal Of Materials Chemistry B, *Article soumis en octobre 2018*

Présentations scientifiques :

- R. Melich, F. Padilla and C. Charcosset *Preparation of perfluorocarbon emulsions by premix membrane emulsification for acoustic droplet vaporization in biomedical applications*, Euromembrane, July 9th-13th, 2018, Valencia, Espagne (Oral)
- R. Melich, F. Padilla and C. Charcosset *Influence of surfactants and gas properties for the preparation of microbubbles by membranes*, Bubble & Drop, June 26th-30th, 2017, Lyon, France (Poster : 3^{ème} Prix)
- R. Melich, F. Padilla and C. Charcosset *Les bulles : Agents de contraste ultrasonores en imagerie médicale*, Journée régionale des innovations thérapeutiques, 25 Janvier 2017, Lyon, France (Oral)

Table des matières

Résumé	i
Remerciements	i
Préambule	i
Table des matières	iii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xvii
Nomenclature	xviii
Introduction générale	1
1 Partie bibliographique	5
1.1 Ultrasons pour applications médicales	6
1.1.1 Généralités sur l'imagerie ultrasonore	6
1.1.1.1 Ondes ultrasonores	6
1.1.1.2 Echographie	7
1.1.1.3 Agents de contraste ultrasonores (ACUs)	9
a) Généralités	9
b) Différents types d'agents de contraste	10
1.1.2 Microbulles	12
1.1.2.1 Généralités	12
1.1.2.2 Microbulles en tant qu'ACUs	13
1.1.2.3 Composition	14
a) Composition du gaz	14
b) Composition de l'enveloppe	14
1.1.2.4 Propriétés acoustiques	15
1.1.2.5 Applications	16
1.1.3 Emulsions	18
1.1.3.1 Généralités	18
1.1.3.2 Emulsions en tant qu'ACUs	19
a) Composition	20

b) Paramètres influençant la vaporisation	20
1.1.3.3 Applications	22
1.2 Physico-chimie des systèmes dispersés	22
1.2.1 Principales propriétés physico-chimiques	23
1.2.1.1 Interfaces liquide/liquide et gaz/liquide	23
1.2.1.2 Tensioactifs	24
1.2.1.3 Concentration micellaire critique	24
1.2.1.4 Pression de Laplace	25
1.2.1.5 Angle de contact	25
1.2.2 Stabilité des systèmes dispersés	25
1.2.2.1 Pour les émulsions	26
1.2.2.2 Pour les microbulles	26
1.3 Procédés de fabrication	29
1.3.1 Procédés utilisant l'agitation mécanique	30
1.3.1.1 Homogénéisateur rotor-stator	30
1.3.1.2 Amalgameur	31
1.3.2 Procédés utilisant les ultrasons (sonication)	31
1.3.3 Procédés microfluidiques	33
1.3.4 Autres procédés de fabrication	34
1.3.4.1 Procédés d'atomisation électrohydrodynamique coaxiale (CEHDA)	34
1.3.4.2 Condensation de microbulles	34
1.4 Procédés membranaires	35
1.4.1 Généralités	35
1.4.1.1 EMD versus EMP	36
1.4.1.2 Comparaison avec les autres procédés	36
1.4.2 Membranes	37
1.4.2.1 Membranes SPG	38
1.4.3 Modules	39
1.4.3.1 Micro-kit SPG	40
1.4.3.2 Cross-flow SPG	41
1.4.4 Emulsification membranaire directe (EMD)	42
1.4.4.1 Mécanismes de génération de microbulles/gouttelettes	42
1.4.4.2 Influence des différents paramètres	43
a) Paramètres du procédé	43
b) Paramètres de la membrane	45
c) Paramètres de formulation	47
1.4.5 Emulsification membranaire par prémix (EMP)	48
1.4.5.1 Mécanismes de génération de gouttelettes	48
a) Cisaillement à la paroi des pores	48
b) Forces de cisaillement localisées	49
c) Instabilités de tension interfaciale	50
d) Obstacle stérique entre les gouttelettes	50

1.4.5.2	Influence de différents paramètres	50
a)	Paramètres du procédé	50
b)	Paramètres de la membrane	51
c)	Paramètres de formulation	51
1.5	Conclusion	52
2	Méthodes expérimentales	55
2.1	Microbulles de PFC	56
2.1.1	Matériels	56
2.1.1.1	Tensioactifs solubles	56
2.1.1.2	Tensioactifs insolubles (phospholipides)	57
	Lyophilisation	58
2.1.1.3	Gaz	59
2.1.2	Procédés membranaires	60
2.1.2.1	Modules et membranes SPG	60
2.1.2.2	Procédé d'émulsification directe	60
a)	Méthode	60
b)	Formulation de microbulles	64
2.2	Emulsions de PFC	65
2.2.1	Matériels	65
2.2.1.1	Tensioactifs	65
2.2.1.2	Liquide de perfluorocarbone	65
2.2.1.3	Huile triglycéride à chaînes moyennes	65
2.2.2	Procédé d'émulsification par prémix	66
2.2.2.1	Pompe seringue à haute pression	66
2.2.2.2	Formulation d'émulsions	68
2.2.2.3	Procédure de nettoyage	69
2.3	Caractérisation physique	70
2.3.1	Tension superficielle	70
2.3.1.1	Microbulles	71
2.3.1.2	Emulsions	71
2.3.2	Mesure de taille et de distribution en taille	71
2.3.2.1	Microscopie optique	71
2.3.2.2	Diffraction laser	72
2.4	Caractérisation acoustique	74
2.4.1	Verasonic et sonde acoustique	74
2.4.2	Réponses harmoniques des microbulles	75
2.4.3	Vaporisation in vitro des gouttelettes	75
2.4.4	Détermination du seuil de vaporisation	76
3	Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes	79
3.1	Préambule	80

3.2	Abstract	80
3.3	Introduction	81
3.4	Materials and methods	83
3.4.1	Materials	83
3.4.2	SPG membranes and membrane module	83
3.4.3	Surface tension measurements	83
3.4.4	Preparation of microbubbles	84
3.4.4.1	Probe-type sonication method	84
3.4.4.2	Membrane process using a cross-flow system	84
3.4.5	Characterization of microbubbles	86
3.4.5.1	Laser diffraction measurement	86
3.4.5.2	Optical microscopy	87
3.5	Results and discussion	87
3.5.1	Comparison of sonication and membrane technique	87
3.5.2	Influence of process parameters	89
3.5.2.1	Influence of the transmembrane pressure	89
3.5.2.2	Influence of the wall shear stress	91
3.5.2.3	Influence of the pore size	93
3.5.3	Influence of the surfactant type	94
3.5.4	Influence of the gaseous phase	95
3.5.5	Microbubbles stability	96
3.6	Conclusion	98
4	Préparation de microbulles de PFC stabilisées par des phospholipides en utilisant un procédé membranaire	101
4.1	Introduction	102
4.2	Mesures de tensions superficielles	103
4.3	Influence du PEG40S	105
4.4	Influence du diamètre des pores	108
4.5	Influence de la température	108
4.6	Influence d'hydrotropes	109
4.7	Stabilité des microbulles	111
4.8	Réponse harmonique	111
4.9	Conclusion	113
5	Preparation of perfluorocarbon emulsions by premix membrane emulsification for acoustic droplet vaporization in biomedical applications	115
5.1	Préambule	116
5.2	Abstract	116
5.3	Introduction	116
5.4	Experimental	118
5.4.1	Materials	118
5.4.2	SPG membranes and membrane module	118

5.4.3	Experimental set-up and procedure	119
5.4.4	Preparation of emulsions	119
5.4.5	Physical characterization	121
5.4.5.1	Laser diffraction measurement	121
5.4.5.2	Optical characterization	121
5.4.6	Interfacial surface measurement	121
5.4.7	Acoustical characterization	122
5.4.7.1	Acoustical device	122
5.4.7.2	Determination of the vaporization threshold	122
5.5	Results and discussion	123
5.5.1	Influence of process parameters	123
5.5.1.1	Effect of membrane pore size	123
5.5.1.2	Effect of flow rate	124
5.5.1.3	Effect of dispersed phase type	126
5.5.2	Acoustical droplet vaporization	126
5.5.2.1	Effect of process on the droplet vaporization threshold	129
5.5.2.2	Effect of diameter	130
5.5.2.3	Effect of the temperature	131
5.5.2.4	Effect of perfluorocarbon type	131
5.5.2.5	Effect of the presence of oil	132
5.6	Conclusion	133
Conclusion générale		135
Bibliographie		150

Liste des figures

1.1	Échographie en mode B d'un fœtus de 10 semaines chez une femme enceinte [1] . .	7
1.2	Photographie d'un échographe pour application en imagerie médicale ultrasonore [2]	8
1.3	Détection d'un carcinome hépatocellulaire chez une femme de 60 ans atteinte du virus de l'hépatite B, (a) Le sonogramme en mode B traditionnel montre une petite masse hypoéchogène (flèche) dans le lobe droit du foie, (b) L'image après injection d'ACUs au maximum de l'amélioration de la phase artérielle montrant une hyper-vascularité classique de la tumeur hépatique [3]	10
1.4	Représentation schématique des différents types d'agents de contraste ultrasonores, microbulles, gouttelettes et particules solides (Schéma adapté de [4])	12
1.5	A gauche, observation au microscope optique de microbulles (Objectif $\times 20$). A droite, représentation schématique de microbulles de gaz stabilisées par des tensioactifs (Coupe transversale d'une MB présentant le cœur gazeux)	13
1.6	Observation du comportement linéaire d'une microbulle. Soumise à une onde ultrasonore présentant des pressions positives et négatives, la bulle oscille par compression/dilatation du volume gazeux	16
1.7	Représentation schématique d'une microbulle utilisée en imagerie ultrasonore classique, moléculaire ou en thérapie (Figure adaptée de [5])	17
1.8	Opacification de la cavité ventriculaire gauche : (a) Vue du ventricule gauche (LV : left ventricle) d'un patient sans agent de contraste, (b) la même vue après une injection de bolus d'un agent de contraste de microbulles. Le LV, le bord endocardique (LV/ENDO) et le muscle papillaire (PAP) sont maintenant visualisés avec précision, permettant d'évaluer l'épaississement du myocarde [6]	18
1.9	Principales configurations d'une émulsion : simple ou double. a) huile dans eau (H/E); b) eau dans huile (E/H); c) Eau dans huile dans eau (E/H/E); d) Huile dans eau dans huile (H/E/H)	19
1.10	Représentation schématique du procédé de vaporisation acoustique de gouttelettes (ADV). La vaporisation de gouttelettes de PFC suite à l'exposition à des impulsions ultrasonores entraîne la formation d'une bulle de gaz	20
1.11	Représentation schématique de l'évolution de la tension superficielle en fonction du temps montrant l'adsorption dynamique de tensioactif à une interface jusqu'à atteindre une saturation totale de la surface par les molécules, caractérisées par une tension superficielle à l'équilibre	23

1.12 Représentation schématique de l'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration logarithmique du tensioactif afin de déterminer la concentration micellaire critique (CMC)	24
1.13 Angle de contact et mouillage d'une goutte/bulle déposée sur une surface solide . .	25
1.14 Représentation schématique des divers mécanismes de déstabilisation d'une émulsion (Figure adaptée [7])	27
1.15 Rayon des microbulles en fonction du temps pour trois différentes compositions : microbulles non stabilisées d'air et de PFC et microbulles de PFC stabilisées par des tensioactifs [8])	29
1.16 Principe schématique du procédé d'homogénéisation de type rotor-stator	30
1.17 VIALMIX® est le dispositif d'activation pour Definity®, utilisé pour générer les microbulles stabilisées par des phospholipides avant leur utilisation en échocardiographie de contraste	31
1.18 Le sonicateur Q55 génère des ondes ultrasonores grâce à trois dispositifs : le générateur électrique qui transforme le courant alternatif en énergie électrique à haute fréquence, le générateur qui convertit l'énergie électrique en vibrations mécaniques et la sonde qui fournit les ultrasons	32
1.19 Illustration schématique des trois principales géométries développée pour les dispositifs microfluidiques utilisée pour la formation des gouttelettes/microbulles, a) co-flow, b) flow focusing et c) cross-flow technique (jonction T)	33
1.20 Schéma des deux principales configurations pour l'émulsification membranaire, a) Emulsification membranaire directe (EMD), dans laquelle la phase dispersée est poussée à travers la membrane dans une phase continue, b) Emulsification membranaire par prémix (EMP) dans laquelle le prémix est poussé à travers la membrane	36
1.21 Images microscopiques des principales membranes utilisées en émulsification membranaire a) Membranes Shirasu Porous Glass observées au microscope électronique à balayage, b) Membranes métalliques observées au microscope optique, c) Membrane polymériques observées au microscope électronique à balayage (PC : Polycarbonate, PES : Polyéthersulfone, CA : Cellulose acétate, Échelle : 1 μm [9, 10])	38
1.22 Principales étapes de fabrication d'une membrane Shirasu Porous Glass (SPG) (SPG Technology Co.,Ltd [11]	39
1.23 Modules utilisés en émulsification membranaire a) Cellule agitée commercialisée par Micropore Technologies, b) Procédé d'extrusion mettant sous pression une suspension	40
1.24 Vue schématique des modules membranaires Shirasu Porous Glass a) Système micro-kit SPG de pression externe, b) Système SPG cross-flow	41
1.25 Forces agissant sur une microbulle/gouttelette à la sortie d'un pore de la membrane pendant l'émulsification membranaire. F_γ : force de tension superficielle, F_D : force de cisaillement (pour Drag force), F_B : force de flottabilité (Buoyancy force) et F_i : force d'inertie et pression [12]	43

1.26 Taille moyenne des gouttelettes, D_d , en EMD (lignes pointillées) par rapport à la taille moyenne des pores, D_p et flux transmembranaire, J . 1) D_d vs. J en EMD contrôlé par la force de cisaillement, 2) D_d vs. J en EMD contrôlé par la force de tension superficielle, 3) D_d vs. D_p en EMD contrôlé par la force de tension superficielle, 4) D_d vs. J en EMP 5) D_d vs. D_p en EMP [13]	45
1.27 Mécanisme de rupture de gouttelettes en EMP : a) $\Delta P_{tm} < P_{crit}$: rétention des gouttelettes à la membrane, b) $\Delta P_{tm} > P_{crit}$: rupture modérée à des contraintes de cisaillement modérées, c) $\Delta P_{tm} > > P_{crit}$: rupture intensive sous forte contrainte de cisaillement	49
2.1 Caractéristiques physico-chimiques des principaux tensioactifs utilisés (CMC : Concentration Micellaire Critique à 25°C) [14, 15]	57
2.2 Lyophilisateur Cryonext; Image de flacons avant/après la lyophilisation	59
2.3 Membranes SPG hydrophiles et tubulaires, à gauche pour module cross flow d'une longueur de 125 mm et à droite pour module microkit d'une longueur de 20 mm . .	60
2.4 Module de type cross flow en acier inoxydable fourni par SPG Technology Co. Ltd . .	61
2.5 Module de type microkit en acier inoxydable fourni par SPG Technology Co. Ltd . .	61
2.6 Procédé membranaire pour la préparation de microbulles avec un module de type cross flow. En rouge les éléments contrôlant la phase dispersée et en bleu celui contrôlant la phase continue	62
2.7 En haut, deux images montrant la tige de PTFE à l'intérieur d'une membrane SPG permettant d'augmenter la force de cisaillement à la surface de la membrane. En bas une représentation schématisée du dispositif réalisé	63
2.8 Procédé membranaire pour la préparation de microbulles avec un module de type microkit	64
2.9 Image du procédé d'émulsification membranaire par prémix développé au sein du laboratoire. 1) Module membranaire, 2) Pompe haute pression et 3) Ordinateur pour les commandes et l'acquisition des données	66
2.10 Résistance hydraulique (R_h) déterminée par le coefficient directeur de la droite pour une membrane de 125 mm avec un diamètre de pore de 1,1 μm	67
2.11 Trois étapes de l'évolution de la pression résultante en fonction du volume injecté par la pompe à un débit constant de 200 mL/min pour la préparation de gouttelettes de PFC à travers une membrane SPG d'un diamètre de pore de 1,1 μm	68
2.12 Trois étapes principales pour la préparation de gouttelettes de PFC monodisperses par émulsification membranaire par prémix	69
2.13 Schéma du tensiomètre DSA-10 Mk2 (Krüss) présentant les deux types de configuration pour la mesure de la tension superficielle avec la méthode de la goutte pendante. 1) Source lumineuse, 2) Cuve en quartz contenant la phase continue, 3) Seringue contenant la phase dispersée, 4) Système pousse seringue, 5) Caméra CMOS, 6) Ordinateur pour l'acquisition. Deux types de configuration possibles : a) aiguille droite et b) aiguille courbée en forme de canne	70

2.14 a) Chambre de comptage Malassez (Marienfeld-Superior) permettant d'observer et compter les microbulles/gouttelettes en suspension, b) Observation de l'ACU Sono-vue® au microscope optique (Objectif $\times 20$)	72
2.15 a) Mastersizer 3000 avec deux modes de dispersion : en voie sèche (à gauche) et en voie liquide (à droite) et b) Représentation schématique de la diffraction des grosses et petites particules	73
2.16 a) Système d'imagerie ultrasonore Verasonics Vantage 256, b) Sonde échographique linéaire L12-3V de 7,813 MHz à 196 éléments [16]	74
2.17 Représentation schématique de l'installation utilisée pour l'observation des réponses harmoniques des microbulles et de la vaporisation des gouttelettes de PFC dans l'eau	75
2.18 Sélection de la région d'intérêt avec ImageJ sur une image en mode B afin de déterminer l'amplitude moyenne d'écho (MEA)	77
3.1 Schematic diagram of the membrane process principle where a gaseous phase is injected into the continuous phase composed of surfactants which stabilized the new interface	82
3.2 Scanning electron micrograph of the surface of the hydrophilic SPG membrane with a mean pore diameter of $0.2\ \mu\text{m}$	84
3.3 Experimental set-up to produce microbubbles using a tubular SPG membrane and to measure their size distribution by laser diffraction particle size analysis	85
3.4 Comparison of the size of microbubbles generated by sonication and membrane with a mean pore diameter of $1.1\ \mu\text{m}$. For both experiments, the continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8	87
3.5 Immediate observation by optical microscopy of the size distribution of microbubbles generated by the membrane with a mean pore diameter of $1.1\ \mu\text{m}$. The continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8	88
3.6 Influence of transmembrane/bubble point pressure ratio, $\Delta P/P_{\text{BP}}$, on the gaseous phase flux, J , microbubble diameter, D_{50} , and span of the distribution. Experimental conditions : gaseous phase was C_3F_8 , mean pore of $1.1\ \mu\text{m}$, with 1.0 wt% of SDS and a low shear stress	91
3.7 Influence of shear stress, τ_w , (a) on the microbubble diameter and (b) on the CV% for membrane mean pore size $1.1\ \mu\text{m}$ at experimental conditions : continuous phase 1.0 wt% SDS in water, gaseous phase C_3F_8 , and ratio $\Delta P/P_{\text{BP}}$: 1.1	92
3.8 Influence of mean pore size (0.2, 0.5 and $1.1\ \mu\text{m}$) on the microbubble diameter, D_{50} , at experimental conditions : continuous phase 1.0 wt% SDS in water and ratio $\Delta P/P_{\text{BP}}$: 1.1	93
3.9 Influence of the surfactants at a concentration of 1.0 wt% on the microbubble size distribution. Experimental conditions : gaseous phase was C_3F_8 , membrane mean pore size $1.1\ \mu\text{m}$ and ratio $\Delta P/P_{\text{BP}}$: 1.1	94
3.10 Surface tension at the gaseous/liquid interface for various surfactants at 1.0 wt% and air or C_3F_8 at room temperature (PFC : Perfluorocarbon)	95

3.11 Influence of the gaseous phase on the microbubble size distribution stabilized with 1.0 wt% (a) SDS, (b) Tween 20 and (c) PEG40S. Experimental conditions : membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC : Perfluorocarbon)	96
3.12 Variation of microbubble diameter, D_{50} , as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions : membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC : Perfluorocarbon)	97
3.13 Variation of concentration MBs/ml as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions : membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC : Perfluorocarbon)	98
4.1 Mécanismes d'adsorption de phospholipides à l'interface, a) adsorption d'un monomère via un échange vésicule-monomère et b) adsorption directe des vésicules à l'interface [17]	102
4.2 Évolution de la tension superficielle en fonction du temps (PG : Propylène glycol) . .	104
4.3 Cinétique d'adsorption de différentes phases continue contenant le phospholipide DPPG à l'interface d'un gaz de PFC	105
4.4 Procédé membranaire en configuration microkit pour la préparation de bulles à partir d'une phase continue contenant seulement du DPPG avec une membrane présentant un diamètre de pore de 1,1 μm , a) $\Delta P/P_{BP} < 1$: aucune microbulle n'est produite, b) et c) $\Delta P/P_{BP} > 1$: la pression de gaz exercée est supérieure à la pression de point de bulle. Les flèches rouges indiquent la formation de macrobulles	105
4.5 Préparation de microbulles stabilisées par un mélange de 0,5 wt% DPPG :PEG40S (9 :1) avec une membrane présentant un diamètre de pore de 1,1 μm , a) $\Delta P/P_{BP} < 1$: aucune microbulle n'est produite, b) $\Delta P/P_{BP} = 1$: la pression de point de bulle minimale est atteinte et les premières microbulles apparaissent, c) $\Delta P/P_{BP} = 1,1$: production de microbulles	106
4.6 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire utilisant une membrane SPG avec un $D_{pore} = 1,1 \mu\text{m}$ et $\Delta P/P_{BP} = 1,1$ (0,5 wt% DPPG :PEG40S). a) graphique représentant le nombre de microbulles en fonction du diamètre à partir b) des images obtenues par microscopie optique (Objectif $\times 20$)	107
4.7 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par sonication (0,5 wt% DPPG :PEG40S). a) Avant b) Après décantation par une ampoule à décanter (Objectif $\times 20$)	107
4.8 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire en fonction de trois diamètres de pore de membranes SPG 1,1 ; 0,8 et 0,6 μm (0,5 wt% DPPG :PEG40S)	108
4.9 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire en fonction de la température 25°C et 50°C (0,5 wt% DPPG :PEG40S et $D_{pore} = 0,6 \mu\text{m}$)	109

4.10 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d'une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S et 10 vol% GPW. a) objectif $\times 20$, b) objectif $\times 40$, c) distribution en taille des microbulles (GPW : Glycérol, Propylène glycol, eau; $D_{pore}=1,1 \mu m$)	110
4.11 Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d'une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S et 10 vol% PG. a) objectif $\times 20$, b) distribution en taille des microbulles (PG : Propylène glycol; $D_{pore}=1,1 \mu m$)	110
4.12 a) Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d'une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S, b) Observation de la distribution en taille du même échantillon après avoir été placé pendant 7 jours à $4^{\circ}C$	111
4.13 Comparaison des réponses harmoniques dans un bécher rempli d'eau a) en absence, b) en présence de microbulles avec une pression acoustique de 16 Volts et une fréquence fondamentale émise à $f_0=5 \text{ MHz}$ (f_h : fréquence harmonique)	112
5.1 Experimental set-up of premix membrane emulsification with a high pressure syringe pump and SPG membrane (top). Perfluorocarbon droplet size distribution of the premix emulsion obtained by ultra turrax and monodisperse emulsion obtained by premix membrane emulsification with a membrane pore size of $1.1 \mu m$ at 200 mL/min. Observation by optical microscopy of both emulsions with a optical objective ($40\times$) (bottom)	120
5.2 Perfluorocarbon droplet size distribution (top), droplet size and resulting pressure (bottom) of monodisperse emulsions obtained at different pore sizes 3.1, 1.1 and $0.8 \mu m$ by membrane emulsification at 200 mL/min (top)	124
5.3 Effet of flow rate on the droplet size distribution (top) and the resulting pressure (bottom) for the preparation of MCT oil droplets by premix emulsification with membrane of $1.1 \mu m$ pore size, for flow rates of 10, 50, 100, 200 mL/min	125
5.4 Resulting pressure as function of the dispersed phase type for the preparation of droplets by premix emulsification with pore size of $1.1 \mu m$, for PFHex : PFHexane (C_6F_{14}), PFHep : PFHeptane (C_7F_{16}), MCT oil, and a mix of PFHex :MCT oil (50/50vol%). On the histogram bars is the interfacial tension at the equilibrium, γ_{eq} , between the dispersed phase and the continuous phase of 2.0 wt% Tween :PEG40S	127
5.5 Droplet size as function of various dispersed phase types PFHex, PFHep, MCT oil and mixture of PFHex :MCT oil (50/50 vol%) prepared by premix emulsification with pore size of $1.1 \mu m$ at 200 mL/min. Above the histogram bars are the coefficient of variation of the droplet size distribution	127
5.6 Optical and acoustic images of beaker filled with a PFHex droplet solution at $37^{\circ}C$ before and after the ADV threshold vaporization. The droplet vaporization and formation of microbubbles opacified the solution and increased the echogenicity . . .	128

5.7	a) Acoustic observation of the vaporization of monodispersed and polydispersed sample containing PFHex droplets in the region of interest of the transducer at ultrasound pressure corresponding at 50 V, and b) at increasing ultrasound pressure. c) Relative echo amplitude (REA) for monodispersed and polydispersed sample containing PFHex droplets as function of ultrasound probe driving voltage. d) Influence of PFHex droplet size on the ADV threshold at 37°C prepared by premix emulsification at 200 mL/min	129
5.8	Influence of temperature on the ADV process : Vaporization response in the region of the interest of PFHex droplets (top) and Relative echo amplitude (REA) (bottom) as function of ultrasound propbe driving voltage, at 25°C and 37°C	131
5.9	Optical microscopy observation of the dual-phase (PFHex :MCT oil) droplets from premix emulsion sample	132

Liste des tableaux

1.1 Paramètres acoustiques de différents tissus du corps humain, de l'air et de l'eau distillée [18]	8
1.2 Comparaison des trois principaux agents de contraste ultrasonores sous forme de microbulles commercialisés pour l'imagerie médicale ultrasonore [19, 20]	11
1.3 Facteurs influençant le seuil de vaporisation ADV	21
1.4 Caractéristique de l'air et des gaz perfluorés pour la stabilisation de microbulles [21, 22]	28
1.5 Principales propriétés des membranes SPG [23]	39
2.1 Principales propriétés des PFC liquides : PFHexane et PFHeptane à 25°C [24]	66
3.1 Measured values of surface tensions, γ_0 , at $t=0$ s, and at the equilibrium, γ_{eq} , between gas-liquid interface for surfactant solutions, and the calculated $P_{BP}(\text{Theo})$ and the observed $P_{BP}(\text{Exp})$ values of pression of bubble point with a mean pore size of 1.1 μm (Theo : Theoretical and Exp : Experimental)	89
5.1 Influence of the various parameters on the ADV threshold ($D_{droplet}$: Droplet diameter)	128

Nomenclature

Abréviations

ADV	Acoustic droplet vaporization
C ₃ F ₈	Octafluoropropane
CEHDA	Coaxial electrohydrodynamic atomisation
CMC	Concentration micellaire critique
CV	Coefficient de variation
EMD	Emulsification membranaire directe
EMP	Emulsification membranaire par prémix
EPR	Enhanced permeability and retention
MEA	Amplitude moyenne d'écho
PEG40S	Polyoxyethylene (40) stearate
PFC	Perfluorocarbone
PFHep	Perfluoroheptane, C ₇ F ₁₆
PFHex	Perfluorohexane, C ₆ F ₁₄
PFP	Perfluoropentane, C ₅ F ₁₂
PRF	Fréquence de répétition des impulsions
PTFE	Polytetrafluorethylene
REA	Amplitude d'écho relative
ROI	Région d'intérêt
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SPG	Shirasu Porous Glass
T _m	Température de transition de phase
Tween20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
US	Ultrason

Lettres grecques

ΔP	Pression transmembranaire (bar)
δP	Pression de Laplace (Pa)
ΔP_{pore}	Pression dans les pores (bar)
$\Delta P_{réduction}$	Pression de réduction (bar)
$\Delta P_{résultante}$	Pression résultante (bar)
ΔP_{tuyaux}	Pression dans les tuyaux (bar)
γ_0	Tension superficielle à $t=0$ s (mN.m^{-1})
γ_{eq}	Tension superficielle à l'équilibre (mN.m^{-1})
μ	Viscosité dynamique (Pa.s)
τ_w	Contrainte de cisaillement (Pa)
Θ	Angle de contact
ε	Porosité de la membrane
φ	Fraction volumique de la phase dispersée
ξ	Tortuosité des pores

Lettres latines

A	Air effective membranaire (m^2)
D_G	Diamètre des microgouttelettes (μm)
D_i	Diamètre dans la classe i (μm)
D_{MBs}	Diamètre des microbulles (μm)
D_p	Diamètre des pores (μm)
D_w	Diffusivité des gaz dans l'eau ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
J	Flux transmembranaire ($\text{m}^3.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
L	Coefficient d'Ostwald
n_i	Nombre de microbulles/microgouttelettes dans la classe i
P^*	Pression en excès (Pa)
P_{atm}	Pressure atmosphérique (Pa)
P_{PB}	Pression de point de bulle (Bar)
Q	Débit volumique de la phase gazeuse ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)
r	Rayon d'une microbulle
R & R_2	Rayon intérieur du tube membranaire (m)

NOMENCLATURE

R_1	Rayon de la tige (m)
R_m	Résistance membranaire
t	Temps (s)
V_d	Vitesse moyenne de la phase continue dans le tube (m.s^{-1})

Introduction générale

Les bulles et les gouttelettes sont deux types de systèmes dispersés, d'un gaz ou d'un liquide dans un liquide non miscible. Lorsque leur taille est inférieure à 100 μm , ils sont appelés microbulles et microgouttelettes. Grâce à leur petite taille, ils présentent une très grande surface à l'interface gaz/liquide ou liquide/liquide par unité de volume leur conférant des caractéristiques intéressantes. En effet, les microbulles comme les microgouttelettes offrent de nombreuses applications notamment dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Une des applications de ces agents dans le domaine médical est pour l'imagerie ultrasonore, ou échographie. En effet, depuis la première utilisation des microbulles en échographie par Gramiak et Shah, il y a 50 ans, les agents de contraste ultrasonores, ou ACUs, sous forme de microbulles ont été développés et sont maintenant utilisés en routine clinique pour le diagnostic en imagerie médicale ultrasonore. L'utilisation de ces agents dans des essais thérapeutiques est actuellement en phase d'essai clinique. En général, les ACUs sont des microbulles composées de gaz, stabilisées par une enveloppe biocompatible. Les principales molécules utilisées sont les phospholipides, les protéines et les tensioactifs. Le gaz composant la microbulle peut être de l'air, de l'azote ou des gaz inertes tels que les perfluorocarbones (PFCs), qui augmentent fortement la demi-vie des microbulles en réduisant leur temps de dissolution. Les propriétés physico-chimiques de l'enveloppe et du gaz des microbulles peuvent être optimisées afin d'améliorer leur stabilité, leur biofurtivité, leur capacité de cibler un tissu pathologique mais aussi leur capacité d'encapsulation et d'administration de molécules. Afin de permettre une utilisation optimale des agents de contraste, les microbulles doivent remplir certaines conditions : elles doivent être administrées par voie intraveineuse, en bolus ou par infusion, être suffisamment petites et stables pour assurer leur passage dans les capillaires pulmonaires et leur durée de vie doit être assez longue pour permettre d'effectuer l'examen échographique et l'acquisition des images. Pour cela, les microbulles utilisées comme ACUs en imagerie médicale, ont une distribution de taille comprise entre 1-10 μm . Cette taille est proche du diamètre des globules rouges. Les microbulles présentent ainsi des propriétés rhéologiques similaires dans les micro-vaisseaux et capillaires sanguins. Elles sont par conséquent injectables par voie intraveineuse, et restent confinées dans le compartiment vasculaire.

Suite à une impulsion acoustique, les microbulles modifient le contraste de l'image, grâce à leur forte échogénicité, principalement causée par le gaz, ce qui permet de mettre en évidence les vaisseaux sanguins, et un meilleur diagnostic via une amélioration du contraste échographique. Les agents de contraste fournissent une nouvelle dimension en imagerie ultrasonore puisqu'ils rendent possible la visualisation en temps réel, d'une partie du corps humain observée. Les microbulles médicales ont une durée de vie en circulation de l'ordre de quelques minutes, puis sont éliminées de la circulation par dissolution ainsi que par le système immunitaire pour les molécules qui stabilisent l'interface gaz/liquide. Une alternative aux microbulles qui a été proposée ces dernières années sont les microgouttelettes de PFC. Ces gouttelettes, composées de PFC liquide, peuvent être vaporisées sous l'action d'ondes acoustiques, et présentent un intérêt pour des applications potentielles en imagerie et en administration de médicaments, grâce à leur plus grande stabilité dans le milieu environnant.

La taille et la distribution en taille de ces ACUs sont fondamentalement importantes en raison de la relation entre le diamètre des microbulles et la fréquence de résonance. En effet, la capacité d'une microbulle à diffuser une onde ultrasonore est corrélée à ses propriétés physiques (taille,

compression du gaz), mais aussi au milieu environnant ainsi qu'aux paramètres ultrasonores appliqués sur l'agent de contraste (fréquence, pression acoustique). L'intensité de diffusion des microbulles est proportionnelle au rayon de la microbulle à la puissance six. Les microbulles de plus grand diamètre fournissent une meilleure intensité de diffusion que les plus petites. Dans ce sens, un lot d'ACUs présentant une distribution en taille polydisperse générera la diffusion de différentes intensités tandis qu'une réponse homogène sera obtenue avec une distribution monodisperse. Les microbulles de grande taille présentent une forte échogénicité, cependant elles seront piégées dans les capillaires pulmonaires. Pour cela, la taille des microbulles doit être inférieure à 10 μm . Pour les nouveaux agents de type microgouttelettes, la distribution en taille est un facteur important dans la détermination de la pression seuil de vaporisation, c'est-à-dire la pression acoustique nécessaire pour les faire passer d'un état de gouttelettes à un état de microbulles. Dans cette technique, les plus grosses gouttelettes nécessitent moins d'énergie pour se vaporiser que les plus petites. Ainsi, les gouttelettes monodispersées peuvent être vaporisées à une pression acoustique déterminée puisque toutes les gouttelettes répondent de la même manière. Cette propriété permet d'atteindre un rendement de vaporisation maximal à une pression acoustique donnée. L'une des applications les plus étudiées utilisant les gouttelettes de PFC est l'embolothérapie, permettant l'occlusion de vaisseaux sanguins afin de limiter le flux sanguin dans un tissu spécifique, par exemple pour traiter le carcinome rénal par réduction de l'apport sanguin dans les tumeurs hypervasculaires. Ainsi, des gouttelettes monodispersées sont nécessaires pour cibler un diamètre vasculaire spécifique et éviter l'occlusion non désirée des autres vaisseaux.

Les procédés de fabrication actuels pour la préparation de microbulles/gouttelettes, comme l'agitation mécanique ou les ultrasons, ne contrôlent pas précisément la taille et la distribution en taille des ACUs formés. Lors de la conception d'un procédé, le contrôle de la taille et de la distribution en taille est un paramètre important afin que les ACUs soient suffisamment petits pour générer un signal ultrasonore suffisamment élevé et qu'ils puissent traverser facilement les capillaires sanguins. Pour cela, des méthodes de tri sont souvent ajoutées aux procédés classiques afin de réduire les distributions en taille des agents de contraste. Cependant, l'augmentation de la monodispersité se fait au détriment du rendement et des diamètres spécifiques sont difficiles à isoler à partir d'une population polydispersée. Plus récemment, les dispositifs microfluidiques ont été proposés afin de contrôler la taille et la distribution en tailles des microbulles/gouttelettes. Cependant, un inconvénient majeur de ces dispositifs est leur faible rendement de production. Afin d'augmenter les rendements, il est possible de mettre en parallèle plusieurs dispositifs microfluidiques, mais le colmatage des microcanaux par la phase continue et la phase dispersée est fréquent.

Afin d'obtenir un meilleur contrôle des propriétés des ACUs, de nouvelles technologies de préparation doivent être développées. Les procédés membranaires semblent être une voie prometteuse dans le contrôle de la fabrication de potentiels ACUs. Ces procédés ont l'avantage de permettre un contrôle précis de la taille des colloïdes préparés et de leur homogénéité, grâce aux pores de la membrane. L'objectif général de cette thèse est de développer des procédés membranaires et de déterminer les paramètres de procédé, de membrane et de formulation pouvant influencer la préparation de microbulles ou de microgouttelettes, avec des caractéristiques compatibles pour des applications en imagerie médicale ultrasonore en tant qu'agents de contraste.

Le manuscrit comporte cinq chapitres et s'articule autour de deux principaux axes, la préparation de microbulles et celle de microgouttelettes.

Le **premier chapitre** expose les éléments bibliographiques sur le sujet. Une première partie présente les concepts généraux sur l'imagerie médicale ultrasonore utilisant les ACUs. Les généralités et les applications des microbulles et des émulsions en tant qu'ACUs sont ensuite détaillées. Nous présentons dans une seconde partie les principales propriétés physico-chimique des systèmes dispersés utilisés. Ensuite, dans une troisième partie, les différents procédés d'émulsification sont présentés. Enfin, la quatrième partie du chapitre donne une description plus approfondie des procédés membranaires utilisés dans ce travail.

Le **deuxième chapitre** est consacré aux matériels et méthodes utilisés. Il est divisé en quatre parties, les deux premières parties présentent les deux principaux procédés membranaires développés au laboratoire. Il est ensuite décrit la méthode de préparation de microbulles en utilisant l'émulsification membranaire directe puis les étapes de fabrication des microgouttelettes de PFC avec l'émulsification membranaire par prémix. Les troisième et quatrième parties concernent les techniques et les méthodes de caractérisation physico-chimiques et acoustiques des ACUs en distinguant les microbulles et les microgouttelettes.

Le **troisième chapitre** en anglais, présente les résultats obtenus concernant la préparation de microbulles de PFC avec le procédé membranaire utilisant un module de type cross flow. Les microbulles produites dans ce chapitre sont stabilisées par des tensioactifs solubles. L'influence de trois types de paramètres (procédé, membrane et formulation) sur la formation des microbulles est décrite dans ce chapitre. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes », publiée dans le *Journal Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 560 (2018) 233-243.

Le **quatrième chapitre** présente les résultats obtenus sur la préparation de microbulles de PFC stabilisées par des phospholipides en utilisant un procédé membranaire avec un module de type microkit. Une première caractérisation acoustique a été réalisée en observant les réponses harmoniques des microbulles suite à une impulsion acoustique.

Le **cinquième chapitre** en anglais décrit les résultats obtenus sur la préparation de microgouttelettes monodispersées par procédé membranaire, en utilisant la méthode d'émulsification membranaire par prémix. Dans ces travaux, l'influence de différents paramètres a été observée sur la formation des microgouttelettes. Nous avons ensuite démontré la fonctionnalité des gouttelettes obtenues à se vaporiser à partir une pression acoustique seuil. Egalement, nous avons mis en évidence l'influence de divers paramètres sur ce seuil de vaporisation tels que la taille des gouttelettes, la température, le type de PFC, et la présence d'une couche d'huile entourant la goutte de PFC. Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis dans le *Journal of Materials Chemistry B*.

Dans la **conclusion**, nous dressons le bilan des principaux résultats. Enfin, nous proposons plusieurs perspectives d'études pour le développement de techniques de préparation et d'applications des ACUs obtenus. Enfin, la littérature citée tout au long du manuscrit est répertoriée dans la section **Bibliographie**.

Chapitre 1

Partie bibliographique

1.1 Ultrasons pour applications médicales

Dans cette partie sont présentés les principes physiques de l'utilisation d'ultrasons dans le domaine de l'imagerie médicale. Après une description générale de l'imagerie médicale ultrasonore, nous nous intéressons à l'échographie de contraste basée sur l'utilisation d'agents de contraste permettant d'augmenter l'échogénicité et ainsi améliorer la qualité de l'image et le diagnostic médical. Enfin, nous décrirons ces agents de contraste ultrasonores (ACUs), principalement des microbulles mais aussi sous la forme de gouttelettes, qui présentent des propriétés intéressantes permettant de nouvelles applications médicales.

1.1.1 Généralités sur l'imagerie ultrasonore

Les techniques ultrasonores appliquées à la médecine ont été développées vers les années 1950 et ont commencé à être utilisées pour le traitement d'images dans les années 1970. L'imagerie ultrasonore présente de nombreux avantages techniques mais aussi pour le patient, et est actuellement la deuxième technique d'imagerie médicale la plus utilisée en clinique après l'imagerie par rayons X.

D'un point de vue technique, l'imagerie ultrasonore représente une solution peu coûteuse et moins onéreuse que d'autres techniques d'imagerie (entre 30 000 et 200 000 euros pour un appareil 2D et plus de 500 000 pour un scanner ou un dispositif d'imagerie par résonance magnétique (IRM) [18]. L'imagerie ultrasonore, aussi appelée « échographie », est très employée, du fait de sa simplicité de mise en œuvre, sa portabilité, le coût modéré des appareils, et ses performances. Elle offre la possibilité de donner des informations en temps réel sur la morphologie et la vascularisation des tissus, avec une haute résolution [25, 26].

Cet examen médical est non-invasif, inoffensif et n'induit pas effets secondaires notables. C'est pourquoi l'imagerie ultrasonore est une technique médicale à laquelle les médecins ont recours généralement dans un premier temps et dans de nombreux cas cliniques. De plus l'innocuité et l'absence de contre-indication expliquent son utilisation courante, notamment lors de l'examen échographique obstétrical pour le suivi de grossesse chez la femme enceinte. Un exemple d'échographie pour cette application est donné à la figure 1.1. Ces caractéristiques font de l'imagerie ultrasonore une technique largement utilisée aussi pour d'autres applications, telles que dans le diagnostic de pathologies cardio-vasculaires afin d'obtenir des informations sur la morphologie et la fonction des différentes structures composant le cœur et les vaisseaux sanguins (valves, myocarde, aorte, veines caves...). Également, cette technique est employée dans la détection des tumeurs, dans les organes situés dans l'abdomen : foie, pancréas par exemple, mais aussi dans le cancer du sein chez la femme.

1.1.1.1 Ondes ultrasonores

L'ultrason est une onde de pression, mécanique et élastique, qui se propage de manière longitudinale dans un milieu par une alternance de compression et extension du support le long de la direction de propagation [27]. En effet, une onde acoustique se propage dans les tissus mous et l'eau, et se déplace très difficilement dans l'air et les tissus osseux. La vitesse à laquelle l'onde



FIGURE 1.1 – Échographie en mode B d'un fœtus de 10 semaines chez une femme enceinte [1]

se déplace dépend de la nature du milieu traversé. La propagation à travers des interfaces entre deux milieux différents est fortement influencée par les variations de vitesses du son et aussi de densité, entre les deux milieux.

Les ultrasons sont une gamme spécifique de sons inaudibles chez l'homme. On distingue quatre classes de sons, caractérisées par leur fréquence propre (f) : les infrasons ($f < 20$ Hz), les sons audibles ($20 \text{ Hz} < f < 20 \text{ kHz}$), les ultrasons ($20 \text{ kHz} < f < 1 \text{ GHz}$), et les hypersons ($f > 1 \text{ GHz}$). Pour les applications médicales, les ondes acoustiques ont des fréquences situées entre 1 à 50 MHz [28].

La génération d'ondes ultrasonores se fait par l'intermédiaire d'une sonde échographique pouvant être par exemple linéaire, convexe, sectorielle en fonction de l'application. Ces sondes sont constituées d'éléments piézoélectriques capables de générer des ultrasons sous l'effet d'une impulsion électrique. Puis, la sonde convertit les ondes réfléchies aux différentes interfaces en signaux électriques qui sont envoyés à l'échographe. La sonde est à la fois un émetteur et un récepteur d'ultrasons.

Dans le cas d'un milieu homogène, les ultrasons se propagent facilement en ligne droite et ne sont pas diffractés. Cette structure uniforme ne permet pas la réflexion des ondes acoustiques et donc la formation d'un écho. Dans un support hétérogène, au niveau de l'interface entre deux milieux présentant des caractéristiques acoustiques différentes, une partie de l'énergie est transmise et une partie est réfléchi. Les échos sont détectés et transformés en signal électrique par la sonde. Le délai entre l'émission de l'onde acoustique et de l'écho est directement lié à la distance de l'objet rencontré par l'onde ultrasonore.

1.1.1.2 Echographie

L'échographe est l'appareil nécessaire pour réaliser un examen échographique. Il est composé principalement des éléments suivants : une sonde échographique pour l'émission et réception des ultrasons, une console de commande, et un moniteur pour la visualisation de l'image (Figure 1.2).



FIGURE 1.2 – Photographie d'un échographe pour application en imagerie médicale ultrasonore [2]

Dans le corps humain, la sonde échographique génère une onde acoustique qui est réfléchiée par les tissus biologiques à l'interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes. L'hétérogénéité des tissus présentant des densités variables et des propriétés de compressibilité différentes engendre un déséquilibre d'impédance acoustique à l'interface entre les tissus. De ce fait, une partie de l'énergie de l'onde acoustique est rétrodiffusée puis réceptionnée par la sonde pour ainsi former un contraste sur une image à l'interface entre les tissus. Chaque tissu à sa propre impédance acoustique, c'est à dire sa capacité à réfléchir les ondes ultrasonores entraînant des variations d'énergie de l'onde réfléchiée. Les propriétés acoustiques des tissus soumis aux ondes ultrasonores sont à l'origine de l'intensité du signal qui est détecté par la sonde échographique (Tableau 1.1).

Tissus	Densité (kg/m ³)	Vitesse (m/s)	Impédance acoustique (kg/m ² /s)
Graisse	$0,92 \times 10^3$	1446	$1,33 \times 10^6$
Muscle	$1,07 \times 10^3$	1542-1626	$1,65-1,74 \times 10^6$
Sang	$1,06 \times 10^3$	1566	$1,66 \times 10^6$
Foie	$1,06 \times 10^3$	1566	$1,66 \times 10^6$
Rein	$1,04 \times 10^3$	1567	$1,62 \times 10^6$
Rate	$1,06 \times 10^3$	1566	$1,66 \times 10^6$
Os	$1,38-1,81 \times 10^3$	2070-5350	$3,75-7,38 \times 10^6$
Poumon	$0,4 \times 10^3$	650	$0,26 \times 10^6$
Air	1,2	333	$0,4 \times 10^3$
Eau distillée	$1,00 \times 10^3$	1480	$1,48 \times 10^6$

TABLEAU 1.1 – Paramètres acoustiques de différents tissus du corps humain, de l'air et de l'eau distillée [18]

L'imagerie ultrasonore peut être réalisée suivant différents modes, par exemple le Mode A scan en amplitude, et le Mode B scan en intensité. Le mode B pour brillance est le plus couramment utilisé. Cette méthode fournit une image à partir d'une collection d'échos pour chaque ligne

dans la direction de propagation de l'onde. Le temps nécessaire pour réceptionner l'écho (émission/réception) transmet une information majeure sur la profondeur spatiale d'un point sur l'image reconstruite, et l'intensité de l'écho détermine la luminosité du pixel.

Bien que cette technique présente de nombreux avantages, l'imagerie ultrasonore montre une certaine limite en terme de résolution lorsque la distance entre l'organe cible et la sonde échographique augmente. En effet, les ondes ultrasonores à hautes fréquences de l'ordre de 10 MHz présentent une bonne résolution mais une faible pénétration dans les tissus de l'organisme (environ 2 cm), tandis que les basses fréquences (3,5 MHz), fournissent une bonne pénétration pour l'évaluation d'organes profonds réduisant la résolution de l'image. Pour les hautes fréquences, la profondeur de pénétration des ondes est réduite due à l'atténuation, qui augmente linéairement avec la fréquence. Par conséquent, la fréquence optimale utilisée est toujours un compromis entre la profondeur et la résolution de l'image. Le tableau 1.1 montre également que les tissus biologiques ont des propriétés acoustiques assez proches apportant parfois une difficulté supplémentaire pour l'interprétation par le médecin. Tous les organes peuvent être observés par imagerie ultrasonore sauf le squelette et les poumons qui contiennent une trop grande quantité de gaz [26]. Le gaz en effet présente une impédance acoustique très faible comparé aux tissus mous. Une interface tissu mou/gaz va agir comme un miroir, réfléchissant pratiquement toute les ondes ultrasonores incidentes.

Par ailleurs, il est possible de coupler l'imagerie ultrasonore à la technique Doppler, afin d'apporter une évaluation précise des écoulements du sang dans les vaisseaux d'une taille proche de 100 μm . Cependant, une limitation à l'imagerie ultrasonore conventionnelle est liée à la faible différence d'impédance acoustique entre le sang qui circule, le sang diffusant les ultrasons très faiblement, et les tissus environnants. Ainsi l'évaluation de débit dans de très petits vaisseaux sanguins (inférieur à 100 μm) comme les veinules et artérioles se révèle difficile [29]. Afin d'améliorer le diagnostic de l'imagerie par ultrasons, des ACUs peuvent être injectés dans le système vasculaire du patient et ainsi fournir un meilleur contraste.

1.1.1.3 Agents de contraste ultrasonores (ACUs)

a) Généralités Les ACUs présentent un intérêt majeur pour l'imagerie médicale ultrasonore. Leur utilisation a augmenté ces dernières années, ce qui explique que le Comité de Sécurité des Produits de Contraste (CMSC) de la Société Européenne de Radiologie a décidé d'examiner la sécurité des agents de contraste échographiques chez l'homme et d'élaborer des lignes directrices. Les ACUs sont considérés comme un médicament pour des examens échographiques à usage de diagnostic, afin d'améliorer le rapport signal/bruit. L'administration intraveineuse des ACUs est réalisée pour augmenter l'échogénicité du sang, fournissant au praticien une meilleure qualité de l'image échographique afin d'améliorer le diagnostic médical, comme dans la détection d'une hypervascularité d'une tumeur hépatique (Figure 1.3) [3, 29]. Ils sont utilisés chez les patients pour lesquels l'examen échographique sans amplification de contraste ne permet pas de conclure. Après injection chez un patient, ils permettent par exemple lors d'un examen échocardiographique, l'opacification échographique des cavités cardiaques, et ainsi l'obtention d'une meilleure définition du relief endocardique du ventriculaire gauche. La dose administrée dans la circulation sanguine chez l'adulte ne doit présenter aucune toxicité et est de l'ordre de 2-3 mL

avec une concentration d'environ 10×10^8 ACUs/dose injectée en fonction de l'ACU commercialisé [20, 30]. D'autres propriétés semblent importantes comme leur capacité à être dégradés par les voies métaboliques, tout en ayant un temps de circulation dans le système sanguin suffisamment long pour réaliser un examen clinique (environ 5-10 min). Les ACUs approuvés en clinique sont bien tolérés et de très rares effets indésirables mineurs sont observés, notamment maux de tête, nausées, et sensation de chaleur.

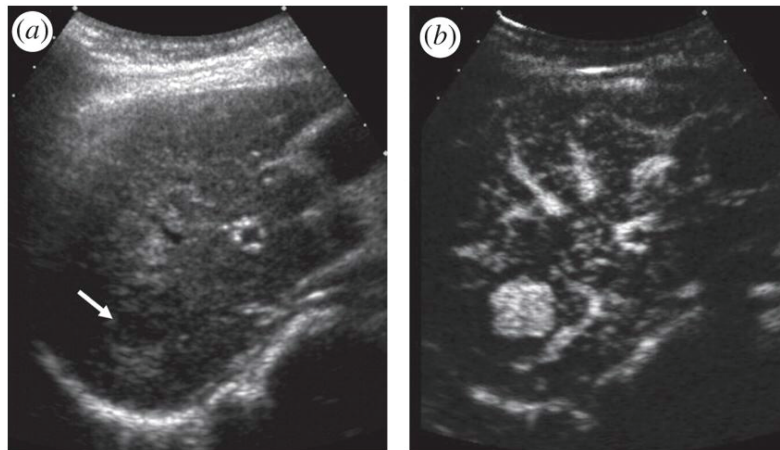


FIGURE 1.3 – Détection d'un carcinome hépatocellulaire chez une femme de 60 ans atteinte du virus de l'hépatite B, (a) Le sonogramme en mode B traditionnel montre une petite masse hypo-échogène (flèche) dans le lobe droit du foie, (b) L'image après injection d'ACUs au maximum de l'amélioration de la phase artérielle montrant une hypervascularité classique de la tumeur hépatique [3]

Leur découverte est assez récente puisque c'est en 1968, que le premier agent de contraste par ultrasons a été découvert par accident. Gramiak et Shah [31] ont en effet observé lors d'un examen intracardiaque, une augmentation significative du contraste sanguin en échographie. Ce rehaussement du contraste était dû à l'injection de microbulles d'air provenant d'une solution saline préalablement agitée. Cependant, le temps de vie des microbulles était trop court par rapport au temps nécessaire pour pratiquer l'examen médical, puisqu'aucune molécule ne stabilisait les bulles de gaz et ainsi évitait leur dissolution rapide dans le sang. Les microbulles sont les premières générations d'ACUs qui ont été développées pour faciliter le diagnostic par échographie.

b) Différents types d'agents de contraste Il est possible de distinguer trois classes d'ACUs sous forme de gaz, solide ou liquide (Figure 1.4). En clinique, les ACUs sont constitués d'une suspension de microbulles stabilisées et avec un diamètre de quelques microns, de sorte qu'elles peuvent circuler en toute sécurité dans les plus petits vaisseaux sanguins. Les microbulles sont des ACUs idéaux puisqu'elles sont extrêmement échogéniques et biocompatibles. De nos jours, les microbulles sont couramment utilisées en clinique pour évaluer la perfusion cardiaque. Les principaux ACUs commercialisés sont présentés dans le tableau 1.2. Ils diffèrent par la composition de l'enveloppe, constituée de phospholipides pour Sonovue® et Definity®, contrairement à Optison® enveloppé par des protéines de sérum albumine humaine. Une autre différence peut-être observée concernant la distribution en taille, où une plus large distribution est obtenue pour

Optison® contrairement aux deux autres ACUs, Sonovue® présentant la distribution en taille la plus étroite. Pour les trois agents de contrastes commercialisés, un gaz fluoré (C_3F_8 ou SF_6) forme le cœur des microbulles. Ces agents de contrastes formés à partir de gaz inertes sont détaillés dans la partie 1.1.2.

	Lumason®/Sonovue®	Definity®/Luminity®	Optison®
Compagnie	Bracco Diagnostics	Lantheus Medical Imaging	GE Healthcare
Enveloppe	Phospholipides	Phospholipides	Protéine HSA réticulée
Gaz	Hexafluorure de soufre (SF_6)	Octafluoropropane (C_3F_8)	Octafluoropropane (C_3F_8)
Diamètre	1,5-2,5 μm	1,1-2,5 μm	3-4,5 μm
Distribution	99% < 10 μm (Taille maximale : 20 μm)	98% < 10 μm (Taille maximale : 20 μm)	95% < 10 μm (Taille maximale : 32 μm)
Utilisation clinique	2001/2014	2001/2006	1998

TABLEAU 1.2 – Comparaison des trois principaux agents de contraste ultrasonores sous forme de microbulles commercialisés pour l'imagerie médicale ultrasonore [19, 20]

D'autres types d'ACUs composés de particules solides ou liquides ont aussi été développés (Figure 1.4) [4]. Des particules solides poreuses contenant du gaz dans les pores ont permis l'augmentation du contraste de l'image dans le foie par la production d'ondes rétrodiffusées détectables par l'échographe [32]. Un autre système formulé par Straub et al. 2005 [33], constitué de microparticules poreuses chargées par le gaz decafluorobutane avec une taille moyenne de 2,3 μm ont montré une échogénicité élevée, et une certaine stabilité dans le temps lors d'une exposition aux ultrasons. Cependant, les particules solides ont tendance à être moins échogènes que les microbulles car elles sont très faiblement compressibles et oscillent très peu avec l'onde ultrasonore. Elles conviennent donc aux applications impliquant des ultrasons à fortes fréquences.

D'autres formes d'ACUs ont été proposés, comme les liposomes échogéniques [34, 35] similaires aux microbulles au niveau de leur composition, mais ils présentent une structure en bicouche lipidique améliorant leur stabilité [36]. Les liposomes échogéniques semblent être un outil intéressant pour la délivrance de principes actifs sur des zones ciblées. Cependant, de fortes doses doivent être injectées afin de retrouver un niveau équivalent à une amélioration de contraste en raison de la faible quantité de gaz encapsulé [37].

Pour l'imagerie ultrasonore, les microbulles restent le premier choix en raison de leur plus grande quantité de gaz encapsulé offrant une meilleure oscillation et ainsi un plus fort contraste. Cependant, grâce à leur très petite taille, les nanobulles sont capables de quitter le système vasculaire sanguin par extravasation et de s'accumuler dans un tissu tumoral présentant un environnement vasculaire différent de celui d'un tissu sain. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet "Enhanced Permeability and Retention" (EPR). Pour extravaser dans la tumeur, les bulles doivent avoir un diamètre inférieur à 700 nm [38]. Les nanoparticules, les liposomes échogéniques, et les nanobulles présentent des caractéristiques pharmaco-cinétiques intéressantes, grâce à leur taille

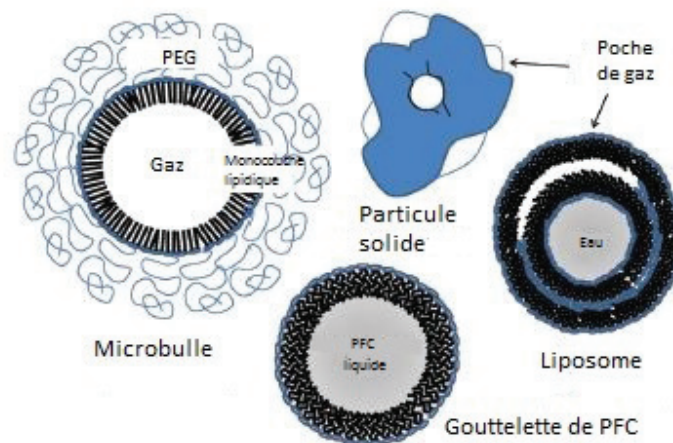


FIGURE 1.4 – Représentation schématique des différents types d'agents de contraste ultrasonores, microbulles, gouttelettes et particules solides (Schéma adapté de [4])

submicronique. Contrairement aux objets micrométriques, ils peuvent ainsi persister plus longtemps dans la circulation sanguine et cibler de manière passive les tumeurs. Les nanobubbles semblent être, elles aussi, un outil efficace et prometteur pour l'administration guidée par ultrasons de médicaments [39].

Une autre approche consiste à utiliser des émulsions liquides. La phase dispersée formant les gouttelettes est en général un PFC liquide stabilisé par des molécules tensioactives. Cette couche de molécules à l'interface aide à stabiliser les gouttelettes contre leur agrégation, coalescence et grossissement. Un de leurs avantages est que le liquide perfluoré est fortement hydrophobe, ce qui les rend plus stables que les microbulles. Une application de ces émulsions de PFC est leur possible vaporisation en microbulles suite à une exposition spécifique aux ultrasons engendrant une augmentation de leur échogénicité dans le milieu environnant [40, 41, 42].

1.1.2 Microbulles

1.1.2.1 Généralités

Les bulles sont composées d'un cœur gazeux stabilisé par des molécules tensioactives réduisant la tension superficielle à l'interface des deux milieux. Le gaz peut être de l'air, ou tous autres types de gaz dispersés dans une solution aqueuse. Les microbulles sont des bulles de diamètre de l'ordre du micromètre (Figure 1.5) et présentent une large gamme d'applications, notamment en imagerie ultrasonore (détaillées dans la partie 1.1.2.5), mais également pour la fabrication de nombreux produits alimentaires tels que les gâteaux, les glaces et les boissons gazeuses. L'introduction de microbulles dans les aliments offre de nombreux avantages, notamment dans l'amélioration de l'apparence ou de la texture des produits alimentaires [43]. Les microbulles trouvent des applications en tant qu'agents nettoyants pour purifier l'eau contaminée [44]. En effet, les bulles générées sont utilisées pour le traitement de l'eau potable afin d'éliminer des contaminants volatils dans la phase aqueuse et la séparation des matières particulaires [45, 46]. En microflottation, les microbulles sont utilisées en raison de leur grande surface et de leur vitesse de montée relative-

ment lente qui engendre la mise en contact avec les polluants organiques et d'autres particules de faible densité pour former une couche de mousse à la surface pour des procédés de séparation et de purification.

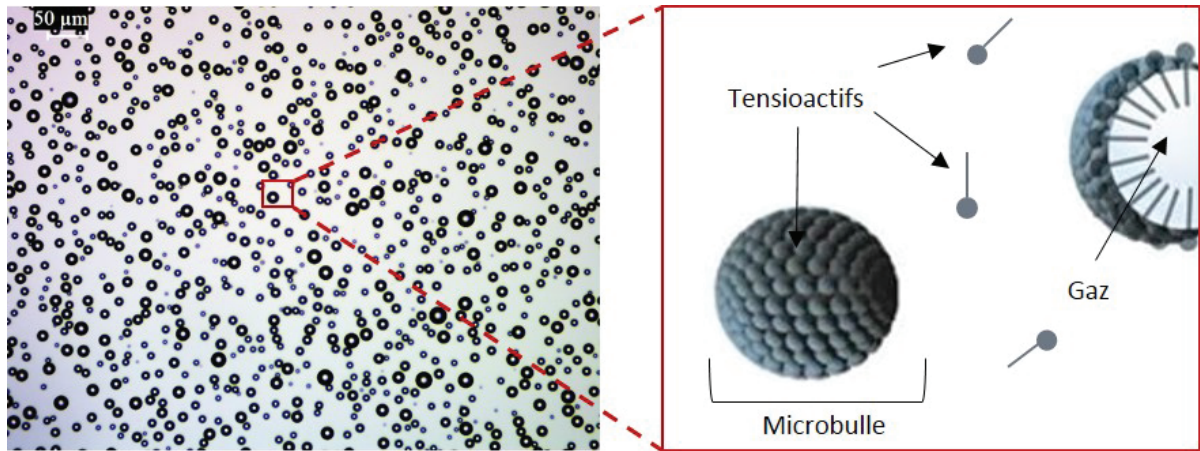


FIGURE 1.5 – A gauche, observation au microscope optique de microbulles (Objectif $\times 20$). A droite, représentation schématique de microbulles de gaz stabilisées par des tensioactifs (Coupe transversale d'une MB présentant le cœur gazeux)

1.1.2.2 Microbulles en tant qu'ACUs

Une microbulle pour être un ACU doit présenter certaines caractéristiques. En effet, un cahier des charges doit être scrupuleusement respecté notamment sur leur taille, la composition du gaz et de l'enveloppe. La composition des agents de contraste sous forme de microbulles est soigneusement choisie pour leur inertie biologique et la biocompatibilité des molécules utilisées. L'ACU consiste en une suspension de microbulles pouvant être administrée par voie intraveineuse soit par bolus ou par perfusion et présente un temps de demi-vie plasmatique assez court (quelques minutes) [47]. La taille des microbulles est un paramètre critique qui doit être contrôlé entre des limites bien définies. Un compromis doit être réalisé entre l'échogénicité du signal reçu et la taille maximale des microbulles pouvant être administrées. En effet, l'échogénicité, caractérisant les propriétés d'un objet à réfléchir les ultrasons, sera d'autant plus grande que son diamètre sera grand. Par conséquent, les microbulles de plus grand diamètre diffusent beaucoup plus d'énergie que les petites. Cette intensité de rétrodiffusion des microbulles est proportionnelle au rayon de la bulle à la puissance six [47]. Par conséquent, une faible diminution du diamètre moyen engendre une réduction significative de l'énergie ultrasonore réfléchi. Cependant, la limite de taille supérieure acceptable pour leur administration est déterminée par la capacité des microbulles à traverser les plus petits capillaires pulmonaires, afin d'éviter un risque d'embolie pulmonaire [48]. Les tailles optimales acceptées actuellement sont comprises entre 1 et 10 µm, avec une distribution de taille la plus étroite possible. Les microbulles sont des systèmes dispersés sensibles à leur environnement (température, pression hydrostatique), il est donc nécessaire de mettre en place des stratégies permettant de maintenir un diamètre constant pour répondre efficacement aux ondes ultrasonores. Le tableau 1.2 liste les principales microbulles commercialisées.

1.1.2.3 Composition

a) Composition du gaz Les agents de contraste de première génération développés dans les années 1990 étaient composés d'air, comme par exemple Albunex® et Levovist®. En raison de la grande solubilité de l'air dans l'eau, ces microbulles se dissolvent rapidement dans la circulation sanguine [47], sous l'effet combiné de plusieurs phénomènes : la pression de Laplace, la pression acoustique des ondes ultrasonores et la pression artérielle. L'instabilité de ces microbulles dans leur milieu environnant rendait difficile l'examen échographique.

La seconde approche a été d'utiliser des gaz présentant une faible solubilité dans le sang, avec une faible diffusivité et un poids moléculaire élevé. Cette stratégie aboutit à augmenter la stabilité et le temps de circulation des agents de contraste. Pour cette raison, les microbulles de deuxième génération utilisent des gaz de type PFC ou hexafluorure de soufre (SF_6). Ces gaz sont biologiquement inertes, ils ne sont pas métabolisés par l'organisme et sont exhalés par les capillaires pulmonaires en quelques minutes [49]. Ils sont hydrophobes, renforçant leur interaction avec les chaînes carbonées hydrophobes de l'enveloppe et ont une très faible solubilité dans l'eau de l'ordre de $0,19 \text{ mol.m}^{-3}$ pour le C_3F_8 , par comparaison avec l'oxygène à $1,32 \text{ mol.m}^{-3}$ et l'azote à $0,63 \text{ mol.m}^{-3}$. Par ailleurs, leur poids moléculaire est plus élevé (188 g/mol pour le C_3F_8 ; 30 g/mol pour N_2), ils diffusent donc plus difficilement à travers l'enveloppe. Le poids moléculaire et la faible solubilité de ces gaz produisent une concentration de vapeur élevée à l'intérieur des microbulles contrebalançant la pression de Laplace et la pression sanguine. Ceci a pour conséquence d'augmenter la stabilité des microbulles dans la circulation sanguine. Plusieurs agents de contraste à base de PFC sont disponibles dans le commerce depuis quelques années. Deux d'entre eux sont composés d'octafluoropropane (C_3F_8) comme Optison® et Definity®, ou constitué d'un gaz hexafluorure de soufre (SF_6) pour Sonovue®.

b) Composition de l'enveloppe Une autre stratégie mise en place pour augmenter la stabilité des microbulles a été d'utiliser une enveloppe capable de réduire la dissolution et la coalescence des microbulles. Cette enveloppe a pour fonction de stabiliser l'interface gaz/liquide. Cependant, bien que le gaz soit responsable de la majorité des propriétés acoustiques des microbulles, l'enveloppe d'une épaisseur d'environ quelques nanomètres, ajoute une rigidité mécanique et réduit la compressibilité du gaz. Les enveloppes des microbulles peuvent être classées en deux catégories en fonction du type de molécules qui stabilisent l'interface : les enveloppes rigides qui permettent d'obtenir des microbulles avec un temps de demi-vie plus long et les enveloppes dites souples.

Enveloppes rigides Les microbulles stabilisées par une enveloppe d'albumine humaine réticulée étaient la première formulation approuvée par la Food Drug Administration sous le nom de Albumex®, puis Optison® (Ge Healthcare). L'utilisation de la sonication pour produire les microbulles avec de l'albumine, engendre la dénaturation thermique de la protéine grâce aux fortes températures créées par la cavitation acoustique. Cette dénaturation génère des liaisons disulfures entre les cystéines de l'albumine formant une coque solide et rigide [50].

Par ailleurs, El-Sherif et Wheatley [51] ont préparé des microcapsules formées de copolymère biodégradable poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) à partir d'une double émulsion (eau/huile/eau) suivie de l'évaporation de solvant. Un autre type d'ACU à base d'acide poly-lactique (PLA) a été

proposé pour l'imagerie ultrasonore [52]. Malgré une stabilité améliorée des microbulles par ces enveloppes rigides, l'inconvénient majeur est la réduction des oscillations des microbulles qui abaisse fortement le signal rétrodiffusé et rendent ces ACUs moins intéressants pour l'imagerie médicale.

Enveloppes souples Certaines enveloppes souples offrent un compromis plus favorable entre l'amélioration du contraste et la stabilité. La grande majorité des composants formant ce type d'enveloppe sont de type lipidique. Plusieurs formulations de microbulles de seconde génération enrobées de phospholipides sont disponibles dans le commerce et ont été approuvées pour une utilisation clinique : Definity® et Sonovue®. En particulier, les phospholipides ont la possibilité de s'auto-assembler spontanément formant une monocouche à l'interface gaz/eau. La tension superficielle est un phénomène physico-chimique à l'interface entre deux phases non miscibles. Une faible tension superficielle présente au niveau de la monocouche lipidique stabilise les microbulles. Il existe aussi des interactions faibles comme les forces de Van der Waals et l'attraction hydrophobe des chaînes hydrophobes qui renforcent la cohésion des lipides et contribuent ainsi à l'amélioration de la stabilité, empêchant la diffusion du gaz à travers l'enveloppe. Les enveloppes souples présentent également la caractéristique d'être résistantes à la rupture, en raison de leur grande flexibilité. Un autre avantage est leur capacité à pouvoir être modifiées en surface par fonctionnalisation de ligands, afin de cibler un tissu pathologique.

Il est intéressant aussi d'observer que d'autres types de molécules ont été utilisés pour stabiliser les microbulles, comme les tensioactifs présentant une seule chaîne hydrocarbonée. Notamment, Wheatley et al. [53] ont mis au point une série de microbulles très stables nommées ST68, stabilisées par des tensioactifs de type monostéarate de sorbitan (Span 60) et polysorbate 80 (Tween 80) avec différents ratios moléculaires [54]. Ces microbulles d'un diamètre inférieur à 10 μm ont montré une stabilité pendant plusieurs semaines ainsi qu'une forte échogénicité en imagerie ultrasonore (B-mode) [53]. Levovist®, constitué d'une enveloppe contenant un saccharide (galactose) et l'acide palmitique stabilisant une bulle d'air a montré une bonne augmentation du contraste lors d'essais cliniques en échocardiographie. À l'heure actuelle, Levovist® n'est plus approuvé pour une utilisation clinique [19]. Une autre étude a montré le développement d'un ACU en utilisant un mélange de monostéarate de sorbitan (Span 60) et de polyoxyéthylène 40 stéarate (PEG40S) par stabilisation d'une bulle de gaz de PFC avec un diamètre moyen d'environ 2 μm [55].

En résumé, la stabilité des microbulles de seconde génération est obtenue grâce à la réduction de la pression de Laplace, causée par une tension superficielle plus faible des molécules amphiphiles, et aussi par une réduction de la perméabilité au niveau de l'interface gaz/liquide.

1.1.2.4 Propriétés acoustiques

Les mécanismes par lesquels les microbulles engendrent un rehaussement du contraste par rapport au tissu environnant peuvent être classés en deux catégories ; rétrodiffusion passive et active. Tout d'abord, la microbulle va réfléchir passivement l'onde ultrasonore incidente principalement grâce à la différence d'impédance acoustique entre l'environnement et l'agent de contraste. Les gaz comme l'air, présentent une impédance acoustique élevée par rapport au sang et tissus humains (Tableau 1.1). Lorsqu'une onde ultrasonore excite une microbulle, une partie de l'énergie

incidente est rétrodiffusée de manière forte dans toutes les directions, ainsi les microbulles gazeuses constituent un puissant réflecteur d'ultrasons.

Le second mécanisme est lié à la capacité des bulles de gaz de se comprimer, entraînant des oscillations radiales en réponse aux ondes incidentes (Figure 1.6). Cette alternance de compressions/expansions génère un écho important sous l'effet de l'impulsion ultrasonore. L'agent de contraste se conduit alors comme un réflecteur actif, devenant une source d'ultrasons. Une pression acoustique positive engendre une diminution du diamètre des microbulles, tandis qu'une expansion est observée pendant la phase de décompression de l'onde ultrasonore. Les propriétés viscoélastiques liées à la composition de la couche stabilisatrice des microbulles peuvent modifier cette oscillation. L'augmentation significative du signal réfléchi est majoritairement causée par ce phénomène vibratoire. Pour de faibles pressions acoustiques, une oscillation symétrique (linéaire) est observée, où la taille de la microbulle varie légèrement, mais linéairement avec l'amplitude de la pression. Pour des impulsions ultrasonores de pression plus élevée, les microbulles oscillent de manière non linéaire, conduisant à un plus grand degré d'expansion que de compression, jusqu'à entraîner finalement un effondrement de la microbulle, un processus appelé cavitation inertielle [29]. En effet, suite à l'oscillation non linéaire en réponse à un champ ultrasonore conducteur, l'écho non linéaire réceptionné permet la visualisation et la quantification de la perfusion d'organes [56].

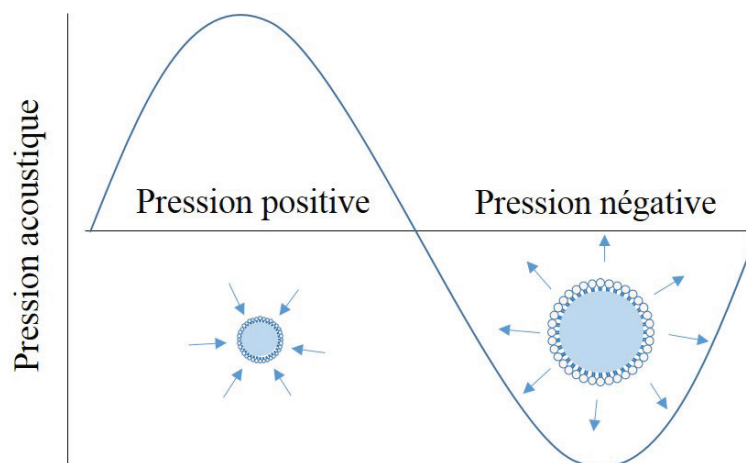


FIGURE 1.6 – Observation du comportement linéaire d'une microbulle. Soumise à une onde ultrasonore présentant des pressions positives et négatives, la bulle oscille par compression/dilatation du volume gazeux

1.1.2.5 Applications

Le développement de microbulles en tant qu'ACUs a également ouvert la voie à de nouvelles applications. Sur la figure 1.7, sont représentées de façon schématique les trois applications majeures de l'utilisation des microbulles en imagerie ultrasonore. La principale application des microbulles en clinique concerne la visualisation et la quantification de la perfusion sanguine dans des organes comme le cœur. En effet, les microbulles ont une taille similaire à celle des globules rouges ($<10\ \mu\text{m}$) et présentent donc des propriétés rhéologiques similaires, ce qui les rend utiles

pour évaluer le flux sanguin et la perfusion dans les organes. La figure 1.8 montre une image échographique d'un cœur chez un patient avant (a) et après (b) l'arrivée d'une injection intraveineuse d'un bolus d'ACUs. L'agent de contraste a rendu possible l'opacification des cavités cardiaques et a amélioré la définition du relief endocardique du ventricule gauche [6]. En regardant le cœur en mouvement, le muscle cardiaque qui fonctionne normalement s'épaissit à mesure qu'il se contracte tandis qu'un muscle cardiaque fonctionnant de manière anormale bouge moins et ne s'épaissit pas.

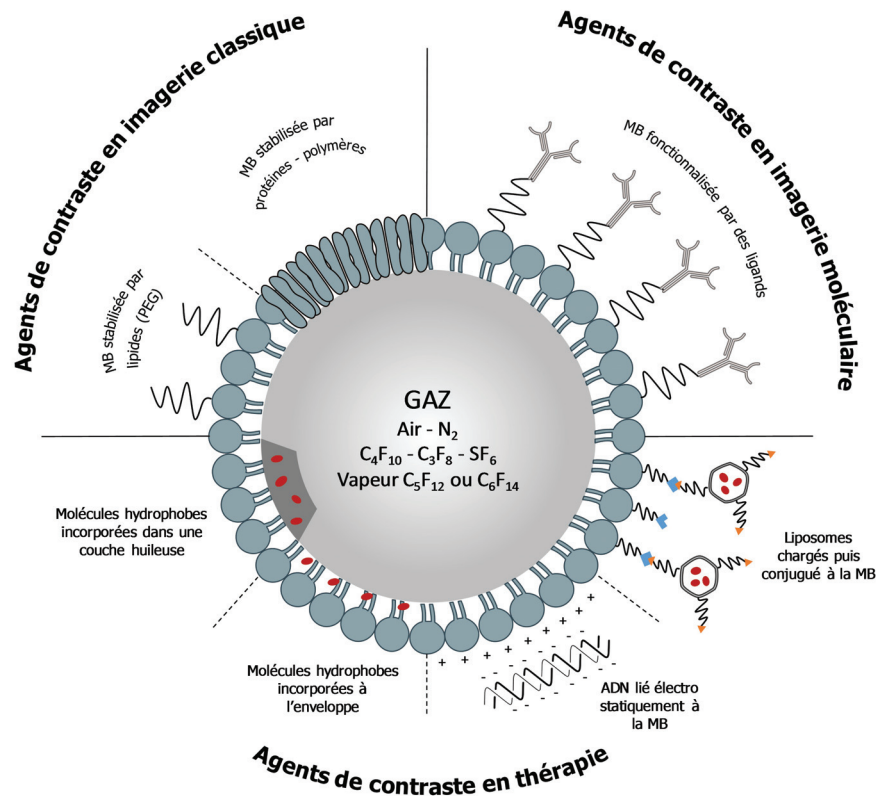


FIGURE 1.7 – Représentation schématique d'une microbulle utilisée en imagerie ultrasonore classique, moléculaire ou en thérapie (Figure adaptée de [5])

Lors d'un examen Doppler, il est possible grâce à l'utilisation d'ACUs d'augmenter la qualité de l'image Doppler du flux sanguin et la durée du rehaussement du signal utile lors de l'examen de la veine porte chez l'adulte. On retrouve également une amélioration dans la visualisation de la vascularisation de lésions du foie et du sein lors d'examens Doppler, permettant une caractérisation plus spécifique des lésions.

La sensibilité de la détection des microbulles par cette technique a facilité le développement d'applications d'imagerie moléculaire ciblées pour le diagnostic de maladies au niveau moléculaire. L'imagerie moléculaire par ultrasons a été introduite par Klivanov et ses collègues à la fin des années 1990 [57]. Les ligands se trouvant à la surface des microbulles permettent une reconnaissance moléculaire en se liant spécifiquement à des biomarqueurs de la paroi des vaisseaux sanguins. L'approche ici consiste à injecter des microbulles ciblées par voie intraveineuse, puis

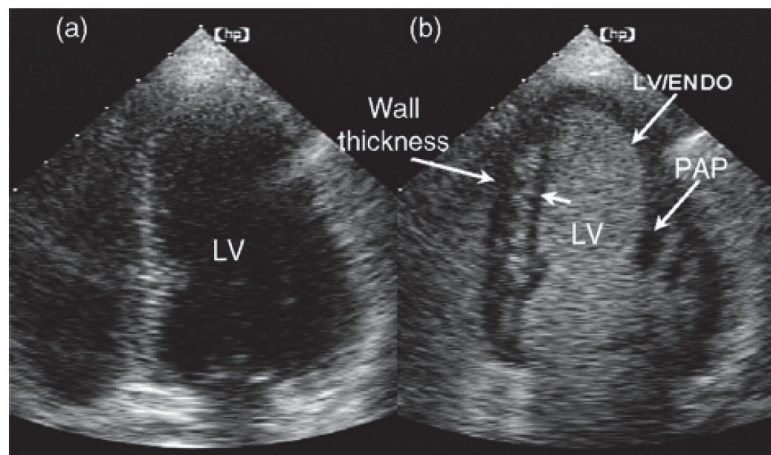


FIGURE 1.8 – Opacification de la cavité ventriculaire gauche : (a) Vue du ventricule gauche (LV : left ventricle) d'un patient sans agent de contraste, (b) la même vue après une injection de bolus d'un agent de contraste de microbulles. Le LV, le bord endocardique (LV/ENDO) et le muscle papillaire (PAP) sont maintenant visualisés avec précision, permettant d'évaluer l'épaississement du myocarde [6]

d'attendre un certain temps pour que les microbulles circulant librement soient éliminées, pour ensuite réaliser une image des microbulles liées spécifiquement aux molécules surexprimées à la surface des cellules d'un tissu pathologique [58]. Par exemple, BR55 est une microbulle ciblant le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2 (VEGFR2) pour le diagnostic du cancer de la prostate [59, 60].

L'usage des microbulles n'est pas seulement limitée au diagnostic, mais peut être utilisée pour des applications thérapeutiques (Figure 1.7). Des microbulles peuvent également être chargées avec des médicaments, des peptides ou des gènes puis détruites par des impulsions ultrasonores pour libérer localement les principes actifs. Par ailleurs, les oscillations des microbulles peuvent induire de nombreux autres phénomènes acoustiques dans le milieu environnant. Au voisinage d'une membrane cellulaire, elles induisent une augmentation temporaire de la perméabilité de la membrane. Ce procédé, appelé sonoporation, est très prometteur en thérapie notamment pour l'administration de gènes et de médicaments [4, 25, 61, 62]. Cette technique est aujourd'hui en cours d'essais cliniques, pour l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, afin de délivrer des chimiothérapies pour traiter des tumeurs du cerveau [63].

1.1.3 Emulsions

1.1.3.1 Généralités

Les émulsions sont des systèmes dispersés constitués de deux phases liquides non miscibles. Elles sont le résultat d'une dispersion d'un liquide, sous forme de petites gouttelettes sphériques, dans un autre liquide. La taille des gouttelettes varie selon les conditions de formulation et de procédé de l'ordre de 0,1 à quelques dizaines de micromètres.

Il existe deux types d'émulsions dites simples, contenant seulement deux phases (Figure 1.9) :

- Emulsions huile dans eau (H/E) pour lesquelles la phase huileuse est dispersée dans la

phase aqueuse.

- Emulsions eau dans huile (E/H) qui sont une dispersion de la phase aqueuse dans la phase huileuse.

Les émulsions doubles sont également courantes. Ce sont des émulsions d'une émulsion simple, comme une émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E) ou huile dans eau dans huile (H/E/H).

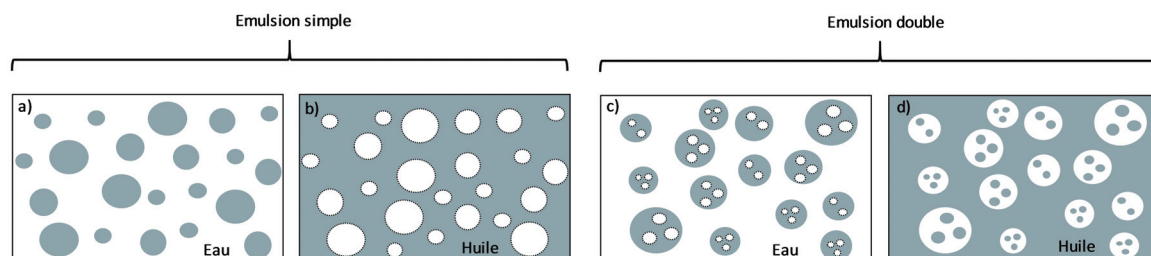


FIGURE 1.9 – Principales configurations d'une émulsion : simple ou double. a) huile dans eau (H/E) ; b) eau dans huile (E/H) ; c) Eau dans huile dans eau (E/H/E) ; d) Huile dans eau dans huile (H/E/H)

En fonction du domaine d'utilisation de l'émulsion, ces phases peuvent contenir différentes substances, lipophiles ou hydrophiles. Les émulsions sont produites dans de nombreuses industries :

- Industrie cosmétique (crèmes, shampoings)
- Industrie pharmaceutique (vaccins)
- Industrie alimentaire (mayonnaise, vinaigrette, dessert)
- Industrie pétrochimique (fluides de forage, bitume).

Pour la suite de la thèse, seulement les émulsions qui ont une configuration huile dans eau (H/E) seront étudiées.

1.1.3.2 Emulsions en tant qu'ACUs

La phase dispersée est généralement huileuse, mais tout autre type de liquide non-miscible peut être utilisé. C'est le cas de gouttelettes de PFC dispersées dans une phase aqueuse, offrant la possibilité de nouvelles applications en imagerie ultrasonores. En effet, ces dernières années, les émulsions de PFC sont apparues comme une alternative possible aux microbulles, puisqu'il est possible de convertir une gouttelette de PFC en microbulle par exposition aux ultrasons. Ce phénomène a été décrit à partir des années 2000 par Kripfans et al. [41] par le terme « Acoustic Droplet Vaporization ». Dans la littérature, ce mécanisme est aussi nommé « phase-shift emulsion ». La conversion du cœur liquide en gaz ne peut se réaliser qu'à partir d'une exposition aux ultrasons au-delà d'un seuil de pression acoustique, nommé seuil de vaporisation ADV (Figure 1.10) [41]. Il a été montré que ce seuil de vaporisation dépendait de la fréquence d'excitation des ultrasons [41] et de la taille des gouttelettes [64].

Lors de l'exposition aux ultrasons au-dessus du seuil ADV, la nucléation et/ou la cavitation du gaz sont initiées et déclenchent la transition de phase. Les ultrasons servent de détonateur pour déclencher la vaporisation des gouttelettes de PFC de manière contrôlée, non invasive et localisée.

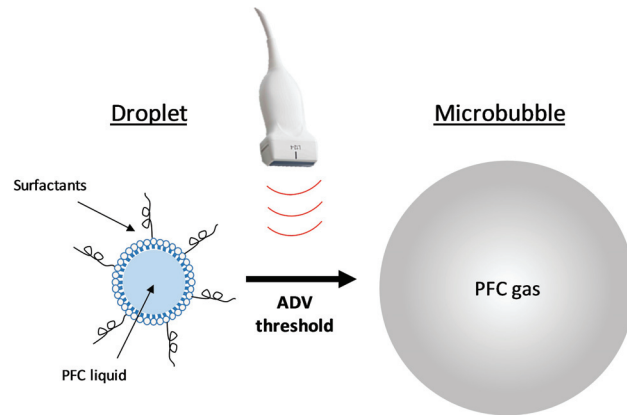


FIGURE 1.10 – Représentation schématique du procédé de vaporisation acoustique de gouttelettes (ADV). La vaporisation de gouttelettes de PFC suite à l'exposition à des impulsions ultrasonores entraîne la formation d'une bulle de gaz

Comparées aux microbulles, les gouttelettes de PFC sont plus stables, et donc peuvent circuler plus longtemps. Cette propriété unique d'activation acoustique sélective fait des gouttelettes un outil potentiellement utile à la fois pour l'imagerie diagnostique et la thérapie [65].

a) Composition Comme pour les microbulles, les gouttelettes de PFC pour applications ultrasonores peuvent être stabilisées par des protéines (principalement l'albumine), des polymères, des phospholipides et des tensioactifs [66]. Les PFCs liquides sont particulièrement attractifs car ils présentent comme les PFCs gazeux une faible solubilité dans l'eau liée à une forte hydrophobicité, et sont des liquides inertes sans effet toxique associé lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse. Le PFC le plus souvent utilisé est le perfluoropentane (PFP, C_5F_{12}) mais sont également possibles le perfluorohexane (PFHex, C_6F_{14}), et le perfluoroheptane (PFHep, C_7F_{16}). Le PFP a une température d'ébullition de $29^\circ C$ et présente un intérêt particulier puisqu'il est possible de maintenir des gouttelettes stables à température physiologique ($37^\circ C$) sans vaporisation, grâce à une pression de Laplace élevée.

b) Paramètres influençant la vaporisation La température de vaporisation des gouttelettes de différentes tailles peut être estimée à partir de l'équation de pression de vapeur d'Antoine [67, 68, 69] :

$$\text{Log}P = A - \frac{B}{T + C} \quad (1.1)$$

où P est la pression, T est la température et A , B et C sont des constantes dépendantes du gaz. Cette équation lie la pression exercée sur la gouttelette, P , et la température nécessaire pour induire la transition de phase, avec :

$$P = P_{amb} + \Delta P = P_{atm} + P_{corps} + \frac{2\gamma}{R} \quad (1.2)$$

où ΔP est la pression de Laplace, où γ et R sont la tension superficielle et le rayon, respectivement.

Facteurs	Relation avec le seuil ADV	Références
<i>Facteurs environnementaux</i>		
Température ambiante	Inverse	[42, 71, 72]
Viscosité du milieu	Direct	[41, 42]
<i>Composition des gouttelettes</i>		
Température d'ébullition du PFC	Direct	[42, 67, 73]
Diamètre	Inverse	[42, 67, 72]
Tension superficielle	Direct	[70]
Concentration	Inverse	[71]
<i>Paramètres acoustiques</i>		
Fréquence	Inverse	[41, 72]
Longueur du pulse	Inverse	[71, 74]
Fréquence de répétition des impulsions	Inverse (jusqu'à 25 Hz)	[42]

TABLEAU 1.3 – Facteurs influençant le seuil de vaporisation ADV

P_{amb} est la pression ambiante pouvant être définie comme la somme de la pression atmosphérique, P_{atm} , et la pression intravasculaire à l'intérieur du corps humain, P_{corps} .

A partir des équations 1.1 et 1.2, l'équation 1.3 est obtenue :

$$T = \frac{B}{A - \log(P_{atm} + P_{corps} + \frac{2\gamma}{R})} - C \quad (1.3)$$

L'équation 1.3, permet de mieux comprendre les mécanismes de vaporisation de gouttelettes. En effet, la pression de Laplace est une fonction inverse de la taille des gouttelettes, ainsi les gouttelettes plus petites ont une température d'ébullition plus élevée et nécessitent donc une énergie d'activation plus grande que les gouttelettes plus larges [70]. Par ailleurs, en fonction des propriétés de l'enveloppe, une tension superficielle plus grande peut entraîner une augmentation de la pression exercée, ce qui augmente la température de vaporisation de la gouttelette. Le tableau 1.3 regroupe d'autres facteurs influençant la pression ultrasonore nécessaire pour induire la vaporisation d'une gouttelette de PFC. Dans tous les cas répertoriés, la vaporisation des gouttelettes a été réalisée à partir d'un échantillon polydisperse en taille, qui est principalement dû à la méthode d'émulsification. Les facteurs influençant le seuil d'ADV peuvent être divisés en trois catégories : les facteurs environnementaux, la composition des gouttelettes et les paramètres acoustiques. Un grand nombre d'applications des émulsions de PFC découlent de ces propriétés.

Une fois que la gouttelette de PFC est vaporisée, la bulle résultante augmente théoriquement son diamètre d'environ 3 à 6 fois, en fonction de la taille initiale des gouttelettes, de la pression ambiante et de la densité du PFC sélectionné [41]. Le taux d'expansion diminue avec la diminution de la taille des gouttelettes en raison de l'augmentation de la pression de Laplace [67]. Divers phénomènes, décrits ci-dessous, interviennent dans l'augmentation de la taille des bulles lors de la vaporisation du PFC induite par ultrasons :

- La transition du liquide en phase gazeuse à l'intérieur d'un espace confiné entraîne une augmentation du diamètre d'environ cinq fois
- La coalescence de gouttelettes avec des bulles ou coalescence de bulles entre elles

- La diffusion de gaz dissous et/ou du PFC à partir de petites bulles dans les grosses bulles (Mûrissement d'Oswald) [75]

1.1.3.3 Applications

Les microbulles issues de gouttelettes de PFC sont stables et répondent aux ultrasons, ce qui les rend aptes à être utilisées comme ACU pour l'imagerie en mode B [76, 77]. Echogen (Sonus Pharmaceuticals), une émulsion de PFP, a été l'une des premières applications de gouttelettes de PFC pour l'amélioration du contraste par ultrasons. Une fois vaporisés, les agents ADV sont facilement détectables par un système d'imagerie, même à de faibles concentrations.

Les principales applications thérapeutiques d'émulsions de PFC, au-delà de l'augmentation de l'échogénicité post-vaporisation, sont liées à la taille des gouttelettes : celles de taille micrométrique et celles dans la gamme nanométrique. Pour les deux gammes de taille, les gouttelettes peuvent être administrées par voie intra-artérielle, ou intraveineuse, puis vaporisées.

Les gouttelettes de taille microscopique sont confinées au système vasculaire sanguin. Elles offrent des possibilités uniques pour l'occlusion ciblée [41, 76], la correction des aberrations ultrasonores [76] et la création de marqueurs internes pour le guidage préopératoire [78]. Dans quelques cas, les applications proposées pour les gouttelettes à l'échelle nanométrique sont similaires à celles des gouttelettes à l'échelle micrométrique, telles que l'administration de médicaments au niveau d'une tumeur. Cependant, les gouttelettes nanométriques sont principalement conçues pour tirer parti de l'effet "Enhanced Permeability and Retention" des tumeurs. Enfin, des nanogouttelettes ont été proposées pour d'autres applications comme l'imagerie diagnostique [79] et l'amélioration du rendement de l'ablation thermique par ultrasons [80, 81].

L'embolothérapie est l'une des applications les plus étudiées des agents ADV. Une fois vaporisées, les gouttelettes ayant un diamètre proche de 5 μm produisent des microbulles de l'ordre de 20-30 μm , permettant ainsi la création intentionnelle d'une occlusion dans un tissu spécifique réduisant fortement le flux sanguin. Ainsi, la vaporisation de gouttelettes a permis de réduire la perfusion rénale de 70% chez le lapin [82]. La réduction du flux sanguin par occlusion est ainsi utilisée pour induire une hypoxie dans les tumeurs. L'occlusion à base d'ADV semble offrir une opportunité significative en ce qui concerne l'administration de médicaments. Le temps de résidence des médicaments pourrait être augmenté grâce à une réduction du flux sanguin, ce qui permet une diffusion accrue dans une région ciblée [83]. Fabiilli et al. 2010 [83] ont développé des agents ADV composés de deux phases dispersées (huile et PFC) capables, l'une de se vaporiser (PFC) et l'autre de pouvoir véhiculer un anticancéreux, le chlorambucil. D'autres approches utilisent des gouttelettes fonctionnalisées avec des ligands moléculaires pour cibler des cellules spécifiques, combinant la destruction mécanique des cellules avec l'administration de médicaments [77].

1.2 Physico-chimie des systèmes dispersés

Cette partie introduit les concepts généraux relatifs à la physico-chimie des systèmes dispersés. D'apparence, ces systèmes sont opaques, en raison du phénomène de diffusion de la lumière par les particules présentes en suspension. Par ailleurs, à l'échelle microscopique, les gouttelettes et

microbulles sont caractérisées par une très grande interface qui sépare deux milieux non miscibles [84].

1.2.1 Principales propriétés physico-chimiques

1.2.1.1 Interfaces liquide/liquide et gaz/liquide

La tension superficielle est une grandeur physique qui quantifie le défaut énergétique provoqué par la création d'une interface entre deux milieux. Généralement, elle est nommée tension interfaciale entre deux liquides non miscibles et la tension superficielle (ou de surface) entre un gaz et un liquide. Le système tend vers un équilibre correspondant à la configuration présentant la plus faible énergie, nécessitant le moins de molécules à la surface. Pour cela, il va modifier sa géométrie et prendre la forme d'une sphère afin de diminuer au maximum l'aire de cette interface. La tension superficielle, notée γ , est définie comme une énergie par unité de surface et correspond à la dimension d'une force par unité de longueur qui s'exprime en N/m. En général, la tension interfaciale entre deux liquides est plus faible que la tension superficielle entre un gaz et un liquide, ce qui s'explique par une plus forte interaction intermoléculaire cohésive au sein des liquides. La tension superficielle entre l'eau et l'air est de 72 mN/m. Dès lors que l'on ajoute dans l'eau des molécules, notamment des tensioactifs, cette tension diminue fortement en raison de l'adsorption de ces molécules à l'interface. Cette adsorption moléculaire entre les deux milieux ne se fait pas de manière instantanée, et la tension superficielle évolue sur un temps plus ou moins long avant de stabiliser la nouvelle interface. Cette dynamique d'adsorption dépend du tensioactif et de sa concentration en solution. En effet, lorsqu'une nouvelle interface est générée, il est observé une diminution de la tension superficielle en fonction du temps qui correspond à l'adsorption progressive des tensioactifs à cette interface jusqu'à atteindre une tension superficielle à l'équilibre (Figure 1.11). A l'équilibre, le tensioactif ne demeure pas à l'interface, et il existe un mouvement permanent d'adsorption et désorption des molécules à l'interface. La dynamique d'adsorption/désorption à l'interface est caractéristique du tensioactif utilisé.

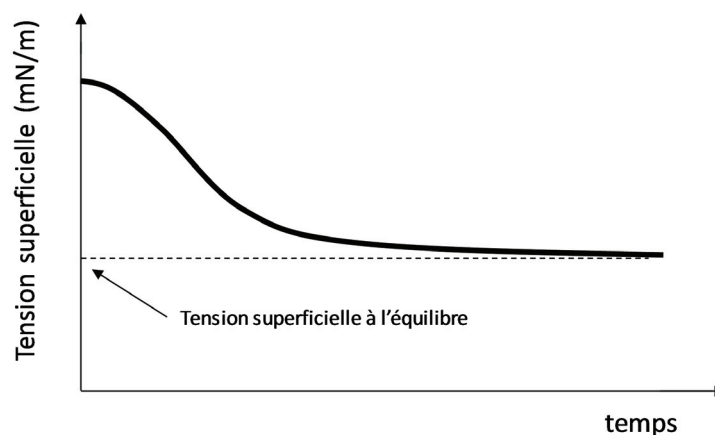


FIGURE 1.11 – Représentation schématique de l'évolution de la tension superficielle en fonction du temps montrant l'adsorption dynamique de tensioactif à une interface jusqu'à atteindre une saturation totale de la surface par les molécules, caractérisées par une tension superficielle à l'équilibre

1.2.1.2 Tensioactifs

Un tensioactif est une molécule amphiphile constituée d'une tête polaire hydrophile et d'une queue hydrophobe composée d'une ou plusieurs chaînes aliphatiques carbonées. Cette structure particulière leur confère la propriété de pouvoir s'adsorber en monocouches aux interfaces eau/huile ou eau/gaz. Ils se positionnent de manière à ce que leur partie hydrophile s'oriente vers la phase aqueuse afin d'établir des liaisons hydrogènes et ioniques, tandis que des liaisons de Van der Waals se forment dans la phase lipophile. En se plaçant à l'interface, les tensioactifs stabilisent la surface et réduisent la tension superficielle jusqu'à ce que celle-ci soit saturée de molécules. Il existe quatre grandes classes de tensioactifs qui diffèrent en fonction de la charge présente au niveau de la partie hydrophile : les anioniques (chargés négativement), les cationiques (chargés positivement), les zwitterioniques (charges positives et négatives sur la tête polaire) et les non ioniques.

1.2.1.3 Concentration micellaire critique

La Figure 1.12 montre l'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactif. La répartition des tensioactifs entre l'interface et la solution aqueuse dépend de la concentration en tensioactif. Pour de faibles concentrations, l'interface est partiellement couverte de molécules avec une répartition autant à l'interface qu'en solution. Au fur et à mesure que la concentration en tensioactif augmente, l'interface est de plus en plus recouverte de tensioactifs jusqu'à atteindre une saturation. Au-delà de cette concentration, les tensioactifs vont former des agrégats sous forme de micelles (structures sphériques), dans lesquels les queues hydrophobes seront orientées vers l'intérieur et les têtes polaires en interaction avec la phase aqueuse. La concentration à laquelle se forme la première micelle est appelée concentration micellaire critique (CMC). Elle s'obtient en déterminant la concentration en tensioactif à partir de laquelle la tension superficielle cesse de diminuer. Au-delà de la CMC, la tension superficielle reste constante.

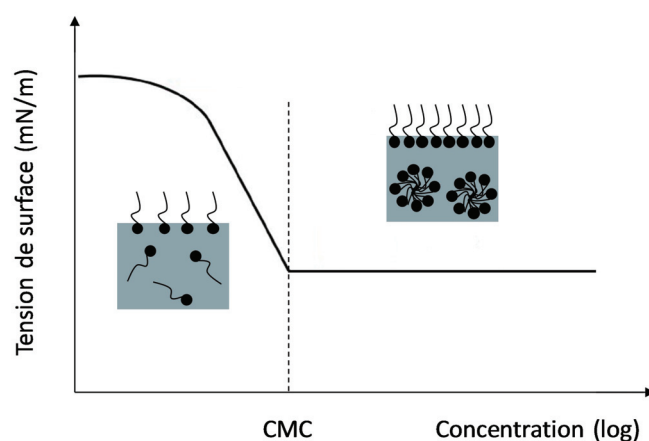


FIGURE 1.12 – Représentation schématique de l'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration logarithmique du tensioactif afin de déterminer la concentration micellaire critique (CMC)

1.2.1.4 Pression de Laplace

La tension superficielle tend à minimiser la surface entre deux milieux non miscibles séparés par une interface. La sphère est la forme adoptée pour réduire la surface entre les deux milieux. Cette configuration entraîne une différence de pression à l'intérieur par rapport à l'extérieur de la sphère, où la pression à l'intérieur est plus grande. Cette pression est appelée pression de Laplace, ΔP , et est proportionnelle à la tension superficielle et inversement proportionnelle au rayon R des microbulles/gouttelettes :

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R} \quad (1.4)$$

Cette équation traduit la concurrence entre la tension superficielle γ , qui tend à réduire la courbure, et la différence de pression qui tend au contraire à courber l'interface. La pression de Laplace aura tendance à augmenter pour les plus petites microbulles/gouttelettes due à l'augmentation de la courbure.

1.2.1.5 Angle de contact

Lorsqu'une gouttelette ou une microbulle est déposée sur un support solide, la forme sphérique générée entre les deux premières interfaces est modifiée par la présence du solide. Un angle se forme entre le support liquide et les deux milieux non miscibles (Figure 1.13). La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface solide par mouillabilité. En cas de mouillage total, caractérisé par un étalement sur la surface, l'angle de contact est égal à 0° . Plus l'angle de contact augmente, plus le mouillage devient partiel.

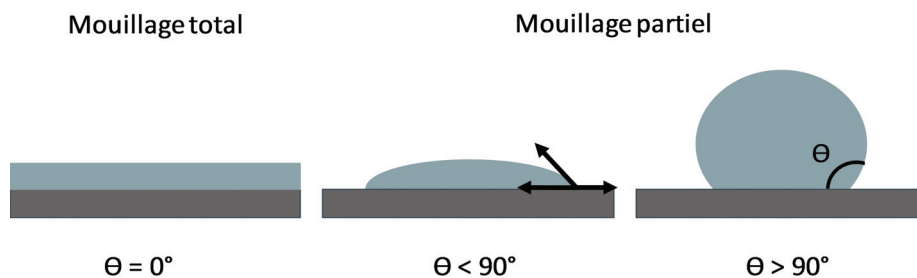


FIGURE 1.13 – Angle de contact et mouillage d'une goutte/bulle déposée sur une surface solide

1.2.2 Stabilité des systèmes dispersés

Aucun système dispersé n'est réellement stable. Les tensioactifs ont pour rôle d'augmenter la stabilité en créant des forces de répulsion entre les particules. Les deux principaux mécanismes qui interviennent sont la répulsion électrostatique grâce aux charges présentes sur les têtes polaires, et la répulsion stérique avec l'utilisation d'une macro molécule de polyéthylène glycol (PEG). Il est également possible de favoriser la stabilité des systèmes dispersés par l'augmentation de la viscosité de la phase continue réduisant ainsi la mobilité et la probabilité de déstabilisation comme la fusion entre deux gouttelettes. Dans le cas des microbulles, la nature du gaz utilisé peut aussi être

un paramètre favorisant la stabilité. Les phénomènes de déstabilisation des systèmes dispersés sont décrits ci-dessous.

1.2.2.1 Pour les émulsions

Du fait de leur nature, les émulsions sont thermodynamiquement instables. Les principaux phénomènes de déstabilisation des émulsions sont représentés sur la figure 1.14 et détaillés ci-dessous :

- **Crémage** : la phase dispersée, généralement de l'huile, est moins dense que l'eau ce qui a pour effet la migration des gouttelettes vers la surface.
- **Sédimentation** : la phase dispersée peut être plus dense que la phase continue, il se produit une sédimentation, comme avec l'utilisation de PFC sous forme liquide (par exemple le PFHex a une densité de 1.63). Également, les particules agrégées donc plus grosses tombent vers le fond du récipient sous l'effet de la gravité.
- **Floculation** : l'agglomération de particules en suspension due à la présence de forces attractives forme des particules plus grosses, appelées agglomérats.

Pour ces trois types de déstabilisation, il n'y a pas de rupture du film interfacial. Par conséquent, l'intégralité individuelle des gouttelettes est préservée et ces phénomènes sont non destructifs. En effet, une simple agitation manuelle permet de remettre en suspension les gouttelettes afin de retrouver l'état initial de l'émulsion.

Cependant, ces phénomènes sont précurseurs à la destruction irréversible des gouttelettes en favorisant le phénomène de coalescence.

- **Coalescence** : les gouttelettes ont tendance à se réunir par rupture du film entre deux gouttelettes, de manière à réduire la surface de contact entre les deux liquides, et donc l'énergie de surface.

Un autre phénomène de déstabilisation est le mûrissement d'Ostwald, qui contrairement à la coalescence, ne nécessite pas la proximité des gouttelettes.

- **Mûrissement d'Ostwald** : le phénomène représente la diffusion de la phase dispersée des petites gouttelettes vers les plus grandes via la phase continue, en raison d'une pression de Laplace plus grande pour les plus petits diamètres. Ce transfert de masse entre les gouttelettes va entraîner la disparition complète des petites gouttelettes et donc une augmentation de la taille moyenne des gouttelettes dispersées dans l'émulsion.
- **L'inversion de phase** : c'est un phénomène rarement observé durant le stockage et correspond à un processus où une émulsion eau dans huile se transforme en huile dans eau, et inversement. Cette déstabilisation est principalement causée par un changement de condition comme la température, ou bien l'utilisation d'un tensioactif non adapté.

1.2.2.2 Pour les microbulles

Une microbulle n'est pas un objet figé. Elle est aussi thermodynamiquement instable, puisque l'énergie libre du système est réduite au minimum lorsque la phase gazeuse se sépare totalement

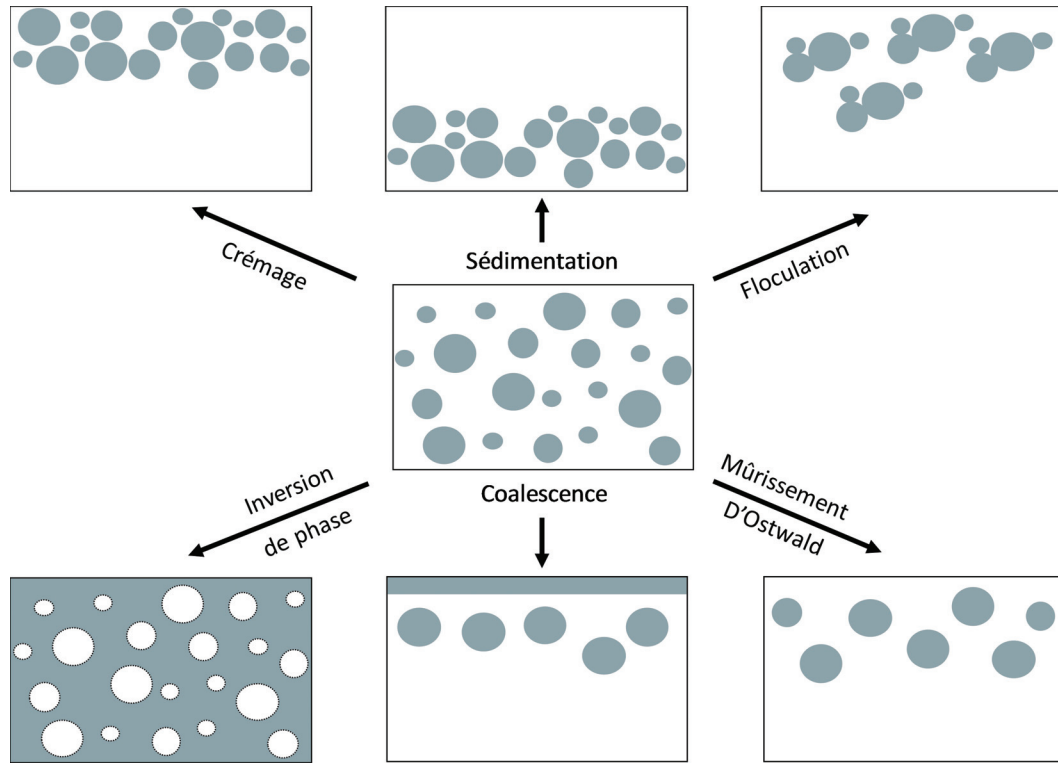


FIGURE 1.14 – Représentation schématique des divers mécanismes de déstabilisation d'une émulsion (Figure adaptée [7])

du milieu liquide pour former deux phases distinctes. Les microbulles présentent aussi des mécanismes de déstabilisation semblables aux émulsions tels que le phénomène de coalescence et le mûrissement d'Ostwald. La pression du gaz à l'intérieur d'une microbulle est égale à la somme de la pression atmosphérique et de la pression de Laplace. Selon la loi de Henry, la quantité de gaz dissous est proportionnelle à sa pression. La surpression augmente la solubilité locale du gaz à la surface des microbulles, créant ainsi un gradient de potentiel chimique. Ainsi pour une microbulle d'air, l'équilibre qui est atteint avec le gaz atmosphérique dans la solution et dans la microbulle engendre un flux gazeux vers l'extérieur responsable d'un dégonflement de la bulle. Ainsi, ce gradient de pression entraîne la dissolution totale de la microbulle. Lorsque le gaz quitte la bulle, elle se contracte et la pression de Laplace augmente, ce qui accélère le taux de dissolution du gaz et le rétrécissement des microbulles qui en résulte. Epstein et Plesset ont établi une équation qui permet de décrire la cinétique de dissolution d'une bulle dans un milieu [21, 85] :

$$\frac{dR}{dt} = -LD_w \left[\frac{P^* + \frac{2\gamma}{R}}{P_{atm} + \frac{4\gamma}{3R}} \right] \left[\frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{D_w t \pi}} \right] \quad (1.5)$$

où R est le rayon de la microbulle, t est le temps, L est le coefficient d'Ostwald de partage du gaz entre la phase gazeuse et la phase aqueuse (calculé comme le rapport entre la solubilité du gaz dans le liquide et la densité du gaz), D_w , le coefficient de diffusion du gaz dans l'eau, γ , la tension superficielle, P_{atm} , la pression atmosphérique, et P^* , la pression en excès. L'équation d'Epstein-Plesset prédit qu'une microbulle d'air non stabilisée par des tensioactifs se dissout complètement

en 1 s dans de l'eau saturée (Figure 1.15).

Une approche pour augmenter la stabilité des microbulles consiste à utiliser des gaz hydrophobes, tels que des hydrocarbures perfluorés (tableau 1.4), qui ont un coefficient d'Ostwald et un coefficient de diffusion du gaz dans l'eau inférieurs de plusieurs ordres de grandeur par rapport aux coefficients de l'air [21, 22]. Ce type de gaz semble être idéal pour augmenter la stabilité des microbulles, grâce à leur faible solubilité dans l'eau et leur faible vitesse de diffusion due à un poids moléculaire élevé. Par exemple, la solubilité de C_3F_8 dans l'eau à 20°C est sept fois inférieure à celle de l'air dans l'eau. Un autre exemple est le SF_6 qui est la plus petite molécule des gaz perfluorés, avec en conséquence une diffusivité, une perméabilité, une solubilité plus grande et donc un temps de dissolution le plus court comme pour l'air. Pour les autres gaz perfluorés, lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente, la solubilité, la diffusivité et la perméabilité diminuent, ce qui augmente le temps de dissolution des microbulles.

Gaz	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau (mol.m ⁻³)	Coefficient d'Ostwald, L	Coefficient de diffusion dans l'eau, D_w (m ² .s ⁻¹)
Air	29	1,32	$1,71 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^{-9}$
SF ₆	146	0,27	$5,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-9}$
C ₃ F ₈	188	0,19	$5,2 \times 10^{-4}$	$7,45 \times 10^{-10}$
C ₄ F ₁₀	238	0,021	$2,02 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-10}$
C ₅ F ₁₂	288	4×10^{-3}	$1,17 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-10}$
C ₆ F ₁₄	338	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-10}$

TABLEAU 1.4 – Caractéristique de l'air et des gaz perfluorés pour la stabilisation de microbulles [21, 22]

La figure 1.15 montre qu'un gaz PFC hydrophobe augmente la durée de vie d'une microbulle dans un milieu saturé, toutefois la microbulle se dissout puisque la tension superficielle est élevée. Lorsque la microbulle de PFC est placée dans une solution aqueuse, la variation du diamètre se fait en deux étapes. Dans un premier temps, le diamètre augmente dû à l'influx de gaz dissous dans l'eau (N_2 et O_2) dans la microbulle de PFC [86]. Dans un deuxième temps, l'efflux de gaz perfluoré entraîne le mécanisme de dissolution, et donc la diminution du diamètre des microbulles. À mesure que le gaz quitte la microbulle, en raison du gradient de pression, la bulle se contracte et la pression de Laplace augmente, ce qui accélère le phénomène de dissolution du gaz et ainsi le rétrécissement des microbulles. Le flux de diffusion entraîne généralement la croissance de plus grandes microbulles et le rétrécissement des microbulles plus petites en raison de l'augmentation de la pression de Laplace.

Cependant, la durée de vie d'une microbulle de PFC non encapsulée reste faible et insuffisante pour la plupart des applications. Ainsi, une encapsulation est nécessaire pour augmenter fortement la stabilité de la microbulle (Figure 1.15). Lorsque la microbulle est stabilisée par des molécules, la cinétique de dissolution est fortement ralentie. En effet, le tensioactif à l'interface gaz/eau réduit la tension superficielle abaissant ainsi la pression de Laplace. Pour les tensioactifs solubles, cette diminution de la tension superficielle n'est pas suffisante et modifie légèrement la diffusion du gaz à l'interface [87]. En effet, la stabilité de microbulles est obtenue à la fois par une réduction

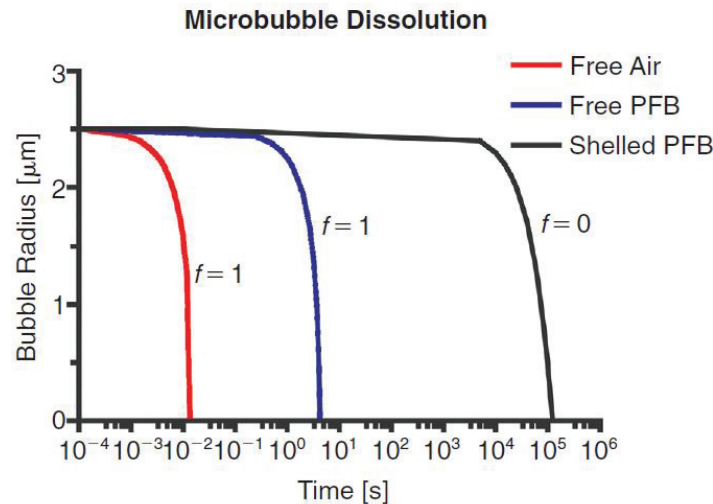


FIGURE 1.15 – Rayon des microbulles en fonction du temps pour trois différentes compositions : microbulles non stabilisées d’air et de PFC et microbulles de PFC stabilisées par des tensioactifs [8])

de la pression de Laplace et une réduction de la perméabilité du gaz à l’interface gaz/liquide. Par ailleurs, il existe un phénomène d’adsorption/désorption des tensioactifs à l’interface qui crée des surfaces sans tensioactifs à court terme, permettant le transfert dans cette zone de molécules de gaz. Pour un tensioactif insoluble, comme par exemple un phospholipide, qui présente une très faible CMC (présence de vésicules lipidiques à de très faibles concentrations), cet échange de tensioactifs à l’interface est très fortement réduit, voir inexistant dû à une forte interaction entre les molécules au niveau des chaînes carbonées hydrophobes [88]. La durée de vie des microbulles stabilisées avec des phospholipides augmente donc considérablement. Ce type de tensioactifs a montré une réduction de la perméabilité du gaz et ainsi une meilleure résistance au transfert des molécules de gaz à l’interface [89].

1.3 Procédés de fabrication

Un apport d’énergie est nécessaire pour formuler un système dispersé stable. L’énergie appliquée permet de déformer l’interface entre les deux phases jusqu’à la formation de microbulles ou gouttelettes. Différents procédés ont été développés pour émulsifier deux phases non-miscibles. Ces procédés à haute énergie nécessitent un taux de cisaillement suffisant pour réduire la taille de l’élément dispersé. Cependant, un désavantage de ce type de procédés est leur absence de contrôle de la taille et de la distribution en taille des microbulles/gouttelettes formées. Dans ce travail, nous présentons successivement les procédés utilisant l’agitation mécanique, les ultrasons, les dispositifs microfluidiques, ainsi que d’autres types de procédés innovants. Un dernier type de procédé qui nécessite l’utilisation de membranes, nommé émulsification membranaire est présenté et détaillé dans la partie 1.4.

1.3.1 Procédés utilisant l'agitation mécanique

1.3.1.1 Homogénéisateur rotor-stator

Le rotor-stator est un dispositif couramment utilisé pour générer des émulsions. Il est constitué d'une partie mobile, le rotor, qui tourne à grande vitesse à l'intérieur d'une partie immobile, le stator (Figure 1.16). La forte contrainte de cisaillement crée un vide qui induit une circulation de l'émulsion à travers l'appareil et la réduction de la taille des gouttelettes formées. Les paramètres qui influencent la taille des gouttelettes et la distribution de la taille peuvent être : la distance entre le rotor et le stator, la vitesse du rotor et le temps de traitement. En fonction de la composition, du volume de l'émulsion et de la taille des gouttelettes ciblées, un choix judicieux de la géométrie du rotor-stator doit être effectué afin d'optimiser l'émulsification. Les gouttelettes formées sont généralement de l'ordre de quelques microns et présentent une certaine polydispersité en taille pouvant être réduite avec l'utilisation de filtres.

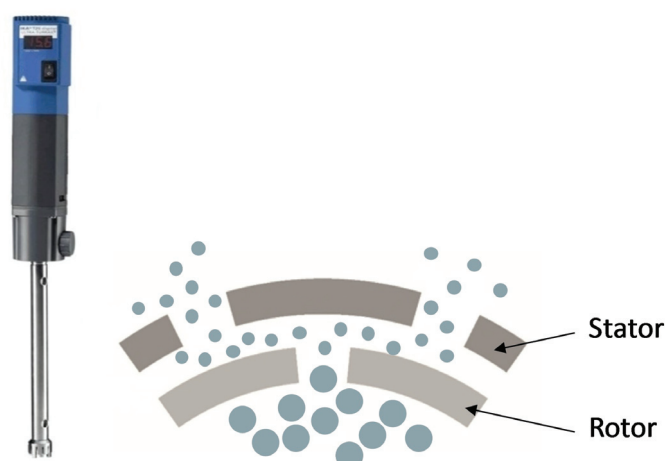


FIGURE 1.16 – Principe schématique du procédé d'homogénéisation de type rotor-stator

Ce procédé permet de formuler des ACUs soit de manière directe pour la préparation d'émulsions de PFC, soit de manière indirecte pour la préparation de microbulles injectables. En effet, un brevet de la société Bracco décrit l'utilisation ce procédé d'émulsification à haut cisaillement pour la préparation d'une formulation lyophilisée et conditionné pour reformuler des ACUs [90]. L'approche est basée sur la production d'une émulsion huile dans eau (H/E) suivie d'une lyophilisation. Dans ce cas, la phase dispersée est un solvant organique non miscible à l'eau, capable de "s'évaporer" lors de la lyophilisation. Lors de l'étape de lyophilisation, les phases aqueuse et organique volatiles sont éliminées, laissant la matrice d'émulsion sous forme d'un gâteau (lyophilisat) blanc. Le flacon de lyophilisation est ensuite remplie d'un gaz, SF_6 . L'ajout d'une solution saline ainsi qu'une agitation manuelle permet la reconstitution des microbulles. Cette méthode est aussi appliquée à la préparation de microbulles revêtues de polymères, qui nécessite une étape supplémentaire pour l'évaporation du solvant solubilisant le polymère provoquant sa précipitation pour ainsi former des microsphères [91, 92].

1.3.1.2 Amalgameur

L'agitation mécanique à l'aide d'un amalgameur est une méthode principalement utilisée pour formuler des microbulles stabilisées par des phospholipides. Cette procédure d'émulsification est appliquée pour générer une dispersion par rupture de l'interface entre un gaz hydrophobe dans une solution aqueuse contenant des tensioactifs. Cette méthode est couramment utilisée pour préparer le produit commercial Definity® et nécessite deux étapes. Premièrement, une suspension de liposomes est préparée puis introduite dans les flacons et l'espace libre est rempli d'un gaz PFC. Puis, ces flacons sont placés dans un agitateur mécanique (Vialmix® for Definity®) et agités à plusieurs milliers d'oscillations par minute générant une suspension de microbulles blanchâtre (Figure 1.17). Dans la littérature, ce type d'agitateur mécanique est également décrit pour la production rapide de gouttelettes de PFC stabilisées par l'albumine [41]. Une étape supplémentaire de filtration à l'aide d'une membrane de polycarbonate peut-être nécessaire afin de réduire la distribution en taille des gouttelettes produites avec cet appareil [73]. Un contrôle des paramètres comme le temps d'agitation, la viscosité de la suspension, la température, la concentration de lipides et la proportion en gaz dans le flacon permet d'optimiser l'obtention de microbulles pour applications biomédicales. Cette technique est efficace pour générer rapidement les microbulles avant leur injection au patient, réduisant les phénomènes de déstabilisation pouvant se produire durant le stockage. Cependant, les distributions en taille ont tendance à être polydisperses avec cette méthode de préparation [93].



FIGURE 1.17 – VIALMIX® est le dispositif d'activation pour Definity®, utilisé pour générer les microbulles stabilisées par des phospholipides avant leur utilisation en échocardiographie de contraste

1.3.2 Procédés utilisant les ultrasons (sonication)

La sonde à ultrasons est la méthode la plus couramment utilisée pour la préparation des microbulles (Figure 1.18). Cette méthode est également appliquée à la formation de gouttelettes. Elle consiste à disperser grâce à des ultrasons à haute intensité, un gaz ou un liquide dans une solu-

tion contenant l'agent stabilisant [94]. Le diamètre de la pointe de la sonde détermine la quantité d'échantillon pouvant être traitée efficacement. En effet, les plus petits diamètres de pointe procurent une sonication à haute intensité, mais l'énergie est concentrée dans une petite zone. Des pointes plus larges permettent de traiter des volumes plus importants, mais offrent une intensité plus faible.

Cette méthode d'émulsification met en jeu deux phénomènes. Le premier est lié à l'instabilité à l'interface entre les deux milieux, ce qui entraîne la formation d'une suspension de gouttelettes ou bulles. Le deuxième phénomène implique la cavitation continue induite par la décomposition des plus grosses particules en fonction du temps de sonication, jusqu'à ce qu'une taille stable soit atteinte. Une taille stable est obtenue à l'équilibre entre les forces de tension superficielle et les forces d'inertie sur la microbulle/gouttelette. Les températures et pressions élevées générées par la cavitation inertielle dans la suspension peuvent entraîner une modification chimique de l'enveloppe qui améliore dans le cas de l'albumine, la stabilité des microbulles. Ce phénomène est dû à la réticulation provoquée par la présence de groupements thiols capables de réaliser des ponts disulfures entre molécules, favorisant la formation d'une enveloppe rigide. Cette méthode peut également être utilisée pour produire des microbulles stabilisées par des phospholipides [86, 89, 93]. Cependant, pour leur production, la température doit être maintenue en dessous de la température de transition de phase des phospholipides.

La préparation de gouttelettes de PFP a été décrite dans la littérature par Zhang et Porter, 2010 [80] et Williams et al. 2013 [95]. Cette méthode présente aussi l'inconvénient de générer une distribution de taille non uniforme. Le passage de l'émulsion à travers un filtre d'une certaine taille de pores, augmente la monodispersité de la suspension mais réduit l'efficacité de fabrication [66]. Pour les microbulles, d'autres types de fractionnement, comme la flottaison [96], ou la centrifugation ont été décrits par Feshitan et al. 2009 [93], et peuvent être efficaces afin de réduire cette polydispersité en taille.

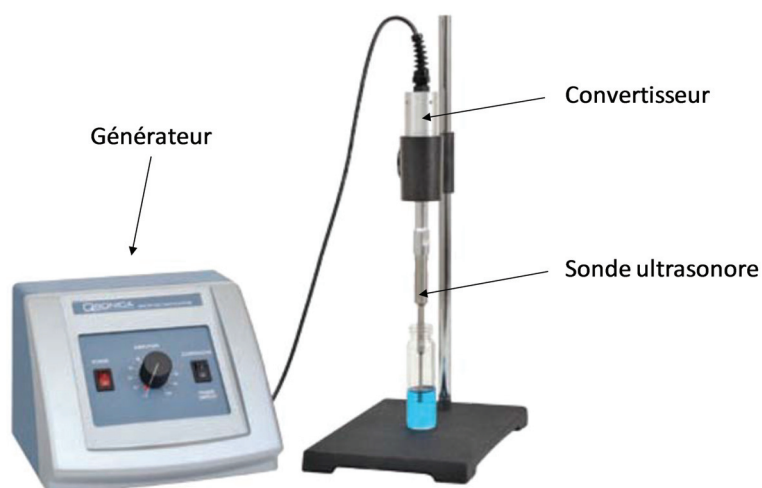


FIGURE 1.18 – Le sonicateur Q55 génère des ondes ultrasonores grâce à trois dispositifs : le générateur électrique qui transforme le courant alternatif en énergie électrique à haute fréquence, le générateur qui convertit l'énergie électrique en vibrations mécaniques et la sonde qui fournit les ultrasons

1.3.3 Procédés microfluidiques

Les technologies microfluidiques permettent de concevoir des suspensions de microbulles/gouttelettes. Elles sont maintenant bien établies pour préparer des gouttelettes monodisperses [69, 97] mais aussi des suspensions de microbulles monodisperses [98] montrant une possible utilisation en imagerie ultrasonore [99, 100, 101]. Les mécanismes de formation de microbulles/gouttelettes varient suivant les différents dispositifs microfluidiques. Il existe trois types principaux de dispositifs en fonction de la géométrie et de la nature du champ d'écoulement : a) co-flowing, b) flow focusing et c) cross flow technique (jonction T) [102]. La figure 1.19 illustre ces trois dispositifs.

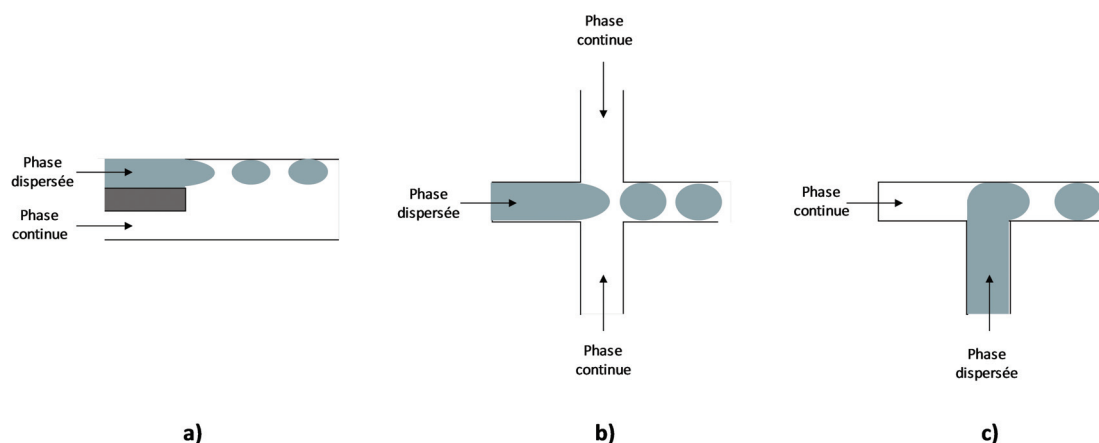


FIGURE 1.19 – Illustration schématisée des trois principales géométries développée pour les dispositifs microfluidiques utilisée pour la formation des gouttelettes/microbulles, a) co-flow, b) flow focusing et c) cross-flow technique (jonction T)

La taille et la monodispersité des microbulles/gouttelettes dépendent des propriétés physiques des liquides, des débits de gaz et de liquide, ainsi que des dimensions et profils de l'orifice et des canaux microfluidiques [98, 99, 103]. Ces techniques offrent la possibilité de préparer de nouveaux agents de contraste comme les émulsions doubles permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles [97].

Bien que ces techniques permettent un grand contrôle de la taille et une très faible polydispersité, elles génèrent assez lentement ($\mu\text{L}/\text{min}$) les agents de contraste [69, 97, 100]. En effet, ces méthodes nécessitent la manipulation de petits volumes de fluides et reposent sur des débits très faibles, pour une production en mode goutte à goutte. Les faibles rendements de production les rendent difficilement industrialisables, et même si de nombreux canaux sont mis en parallèle, le débit global de production reste faible et bien inférieur au rendement de production de microbulles/gouttelettes obtenus avec les procédés précédents. Le rendement peut pas être augmenté simplement en augmentant le débit de gaz, ce qui entraîne en contrepartie une perte de la monodispersité en taille [99]. Bien que ces avancées techniques puissent éventuellement permettre une génération efficace et robuste de microbulles/gouttelettes monodispersées, des écoulements visqueux ou des particules peuvent venir boucher les canaux de quelques micromètres.

1.3.4 Autres procédés de fabrication

1.3.4.1 Procédés d'atomisation électrohydrodynamique coaxiale (CEHDA)

CEHDA est un processus par lequel un liquide traverse une aiguille capillaire à un débit contrôlé et est maintenu à plusieurs kilovolts par rapport à une électrode de masse située à quelques centimètres de distance. Le liquide à la sortie du capillaire prend diverses formes sous l'influence du champ électrique [104]. La présence d'un flux coaxial simultané entre un milieu liquide tel qu'une solution composée de tensioactifs et d'un gaz permet sous l'influence d'un champ électrique externe l'encapsulation de la phase gazeuse par le liquide et donc la formulation de microbulles. De nombreux travaux visant à concevoir des suspensions de microbulles monodisperses pour des applications en imagerie médicale ont porté sur cette nouvelle technique comme décrit par Pancholi et al. 2008 [100] et Farook et al. 2009 [105]. La formation de microbulles nécessite une alimentation en gaz au niveau de l'aiguille interne en acier inoxydable, tandis que l'aiguille externe est alimentée par la solution de tensioactifs constituant l'enveloppe. Une différence de potentiel électrique de plusieurs kilovolts est appliquée entre les aiguilles et une électrode. La taille et l'uniformité des microbulles dépendent de la tension appliquée et des débits de gaz et de liquide contrôlés par des pompes à seringue de haute précision.

1.3.4.2 Condensation de microbulles

La méthode de condensation de microbulles composées d'un gaz de PFC, induite par la pressurisation et une basse température permet une production simple de nanoémulsions avec un haut rendement [106]. Les microbulles sont dans un premier temps générées à partir de procédés d'émulsification classiques, puis l'échantillon est refroidi à température ambiante avant d'être immergé dans un bain de CO₂/isopropanol à -5 à -10°C. La réduction de la polydispersité des microbulles par des dispositifs de filtration permet ensuite de générer des gouttelettes monodispersées. La pressurisation et la condensation du PFC des microbulles est une méthode efficace pour la production de nanoémulsions avec des tailles de gouttelettes condensées de l'ordre de 200 à 300 nm. Les tailles obtenues correspondent bien à la prévision utilisant la loi des gaz parfaits à partir de microbulles originales ayant un diamètre de 1 à 2 µm. Cette nouvelle technique permet de développer des agents de contraste extravasculaires pour des applications diagnostiques et thérapeutiques.

Ces méthodes de fabrications présentées appliquent une contrainte de cisaillement élevée pour déformer et diviser les larges microbulles/gouttelettes en plus petites. L'inconvénient majeur de ces approches est qu'il est difficile de contrôler la taille des systèmes dispersés qui sont généralement très polydisperses. Ceci est dû à l'exposition des microbulles/gouttelettes à un champ de cisaillement et de pression variable, avec une très forte contrainte de cisaillement dans certaines zones et un cisaillement négligeable dans des «zones mortes». Egaleme nt, seulement 1 à 5% de l'énergie appliquée est utilisée pour la formation d'un système dispersé et le reste est perdu sous forme de chaleur [107]. Cette dissipation de chaleur peut être dans certains cas utile comme pour

la formation d'une enveloppe rigide à l'aide de ponts disulfures, mais aussi peut-être responsable de la dégradation et la perte de propriétés fonctionnelles d'ingrédients sensibles à la température et au cisaillement [108]. Également, ces procédés d'émulsification pour la préparation de systèmes dispersés génère une assez grande polydispersité avec un coefficient de variation élevé ($\geq 40\%$) [62]. Bien que des méthodes de tri soient très efficaces pour réduire la distribution, le rendement est réduit et des diamètres spécifiques sont difficiles à obtenir. La séparation des tailles est une procédure nécessaire pour la plupart des préparations, car les microbulles de différentes tailles présentent des signaux acoustiques et des effets biologiques différents. Les populations monodispersées offrent des avantages intéressants à leur utilisation par rapport aux populations polydispersées. Un autre type de procédé, appelé émulsification membranaire, permet de remédier à ces inconvénients, à savoir une faible consommation énergétique, ne dégradant pas les molécules sensibles et offre un contrôle de la taille des microbulles/gouttelettes formées. Dans la section suivante, les principes et applications de l'émulsification membranaire sont présentés.

1.4 Procédés membranaires

1.4.1 Généralités

L'émulsification membranaire a reçu une attention croissante au cours des 25 dernières années comme méthode alternative à d'autres techniques d'émulsification. En effet, cette technique est particulièrement adaptée à la production à grande échelle. Elle permet de produire des émulsions monodispersées en consommant moins d'énergie par rapport à d'autres procédés [109, 110]. Différents types d'émulsification, de membranes, de modules et de montages ont été développés afin de produire une large gamme de formulations. L'émulsification membranaire consiste en la préparation d'un système dispersé par passage sous pression d'une phase dispersée pure ou un mélange pré-émulsionné d'une phase dispersée et d'une phase continue à travers une membrane. Il existe deux configurations principales : soit pour générer directement une émulsion de gouttelettes ou microbulles, soit pour modifier une émulsion déjà existante (Figure 1.20). En émulsification membranaire directe (EMD), une phase dispersée (liquide ou gaz) est injectée à travers une membrane dans une phase continue (liquide non miscible) [111, 112], ce qui conduit à la formation de microbulles/gouttelettes à l'interface entre la membrane et la phase continue (Figure 1.20). En émulsification membranaire par prémix (EMP) (Figure 1.20), une pré-émulsion appelée prémix, passe sous pression à travers la membrane [113], ce qui conduit à une homogénéisation des grosses gouttelettes en plus petites gouttelettes de taille uniforme. Par cette méthode, la préparation de microbulles n'est pas possible. Pour les deux types de configuration, si la pression transmembranaire est inférieure à une pression capillaire, P_c , la force de pression agissant sur la phase dispersée où le prémix n'est pas suffisante et aucune microbulle/gouttelette n'est produite. Il est nécessaire de connaître quel type de membrane utiliser soit hydrophile, soit hydrophobe en fonction du système dispersé préparé. En effet, la membrane ne doit pas être mouillée par la phase dispersée et former des angles de contact élevés entre la surface de la membrane et la phase dispersée. Un mouillage total de la phase dispersée conduit à la coalescence des microbulles/gouttelettes avant leur détachement de la surface de la membrane, et donne une taille re-

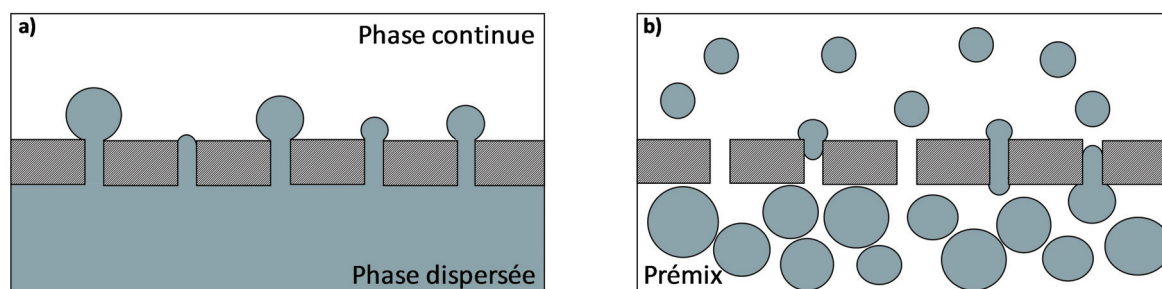


FIGURE 1.20 – Schéma des deux principales configurations pour l'émulsification membranaire, a) Emulsification membranaire directe (EMD), dans laquelle la phase dispersée est poussée à travers la membrane dans une phase continue, b) Emulsification membranaire par prémix (EMP) dans laquelle le prémix est poussé à travers la membrane

lativement grande et une distribution en taille polydisperse. Par conséquent, les membranes hydrophobes sont nécessaires pour produire des gouttelettes E/H [114, 115] et des émulsions H/E/H [116]. Dans le cas contraire, des membranes hydrophiles sont nécessaires pour préparer des gouttelettes H/E [113, 117, 118, 119, 120] et des émulsions E/H/E [121, 122, 123]. Dans le cas de la préparation de microbulles, les membranes hydrophiles sont également utilisées [117, 124, 125, 126]. L'avantage principal de cette technique est d'offrir un meilleur contrôle de la taille des microbulles/gouttelettes, avec des distributions de taille beaucoup plus étroites, sans réduction significative du rendement de microbulles par unité de temps ou de volume produit [127].

1.4.1.1 EMD versus EMP

L'EMD présente l'inconvénient de nécessiter un faible débit transmembranaire, et est principalement utilisée pour la préparation d'émulsions avec des teneurs en phase dispersée relativement faibles, jusqu'à 25% en volume, ce qui signifie que l'émulsion peut-être recyclée dans la phase continue pour atteindre la concentration de phase dispersée souhaitée. En effet, un flux de la phase dispersée de l'ordre de $0,001-0,1 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ doit être maintenu pour contrôler avec précision la taille des gouttelettes. Il est décrit dans la littérature que l'augmentation des flux de phase dispersée en EMD génère des tailles de gouttelettes [128, 129, 130] et de microbulles [124, 126] non contrôlées. Pour une même taille de pores, l'EMP donne une taille de gouttelettes plus petite qu'en EMD. En effet, un ratio $D_{\text{Goutte}}/D_{\text{Pore}}$ de l'ordre de 1-1,5 est obtenu en EMP tandis qu'en EMD, ce ratio est de l'ordre de 2,8-3,5 [23]. Pour la production de microbulles en EMD ce ratio est proche de 9, comme décrit par Kukizaki et al. [124, 126]. Cependant une problématique liée à la technique d'EMP est qu'elle entraîne un encrassement plus important de la membrane. Par ailleurs, l'EMP fonctionne à des pressions transmembranaires plus élevées risquant de fragiliser ou casser la membrane après de nombreuses utilisations.

1.4.1.2 Comparaison avec les autres procédés

Les homogénéisateurs classiques peuvent endommager les composés sensibles au cisaillement et à la chaleur, tels que les protéines, les vitamines et les acides nucléiques, en raison de l'apport énergétique dont une partie importante est transformée en chaleur et de la force de cisail-

ment élevée [131]. En revanche, les dispositifs membranaires fonctionnent dans des conditions de contrainte de cisaillement modérées, de faible consommation d'énergie, à température ambiante et constante [132, 133]. Le taux de cisaillement dans les méthodes conventionnelles est de l'ordre de grandeur de $1\text{--}2 \times 10^{+5} \text{ s}^{-1}$ pour un dispositif de type rotor-stator, tandis qu'un taux de cisaillement largement inférieur est appliqué à la surface des membranes pour l'EMD (10^{+3} s^{-1}) [13]. Il est également décrit dans la littérature, la formation de microbulles/gouttelettes uni-formes produites en l'absence de cisaillement, où un détachement spontané est gouverné par une faible tension superficielle pour un faible flux de phase dispersée [130, 134, 135]. De plus, l'apport d'énergie dans les dispositifs de dispersion conventionnels n'est pas réparti uniformément. Par exemple, dans les dispositifs rotor-stator, les forces de cisaillement sont élevées à proximité du rotor et sont faibles dans les zones mortes, conduisant à la production d'émulsions polydisperses. En revanche, les systèmes d'émulsification membranaire présentent une répartition uniforme du cisaillement, localisé à la surface de la membrane et qui reste constant.

En comparaison avec les dispositifs microfluidiques, le principal avantage de l'émulsification membranaire réside dans la productivité et le fort rendement des microbulles/gouttelettes formées. Les débits volumiques de la phase dispersée en EMP peuvent dépasser 10^{+4} mL/h pour la production d'une émulsion avec des gouttelettes d'environ $10 \text{ }\mu\text{m}$ et une surface effective inférieure à 4 cm^2 [121]. En revanche, le débit volumique de la phase dispersée dans les dispositifs microfluidiques est très faible, généralement de l'ordre de $0,01\text{--}10 \text{ mL/h}$ [23], ce qui s'explique par la présence d'un seul canal d'injection, et donc d'une seule unité de génération de goutte-lettes, contrairement à la présence d'une multitude de pores dans une membrane ($10^{+9}\text{--}10^{+14}$ pores/ m^2). Même si seulement 1 à 8% des pores d'une membrane SPG sont actifs en EMD, cela représente un nombre total d'unité de génération (UG) supérieur à 10^{+7} UG/m^2 . En microflui-dique, une très forte uniformité des microbulles/gouttelettes est obtenue avec un coefficient de variation très faible de l'ordre de 5%. En revanche, la variation de la distribution en taille en emul-sification membranaire est légèrement supérieure avec un coefficient de variation au-dessus de 10%, correspondant à un span compris entre 0,3-0,6.

1.4.2 Membranes

Les membranes principalement utilisées en émulsification membranaire sont les membranes SPG [117, 130, 136], les membranes micro-usinées [9, 137, 138] et les membranes polymériques [10, 139] (Figure 1.21). Ces trois types de membrane représentent les principaux groupes de struc-tures membranaires. Les membranes SPG et polymériques sont des membranes constituées de nombreuses ramifications avec des pores interconnectés, tandis les membranes micro-usinées sont des membranes avec des pores cylindriques réguliers. Dans la littérature, les membranes dif-fèrent non seulement par leur composition chimique et leur structure, mais également par leur épaisseur, leur surface membranaire et leur géométrie (plane ou cylindrique). Ces propriétés ont une influence sur la granulométrie des systèmes dispersés obtenus.

Pour être utilisées en émulsification membranaire, les membranes doivent présenter les pro-priétés suivantes : 1) une distribution uniforme de la taille des pores avec une large gamme de tailles de pores disponibles pour pouvoir obtenir des microbulles/gouttelettes uniformes avec

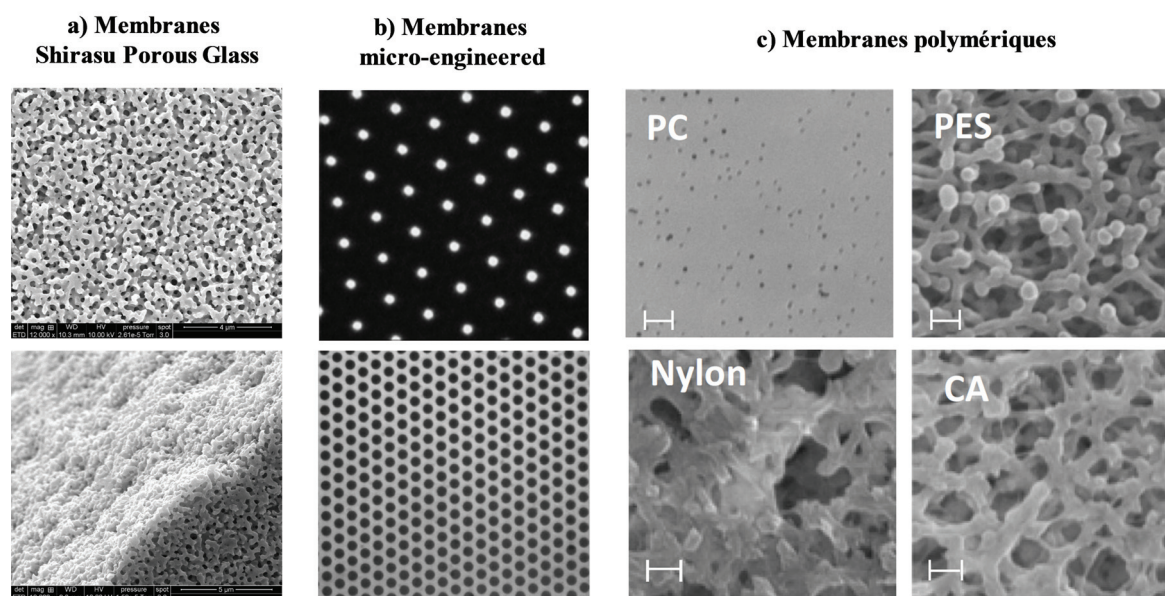


FIGURE 1.21 – Images microscopiques des principales membranes utilisées en émulsification membranaire a) Membranes Shirasu Porous Glass observées au microscope électronique à balayage, b) Membranes métalliques observées au microscope optique, c) Membrane polymériques observées au microscope électronique à balayage (PC : Polycarbonate, PES : Polyéthersulfone, CA : Cellulose acétate, Échelle : 1 μm [9, 10])

des tailles ajustables en fonction de l'application, 2) une faible résistance hydrodynamique, 3) des résistances mécanique, thermique et chimique élevées, 4) une certaine tolérance aux solvants organiques utilisés dans la formulation de certains produits, 5) la possibilité de modification de la charge en surface ainsi que la modification de surface par fonctionnalisation influençant la mouillabilité de la membrane, 6) un faible coût de fabrication [13].

1.4.2.1 Membranes SPG

Les membranes SPG sont les membranes les plus couramment utilisées en émulsification membranaire puisqu'elles répondent à la majorité des critères mentionnés ci-dessus [11]. Les membranes SPG sont composées principalement de SiO_2 et Al_2O_3 qui est obtenu par réaction du Shirasu (cendres volcaniques provenant d'une région du Japon), de l'acide borique et du calcaire. Après plusieurs traitements thermiques et chimiques à l'acide, la membrane finale est produite. La figure 1.22 présente les principales étapes de fabrication d'une membrane SPG. La taille finale des pores dépend, pour une même composition, du temps de chauffage et de la température. Les principales propriétés des membranes SPG commercialisées par la société SPG Technology sont résumées dans le tableau 1.5. Les membranes SPG sont disponibles sous forme cylindrique ou de disques plats. Les avantages des membranes SPG par rapport aux membranes micro-usinées sont une porosité plus élevée, une gamme plus large de tailles de pores disponibles, une distribution de taille de pores étroite, une épaisseur suffisante permettant une résistance mécanique élevée, une chimie de surface pouvant être facilement modifiée grâce aux groupements silanols en surface et des coûts de fabrication faibles.

La figure 1.21 montre que les pores sont cylindriques, tortueux et interconnectés. Grâce à leur

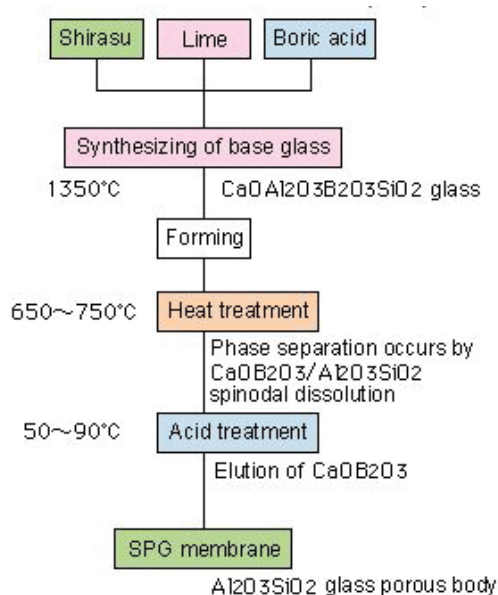


FIGURE 1.22 – Principales étapes de fabrication d’une membrane Shirasu Porous Glass (SPG) (SPG Technology Co.,Ltd [11])

Caractéristiques	Membrane SPG
Forme	Cylindrique ou plate
Epaisseur	0,4 - 1 mm
Résistance à la compression	200-280 MPa
Diamètre des pores	0,04-40 μm
Porosité	50-60%
Densité	2000-2500 kg.m^{-3}
Potentiel zéta (pH : 3-10 et C_{NaCl} : 1-100 mol.m^{-3})	-15 à -45 mV
Tortuosité des pores	1.25-1.4
Nombre de pores par unité de surface transversale	10^9 - 10^{14} m^{-2}
Résistance hydraulique	10^8 - 10^{12} m^{-1}

TABLEAU 1.5 – Principales propriétés des membranes SPG [23]

épaisseur, les membranes SPG présentent une résistance mécanique élevée en comparaison avec des membranes plus fines pouvant casser facilement. Les membranes SPG sont chargées négativement et sont initialement hydrophiles en raison de la présence de groupes silanols [136, 140] mais peuvent être modifiées pour devenir hydrophobes par un traitement avec des groupements organosilanes [125]. Cependant, une porosité élevée de la membrane peut favoriser les interactions gouttelettes-gouttelettes ou microbulles-microbulles à la surface de la membrane, ce qui peut compromettre l’uniformité de la taille des microbulles/gouttelettes formées.

1.4.3 Modules

Il existe plusieurs types de module pour l’émulsification membranaire qui peuvent être utilisés en EMD et EMP. Les différentes configurations varient en fonction du matériau, de la géométrie de la membrane, des volumes utilisés, du type de détachement des microbulles/gouttelettes, et

du cisaillement en surface. Un dispositif développé par Micropore Technologies Ltd. (Loughborough, Royaume-Uni) utilise une cellule agitée avec une membrane plane sous forme de disque, avec un agitateur à pales permettant le détachement des microbulles/gouttelettes (Figure 1.23). Ce dispositif produit des gouttelettes monodispersées pour de petits volumes à l'aide d'un pousse seringue, cependant une des problématiques est la faible surface effective des membranes et le faible débit de la phase dispersée pour contrôler la formation des microbulles/gouttelettes. Un autre type de dispositifs utilisant des membranes planes, est un extrudeur qui permet le passage sous pression de la phase dispersée à travers un filtre de polycarbonate. Ce type de dispositif est couramment utilisé pour la réduction en taille de liposomes et nécessite un temps de production long pour obtenir une monodispersité élevée car de nombreux cycles de passage doivent être réalisés. D'autres types de modules améliorant le détachement en surface ont été développés grâce à l'utilisation de membranes rotatives [141, 142] ou vibrantes [143].

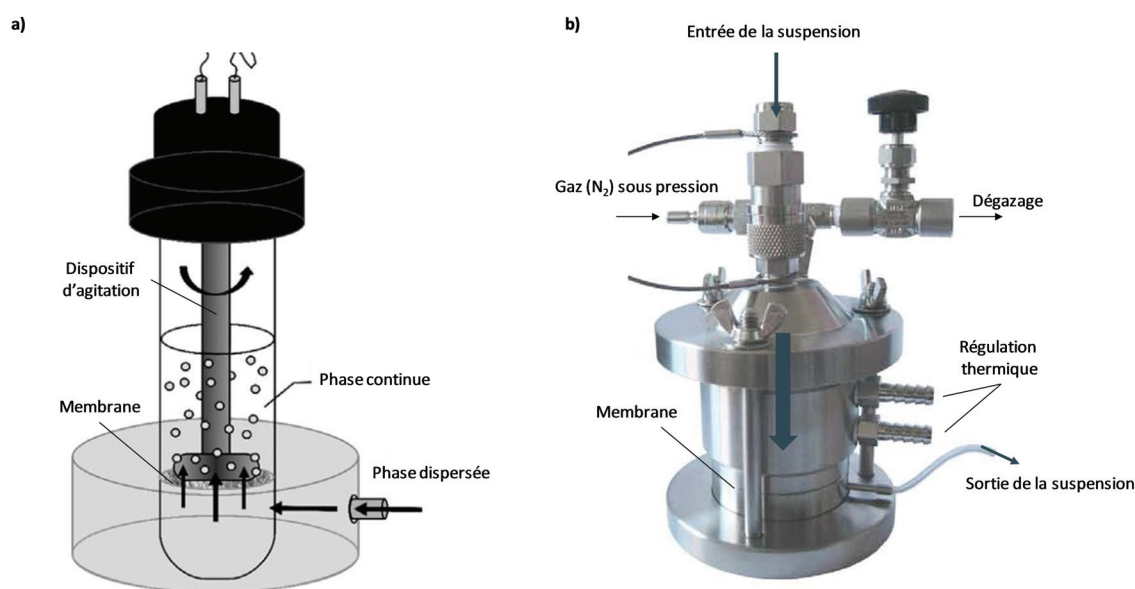


FIGURE 1.23 – Modules utilisés en émulsification membranaire a) Cellule agitée commercialisée par Micropore Technologies, b) Procédé d'extrusion mettant sous pression une suspension

Les deux principaux modèles de modules utilisant les membranes SPG sont : les systèmes micro-kits SPG utilisant une petite membrane SPG tubulaire (7-20 mm) qui est immergée dans une phase continue sous agitation (Figure 1.24 a)) et les systèmes avec un écoulement tangentiel "cross-flow" avec une membrane tubulaire pouvant atteindre 500 mm de longueur (Figure 1.24 b)).

1.4.3.1 Micro-kit SPG

Ce module membranaire mis au point par la société SPG Technology Co., Ltd (Miyazaki, Japon) est principalement utilisé pour une production à l'échelle laboratoire (Figure 1.24 a)). Ce dispositif utilise des membranes tubulaires de 20 mm, avec une longueur effective d'environ 10 mm, qui résulte de l'ajout de joints permettant l'étanchéité du module. Il est principalement utilisé en EMD, dans laquelle la phase dispersée est poussée de l'extérieur vers l'intérieur de la mem-

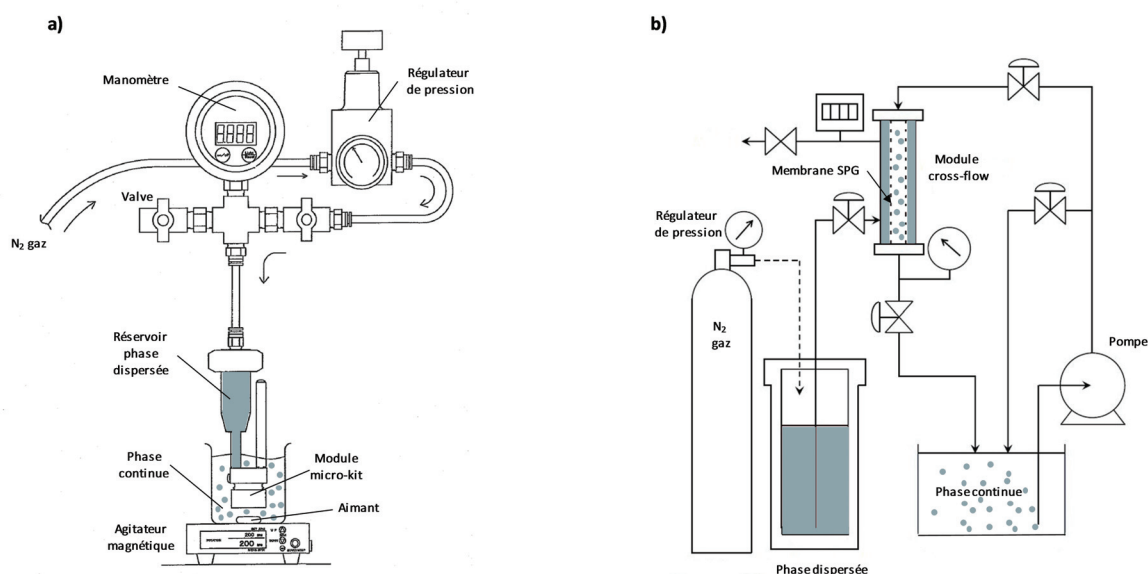


FIGURE 1.24 – Vue schématique des modules membranaires Shirasu Porous Glass a) Système micro-kit SPG de pression externe, b) Système SPG cross-flow

brane tubulaire. Pour la préparation de gouttelettes, la phase dispersée est pressurisée par un gaz, généralement de l'azote. Le module contenant la membrane est totalement immergé dans la phase continue contenant les tensioactifs. Une agitation magnétique à l'aide d'un aimant permet de décrocher les gouttelettes en surface. En effet, l'agitation magnétique située au dessous de la membrane tubulaire va entraîner une circulation de bas en haut de la phase continue générant un cisaillement à la surface. Les micro-kits SPG nécessitent au minimum 25 mL de phase continue, ce qui peut-être un avantage pour la préparation de systèmes dispersés utilisant des composés onéreux. Ce dispositif est également utilisé en EMP, cependant un faible volume de prémix peut être introduit dans le réservoir (maximum 10 mL de prémix).

1.4.3.2 Cross-flow SPG

La configuration "cross-flow" est basée sur le principe de la microfiltration. Un schéma classique d'émulsification membranaire dans cette configuration est présenté à la figure 1.24 b). La phase dispersée, mise sous pression grâce au gaz comprimé, pénètre à travers les pores de la membrane, côté extérieur, dans la phase continue. A l'intérieur du tube de la membrane, la phase continue circule grâce à une pompe et vient décrocher les microbulles/gouttelettes en surface par cisaillement. Les systèmes cross-flow sont faciles à mettre à échelle et offrent une contrainte de cisaillement constante le long de la surface de la membrane grâce à un débit appliqué constant. Cependant, ce système nécessite l'utilisation d'un grand volume de production, plusieurs millilitres (minimum 500 mL) de phase continue. Ils peuvent être utilisés en flux discontinu, avec une recirculation de la phase continue permettant de concentrer l'échantillon ou en flux continu, sans aucune recirculation. En effet, une recirculation peut provoquer l'endommagement des microbulles/gouttelettes par le cisaillement généré à l'intérieur des tuyaux. Une longueur de membrane effective plus grande permet d'augmenter le rendement de microbulles/gouttelettes formées.

1.4.4 Emulsification membranaire directe (EMD)

L'EMD, pour la production d'une émulsion, a été présentée pour la première fois au Japon par Nakashima et al. au début des années 1990 [111]. Le principe est le suivant : une phase dispersée, liquide ou gazeuse, est forcée à travers une membrane poreuse par une pression transmembranaire. Les microbulles/gouttelettes sont ensuite formées de l'autre côté de la membrane et se détachent dans la phase continue lorsqu'elles ont atteint une certaine taille (Figure 1.20 a)). Au niveau d'un pore, la microbulle/gouttelette a tendance à former une forme sphérique sous l'action de la tension superficielle, mais une certaine distorsion peut se produire en fonction du débit de la phase continue et de l'angle de contact à la surface de la membrane [12]. La taille de la microbulle/gouttelette ainsi formée est déterminée lorsqu'un équilibre entre les différentes forces exercées est atteint [144, 145].

1.4.4.1 Mécanismes de génération de microbulles/gouttelettes

Dans cette partie, les mécanismes responsables de la génération d'une microbulle/gouttelette à la surface d'une membrane sont détaillés. Le détachement des gouttelettes à la surface de la membrane dépend des différentes forces présentées sur la figure 1.25. Certaines de ces forces sont considérées comme négligeables par rapport aux quatre forces principales responsables de ce détachement : 1) la force de cisaillement à la surface de la membrane de la phase continue qui circule (F_D), 2) la tension superficielle entre les deux fluides émulsionnés (F_γ), 3) la force d'inertie/pression du flux transmembranaire à travers les pores de la membrane (F_i) et 4) la force de flottabilité (F_B) [12].

- F_D : force de cisaillement produite par l'écoulement de la phase continue. La direction de la force est parallèle à la surface de la membrane.
- F_γ : force provoquée par la tension superficielle. Elle représente l'effet de l'adhésion de la microbulle/gouttelette au bord de l'ouverture des pores de la membrane. La direction de cette force agit contre leur détachement de la membrane. La force de tension superficielle évolue en fonction de l'adsorption du tensioactif à l'interface entre les deux phases et dépend de la vitesse de cette adsorption. Cette force de tension superficielle est fonction du type de tensioactif et de sa concentration et est minimale pour une concentration élevée.
- F_i : force d'inertie provoquée par l'écoulement de la phase dispersée se déplaçant dans le pore. La pression appliquée à la phase dispersée pour passer la membrane fournit cette force d'inertie du liquide ou du gaz à travers la membrane. La direction de la force est perpendiculaire à la surface et dirigée vers la microbulle/gouttelette.
- F_B : force de flottabilité. La différence entre les densités de deux phases est responsable de cette force. Cette force est beaucoup plus petite que les autres forces agissant sur les gouttelettes pendant le détachement et peut donc être considérée comme négligeable. Cependant dans le cas d'une préparation de microbulles, cette force devient non négligeable.

Une approche théorique simplifiée pour décrire l'évolution et le détachement d'une gouttelette d'un pore individuel a été proposée [12]. Le processus comprend deux étapes, à savoir la crois-

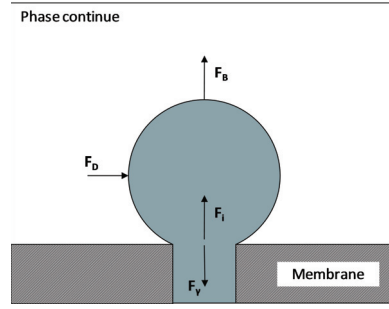


FIGURE 1.25 – Forces agissant sur une microbulle/gouttelette à la sortie d'un pore de la membrane pendant l'émulsification membranaire. F_γ : force de tension superficielle, F_D : force de cisaillement (pour Drag force), F_B : force de flottabilité (Buoyancy force) et F_i : force d'inertie et pression [12]

sance des microbulles/gouttelettes par gonflement, puis le détachement des microbulles/gouttelettes du pore.

1.4.4.2 Influence des différents paramètres

La taille et la distribution en taille des microbulles/gouttelettes en EMD dépend de nombreux paramètres : les paramètres membranaires (mouillabilité et charge de la surface de la membrane, porosité, distribution en taille des pores, morphologie des pores et disposition spatiale), les paramètres du procédé (contrainte de cisaillement à la surface de la membrane et flux transmembranaire) et les paramètres de formulation (viscosité des phases dispersée et continue, type et concentration de tensioactifs). En EMD, les principaux mécanismes de détachement de la microbulle/gouttelette à la sortie d'un pore sont les suivants : 1) le mécanisme est principalement contrôlé par la force de cisaillement, F_D , créée par la phase continue à la surface de la membrane. Ce mécanisme se produit lorsque la tension superficielle est élevée et que les pores de la membrane sont rectilignes et circulaires [137], 2) un mécanisme génère un détachement spontané des microbulles/gouttelettes dépendant principalement de la tension superficielle, F_γ , et peut être observé avec les pores tortueux, non circulaires des membranes SPG (Figure 1.21).

a) Paramètres du procédé

Pression transmembranaire La pression minimale pour forcer la phase dispersée à travers les pores est appelée la pression capillaire P_c lorsque la phase dispersée est un liquide et la pression de point de bulle P_{BP} lorsque la phase dispersée est un gaz [146]. Cette pression est donnée par l'équation de Young-Laplace :

$$P_c \text{ ou } P_{BP} = \frac{4\gamma \cos\theta}{D_p} \quad (1.6)$$

avec γ , la tension superficielle, D_p , le diamètre des pores et θ , l'angle de contact entre la surface de la membrane et la microbulle/gouttelette. Cette pression peut varier avec la configuration des pores et la porosité de la membrane (Figure 1.21). En effet, Vladislavljević et Schubert, 2003 [120] ont trouvé qu'une très faible quantité de pores est actif pour les membranes SPG, environ 2% pour

des très faibles flux transmembranaires, dû en grande partie à une tortuosité élevée. Le nombre de pores actifs augmente avec la pression transmembranaire [128]. La pression transmembranaire, ΔP_{tm} , est un paramètre important du procédé. Elle est définie comme la différence entre la pression de la phase dispersée, P_d , et la pression moyenne de la phase continue à l'entrée et à la sortie du module membranaire [147, 148] :

$$\Delta P_{tm} = P_d - \frac{P_{c,in} + P_{c,out}}{2} \quad (1.7)$$

où $P_{c,in}$, $P_{c,out}$ sont les pressions de la phase continue à l'entrée et à la sortie du module, respectivement. ΔP_{tm} doit être supérieure à P_c ou P_{BP} pour générer en grande quantité les microbulles/gouttelettes. Pour cela, le ratio $\Delta P_{tm}/P_c$, permet de caractériser ce paramètre. Si $\Delta P_{tm}/P_c < 1$ aucune microbulle/gouttelette n'est produite. $\Delta P_{tm}/P_c = 1,1$ est le ratio généralement utilisé pour générer des systèmes dispersés monodisperses. En effet, à des pressions transmembranaires légèrement supérieures à la pression capillaire, le tensioactif s'adsorbe et stabilise rapidement les microbulles/gouttelettes formant des diamètres plus petits et réduit la coalescence. Lorsqu'une pression transmembranaire critique ou une vitesse critique de la phase dispersée est dépassée, la formation spontanée des microbulles/gouttelettes est remplacée par un écoulement continu de la phase dispersée à travers les pores de la membrane. En effet, l'augmentation de la pression transmembranaire augmente le flux de la phase dispersée à travers la membrane, conformément à la loi de Darcy [148, 149] :

$$J = \frac{K \Delta P_{tm}}{\mu L} \quad (1.8)$$

où J est le flux de la phase dispersée, K , la perméabilité de la membrane, L , l'épaisseur de la membrane et μ , la viscosité de la phase dispersée.

Cisaillement à la surface de la membrane Dans un processus de formation de gouttelettes contrôlé par le cisaillement, de plus grosses gouttelettes se forment à un flux transmembranaire plus élevé (ligne 1 sur la figure 1.26), ce qui peut s'expliquer par le fait que le détachement n'est pas instantané. Pendant le temps nécessaire au détachement, une quantité supplémentaire de phase dispersée pénètre dans la microbulle/gouttelette en formation, ce qui entraîne une augmentation de la taille proportionnellement au débit de la phase dispersée [150].

Le détachement spontané contrôlé par la force de tension superficielle peut avoir lieu sous deux régimes déterminés par le nombre capillaire de la phase dispersée :

$$Ca = \frac{U_d \eta_d}{\gamma} \quad (1.9)$$

où U_d est la vitesse de la phase dispersée dans un pore et η_d est la viscosité de la phase dispersée. Lorsque le flux transmembranaire est faible, soit $Ca < Ca_{critique}$, les microbulles/gouttelettes sont formées par un régime dit « dripping regime ». Dans ce régime, la force de tension superficielle domine les forces d'inertie et de cisaillement [151] et la taille des gouttelettes est presque indépendante du flux transmembranaire ou de la contrainte de cisaillement (ligne 2 de la figure 1.26), des microbulles/gouttelettes de taille uniforme sont ainsi générées. Lorsque le flux transmembranaire augmente, les valeurs de U_d augmente aussi et les gouttelettes/microbulles gros-

sisent jusqu'à se détacher de la surface de la membrane. Dans ce régime, la force d'inertie domine la force de tension superficielle et la taille des microbulles/gouttelettes dépend fortement du flux transmembranaire. Lorsque le flux transmembranaire augmente, la taille moyenne et la distribution en tailles ont tendance à augmenter en raison de la coalescence des microbulles/gouttelettes à la surface de la membrane, jusqu'à atteindre un écoulement continu de la phase dispersée à la sortie du pore.

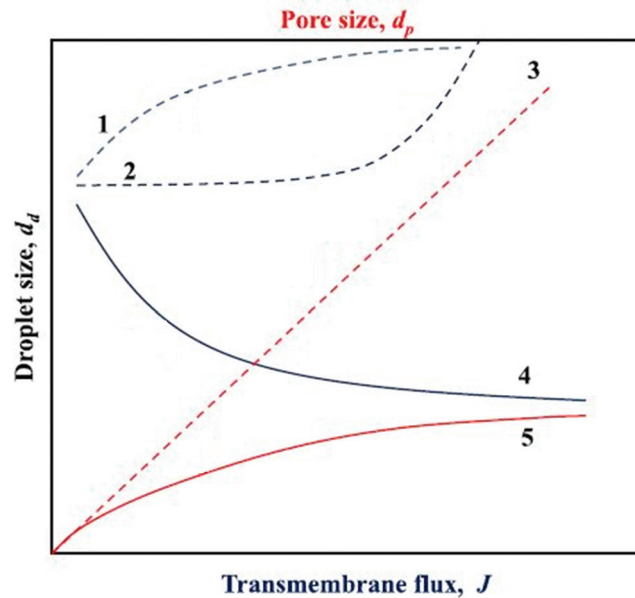


FIGURE 1.26 – Taille moyenne des gouttelettes, D_d , en EMD (lignes pointillées) par rapport à la taille moyenne des pores, D_p et flux transmembranaire, J . 1) D_d vs. J en EMD contrôlé par la force de cisaillement, 2) D_d vs. J en EMD contrôlé par la force de tension superficielle, 3) D_d vs. D_p en EMD contrôlé par la force de tension superficielle, 4) D_d vs. J en EMP 5) D_d vs. D_p en EMP [13]

b) Paramètres de la membrane

Diamètre des pores Les membranes les plus couramment utilisées pour la préparation d'émulsions sont les membranes SPG. Elles présentent des pores interconnectés et uniformes avec un large spectre de tailles de pores disponibles (0,1–20 μm) et une porosité élevée (50–60%). L'impact du diamètre des pores sur la taille des gouttes a été largement étudié, car c'est l'un des paramètres importants qui influence le diamètre des microbulles/gouttelettes formées. La variation du diamètre des microbulles/gouttelettes avec le diamètre des pores est différente si le mécanisme de détachement est dépendant de la contrainte de cisaillement ou de la tension superficielle. Dans le cas où la tension superficielle domine, le diamètre varie linéairement avec la taille des pores, avec un coefficient directeur, K' (ligne 3 sur la figure 1.26) :

$$D_{\text{goutte/bulle}} = K' D_{\text{pore}} \quad (1.10)$$

Pour les membranes SPG, le rapport entre la taille finale des gouttelettes et la taille des pores est comprise entre 2,8 et 3,5 [23, 130]. Ce rapport augmente pour la préparation de microbulles, dû en grande partie à la diminution de la viscosité de la phase dispersée gazeuse [117].

Pour le mécanisme de détachement contrôlé par cisaillement, la taille moyenne des gouttelettes n'est plus proportionnelle à la taille des pores et est déterminée par un équilibre entre la force de cisaillement de la phase continue et la force de tension superficielle. En effet, l'augmentation de la contrainte de cisaillement à la surface de la membrane contribue à diminuer le diamètre des microbulles/gouttelettes. Les rapports obtenus se situent entre 3 et 10 pour les membranes SPG. Cet intervalle s'explique par les différentes conditions opératoires et par le type de membrane SPG utilisée [152]. Pour d'autres membranes, ce rapport peut-être plus élevé entre 3 et 50 [148]. Dans ce cas, le diamètre des microbulles/gouttelettes augmente avec l'augmentation du flux transmembranaire et de la taille des pores, et diminue avec l'augmentation de la contrainte de cisaillement à la surface de la membrane.

Mouillabilité La mouillabilité de la membrane est essentielle pour une émulsification efficace. En effet, pour la préparation d'une émulsion H/E, la membrane doit être hydrophile de sorte que l'huile peut former une goutte plutôt que de s'étendre sur la surface de la membrane. Inversement, pour la préparation d'une émulsion E/H, la surface de la membrane doit être hydrophobe. La mouillabilité de la surface a également une grande influence pour la préparation de bulles, où la phase dispersée est un gaz [125].

La mesure de l'angle de contact permet d'étudier la mouillabilité d'une membrane, et notamment les modifications de surface. En effet, des traitements peuvent être appliqués pour modifier la mouillabilité de la surface, par exemple avec des silanes organiques [114, 125]. Dans ces études, une augmentation de l'angle de contact a montré une augmentation du diamètre moyen et une diminution de la monodispersité des bulles. Des microbulles monodispersées ont été générées à partir de membranes présentant un angle de contact inférieur à 45°. En revanche, des bulles relativement plus grandes avec une distribution de grand diamètre ont été obtenues lorsque l'angle de contact était supérieur à 45° [125].

La mouillabilité de la surface peut-être également modifiée par le tensioactif. Les membranes SPG sont chargées négativement en raison de la dissociation des groupes silanols en surface. L'interaction répulsive entre la tête hydrophile du tensioactif et la surface de la membrane et les faibles angles de contact contribuent à maintenir la surface de la membrane hydrophile. Cette condition est nécessaire à la formation de microbulles/gouttelettes monodisperses. En revanche, une interaction attractive entre un tensioactif cationique et la membrane conduit à une formation d'un échantillon polydisperse, parce que le tensioactif cationique s'adsorbe à la surface de la membrane, entraînant une diminution de l'hydrophilicité de la surface. Ce phénomène est observé à la fois pour la préparation de gouttelettes [112, 130] et de microbulles [124].

Porosité Un autre paramètre qui modifie la formation de microbulles/gouttelettes est la porosité. Pour une porosité élevée, les pores sont proches les uns des autres et la coalescence des microbulles/gouttelettes à la surface de la membrane est probable avant qu'elles ne se détachent. Ce phénomène se produit lors du contact de deux gouttelettes ou deux microbulles à la sortie de deux pores adjacents, conduisant à une coalescence avant le détachement. Par ailleurs, en présence d'une force de cisaillement due à la phase continue, les microbulles/gouttelettes sont déformées, de sorte qu'une distance plus grande doit être nécessaire entre des pores adjacents

par rapport à un mécanisme de détachement spontané. En revanche, si la porosité est très faible, le flux de la phase dispersée peut être insuffisant pour la production de gouttelettes [109].

c) Paramètres de formulation

Tensioactifs Deux caractéristiques sont importantes en ce qui concerne les agents tensioactifs : leur vitesse d'adsorption à la nouvelle interface et leur capacité à réduire la tension superficielle entre les deux phases. L'effet de la cinétique d'adsorption de tensioactifs à l'interface H/E en EMD sur la taille des gouttelettes a été étudié par Schröder et al. 1998 [144], Van der Graaf et al. 2004 [153] et Rayner et al. 2005 [154]. Plus les molécules de tensioactifs s'adsorbent rapidement à l'interface nouvellement formée, plus la taille des microbulles/gouttelettes est petite et plus la distribution en taille est étroite. Par conséquent, plus les molécules des tensioactifs s'adsorbent rapidement à l'interface, plus la tension superficielle de la phase aqueuse diminue rapidement. Egalement, une concentration plus élevée en tensioactif entraîne une diminution plus rapide de la tension superficielle, formant des diamètres plus petits. Par conséquent, une tension superficielle plus faible signifie que la force de tension superficielle retenant la microbulle/gouttelette à la sortie du pore est plus faible, ainsi la microbulle/gouttelette se détache plus tôt, et des tailles plus petites sont obtenues [155, 156]. L'adsorption rapide de tensioactifs permet également d'éviter le phénomène de coalescence des microbulles/gouttelettes formées provenant de deux pores adjacents, grâce à une rapide stabilisation de l'interface [126, 144, 156]. Etant donné que la probabilité de coalescence des microbulles/gouttelettes à la surface de la membrane diminue, une distribution de diamètre plus étroite est ainsi obtenue. La dynamique d'adsorption du tensioactif à l'interface dépend aussi de sa nature. En effet, les molécules de tensioactifs ne doivent pas interagir avec la surface de la membrane par des interactions de type van der Waals ou des interactions électrostatiques. Ces interactions peuvent être responsables d'un étalement de la phase dispersée à la surface de la membrane, et entraîner une génération de microbulles/gouttelettes non contrôlée. Des répulsions électrostatiques peuvent également se produire entre les microbulles/gouttelettes et la surface de la membrane de même charge, entraînant un détachement plus rapide, donc des tailles plus petites [130]. Les phospholipides présentent un comportement différent de celui des autres tensioactifs solubles. Il a été décrit que les phospholipides forment rapidement des vésicules à de très faibles concentrations, il leur faut donc plus de temps pour s'adsorber à la nouvelle interface H/E, car il faut d'abord que les molécules se dissocient des vésicules [156].

Viscosité Les viscosités de la phase dispersée et de la phase continue ont également un effet important sur les performances du procédé d'EMD. Deux cas sont possibles lorsque la viscosité de la phase continue augmente. Si le détachement est dépendant de la force de cisaillement, alors une viscosité plus élevée conduit à des microbulles/gouttelettes plus petites. En effet, la phase continue exerce un cisaillement plus élevé sur les gouttes lorsque leur viscosité augmente. Cela conduit à un détachement plus précoce des gouttes, d'où des tailles de gouttes plus petites [156]. Un effet contraire est observé dans le cas où le détachement est contrôlé par la force de tension superficielle. L'augmentation de la viscosité de la phase continue entraîne une augmen-

tation du diamètre des gouttelettes formées. La phase visqueuse continue retarde le détachement de la gouttelette, de sorte qu'elle se remplit de la phase dispersée avant de se détacher. Par conséquent, une distribution en taille plus large est obtenue due également à une diffusion plus lente du tensioactif à l'interface, conduisant au phénomène de coalescence [130].

En ce qui concerne l'influence de la viscosité de la phase dispersée, Kukizaki (2009) [130] a montré qu'une augmentation de la viscosité de la phase dispersée entraîne également une diminution de la taille des gouttes. Ceci s'explique par le fait que le flux de phase dispersée diminue selon la loi de Darcy, car le flux dispersé est inversement proportionnel à la viscosité de la phase dispersée (Equation 1.8). Dans ce sens, une phase dispersée huileuse est beaucoup plus visqueuse qu'une phase dispersée gazeuse. Ceci peut expliquer que des rapports D_{MB}/D_{pore} de l'ordre de 9 pour les microbulles sont bien supérieurs aux rapports D_{Goutte}/D_{pore} de l'ordre de 3.

1.4.5 Emulsification membranaire par prémix (EMP)

L'EMP pour la production d'une émulsion, a été présentée pour la première fois par Suzuki et al. 1996 [113]. En EMP, les membranes sont utilisées comme homogénéisateurs et les mécanismes de formation de gouttelettes sont différents de ceux en EMD. En effet, la formation des gouttelettes se produit dans les pores en EMP tandis qu'en EMD les gouttelettes se forment à la surface de la membrane à l'interface entre la phase dispersée et la phase continue. Le coût énergétique en EMP est relativement faible, d'un ordre de grandeur inférieur à celui en EMD pour les produits hautement concentrés [149]. En effet, la production d'émulsions avec des fractions de phase dispersée plus élevées est plus facilement obtenue en EMP. Le principe de ce procédé est qu'un prémix, c'est à dire un prémélange grossier, est poussé à travers une membrane poreuse, ce qui conduit à réduire la taille des gouttelettes et à améliorer la monodispersité de l'émulsion. La taille moyenne des gouttelettes de l'émulsion peut être précisément ajustée en fonction du diamètre des pores, de la pression transmembranaire et du nombre de passages à travers la membrane. Dans la plupart des cas, la membrane est totalement mouillée par la phase continue du prémix pour réduire l'émulsion en gouttelettes plus petites. L'inconvénient de l'EMP est le phénomène d'encrassement, en grande partie dû aux interactions entre les composants du prémix et la surface de la membrane. De manière générale, la force de cisaillement à l'intérieur des pores de la membrane est la principale force responsable de la réduction en taille des gouttelettes. D'autres types de phénomènes ont été identifiés comme mécanismes de rupture des grosses gouttelettes en plus petites [149].

1.4.5.1 Mécanismes de génération de gouttelettes

a) Cisaillement à la paroi des pores La réduction de la taille des gouttelettes en EMP est principalement due à la contrainte de cisaillement à la paroi. Cette contrainte de cisaillement est fonction de la vitesse du prémix dans les pores ainsi que de la géométrie des pores (taille, porosité et tortuosité). Cette contrainte de cisaillement à la paroi, $\tau_{w,p}$, peut s'exprimer comme [121] :

$$\tau_{w,p} = \frac{8\eta_e J \xi}{\epsilon D_p} \quad (1.11)$$

où η_e est la viscosité de l'émulsion, J est le flux transmembranaire, ξ est la tortuosité des pores, ϵ est la porosité de la membrane et D_p est le diamètre des pores. Pour une pression transmembranaire, ΔP_{tm} , inférieure à une pression critique, P_{crit} , les gouttelettes plus grandes que le diamètre des pores sont complètement retenues par la membrane. Dans ces conditions, les gouttelettes ne traversent pas la membrane et l'émulsification membranaire n'est pas possible (Figure 1.27 a)). Lorsque la pression transmembranaire augmente, les gouttelettes traversent la membrane, indépendamment de leur taille. Cependant, à des contraintes de cisaillement faibles à l'intérieur des pores, la taille finale des gouttelettes est plus grande que la taille des pores. Dans ce cas, les grosses gouttelettes sont déformées à l'intérieur des pores jusqu'à leur rupture due au frottement entre les gouttelettes et la paroi (Figure 1.27 b)). Lorsque les contraintes de cisaillement deviennent très élevées, les gouttelettes sont plus fortement perturbées à l'intérieur des pores en raison des collisions entre les gouttelettes et les parois, de sorte que la taille finale des gouttelettes devient inférieure à la taille des pores (Figure 1.27 c)).

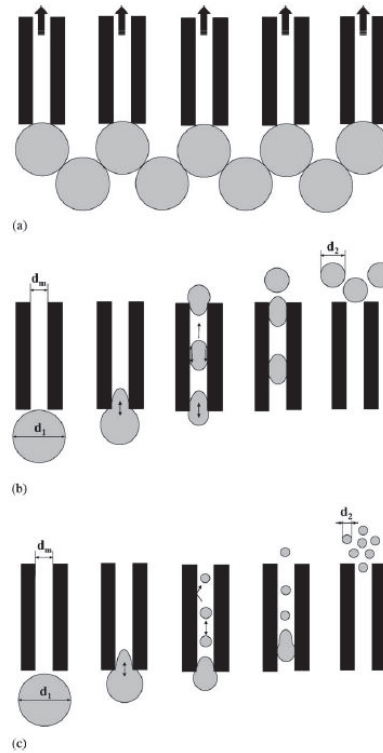


FIGURE 1.27 – Mécanisme de rupture de gouttelettes en EMP : a) $\Delta P_{tm} < P_{crit}$: rétention des gouttelettes à la membrane, b) $\Delta P_{tm} > P_{crit}$: rupture modérée à des contraintes de cisaillement modérées, c) $\Delta P_{tm} >> P_{crit}$: rupture intensive sous forte contrainte de cisaillement

b) Forces de cisaillement localisées Une autre contrainte de cisaillement peut être générée à l'intersection entre les pores [157, 158]. La différence de flux dans les branches génère une contrainte de cisaillement qui aide à réduire la taille des gouttelettes de l'émulsion. En particulier, une membrane SPG est composée de plusieurs pores ramifiés, complexes, avec des ramifications en Y et/ou T, l'effet de la force de cisaillement localisée sur la rupture des gouttelettes devient alors difficile à prédire. Selon Van der Zwan et al. 2006 [157] cette contrainte de cisaillement localisée

est plus importante à fort débit car pour de faibles débits très peu de pores ramifiés sont activés.

c) Instabilités de tension interfaciale Deux types d'instabilité peuvent se produire dûs à la tension interfaciale et dépendent des conditions d'écoulement du prémix dans les pores de la membrane. Les instabilités de Laplace se produisent lorsqu'une gouttelette s'allonge à de faibles débits pour former une forme en haltère, puis réduit la taille de la gouttelette. Par ailleurs, les instabilités de Rayleigh peuvent être présentes lorsque le flux de la phase continue est plus élevé [159]. Les gouttelettes restent allongées dans les pores, ce qui peut conduire à la production de gouttelettes polydisperses.

d) Obstacle stérique entre les gouttelettes Les gouttelettes proches à l'intérieur d'un pore peuvent également avoir un impact les unes sur les autres. Si l'interface est bien stabilisée, la coalescence ne se produit pas entre les gouttelettes. Ces gouttelettes accumulées dans les pores peuvent s'influencer mutuellement et induire ainsi une rupture en plus petites gouttelettes.

1.4.5.2 Influence de différents paramètres

a) Paramètres du procédé

Flux transmembranaire L'augmentation de la pression transmembranaire entraîne l'augmentation du flux à l'intérieur des pores de la membrane (loi de Darcy) générant une contrainte de cisaillement plus élevée et donc une réduction de la taille plus importante des gouttelettes. En EMP, la pression nécessaire pour formuler une émulsion monodisperse à partir d'un prémix est très largement supérieure à la pression transmembranaire en EMD. En effet, le prémix est composé d'une phase dispersée et d'une phase continue pouvant interagir avec les parois de la membrane, de sorte qu'une pression minimale est nécessaire pour garantir le passage total du prémix à travers la membrane. Par conséquent, pour éviter la filtration des gouttelettes dispersées et l'eau pénétrant dans la membrane, une pression plus élevée et constante est nécessaire pour réduire la taille et la monodispersité des gouttelettes. Dans ce cas, la pression transmembranaire, ΔP_{tm} , correspond à la somme de deux pressions : ΔP_{pore} correspondant à la pression d'écoulement nécessaire pour surmonter la résistance à l'écoulement à travers les pores de la membrane et $\Delta P_{réduction}$ la pression nécessaire pour surmonter la tension interfaciale entre l'huile et l'eau afin de réduire la taille des gouttelettes et leur passage à travers la membrane [121, 149].

$$\Delta P_{tm} = \Delta P_{pore} + \Delta P_{réduction} \quad (1.12)$$

avec,

$$\Delta P_{pore} = \eta_e R_m J \quad (1.13)$$

où η_e est la viscosité de l'émulsion dans les pores, R_m est la résistance de la membrane, J le flux transmembranaire.

$$\Delta P_{réduction} = C\phi\gamma_{eq}D_G \quad (1.14)$$

où C est une constante, ϕ est la fraction volumique de la phase dispersée dans l'émulsion, γ_{eq} est la tension interfaciale à l'équilibre entre la phase dispersée et la phase continue et D_G est la taille des gouttelettes.

Nombre de passages à travers la membrane En EMP, la nécessité de réaliser plusieurs cycles dépend du type de membrane utilisée. Pour les membranes tortueuses et ramifiées, comme la membrane SPG, la contrainte de cisaillement est plus importante. En effet, ces membranes sont plus épaisses comparées à d'autres membranes ce qui explique pourquoi un seul passage d'extrusion est généralement suffisant [115, 122, 160], alors que les membranes polymères plus fines et moins tortueuses nécessitent jusqu'à 21 cycles d'extrusion [115, 160] pour obtenir des gouttelettes de diamètre proche de la taille des pores et monodisperses. Cependant, les composants du prémix peuvent avoir des effets négatifs lorsqu'ils encrassent la membrane. Surh et al. 2008 [161] ont étudié la préparation d'émulsions H/E stabilisées par la lécithine (zwitterionique) par EMP répétée à l'aide de membranes SPG (charge négative). Ils ont constaté que lorsque le nombre de passages à travers la même membrane augmentait de 1 à 5, le flux transmembranaire diminuait fortement en raison de l'encrassement de la membrane dû à interaction entre la surface de la membrane et la lécithine, malgré sa charge nette négative.

b) Paramètres de la membrane La taille des pores a une influence directe sur la contrainte de cisaillement à la paroi. En fonction de la pression transmembranaire et de la taille des pores, le rapport entre la taille des gouttelettes et la taille des pores varie généralement de 1 à 1,5 pour les membranes SPG [23]. Une tortuosité plus élevée augmente la contrainte de cisaillement, comme prédit par l'équation 1.11. De plus, les membranes SPG présentent beaucoup de ramifications, ce qui peut créer plus de contraintes de cisaillement et une réduction plus efficaces de la taille. Au contraire, pour ce type de géométrie, de très faibles pores sont actifs, inférieur à 8% [90], ce qui entraîne une pression plus élevée pour la même surface de membrane et la même taille de pore. Des membranes plus épaisses ont donné des émulsions plus uniformes, indiquant une fragmentation multiple à l'intérieur des pores de la membrane. La membrane doit être totalement mouillée par la phase continue caractérisée par un faible angle de contact à l'interface entre la membrane et la phase continue. Dans le cas contraire, l'EMP forme une émulsion polydisperse et une plus grande taille des gouttelettes. Une membrane mouillée par la phase dispersée peut également entraîner une inversion de phase.

c) Paramètres de formulation

Prémix En EMP, la taille des gouttelettes est indépendante de la distribution en taille du prémix et de la quantité de la phase dispersée sur une large plage (1–60 vol%) [149]. Cependant, la pression transmembranaire dépend fortement de la teneur en phase dispersée en raison de l'augmentation de la viscosité. En effet, la taille des gouttelettes dépend principalement de la taille moyenne des pores et de la contrainte de cisaillement à la paroi.

Tensioactifs En EMP, de nombreuses nouvelles interfaces sont créées à l'intérieur des pores de la membrane. Une forte concentration en tensioactif dans le prémix permet de stabiliser ra-

pidement les gouttelettes plus petites. En effet, la tension interfaciale entre les deux phases et la cinétique d'adsorption du tensioactif jouent un rôle important dans la stabilisation des nouvelles gouttelettes, réduisant également leur probabilité de coalescence.

Viscosité En général, le flux est inversement proportionnel à la viscosité de l'émulsion, comme indiqué par l'équation 1.8. La viscosité de l'émulsion sera proche de la viscosité de la phase continue pour une faible fraction de phase dispersée. La viscosité peut devenir considérablement plus élevée lorsque le pourcentage de phase dispersée par rapport à la phase continue augmente. De plus, la viscosité de la phase continue influence la contrainte de cisaillement à la paroi, comme indiqué dans l'équation 1.11, qui sera donc plus élevée pour les liquides visqueux, entraînant la formation de gouttelettes plus petites [122].

1.5 Conclusion

Les ACUs ont montré un intérêt majeur en imagerie médicale ultrasonore. A l'aide d'une sonde échographique, les ACUs permettent d'augmenter l'échogénicité du sang, fournissant au praticien une meilleure qualité de l'image échographique et ainsi une amélioration du diagnostic médical. En général, les ACUs sont des microbulles composées de gaz, stabilisées par une enveloppe biocompatible (tensioactifs, phospholipides, protéines). Le gaz constituant les microbulles peut être de l'air, de l'azote ou des gaz inertes tels que les PFCs, qui augmentent fortement la demi-vie des microbulles. Afin d'augmenter la stabilité des ACUs, une alternative à l'utilisation de microbulles a été proposé. En effet, des microgouttelettes de PFC peuvent être vaporisées sous l'action d'ondes acoustiques, et présentent ainsi un intérêt pour des applications potentielles à la fois en imagerie et en administration de médicaments.

La taille des ACUs est un paramètre critique qui doit être judicieusement contrôlé entre des limites bien définies. Un compromis doit être réalisé entre l'obtention d'un signal suffisamment fort et la taille maximale des ACUs pouvant être injectés. En effet, la limite de taille supérieure acceptable pour leur administration est déterminée par la capacité des ACUs à traverser les plus petits capillaires pulmonaires, afin d'éviter toute complication médicale. Cependant, une faible diminution du diamètre moyen engendre une réduction significative de l'énergie ultrasonore réfléchi. Par conséquent, l'échogénicité qui caractérise l'ACU à réfléchir les ultrasons, sera d'autant plus grande que son diamètre sera grand. Dans le cas inverse, les microbulles de plus petit diamètre vont diffuser beaucoup moins d'énergie que les grandes, un signal plus faible sera détecté par la sonde échographique. Dans ce sens, l'utilisation d'un échantillon de microbulles monodisperses permettrait d'obtenir un signal ultrasonore uniforme au niveau de la zone observée.

Actuellement, de nombreux procédés d'émulsification ont été mis au point, où l'énergie appliquée permet de déformer l'interface entre les deux phases jusqu'à la formation de microbulles/gouttelettes, en fonction de la phase dispersée. Les procédés à haute énergie, notamment ceux utilisant l'agitation mécanique et la sonication nécessitent un taux de cisaillement suffisant pour réduire la taille de l'élément dispersé. Cependant, un désavantage de ce type de procédés est leur absence de contrôle de la taille et de la distribution en taille des microbulles/gouttelettes formées. Bien qu'il existe des méthodes de tri efficaces pour réduire la distribution, le rendement des ACUs

est réduit et des diamètres spécifiques sont difficiles à obtenir. Ainsi, dans le but de contrôler au mieux la préparation de ces systèmes dispersés, de nouvelles méthodes de préparation basées sur des dispositifs membranaires sont particulièrement intéressantes. En effet, l'avantage principal de cette technique est d'offrir un meilleur contrôle de la taille des microbulles/gouttelettes, avec des distributions de taille beaucoup plus étroites, sans réduction significative du rendement et une possible compatibilité avec des actifs sensibles au cisaillement et à la température.

L'objectif général de la thèse porte donc sur le développement de nouvelles techniques à membrane pour la formulation de microbulles et de microgouttelettes de taille contrôlée, en vue d'applications en imagerie et thérapie ultrasonore. La première étape consistait à développer un procédé membranaire capable de produire des microbulles et de comprendre les paramètres du procédé, de membrane et de formulation influençant la faisabilité à contrôler la taille et l'obtention de microbulles monodisperses. La deuxième étape a été d'adapter le procédé membranaire afin de produire des microbulles présentant les caractéristiques des formulations d'ACUs commerciales et également d'améliorer leur stabilité. La dernière partie traite de la préparation de microgouttelettes de PFC par un procédé membranaire. Nous avons étudié l'influence de différents paramètres de procédé, de membrane et de formulation sur leur production. Par ailleurs, nous avons observé l'influence de la taille, la distribution en taille, la température, le type de PFC et la présence d'une double phase dispersée sur le seuil de vaporisation des gouttelettes en microbulles.

Chapitre 2

Méthodes expérimentales

Contents

1.1	Ultrasons pour applications médicales	6
1.1.1	Généralités sur l'imagerie ultrasonore	6
1.1.2	Microbulles	12
1.1.3	Emulsions	18
1.2	Physico-chimie des systèmes dispersés	22
1.2.1	Principales propriétés physico-chimiques	23
1.2.2	Stabilité des systèmes dispersés	25
1.3	Procédés de fabrication	29
1.3.1	Procédés utilisant l'agitation mécanique	30
1.3.2	Procédés utilisant les ultrasons (sonication)	31
1.3.3	Procédés microfluidiques	33
1.3.4	Autres procédés de fabrication	34
1.4	Procédés membranaires	35
1.4.1	Généralités	35
1.4.2	Membranes	37
1.4.3	Modules	39
1.4.4	Emulsification membranaire directe (EMD)	42
1.4.5	Emulsification membranaire par prémix (EMP)	48
1.5	Conclusion	52

Ce chapitre décrit le matériel, les procédés, ainsi que les procédures utilisées pour la préparation de systèmes dispersés composés de PFC. Les molécules et composants, les fournisseurs correspondants et les caractéristiques des produits sont indiqués. Dans un premier temps sont détaillés l'équipement développé pour la préparation de microbulles de PFC, puis dans un second temps celui utilisé pour la préparation de gouttelettes de PFC. Puis, les méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des suspensions sont décrites. Enfin, l'équipement et la méthode pour la caractérisation acoustique des microbulles/gouttelettes produites sont présentées.

2.1 Microbulles de PFC

2.1.1 Matériels

2.1.1.1 Tensioactifs solubles

Les principaux tensioactifs utilisés pour la préparation de microbulles avec le procédé membranaire de type "cross-flow" sont le dodécylsulfate de sodium (SDS), le monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitan (Tween 20) ou le polyoxyéthylène (40) stearate (PEG40S). Ainsi, trois tensioactifs ont été utilisés pour faciliter la formation de microbulles avec un procédé membranaire, un tensioactif anionique et deux tensioactifs non ioniques. Les trois tensioactifs ont été achetés chez Sigma Aldrich (France). Une liste des tensioactifs utilisés dans les expériences est présentée dans la figure 2.1.

- SDS : dodécylsulfate de sodium, tensioactif anionique qui diminue grandement la tension superficielle des solutions aqueuses. Il est principalement utilisé comme émulsifiant, agent mouillant, tensioactif dans les cosmétiques, et également comme outil de recherche en biochimie.
- Tween 20 : le monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitan est un détergent non ionique de type polysorbate utilisé dans de nombreuses applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.
- PEG40S : le polyoxyéthylène (40) stearate est un agent tensioactif non ionique qui est non toxique et approuvé par la FDA pour une utilisation comme excipient ou dans différentes formulations pharmaceutiques et cosmétiques. Il présente sur sa partie hydrophile une macromolécule de PEG.

L'eau ultrapure pour préparer les solutions aqueuses a été obtenue en utilisant un système Synergy (Millipore, France). La phase continue était composée de 1,0 wt% de tensioactifs dans une solution saline à 0,9% de NaCl comme pour une solution parentérale. Il a été montré également que la préparation de microbulles était améliorée grâce à l'ajout de NaCl dans la solution aqueuse [162]. Dans la plupart des expériences, la concentration totale de tensioactifs a été fixée à 1,0 wt% qui est une valeur largement supérieure à la CMC de chaque tensioactif, permettant de garantir que les microbulles nouvellement formées sont immédiatement stabilisées par les tensioactifs.

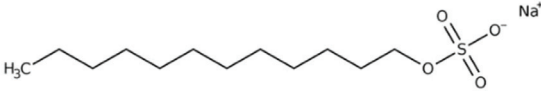
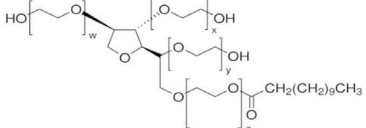
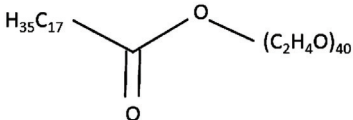
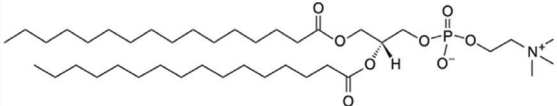
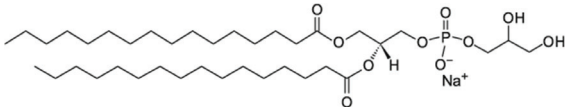
Tensioactifs	Formule	Masse moléculaire (g/mol)	CMC dans l'eau (mol/L)
Dodecylsulfate de sodium (SDS) 	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	288,4	$8,2 \cdot 10^{-3}$
Monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitan (Tween 20) 	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	1227,5	$5 \cdot 10^{-5}$
Polyoxyéthylène (40) stearate (PEG40S) 	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{40}$	2043	$8 \cdot 10^{-5}$
1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) 	$\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$	734,0	$4,6 \cdot 10^{-10}$
1,2-Dipalmitoylphosphatidyl glycerole (DPPG) 	$\text{C}_{38}\text{H}_{74}\text{O}_{10}\text{PNa}$	744,9	-

FIGURE 2.1 – Caractéristiques physico-chimiques des principaux tensioactifs utilisés (CMC : Concentration Micellaire Critique à 25°C) [14, 15]

2.1.1.2 Tensioactifs insolubles (phospholipides)

La préparation de microbulles stabilisées par des molécules insolubles telles que les phospholipides a été réalisée avec un procédé membranaire de type microkit. Le phospholipide utilisé est le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) qui présente une charge négative sur sa partie hydrophile. Le phospholipide a été acheté chez Lipoid (Suisse), et se présente sous la forme d'une poudre blanche, conservée à 4°C (Figure 2.1). En générale, c'est le DPPC qui est le lipide le plus courant pour stabiliser les microbulles dans les applications médicales ultrasonores. En effet, ce phospholipide est le phospholipide membranaire majeur des cellules eucaryotes et il est utilisé également pour la préparation de suspensions de liposomes (vésicules stabilisées par des bicouches lipidiques). Le DPPC présente deux charges opposées sur sa partie hydrophile, il est zwitterionique du fait d'une charge négative sur le groupe phosphate et d'une charge positive sur le groupe ammonium. Afin d'éviter l'interaction entre la charge positive du DPPC et la charge négative à la surface de la membrane SPG, comme observée chez Surh et al. 2008 [161], le DPPG a été choisi comme molécule pour stabiliser les microbulles formées.

Le phospholipide apporte la majorité des propriétés viscoélastiques de l'enveloppe fluide, capable de se comprimer et se dilater avec l'onde acoustique. Les phospholipides présentent une tête hydrophile mais contrairement aux tensioactifs classiques, ils sont composés de deux chaînes

hydrocarbonées. La présence de ces deux chaînes permet d'augmenter les forces hydrophobes et les forces attractives de van der Waal entre les molécules lipidiques rigidifiant la structure de l'enveloppe. Cette rigidité est souvent accompagnée d'une perméabilité aux gaz plus faible. En conséquence, les microbulles constituées de lipides avec des chaînes hydrophobes plus longues ont une durée de vie supérieure. Comme pour les liposomes, les groupements se trouvant sur la partie hydrophile des lipides constituent une surface pouvant être fonctionnalisée avec diverses molécules permettant par exemple le ciblage en imagerie moléculaire ultrasonore.

Les microbulles ne sont pas uniquement stabilisées par les lipides. Des agents émulsifiants sont présents dans les formulations de microbulles augmentant le rendement et la stabilité des microbulles produites. Par exemple, certaines formulations contiennent un phospholipide fonctionnalisé avec une macromolécule de PEG (DSPE-PEG2000) [163]. Cependant, l'utilisation d'un PEG ancré dans les lipides est relativement chère. Il est possible aussi d'utiliser le polyoxyéthylène (40) stearate (PEG40S) qui présente une plus grande solubilité dans l'eau [164, 165, 166]. Le rôle principal de l'émulsifiant est d'aider la génération de microbulles et d'empêcher leur coalescence. Une fois que la monocouche se forme, le PEG forme "une brosse" qui inhibe la coalescence des microbulles grâce à une force répulsive de type stérique. En général, le rapport molaire entre le phospholipide et le PEG40S est de 9 :1 [89, 167, 168].

Lyophilisation Lors de la préparation de suspensions de phospholipides, les lipides sont d'abord dissous et mélangés dans un solvant organique, pour assurer un mélange homogène des molécules. Habituellement, le chloroforme est utilisé et est ensuite évaporé en utilisant un flux d'azote ou d'argon pour obtenir une poudre sèche. Dans notre cas, un mélange de tert-butanol/eau (ratio massique 9 :1) a été utilisé pour dissoudre les molécules. Puis, le solvant organique a été éliminé par lyophilisation grâce à un lyophilisateur Cryonext (Figure 2.2). Cet appareil est composé de quatre étagères d'une surface de 1,3 m² avec une circulation de fluide caloporteur pouvant aller de -60°C à +60°C, d'un piège refroidi à -85°C, de deux sondes pour la mesure du vide (sonde capacitive et pirani) et de trois sondes de température de type thermocouple. La lyophilisation est un procédé qui permet de retirer le solvant contenu dans un produit, afin de le rendre stable à température ambiante et de faciliter ainsi sa conservation. La lyophilisation est constituée de trois étapes, elle commence par une congélation du produit puis l'échantillon est soumis à une évaporation sous vide ou dessiccation primaire. Ceci permet de faire passer le solvant directement de l'état solide à l'état gazeux. La dessiccation secondaire permet d'extraire par désorption les molécules de solvant piégées à la surface des produits séchés. Le lyophilisateur utilisé a été préféré à un lyophilisateur de type paillasse en raison des grandes quantités de phospholipides nécessaires à la préparation de microbulles.

Pour ce faire, nous avons dissout des phospholipides à 2,5 wt% dans un mélange de tert-butanol/eau (9 :1) dans un bain-marie à 50°C. Puis, 12 ml de cette solution a été réparti dans des flacons de lyophilisation de 50 mL chacun. Enfin, les flacons ont été placés sur les étagères du lyophilisateur. La procédure de lyophilisation utilisée est la suivante :

Pour la congélation :

- Les flacons sont congelés à -1°C à une vitesse de (1°C/min) pendant 20 min.
- Puis à 0,1°C/min de -1°C à -15°C pendant 140 min.



FIGURE 2.2 – Lyophilisateur Cryonext; Image de flacons avant/après la lyophilisation

- Puis à 0,5°C/min de -15°C à -50°C pendant 70 min. Cette température est maintenue 120 min.

Pour la dessiccation primaire :

- Une température de -45°C est maintenue pendant 15 min à 300 µbar.
- Puis 0,25°C/min de -50°C à -35°C pendant 60 min à 300 µbar. Cette température de -35°C est maintenue 120 min.
- Puis 0,25°C/min de -35°C à -20°C pendant 60 min à 200 µbar. Cette température de -20°C est maintenue 120 min.
- Puis 0,5°C/min de -20°C à +5°C pendant 50 min à 100 µbar. Cette température de +5°C est maintenue 180 min.
- Puis 10 min à +5°C à 50 µbar.

Pour la dessiccation secondaire :

- 0,5°C/min de +5°C à +25°C pendant 40 min à 20 µbar. Cette température de +25°C est maintenue 24 h.

L'hydratation du gâteau lipidique sec est ensuite réalisée en ajoutant un milieu aqueux et en agitant. La température du milieu hydratant de 55°C est supérieure à la température de transition des lipides pour faciliter la formation des liposomes. Afin de réduire la taille des liposomes, la suspension a été placée dans une cuve à ultrasons à 55°C, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Il a été également réalisé dans certaines expériences, une hydratation du gâteau lipidique avec une solution aqueuse contenant du glycérol et/ou du propylène glycol.

2.1.1.3 Gaz

Les microbulles sont composées de PFC ou d'air en tant que phase gazeuse dispersée. L'air utilisé provient du réseau de gaz du laboratoire, préalablement filtré par un filtre à air JUN-AIR. Les

PFC ont été achetés auprès de F2 Chemicals Ltd (Preston, Royaume-Uni 70). L'octafluoropropane, C_3F_8 , est le gaz majoritairement décrit dans la préparation de microbulles comme ACUs. C'est un gaz liquéfié qui présente une pression de vapeur de 792 kPa et une solubilité dans l'eau à 25°C faible de $0,19 \text{ mol.m}^{-3}$ [47]. Les gaz de PFC ont un poids moléculaire élevé (188 g/mol) ce qui permet d'améliorer la persistance des microbulles dans la circulation sanguine. Également, ils peuvent être associés à un second gaz, généralement le N_2 , dans la préparation de microbulles [21]. En effet l'afflux de N_2 , pour atteindre un équilibre osmotique entre le gaz dans la bulle et dans la solution, est réduit avec ce mélange de gaz, ce qui a pour effet d'augmenter leur stabilité.

2.1.2 Procédés membranaires

2.1.2.1 Modules et membranes SPG

Deux longueurs de membranes SPG ont été utilisées en fonction du type de module (Figure 2.3). Les membranes SPG sont hydrophiles et ont été fournies par SPG Technology Co. Ltd (Miyazaki, Japon) ainsi que les modules. Les membranes d'une longueur de 125 mm ont été utilisées avec le module de type cross flow (Figure 2.4), et celles d'une longueur de 20 mm avec le module de type microkit (Figure 2.5).

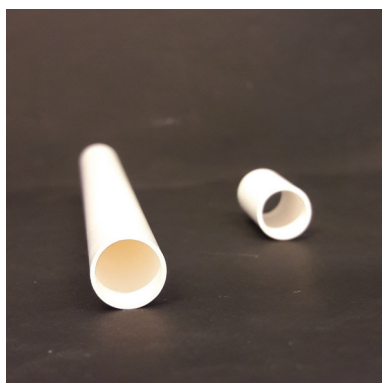


FIGURE 2.3 – Membranes SPG hydrophiles et tubulaires, à gauche pour module cross flow d'une longueur de 125 mm et à droite pour module microkit d'une longueur de 20 mm

Les membranes SPG sont tubulaires avec un diamètre intérieur de 8,3 mm et une épaisseur de 0,75 mm. Trois membranes SPG ont été utilisées avec des diamètres de pores de 0,2, 0,5 et 1,1 μm et des distributions en taille caractérisées par un span compris entre 0,4 et 0,6. Ces membranes ont été placées à l'intérieur du module et afin de maintenir une bonne étanchéité, deux joints toriques en caoutchouc sont placés aux extrémités du tube de la membrane ce qui réduit la surface effective à $27,4 \text{ cm}^2$ pour les membranes de 125 mm et à $3,2 \text{ cm}^2$ pour celles de 20 mm.

2.1.2.2 Procédé d'émulsification directe

a) Méthode Le procédé membranaire permet de mettre en contact deux phases non miscibles pour la préparation de microbulles. La Figure 2.6 montre les différents éléments utilisés pour le

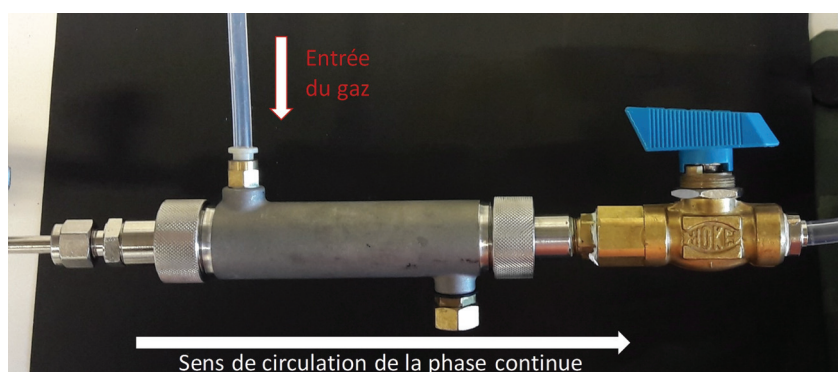


FIGURE 2.4 – Module de type cross flow en acier inoxydable fourni par SPG Technology Co. Ltd



FIGURE 2.5 – Module de type microkit en acier inoxydable fourni par SPG Technology Co. Ltd

contrôle de la phase continue en bleu et ceux contrôlant la phase dispersée en rouge. Une structure métallique permet de maintenir et d'agencer les différents éléments autour du module membranaire. Il a été choisi de placer sur la gauche, la phase dispersée et la phase continue qui passent à travers les différents éléments, avec en haut ceux pour le gaz et en bas la pompe utilisée pour faire circuler la phase continue. La suspension de microbulles est ensuite récupérée sur la droite dans le "sens de la lecture".

Des raccords haute pression de type Swagelock et des tubes inox de 6 mm ont été utilisés afin de faire circuler la phase dispersée gazeuse jusqu'au module membranaire. Les dispositifs de contrôle de la pression du gaz ont été achetés chez Swagelock, France. Le détendeur en sortie de la bouteille de gaz a permis de détendre la pression (au alentour de 7-8 bars) à une pression inférieure. Le détendeur est en inox de configuration F (de droite à gauche) avec une pression maximale en entrée de 34,4 bars et une pression maximale en sortie de 17,2 bars. Deux manomètres en inox (0-25 bars) placés sur le détendeur permettent de connaître la pression à l'intérieur de la bouteille de gaz et la pression appliquée. Le gaz passe ensuite dans un débitmètre massique

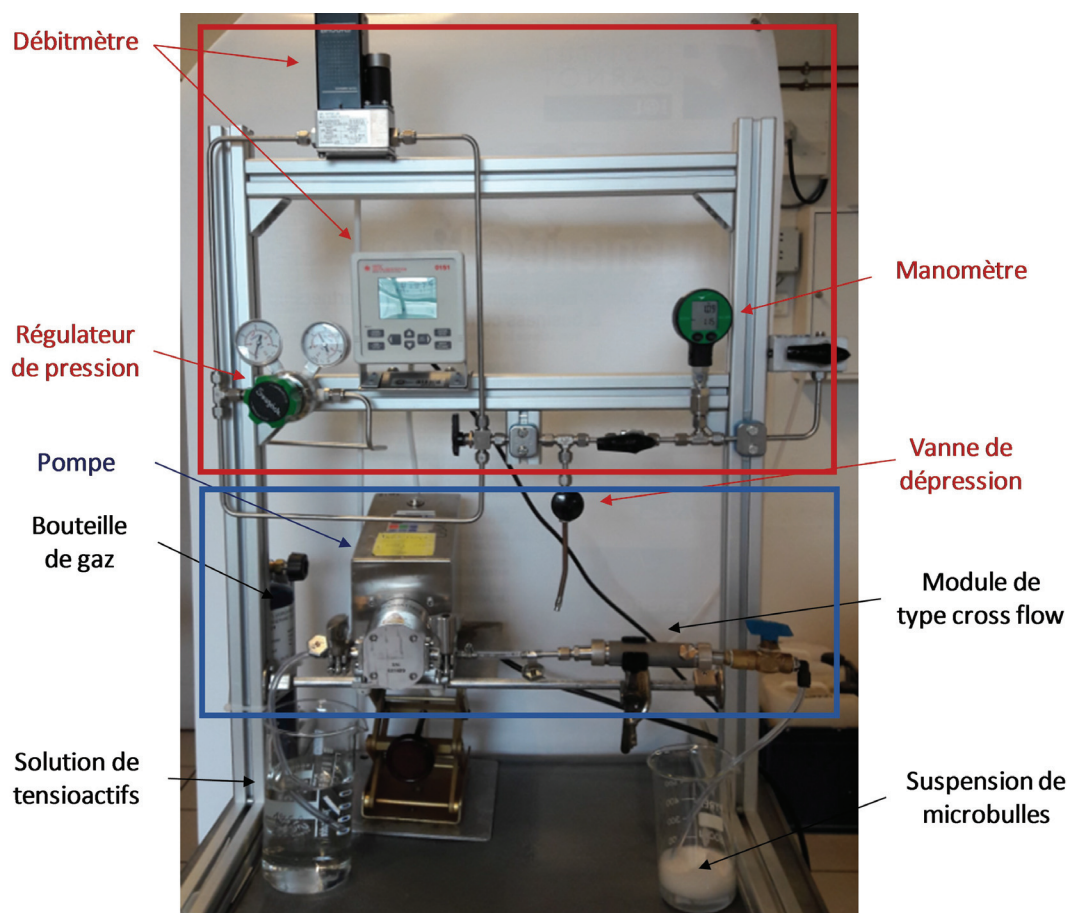


FIGURE 2.6 – Procédé membranaire pour la préparation de microbulles avec un module de type cross flow. En rouge les éléments contrôlant la phase dispersée et en bleu celui contrôlant la phase continue

Brook (Serv' Instrumentation, Lyon, France). Ce débitmètre a été calibré pour une utilisation avec l'octafluoropropane, pour une gamme de débits de 0,003 à 50 mL/min et une pression maximale en entrée de 8 bars. Un coffret d'affichage est connecté au débitmètre afin de suivre l'évolution du débit au cours du temps. Enfin, un manomètre numérique Keller, pouvant aller jusqu'à 30 bars, est placé juste avant le module membranaire afin de suivre l'évolution de la pression de manière précise. Différentes vannes ont été placées entre les différents éléments du montage, pour observer la chute de pression créée par le passage du gaz à travers la membrane. Une vanne de dépression a été également placée en cas de surpression, afin de réduire la pression et d'évacuer le gaz des tuyaux.

Une pompe Quattroflow 150S (Pall, France) a été utilisée pour faire circuler la solution aqueuse (la phase continue) à l'intérieur du tube de la membrane et ainsi récupérer les microbulles produites. La pompe Quattroflow est une pompe à quatre pistons/membranes, dans laquelle les quatre segments sont entraînés de manière séquentielle par un anneau de liaison, qui se déplace vers l'avant et l'arrière au moyen d'un arbre excentrique et crée ainsi le mouvement.

Pour la génération de microbulles avec le module cross flow, nous nous sommes intéressés à la présence d'un fort ou faible cisaillement (τ_w) à la surface de la membrane. Dans le cas d'un faible cisaillement en surface de 0,73 Pa, la pompe a été utilisée principalement pour prélever les mi-

crobulles formées à l'intérieur de la membrane tubulaire. Le taux de cisaillement est calculé en utilisant l'équation :

$$\tau_w = \frac{4\mu V_d}{R} \quad (2.1)$$

où R est le rayon intérieur du tube de la membrane (m), μ est la viscosité dynamique (Pa.s) et V_d est la vitesse moyenne de la phase continue dans le tube (m.s^{-1}).

Afin d'observer l'influence de la force de cisaillement à la surface de la membrane, nous avons introduit une tige de polytétrafluoréthylène (PTFE) (diamètre de 6,3 mm) à l'intérieur de la membrane tubulaire (Figure 2.7). L'ajout de la tige a permis, pour un même débit, d'augmenter la force de cisaillement de la phase continue à la surface de la membrane par réduction du diamètre effectif. Six tiges métalliques ont été usinées à l'intérieur de la tige de PTFE afin de laisser dépasser 1 mm à la surface de la tige. Trois tiges métalliques ont été placées à 2 cm d'une extrémité et trois autres à la seconde extrémité. Le maintien de la tige au centre de la membrane a été possible grâce à la répartition des six tiges métalliques. Le centrage fournit une distance constante entre la tige de PTFE et la surface de la membrane, ce qui permet de maintenir une force de cisaillement constante sur toute la longueur. Deux tiges métalliques supplémentaires ont été ajoutées à une des extrémités afin d'éviter le déplacement de la tige de PTFE dans le module cross flow. Dans cette configuration, la contrainte de cisaillement au niveau de la paroi de la membrane, τ_w , est bien plus élevée (31,8 Pa) et calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\tau = 4\mu V_d \frac{R_2 - R_1}{R_1^2 + R_2^2 - \frac{R_2^2 - R_1^2}{\ln(R_2/R_1)}} \quad (2.2)$$

où R_1 est le rayon de la tige (m) et R_2 est le rayon intérieur de la membrane (m) [169].

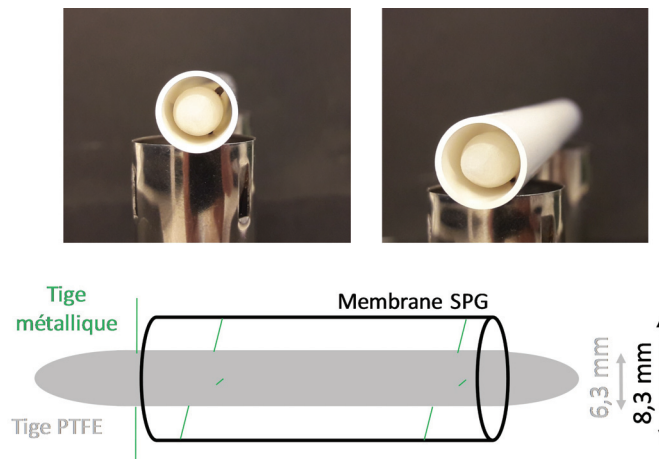


FIGURE 2.7 – En haut, deux images montrant la tige de PTFE à l'intérieur d'une membrane SPG permettant d'augmenter la force de cisaillement à la surface de la membrane. En bas une représentation schématique du dispositif réalisé

Le module de type microkit s'adapte parfaitement à la structure présentée avec un module de type cross flow. Il suffit de retirer la pompe utilisée pour faire circuler la phase continue et de connecter le tuyaux d'arrivée du gaz au module, comme sur la Figure 2.8. Dans cette configuration, une

agitation magnétique génère un taux de cisaillement à l'intérieur du module microkit facilitant le détachement des microbulles à la surface de la membrane.

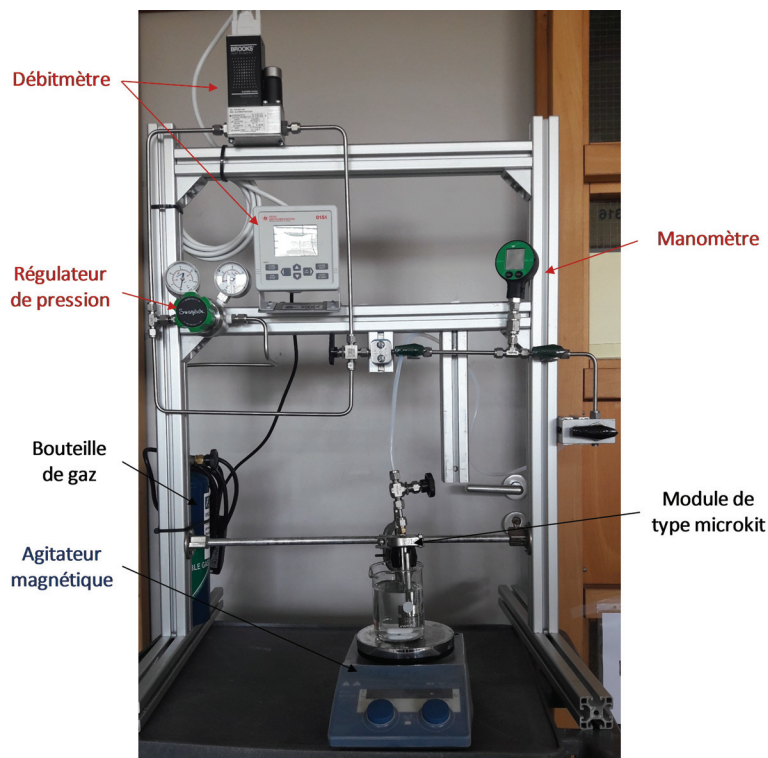


FIGURE 2.8 – Procédé membranaire pour la préparation de microbulles avec un module de type microkit

b) Formulation de microbulles Avant chaque préparation de microbulles, la membrane SPG a été placée dans une solution de tensioactif puis dans une cuve à ultrasons pendant 5 min, afin de garantir une mouillabilité totale de la phase continue avec la membrane. Une pince en plastique est utilisée pour placer la membrane dans le module membranaire. Puis, les deux joints toriques sont ajoutés aux extrémités de la membrane avant de fermer le module. Une première circulation de la phase continue est effectuée remplissant l'intérieur du tube. Après l'ouverture de la bouteille de gaz, le détendeur permet d'appliquer une pression du côté extérieur de la membrane. Une chute de pression au niveau du manomètre permet de déterminer la pression de point de bulle, P_{BP} , confirmée par la présence de microbulles à la sortie du module membranaire. Une pression transmembranaire correspondant à $1,1 \times P_{BP}$ est alors appliquée et le débit de la phase dispersée est indiqué par le débitmètre. En raison de la grande instabilité des microbulles, une première circulation de la phase continue est alors effectuée et les microbulles produites ne sont pas mesurées. Puis, une seconde circulation génère les microbulles qui sont analysées et dont les tailles et les distributions en tailles sont mesurées.

Dans la configuration microkit, la procédure de préparation de microbulles est identique, l'agitation magnétique à 500 rpm est démarrée avant l'apparition des premières microbulles.

2.2 Emulsions de PFC

2.2.1 Matériels

2.2.1.1 Tensioactifs

Les principaux tensioactifs utilisés pour la préparation de gouttelettes de PFC par émulsification membranaire par prémix ont été le Tween 20 et le PEG40S (Figure 2.1). La phase continue était composée de 2,0 wt% du mélange de tensioactifs Tween20 :PEG40S, avec un ratio molaire de 9 :1. Dans la plupart des expériences, la concentration totale de tensioactif fixée à 2,0 wt% était largement supérieure à la CMC de chaque tensioactif, permettant de garantir une stabilisation rapide et efficace des tensioactifs à l'interface de la gouttelette. Le Tween 20 et PEG40S sont tous deux approuvés par la FDA pour une administration intraveineuse et sont inoffensifs en faible quantité.

2.2.1.2 Liquide de perfluorocarbone

Les PFCs sont des molécules organiques dans lesquelles tous les atomes d'hydrogène sont remplacés par du fluor. En raison de la spécificité de la liaison carbone-fluor, leurs propriétés physico-chimiques les rendent attractifs pour les applications médicales. La solubilité élevée de l'oxygène, la faible tension superficielle, leur hydrophobicité et lipophobicité, leur biocompatibilité sont leurs caractéristiques les plus intéressantes pour les applications médicales [24, 170]. En fonction de leur poids moléculaire et de leur structure chimique, les PFCs peuvent exister sous forme de gaz ou de liquide, à partir de six carbones. Pour notre étude, les liquides PFHex et PFHep ont été achetés chez Sigma Aldrich (France). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 2.1. La phase dispersée de PFC a été utilisée à 10% en volume pour la préparation d'émulsions de PFC.

2.2.1.3 Huile triglycéride à chaînes moyennes

Nous avons formulé des gouttelettes composées d'une double phase dispersée constituée d'un mélange de PFC et d'une huile de triglycérides à chaîne moyenne (MCT) à 50/50% en volume. L'huile MCT a été choisie pour sa compatibilité à la fois pour les produits cosmétiques et pharmaceutiques, il s'agit d'une huile approuvée par la FDA souvent utilisée dans les formulations parentérales. L'huile MCT (nom commercial Labrafac Lipophile WL 1349) a été achetée chez Gattefossé (Saint-Priest, France) et consiste en des MCT saturés d'environ 50 à 80% d'acides capryliques (C8 :0) et 20 à 50% capriques (C10 :0). Sa viscosité est de 25-33 mPa.s, sa densité de 0,93-0,96 g.cm⁻³ à 20°C et c'est un liquide huileux transparent. Par ailleurs, un colorant orange 3G a été solubilisé dans l'huile MCT avant la formation des gouttelettes afin de pouvoir distinguer les deux phases dispersées au microscope optique.

Caractéristiques	PFHexane (C ₆ F ₁₄)	PFHeptane (C ₇ F ₁₆)
Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	338	388
Densité (g.cm ⁻³)	1,68	1,72
Viscosité (mPa.s)	0,67	0,90
Température d'ébullition	56°C	80°C

TABLEAU 2.1 – Principales propriétés des PFC liquides : PFHexane et PFHeptane à 25°C [24]

2.2.2 Procédé d'émulsification par prémix

2.2.2.1 Pompe seringue à haute pression

Le montage expérimental développé au sein du laboratoire [171] pour la préparation des émulsions de PFC par PME est présenté à la figure 2.9. Il est composé de trois parties : 1) un module membranaire contenant la membrane SPG, 2) une pompe à haute pression et 3) un ordinateur équipé d'un logiciel pour les commandes et l'acquisition des données.

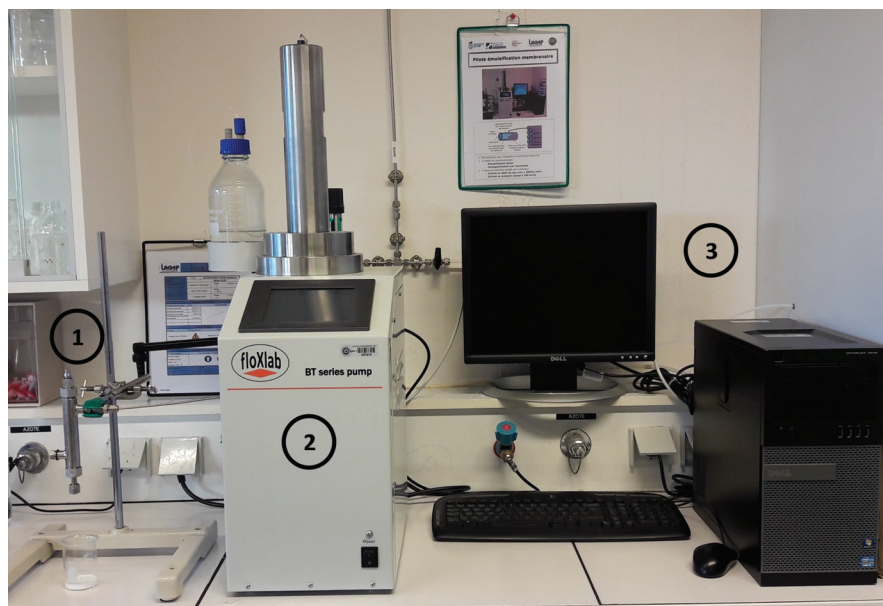


FIGURE 2.9 – Image du procédé d'émulsification membranaire par prémix développé au sein du laboratoire. 1) Module membranaire, 2) Pompe haute pression et 3) Ordinateur pour les commandes et l'acquisition des données

La pompe est une pompe monocylindre BTSP 500-5 à haute pression (Floxlab, Nanterre, France). Elle est équipée d'un cylindre d'un volume de 500 ml avec un piston entraîné par un moteur. Le moteur est situé sous le cylindre et pousse le piston vers le haut de la pompe. Le cylindre est connecté à deux vannes, dont l'une permet son remplissage et la seconde sa vidange poussant ainsi le liquide à travers la membrane. Ces vannes pneumatiques sont alimentées en air et fonctionnent en mode « tout ou rien », c'est-à-dire que leur position est soit ouverte soit fermée. Les pièces de la pompe en contact avec le fluide sont en acier inoxydable. La pompe est également équipée d'un capteur de pression ($\pm 0,1$ bar). Elle peut être commandée par le panneau de commande ou par l'ordinateur permettant également l'acquisition instantanée des données.

La pompe peut fonctionner selon deux modes principaux, soit à pression constante soit à débit constant. C'est le second mode, à débit constant, qui a été sélectionné pour la préparation des gouttelettes de PFC. La pompe peut être paramétrée en indiquant le débit de 5 à 200 mL/min, la pression maximale et le volume à injecter. Une valeur de pression maximale de 80 bars a été saisie pour éviter une suppression et la rupture de la membrane. L'ordinateur permet d'acquérir chaque seconde les données suivantes : le temps, le débit qui est le paramètre fixé, la pression qui varie et le volume de liquide à l'intérieur du cylindre.

Lors de la première utilisation d'une membrane SPG, la résistance hydraulique (R_h) de la membrane a été estimée par le coefficient directeur de la droite reliant la pression mesurée et le débit fixé (Figure 2.10). Pour cela, de l'eau à température ambiante a été injectée à travers la membrane à différents débits de 10 à 200 mL/min et la pression résultante a été mesurée.

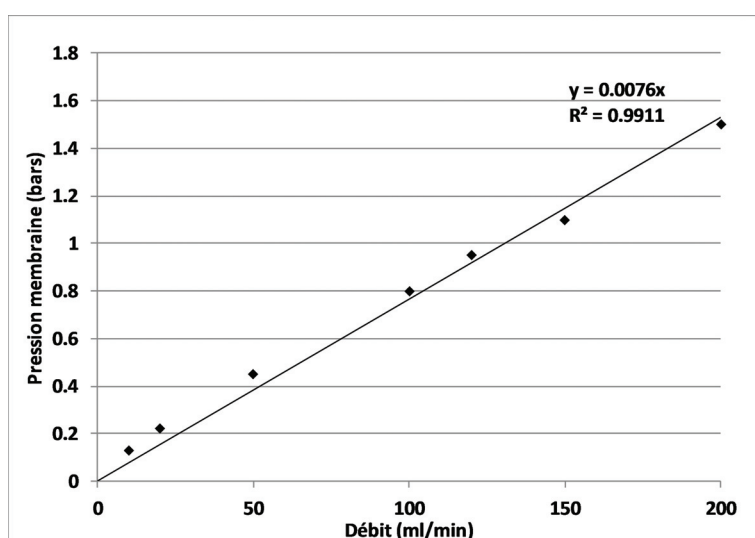


FIGURE 2.10 – Résistance hydraulique (R_h) déterminée par le coefficient directeur de la droite pour une membrane de 125 mm avec un diamètre de pore de 1,1 μm

Tout d'abord, le prémix a été injecté dans les tuyaux du montage en absence du module et de membrane SPG. La procédure était similaire à celle réalisée avec l'eau permettant ainsi de déterminer la pression requise pour le déplacement du prémix dans le tuyau reliant la pompe au module, ΔP_{tuyau} . Lors de l'émulsification, la pression résultante, $\Delta P_{\text{résultante}}$, obtenue par l'acquisition de la pompe, correspond à la somme des pressions pour faire passer le prémix du cylindre à travers la membrane. La pression, ΔP_{tuyau} , a été soustraite à la pression, $\Delta P_{\text{résultante}}$, afin de déterminer la pression transmembranaire, ΔP_{tm} nécessaire à la fois au passage du prémix à travers les pores de la membrane, ΔP_{pore} et à la réduction des gouttelettes en plus petites gouttelettes, $\Delta P_{\text{réduction}}$ (Équation 1.12).

Lorsqu'un débit constant est imposé par la pompe, il est possible de suivre l'évolution de la pression résultante, caractéristique d'une taille de pore et d'une formulation de gouttelettes. Trois étapes caractérisent l'évolution de la pression résultante pour un débit constant de 200 mL/min pour la préparation de gouttelettes de PFC à travers une membrane SPG d'un diamètre de pore de 1,1 μm .

Après avoir démarré la pompe à un débit constant, les étapes suivantes sont observées (Figure

2.11) :

- Etape 1 : le module membranaire se remplit de prémix et la pression augmente sous l'effet de la résistance de la membrane au passage du prémix à l'intérieur des pores.
- Etape 2 : La pression émulsifiante est atteinte et reste constante. Le débit imposé et le débit à la sortie de la membrane sont alors égaux, ce qui signifie qu'aucune filtration ne se produit à la surface de la membrane. C'est la phase où l'émulsion est recueillie pour être caractérisée.
- Etape 3 : La pression chute rapidement, car le volume imposé est atteint et le piston s'arrête.

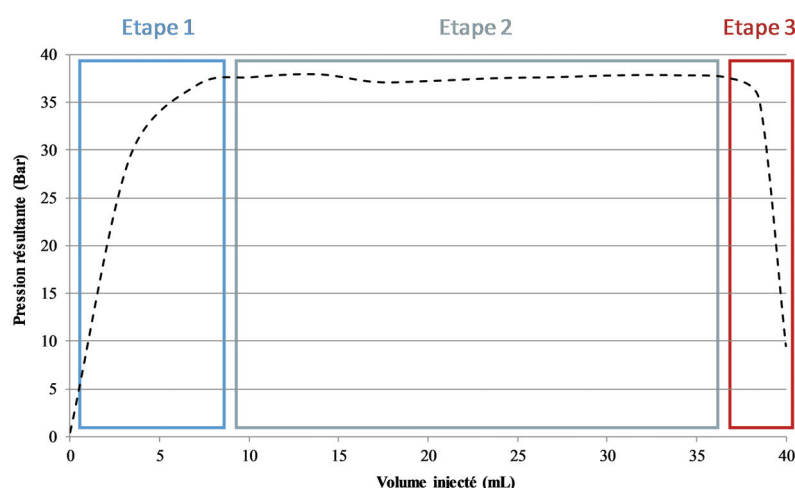


FIGURE 2.11 – Trois étapes de l'évolution de la pression résultante en fonction du volume injecté par la pompe à un débit constant de 200 mL/min pour la préparation de gouttelettes de PFC à travers une membrane SPG d'un diamètre de pore de 1,1 μ m

2.2.2.2 Formulation d'émulsions

Préalablement à la préparation de l'émulsion de PFC, la membrane SPG d'une longueur de 125 mm a été placée dans une solution de tensioactifs, Tween20 :PEG40S (9 :1) puis dans une cuve à ultrasons pendant 5 min. La membrane est ensuite placée dans le module SPG avec un joint torique en caoutchouc à chaque extrémité. Un second joint torique avec un diamètre plus grand est inséré à l'intérieur des deux raccords (entrée et sortie) du module pour garantir une étanchéité totale lors du passage du prémix. La préparation de gouttelettes de PFC monodisperses se fait en trois étapes : 1) la préparation du prémix, 2) le remplissage de la pompe et 3) l'émulsification membranaire par prémix avec la membrane SPG (Figure 2.12).

La première étape consiste en la préparation d'un prémix constitué d'une phase dispersée de PFC, (10% en volume) mélangée à une phase continue constituée de 2,0 wt% de Tween20 :PEG40S (ratio molaire 9 :1). Ce prémix est généré à l'aide d'un ultra-turrax, à une agitation de 8000 rpm pendant 1 min. Afin d'éviter l'évaporation du PFC dû à l'échauffement créé par le cisaillement, le bécher est placé dans un bain de glace. Le bécher est ensuite mis sous agitation magnétique afin d'éviter l'agrégation des grosses gouttelettes de PFC pendant le remplissage de la pompe à un débit de 40 mL/min. Un débit plus élevé pourrait engendrer l'incorporation d'air dans la pompe.

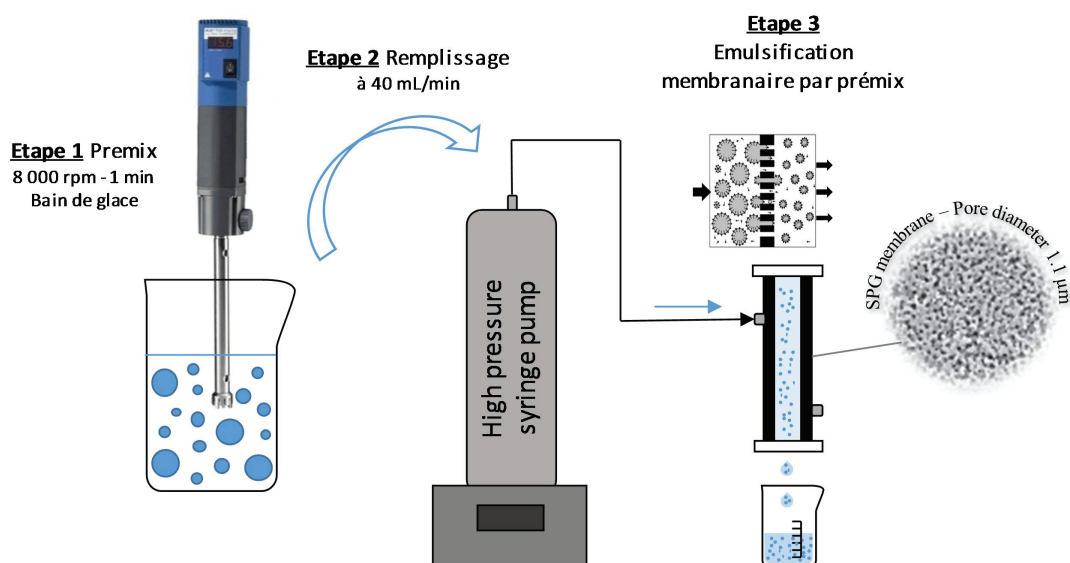


FIGURE 2.12 – Trois étapes principales pour la préparation de gouttelettes de PFC monodisperses par émulsification membranaire par prémix

Enfin, la plupart des expériences ont été réalisées avec un volume d'injection de 30 mL à travers la membrane SPG afin de réduire la taille et la distribution en taille des gouttelettes de PFC. Un bécher a été placé sous le module et sous l'effet de la gravité, l'émulsion a été recueillie pour être analysée. De manière générale, le débit fixé était de 200 mL/min.

2.2.2.3 Procédure de nettoyage

L'émulsification membranaire par prémix génère un encrassement par les gouttelettes à la fois à la surface et à l'intérieur des pores de la membrane. Cet encrassement provoque une réduction progressive des flux transmembranaires et ainsi la perte d'efficacité de la réduction de tailles des gouttelettes. Afin d'observer l'influence de chaque paramètre, un nettoyage de la membrane a été effectuée pour retrouver la perméabilité initiale de la membrane. Le nettoyage de la pompe et de la membrane ont été effectués avec plusieurs cycles d'une solution d'un tensioactif Derquim+ (1wt%) à 70-80°C, d'une solution aqueuse à 70-80°C et de l'éthanol jusqu'à ce qu'une solution limpide soit récupérée à la sortie de la membrane. La solution de Derquim+ est un détergent universelle liquide composé d'un mélange de tensioactifs ioniques et non ioniques. Cette solution de tensioactifs a montré être le plus efficace pour le nettoyage de dispositifs membranaires [172]. Trois cycles ont été réalisés pour nettoyer la pompe, sans membrane dans le module, afin de vider le cylindre et les tuyaux. Pendant ce temps, la membrane a été placée dans une solution de Derquim+ dans une cuve à ultrasons à 70°C. L'apparition de bulles a été observée, due à l'évaporation de gouttelettes de PFC présentes dans les pores de la membrane. Ensuite, la membrane est remplacée dans le module SPG, et trois cycles d'une solution de Derquim+, d'une solution aqueuse à 70-80°C puis éthanol sont réalisés. Enfin, 500 mL d'eau pure à température ambiante est poussée à travers la membrane à un débit de 200 mL/min. Cette procédure de nettoyage a permis de retrouver la résistance hydraulique initiale pour chaque membrane utilisée.

2.3 Caractérisation physique

2.3.1 Tension superficielle

Il existe de nombreuses techniques pour mesurer la tension superficielle d'un liquide [173], classées en deux catégories : les techniques de mesure de force (mesure de la force nécessaire à l'arrachement d'un objet de la surface du liquide par exemple) et les techniques de mesure de forme. Dans notre étude, les mesures de tension superficielle ont été effectuées par la méthode de la goutte pendante en utilisant un tensiomètre à analyse de forme de goutte de type DSA-10 Mk2 (Krüss).

Dans ce dispositif, une seringue est fixée verticalement sur un support. Un poussoir de seringue permet de générer une goutte/bulle de volume contrôlé à partir d'une aiguille placée à l'intérieur d'une cuve en quartz contenant la phase continue. La goutte/bulle ainsi créée est éclairée par une source lumineuse, puis une image est obtenue par une caméra CMOS qui transfère l'information à l'ordinateur pour l'acquisition (Figure 2.13).

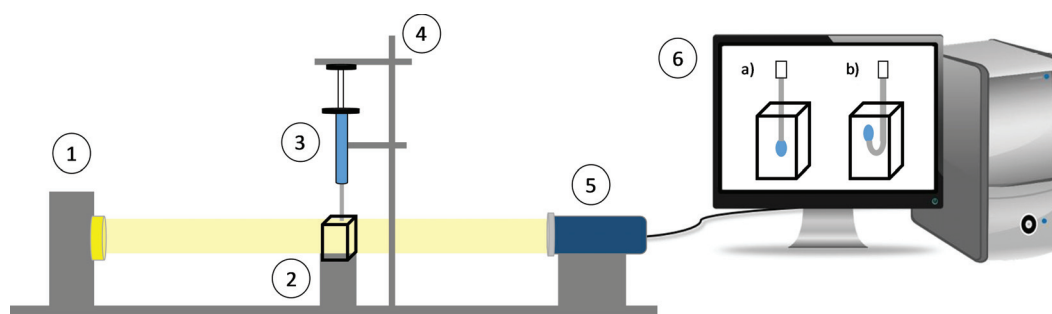


FIGURE 2.13 – Schéma du tensiomètre DSA-10 Mk2 (Krüss) présentant les deux types de configuration pour la mesure de la tension superficielle avec la méthode de la goutte pendante. 1) Source lumineuse, 2) Cuve en quartz contenant la phase continue, 3) Seringue contenant la phase dispersée, 4) Système poussoir de seringue, 5) Caméra CMOS, 6) Ordinateur pour l'acquisition. Deux types de configuration possibles : a) aiguille droite et b) aiguille courbée en forme de canne

Tout d'abord, une mesure de la tension superficielle d'une bulle d'air dans l'eau pure Millipore a permis de confirmer la propreté des dispositifs utilisés en vérifiant que la valeur de la tension superficielle est proche de 72 mN/m. Toutes les mesures de tension superficielle ont été faites à température ambiante. L'appareil a été calibré en utilisant le diamètre extérieur de l'aiguille (1,507 mm) et une acquisition de la tension superficielle a été effectuée toutes les secondes. La goutte/bulle a été imagée avec une caméra CMOS, puis sa forme a été extraite par analyse d'image, et la tension superficielle, γ , déterminée au cours du temps par l'équation de Young-Laplace. Le temps de formation de la goutte/bulle avant le déclenchement de la mesure est d'environ 2 s, ce qui ne permet pas d'observer pendant ce court instant l'évolution dynamique de la tension superficielle. La tension superficielle commence par décroître dans un premier temps, ce qui caractérise une adsorption des tensioactifs à l'interface avant de se stabiliser à la valeur d'équilibre.

2.3.1.1 Microbulles

En raison de la faible densité des gaz, une bulle ascendante a été formée à l'extrémité d'une aiguille courbée en forme de canne placée dans la cellule de quartz (10 mL) contenant 1,0 wt% de solution de tensioactifs (Figure 2.13 b)). La seringue a été trois fois purgée avec le gaz (C_3F_8 ou air) avant de réaliser la mesure de tension superficielle. Les tensions superficielles nous ont permis d'observer la dynamique d'adsorption des molécules à l'interface gaz/liquide et de déterminer la tension superficielle à l'équilibre, γ_{eq} . Également, cette dernière valeur nous a permis de définir une pression de point de bulle théorique, P_{BP} , en supposant que l'angle de contact (θ) est nul, en raison d'une mouillabilité totale de la membrane par la phase aqueuse (Équation 1.6).

2.3.1.2 Emulsions

La mesure de tensions interfaciales a été également effectuée avec ce tensiomètre. Des gouttelettes de phase dispersée 20 μ l ont été produites dans une solution de tensioactifs à 2 wt%, contenue dans une cellule de quartz de 10 mL. En raison de la différence de densité entre le PFC (1,32 g/cm^3) et l'huile (0,96 g/cm^3) par rapport à l'eau, une aiguille droite permet de former une goutte pendante de PFC (Figure 2.13 a)), et une aiguille courbée en forme de canne permet de former une goutte d'huile (Figure 2.13 b)).

2.3.2 Mesure de taille et de distribution en taille

Les méthodes utilisées pour déterminer la taille, la distribution en taille et la concentration des agents de contraste ultrasonore sont basées sur des mesures utilisant la microscopie optique, la diffraction laser ou des mesures de changement de résistance électrique causée par le passage d'un électrolyte au niveau d'une ouverture calibrée, appelé Compteur Coulter. Sennoga et al. 2012 [174] ont réalisé une étude comparative de ces trois techniques à partir de microbulles commerciales Sonovue®. Cette étude a montré qu'aucune méthode n'est parfaitement adaptée simultanément à la mesure de la taille et au comptage mais qu'elles sont cependant complémentaires pour l'analyse de microbulles.

2.3.2.1 Microscopie optique

L'observation des microbulles/gouttelettes a été effectuée au microscope optique (Leica DM LM, France). Une caméra vidéo CCD (Leica MC120 HD) a été connectée au microscope pour capturer les images en utilisant le logiciel Leica Application Suite (LAS EZ) (version 3.4.0). En fonction de la concentration, une dilution au 1/10ème ou 1/100ème a été effectuée au préalable dans un tube Eppendorf. Puis, à l'aide d'une micropipette, 20 μ L de la suspension a été ajoutée dans une chambre de comptage Malassez (Marienfeld-Superior) placée sous le microscope optique (Figure 2.14). Afin de déterminer la taille et la distribution en taille sur une représentation globale de la suspension, une vingtaine d'images sont capturées à différents endroits de l'échantillon. Les images ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel MATLAB 2013 (The MathWorks), comme décrit par Sennoga et al. 2010 [175]. Un graphique est ainsi obtenu, représentant le nombre en fonc-

tion du diamètre (μm), ainsi que le diamètre moyen, l'écart-type, le coefficient de variation, et la concentration (nombre/mL).

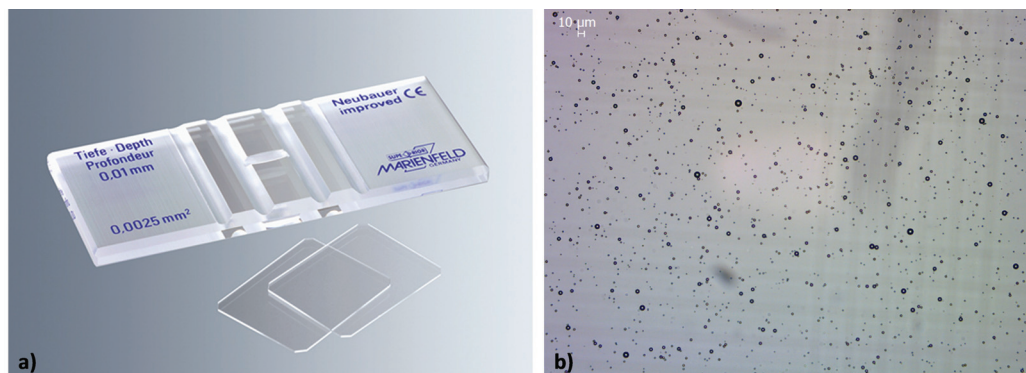


FIGURE 2.14 – a) Chambre de comptage Malassez (Marienfeld-Superior) permettant d'observer et compter les microbulles/gouttelettes en suspension, b) Observation de l'ACU Sonovue® au microscope optique (Objectif $\times 20$)

Une concentration trop élevée ou trop faible occasionnerait des erreurs dans l'estimation de la taille et de la concentration. La chambre de comptage Malassez permet de déterminer le nombre de microbulles/gouttelettes en suspension dans une solution pour un volume connu, sans engendrer un écrasement de l'échantillon entre la lame et la lamelle. Il est ainsi possible d'observer différentes profondeurs de la cellule contenant l'échantillon. En raison de leur faible densité, les microbulles et les gouttelettes d'huile se trouvent à la surface interne de la lamelle, tandis que les gouttelettes de PFC, ayant une plus grande densité, sont situées au fond de la cellule de Malassez. Dans la préparation d'émulsions avec le mélange PFC et huile MCT (50/50 vol%), un colorant hydrophobe, orange 3G, a été solubilisé dans la phase huileuse avant la formation des gouttelettes. Cette étude a permis de déterminer l'agencement des deux phases dispersées, huile et PFC, au sein de la gouttelette.

2.3.2.2 Diffraction laser

Le Mastersizer 3000 fournit des distributions granulométriques, pour deux modes de dispersion, voie sèche ou voie liquide (Figure 2.15 a)). Cette technique permet de mesurer des plages de tailles de particules allant du nanomètre au millimètre. Elle repose sur la mesure de l'intensité de la lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser (longueurs d'onde de lumière rouge et bleue) traverse un échantillon de particules dispersées dans une solution. Les grosses particules diffractent de la lumière aux petits angles et les petites particules diffractent de faibles intensités aux grands angles (Figure 2.15 b)).

La théorie de la diffusion de Mie a été utilisée pour convertir les données de diffusion de la lumière en distribution de taille des microbulles/gouttelettes. Les résultats ont été exprimés par D_{50} , correspondant au diamètre médian des microbulles/gouttelettes pour lequel 50% des microbulles/gouttelettes sont inférieures à cette taille, de même, 90% sont inférieures à D_{90} et 10% inférieures à D_{10} . Deux paramètres ont été utilisés pour caractériser la largeur de la distribution de

taille : tout d'abord l'étendue de la distribution de la taille des microbulles, appelé span, exprimée par :

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (2.3)$$

La polydispersité a été également caractérisée par le coefficient de variation (CV) qui est une mesure de l'écart type à D_{50} exprimé en %, en utilisant l'équation [103, 176, 177, 178] :

$$CV = \frac{\sum n_i |D_{50} - D_i|}{D_{50} \sum n_i} \times 100 \quad (2.4)$$

où D_i , est le diamètre de la class i , n_i correspond au nombre de microbulles/gouttelettes de la classe i .

L'unité de dispersion est sous agitation et la vitesse d'agitation de l'hélice était réglée à 1500 rpm afin de disperser de manière homogène les microbulles/gouttelettes dans la suspension. La valeur de la taille des microbulles/gouttelettes est la moyenne de trois séries de mesures successives à température ambiante.

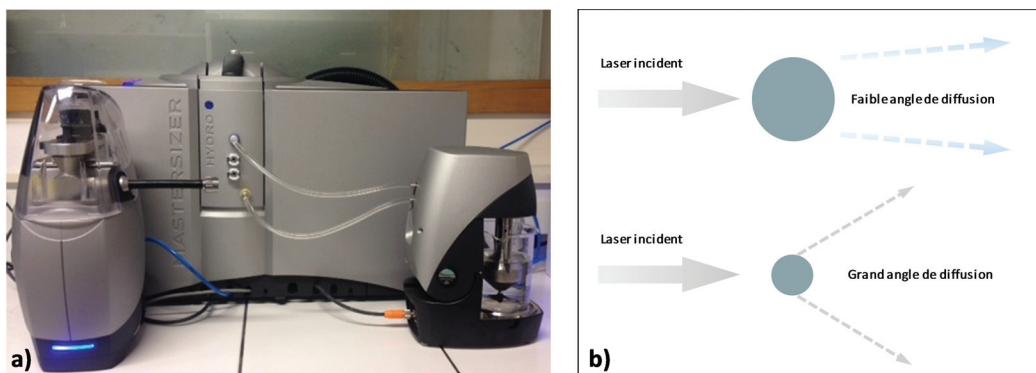


FIGURE 2.15 – a) Mastersizer 3000 avec deux modes de dispersion : en voie sèche (à gauche) et en voie liquide (à droite) et b) Représentation schématique de la diffraction des grosses et petites particules

Pour la mesure de la taille des gouttelettes, l'indice de réfraction de la phase dispersée était de 1,2515 pour le PFHex, 1,265 pour le PFHep et 1,445 pour l'huile MCT. La phase aqueuse continue avait un indice de réfraction de 1,33. Pour la mesure de la taille des microbulles, l'indice de réfraction utilisé était 1,0 pour la phase gazeuse [38] et 1,33 pour la phase continue. Pour étudier la stabilité des microbulles en circulation, les microbulles ont été prélevées à la sortie de la membrane et diluées dans le bécher sous agitation. La suspension de microbulles a été mise en circulation dans la cellule de mesure de l'instrument pendant 90 s et la taille a été mesurée toutes les 10 s.

2.4 Caractérisation acoustique

2.4.1 Verasonic et sonde acoustique

Pour rappel, une image ultrasonore est le résultat des interactions (réflexion, réfraction, rétrodiffusion, absorption) entre l'onde ultrasonore et les tissus qu'elle traverse. Pour former une image, les données du signal ultrasonore sont d'abord acquises puis reconstruites et traitées. Les quatre principales étapes pour la reconstitution d'une image ultrasonore sont : 1) Génération d'ondes ultrasonores par un transducteur piézoélectrique, appelé sonde échographique, 2) Interaction entre les ondes et les différents tissus ayant chacun des impédances acoustiques qui leur sont propres, générant une onde ultrasonore réfléchie ou rétrodiffusée, 3) Réception de l'onde réfléchie par la sonde générant un signal radio fréquence, où la distance de l'objet est proportionnelle au temps parcourue par l'onde (aller-retour) et la vitesse dans les tissus, 4) Le signal radio fréquence est ensuite traité par un filtre passe-bande à large bande de fréquences.

La méthode d'imagerie par réseau phasé a été utilisée pour générer une image. Cette technique consiste à émettre des ondes ultrasonores déphasées de façon à les focaliser en un point donné.

Le système d'imagerie ultrasonore utilisé dans le cadre de la thèse est un système Verasonics Vantage à 256 canaux électroniques (Verasonics, Kirkland WA, USA) (Figure 2.16 a)). Il est conçu pour être un outil permettant la transmission, la réception et le traitement des ondes ultrasonores. Le Verasonics se compose d'un formateur de faisceau d'émission et d'un module d'acquisition multicanal connecté à un ordinateur. L'ordinateur contient des modules logiciels implémentés dans Matlab qui permettent à l'utilisateur de programmer et d'exécuter des séquences d'actions, appelées événements. La sonde échographique linéaire L12-3V (Verasonics, Kirkland WA, États-Unis) utilisée est un transducteur d'imagerie composé de 196 éléments, qui émet des ultrasons à une fréquence de 7,813 MHz (Figure 2.16 b)).

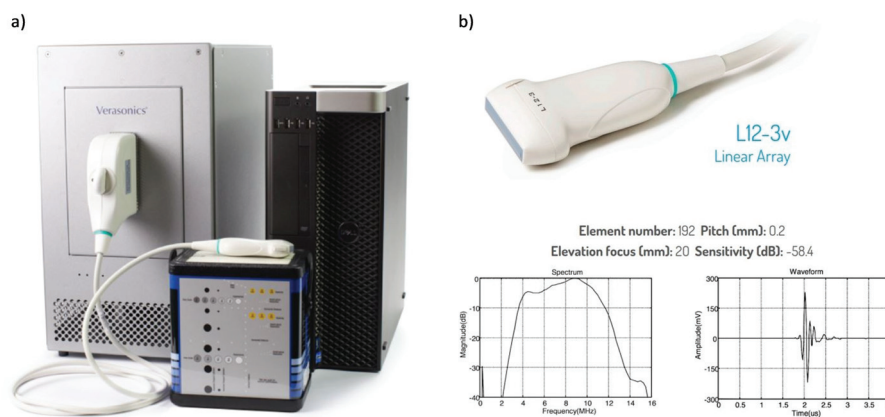


FIGURE 2.16 – a) Système d'imagerie ultrasonore Verasonics Vantage 256, b) Sonde échographique linéaire L12-3V de 7,813 MHz à 196 éléments [16]

2.4.2 Réponses harmoniques des microbulles

L'échographie de contraste est fondée sur la réception du signal dû à la vibration des microbulles sous l'influence d'impulsions ultrasonores. Ce mode vibratoire peut être linéaire ou non linéaire en fonction de l'amplitude appliquée. Dans le cas d'une réponse non linéaire, la microbulle se dilate plus qu'elle ne se comprime. Cette réponse génère une réponse harmonique qui peut être captée par la sonde d'échographie. Ainsi, les agents de contraste ont des réponses détectables à des fréquences qui sont des harmoniques de la fréquence ultrasonore transmise, tandis que les tissus possèdent généralement des composantes harmoniques beaucoup plus faibles. Cette caractéristique permet notamment de diminuer la présence du bruit causé par le milieu environnant et ainsi d'isoler le signal provenant des microbulles. Pour caractériser les microbulles préparées, un dispositif constitué d'une sonde ultrasonore a été placée à la surface d'une suspension de microbulles dans un bécher, afin de détecter leur réponse non linéaire avec la sonde (Figure 2.17). Pour cela, nous comparons les réponses harmoniques en l'absence et en présence de microbulles contenues dans une solution aqueuse. Un bécher de 300 mL d'eau contenant une concentration de microbulles de 10^{+5} MBs/mL a été utilisé. A l'aide d'un agitateur magnétique, une répartition homogène des microbulles dans l'eau a été obtenue. Suite aux impulsions ultrasonores à une fréquence de 5 MHz, les réponses harmoniques à 10 MHz sont quantifiées après un traitement des données par Matlab.

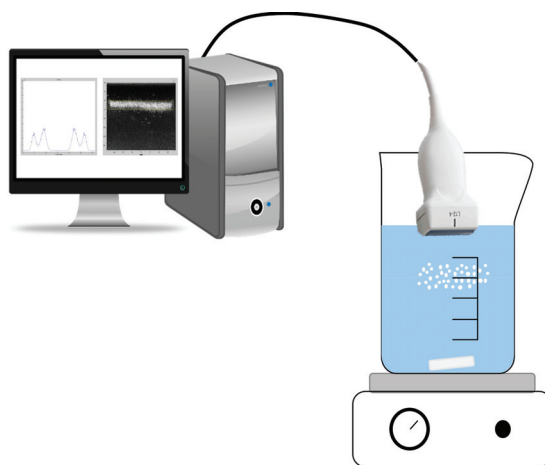


FIGURE 2.17 – Représentation schématique de l'installation utilisée pour l'observation des réponses harmoniques des microbulles et de la vaporisation des gouttelettes de PFC dans l'eau

2.4.3 Vaporisation in vitro des gouttelettes

Afin de vaporiser les gouttelettes préparées par le procédé membranaire en microbulles, un dispositif expérimental similaire à celui utilisé pour caractériser la réponse harmonique des microbulles a été mis en place (Figure 2.17). Elle nécessite un dispositif générant des ultrasons et un bécher contenant la suspension de gouttelettes. Sauf indication contraire, la suspension contenue dans le bécher a été maintenue à 37°C à l'aide d'une plaque chauffante. Une dilution au 1/10 (10^{+9} gouttelettes/mL) a été nécessaire afin d'éviter une trop forte génération de microbulles pou-

vant atténuer les ondes ultrasonores après l'impulsion acoustique. La suspension a été exposée aux impulsions acoustiques émises par la sonde échographique placée 1 cm sous la surface de l'eau. Les impulsions ont été émises en utilisant une séquence de formation de faisceau, en mode rafale, avec 10 cycles par rafale, à une fréquence de répétition des impulsions (PRF) de 1 kHz, pour un temps d'exposition total de 3 s. Avant chaque expérience, la suspension de gouttelettes a été agitée par agitation magnétique pour assurer l'homogénéisation des gouttelettes dans la solution. En effet, à cause de leur différence de densité, les gouttelettes ont tendance à s'accumuler au fond du bécher. Après chaque vaporisation, le bécher est vidé et rempli par une nouvelle suspension de gouttelettes, chauffé à 37°C avant une nouvelle impulsion acoustique. La pression acoustique incidente a été augmentée entre deux séquences d'impulsions acoustiques successives, en augmentant la tension délivrée à la sonde d'imagerie de 0 à 50 V. Pour évaluer la formation de microbulles de gaz à partir de gouttelettes liquides lorsque la pression a atteint le seuil ADV, une imagerie en mode B a été réalisée en temps réel pour détecter l'augmentation de l'échogénicité des microbulles nouvellement générées. Comme vu précédemment, les microbulles de gaz sont hyperéchogènes en raison de la différence d'impédance acoustique avec la phase aqueuse.

2.4.4 Détermination du seuil de vaporisation

Le seuil ADV a été déterminé en utilisant une méthodologie similaire à celle décrite précédemment par Kripfgans et al. [41] et Fabiilli et al. [42]. La conversion des gouttelettes en microbulles de gaz a été identifiée de manière acoustique par une augmentation de l'échogénicité de l'échantillon après l'excitation par rapport à la ligne de base de pré-excitation. La conversion a été confirmée par observation de microbulles à l'intérieur du bécher. Pour déterminer la pression de seuil de vaporisation, l'échantillon de gouttelettes a été soumis à une série de séquences acoustiques d'excitation et détection, augmentant à chaque fois la pression acoustique. Les images en mode B enregistrées ont été analysées par ImageJ et converties en niveaux de gris. Pour chaque mesure de vaporisation, une région d'intérêt rectangulaire de 40 mm de largeur sur 5 mm de profondeur (correspondant à 32132 px^2), centrée sur la focale naturelle de la sonde, a été sélectionnée (Figure 2.18). L'amplitude moyenne d'écho (MEA) sur la région d'intérêt a été calculée comme la somme des valeurs de gris de tous les pixels de la région d'intérêt divisée par le nombre de pixels et obtenue par l'équation suivante :

$$\text{MEA}(n) = \frac{1}{NM} \sum_{j=1}^M \sum_{i=1}^N A(i, j) \quad (2.5)$$

où A est le signal au pixel (i, j) qui a pour dimensions M par N. Ensuite, l'amplitude d'écho relative (REA) a été calculée comme la différence entre MEA (X) après et MEA (0) avant l'impulsion acoustique.

$$\text{REA} = \text{MEA}(X) - \text{MEA}(0) \quad (2.6)$$

Une absence de changement de REA entre deux sonications successives indique l'absence de vaporisation de gouttelettes, alors qu'une augmentation de l'échogénicité est caractéristique de la vaporisation des gouttelettes. La REA résultante et son écart type ont été tracés en fonction de

la tension électrique utilisée pour entraîner l'émission par la sonde à ultrasons. Le seuil de vaporisation a ainsi été déterminé à l'intersection entre la ligne de base et l'augmentation linéaire de l'échogénicité avec l'augmentation de la tension. La variation du seuil ADV en fonction de la taille des gouttelettes, la distribution en taille, la température de l'échantillon, le type de PFC et la présence d'une couche d'huile supplémentaire a été mesurée. Pour les expériences, différentes températures (25°C ou 37°C) ont été étudiées et deux types de PFC, le PFHexane (C_6F_{14}) et le PF-Heptane (C_7F_{16}) ont été considérés.

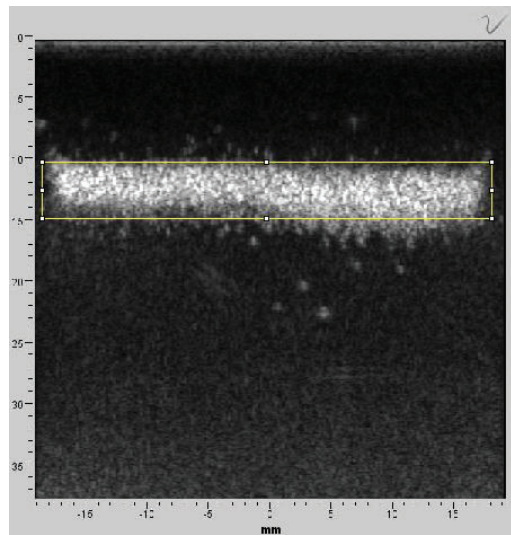


FIGURE 2.18 – Sélection de la région d'intérêt avec ImageJ sur une image en mode B afin de déterminer l'amplitude moyenne d'écho (MEA)

Chapitre 3

Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes

Contents

2.1 Microbulles de PFC	56
2.1.1 Matériels	56
2.1.2 Procédés membranaires	60
2.2 Emulsions de PFC	65
2.2.1 Matériels	65
2.2.2 Procédé d'émulsification par prémix	66
2.3 Caractérisation physique	70
2.3.1 Tension superficielle	70
2.3.2 Mesure de taille et de distribution en taille	71
2.4 Caractérisation acoustique	74
2.4.1 Verasonic et sonde acoustique	74
2.4.2 Réponses harmoniques des microbulles	75
2.4.3 Vaporisation in vitro des gouttelettes	75
2.4.4 Détermination du seuil de vaporisation	76

3.1 Préambule

Comme exposé dans la partie bibliographique (section 1.4), l'émulsification membranaire a fait l'objet de nombreuses recherches depuis son développement dans les années 90. Seulement quelques études réalisées par l'équipe de Kukizaki, montrent la possible préparation de bulles monodispersées par émulsification membranaire, dans laquelle une phase gazeuse (air) est poussée à travers une membrane dans une phase continue contenant des tensioactifs.

La première étape de la thèse a été de développer un procédé membranaire dans une configuration similaire à celle utilisée par cette équipe de recherche japonaise, afin d'observer les paramètres pouvant influencer la formation des microbulles. Les principaux paramètres étudiés dans ce chapitre sont les paramètres du procédé, de la membrane et de la formulation. Dans cette étude, nous avons pour la première fois décrit l'influence de la phase dispersée gazeuse sur la préparation de microbulles avec un procédé membranaire. En effet, les mesures de tension superficielles nous ont aidé à mieux comprendre les phénomènes qui ont permis de former des microbulles plus petites et plus stables avec une amélioration de la monodispersité grâce à l'utilisation de PFC sous forme gazeuse.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes », publiée dans le *Journal Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 560 (2018) 233-243. L'article original tel que publié dans le journal a été placé en annexe.

3.2 Abstract

Microbubbles are increasingly used in several fields, such as medical imaging for enhanced contrast ultrasound imaging. These microbubbles usually consist of a gas core stabilized by surfactants molecules. In this study, a technique using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes was used to produce perfluorocarbon microbubbles. The microbubbles obtained were characterized by their size, size distribution, and stability. The effect of several parameters on the microbubble's size was investigated related to the process (transmembrane pressure, ΔP , bubble point pressure, P_{BP} , shear stress, τ_w), membrane pore size, D_p , and formulation (gas, surfactants in the aqueous phase). The transmembrane pressure nor the shear stress (τ_w) had influence on the microbubble's size or size distribution for $\Delta P/P_{BP} < 1.5$. The decrease of the membrane pore size from 1.1, 0.5, to 0.2 μm led to lower microbubble size 13.3, 6.36, and 4.42 μm , respectively, which was associated with higher size distribution 16%, 24% and 31%, respectively due to the higher Laplace pressure exerted on smaller microbubbles leading to their destabilization. With the 1.1 μm pore size membrane, perfluorocarbon microbubbles were obtained with a diameter of 13.3 μm and coefficient of variation (CV) of 16% when stabilized by sodium dodecyl sulfate (SDS), 15.6 μm with CV% of 23% when stabilized by Tween20, and 16.5 μm with CV% of 26% when stabilized by Polyoxyethylene (40) stearate (PEG40S). These low CV were indication of monodispersity. Perfluorocarbon microbubbles had a smaller size than air microbubbles due to the lower surface tension that decreased the retention force, keeping the microbubbles at the pore opening. The stability study showed that the perfluorocarbon gas greatly increased the lifetime of the microbubbles with a slight increase

in size of 1.3 after 90 s compared to 2.2 for air microbubbles. Overall, the membrane technique proved to be an effective, controlled and reproducible method to produce perfluorocarbon microbubbles at a high rate $0.6\text{-}1.5 \times 10^{+10}$ microbubbles/min. The key factor that determines the microbubbles formation is the adsorption kinetics of the surfactant at the new gas-liquid interface at the pore opening.

3.3 Introduction

Microbubbles have many potential applications in chemical and food industries, process engineering, water treatment, pharmaceutical and medicine. Due to their small size (typically around some microns), microbubbles have a very large gas-liquid interface area per unit volume. Microbubbles can thus increase the efficiency of gas-liquid contacting devices, such as bubble columns, chemical reactors and fermenters [125]. In chemical industries, many gas-liquid reactions are based on the dispersion of gas bubbles in a continuous liquid phase to improve both hydrodynamics and mass transfer [179]. In the food industry, the density and texture of products such gel and cream-based foods can be improved by monodisperse gas microbubbles in these materials [125]. In wastewater treatments, microbubble aeration can enhance ozone and oxygen gas-liquid mass transfer [180]. In biomedical applications, microbubbles of 1-10 μm in diameter (sized to flow safely through a patients smallest capillaries) are used as ultrasound contrast agent for imaging, and are also studied for drug, gene and metabolic gas delivery [181, 182, 183, 93]. For these applications, monodispersity can be essential to improve echographic image quality [184], and also to limit Ostwald ripening effect by reducing effective Laplace pressure difference between polydisperse microbubbles, leading to better microbubble stability.

To design these gas-liquid contacting devices, the control of the size and size distribution of microbubbles generated is very important. To improve the manufacturing process, gases with reduced solubility in water, such as fluorocarbons can be used [185, 186, 187]. Perfluorocarbons gases reduce the osmotic pressure [21], allowing an increase in the microbubble stability [188, 189] and presenting a lower surface tension [190]. The shell composition is also a key determinant for microbubble's physical properties as well as their acoustic behavior and imaging time. The shell core serves to prevent gas escaping from the core and avoid microbubbles coalescence [4, 191]. While for biomedical applications, microbubbles are shelled with phospholipids or albumin [192], soluble surfactants are also advisable for the production of microbubbles with perfluorocarbon, as they are easy to implement due to a rapid adsorption at gas-liquid interface, such as mixture of sorbitan monostearate Span 60 and polyoxyethylene 40 stearate (PEG40S) in aqueous media to produce perfluorocarbon-filled microbubbles by sonication [55]. Other possible shell materials include proteins, and biocompatible polymers such as Pluronic F68 [193].

The main techniques used to generate microbubbles are mechanical agitation or sonication and microfluidic technologies [62, 93, 127, 187, 194]. In mechanical agitation, the hydrophobic gas is dispersed within an aqueous surfactant solution by disruption of the interface via high-shear mixing. Mechanical agitation is highly efficient at generating microbubbles at a high production rate, however the size distribution is highly polydisperse which requires further fractionation, for example by centrifugation [189], decantation [195] or flotation under gravity [187]. These methods

are not ideally adapted for physicochemical investigations [186]. Microfluidic technologies include flow-focusing [196, 197, 198], T-junctions [103, 199] and electrodynamic atomization [105]. These techniques provide microbubbles with very low polydispersity by a precise control of their size, however, microbubbles are produced at a very low rate and microchannels tend to clog when preparing microbubbles smaller than 10 μm . The microfluidic methods are time-consuming [62], which requires new microfluidic strategies in order to improve the production yield.

A membrane technique is an alternative to generate monodisperse microbubbles. This method was first proposed by Kukizaki et al. [117, 124, 125, 126, 134]. With this technique, monodisperse microbubbles are produced by pushing air through a Shirasu porous glass (SPG) membrane (Figure 3.1). Air microbubbles were formed at the pore outlets and detached from the membrane by the shear force exerted by the continuous phase containing surfactant(s) flowing along the surface. The size and size distribution of the microbubbles depended on several parameters related to the membrane pore size [134], surface wettability of the SPG membrane [125], symmetry/asymmetry [126], process parameters such as shear stress [117, 134], transmembrane pressure [134], and surfactants in the aqueous phase [124]. SPG membranes have also been used for microbubble aeration in a biofilm reactor for wastewater treatment [180]. Other membranes were used such as ceramic tubular membranes (PALL, France) to generate air or nitrogen microbubbles in aqueous or organic phase (water or heptane) for gas-liquid reactors [179]. Other advantages of using the membrane technique are low energy consumption, simplicity of design, easy scale-up, and reproducibility [109].

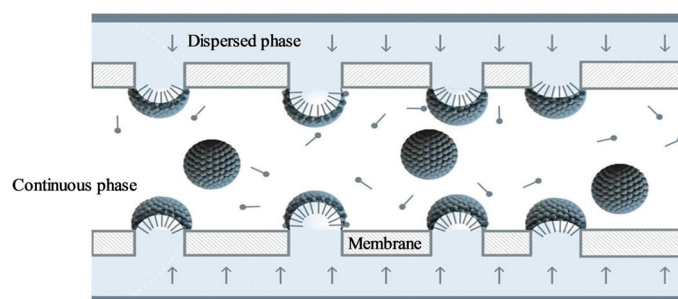


FIGURE 3.1 – Schematic diagram of the membrane process principle where a gaseous phase is injected into the continuous phase composed of surfactants which stabilized the new interface

In this study, we considered the membrane technique to produce perfluorocarbon microbubbles. The microbubbles obtained with three different types of surfactants were characterized by their mean size and size distribution. The influence of the dispersed gaseous phase on microbubble formation was investigated. In addition, the microbubbles stability with each surfactant was observed. Surface tensions were also measured. The effect of several parameters on microbubbles characteristics were investigated such as shear stress, transmembrane pressure as well as surfactant types in the aqueous phase. In addition, perfluorocarbon microbubbles produced by the membrane technique versus sonication were compared.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Materials

The gas-liquid dispersion system was composed of perfluorocarbon or air as the dispersed gaseous phase and a continuous aqueous phase. Octafluoropropane (C_3F_8) is a hydrophobic gas (vapor pressure of 792 kPa and water solubility at 25°C of 0.19 mol.m^{-3}) [47] purchased from F2 Chemicals Ltd (Preston, United Kingdom).

Three surfactants were used in this study : an anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), and two non-ionic surfactants, Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) and Polyoxyethylene (40) stearate (PEG40S) purchased from Sigma Aldrich (France). Ultrapure water was obtained using a Synergy unit system (Millipore, France) to prepare the aqueous solutions. The continuous phase was composed of 1.0 wt% surfactant in saline solution at 0.9% of NaCl for parenteral solution, since the microbubble preparation was found to be improved with the addition of NaCl [162]. Microbubble diameter was found to decrease when surfactant concentration increased, to achieve a minimum diameter for a concentration above the critical micelle concentration (CMC). Surfactants were therefore used at concentration above CMC to achieve maximum effect [200].

3.4.2 SPG membranes and membrane module

Hydrophilic tubular SPG membranes were provided by SPG Technology Co. Ltd (Miyazaki, Japan). The SPG membranes had a length of 125 mm and an inner diameter of 8.3 mm. These membranes are manufactured by a phase separation process of calcium aluminum borosilicate glass and subsequent acid leaching [117, 201], and have been widely used for production of emulsions and particles [23, 145]. Membrane with a mean pore size of 1.1, 0.8 and $0.5 \mu\text{m}$ were used. The mean pore size data was provided by the manufacturer.

The microstructure of the membranes was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a FEI Quanta 250 FEG microscope at the “Centre Technologique des Microstructures” at the University of Lyon (Villeurbanne, France). A fragment of SPG membrane was deposited on a flat steel holder. The sample was coated under vacuum by cathodic sputtering with copper. The samples were observed by SEM under an accelerating voltage of 10 kV. SPG membranes have cylindrical tortuous pores that form a three-dimensional network (figure 3.2). The membrane porosity is in the range of 0.53-0.60 [120]. SPG membranes are negatively charged and hydrophilic due to the presence of hydroxyl groups such as silanol groups on their surface. The dissociation of the silanol groups gives the negative charge of the SPG membrane surface [124].

3.4.3 Surface tension measurements

The surface tension of surfactant solutions was measured by the pendant drop method using a Drop Shape Analysis tensiometer model DSA-10 Mk2 (Krüss). A rising bubble (volume approximately of $6 \mu\text{l}$) of air or C_3F_8 was formed at the extremity of a needle using a syringe inside a quartz

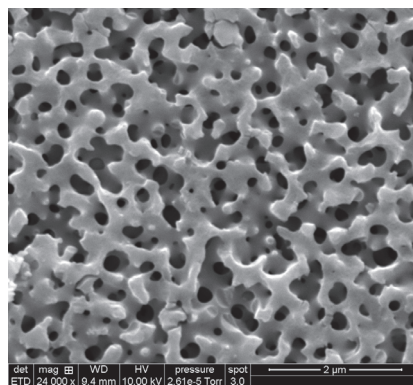


FIGURE 3.2 – Scanning electron micrograph of the surface of the hydrophilic SPG membrane with a mean pore diameter of 0.2 μm

cell (10 ml) containing 1.0 wt% of surfactant solution at room temperature. The formation time of the bubble was about 2s. The system was calibrated using the outer diameter of the needle (outer diameter of 1.507 mm). The bubble was imaged with a CMOS camera, and its shape was then extracted by image analysis, and the surface tension, γ , was obtained as the best fit of the theoretical drop shape to the experimental profile [202].

3.4.4 Preparation of microbubbles

3.4.4.1 Probe-type sonication method

Sonication is the most commonly used method for producing microbubbles which involves dispersing gas or liquid in a suspension of a suitable coating material using a high intensity ultrasound probe. The microbubble samples were prepared according to the method described by Ando et al. [193] by submitting a 1.0 wt% surfactant solution to brief sonication. The sonicator (Qsonica Q55 Sonicator, Newtown, USA) was equipped with a 3.2 mm probe and operated at 20 kHz. A surfactant solution of 6 ml was added to a 10 ml vial, and the atmosphere above the solution in the vial was filled with C_3F_8 for 5 min. Then, microbubbles were formed by bringing the probe sonifier tip at around 5 mm below the gas-liquid interface of the solution and sonicating (amplitude 100%) for 15 s keeping a C_3F_8 atmosphere above the solution.

3.4.4.2 Membrane process using a cross-flow system

The experimental set-up used for the microbubble formation experiments is shown in Figure 3.3. In this cross-flow system, the gas was used as the dispersed phase and a solution containing 1.0 wt% surfactant was used as the continuous phase and circulated to create a shear stress at the membrane surface to detach microbubbles. Before each experiments, the SPG membrane was placed in the beaker containing the continuous water phase and sonicated for 5 minutes to ensure complete membrane wettability. Indeed, Kukizaki et Wada [125] have reported the influence of the surface wettability on the microbubble formation, and only monodispersed microbubbles are created with a totally wet membrane characterized by a contact angle, θ , smaller than 45° . The

membrane was installed inside a cross-flow module of stainless steel supplied by SPG Technology. The effective length of the membrane was reduced to 105 mm due to sealing rings placed at both ends of the membrane tube. The new effective membrane area was then 27.4 cm². Then, the membrane module was placed horizontally and the continuous phase was circulated inside the membrane tube using a pump (Quattroflow 150S, Pall, France). Two conditions of shear stress were tested, corresponding to a fluid pressure of 0.73 Pa (with no rod inside the membrane) and 34.8 Pa (when a rod was inserted inside the tubular membrane). The shear stress at the membrane wall, τ_w , for a tubular membrane with a circular section was calculated using the equation :

$$\tau_w = \frac{4\mu V_d}{R} \quad (3.1)$$

where R is the inner radius of the membrane tube (m), μ is the dynamic viscosity (Pa.s) and V_d is the mean velocity of the continuous phase in the tube (m.s⁻¹).

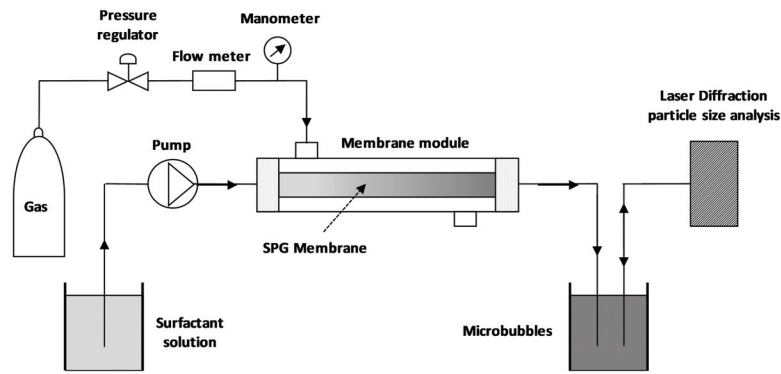


FIGURE 3.3 – Experimental set-up to produce microbubbles using a tubular SPG membrane and to measure their size distribution by laser diffraction particle size analysis

To obtain a high shear stress, a PTFE (polytetrafluorethylene) rod with a diameter of 6.35 mm was introduced inside the tubular membrane. In this case, the shear stress at the membrane wall, τ_w , was calculated using the following equation :

$$\tau = 4\mu V_d \frac{R_2 - R_1}{R_1^2 + R_2^2 - \frac{R_2^2 - R_1^2}{\ln(R_2/R_1)}} \quad (3.2)$$

where R_1 is the rod radius (m) and R_2 is the inner membrane radius (m) [169]. Under these conditions, the mean velocity of the aqueous phase was 0.75 m.s⁻¹ (with no rod inside the membrane) and 5.18 m.s⁻¹ when a rod was inserted inside the tubular membrane.

The gas was introduced on the external side and forced through the microporous membrane. At a pressure higher than the bubble point pressure, the gas that passed through the membrane generated microbubbles at the internal surface of the membrane. A pressure regulator (KPR1FRL412A 20000, Swagelok), flowmeter (Model SLA5850S, Brooks instrument) and manometer (PGI-63B-BG2.5-LASX, Swagelok) were added to the set-up to control the gas pressure. The bubble point pressure was defined as the minimum transmembrane pressure, ΔP , needed to generate the first microbubbles appearing at the membrane surface. The bubble point pressure, P_{BP} , can be estimated from Young-Laplace equation :

$$P_{BP} = \frac{4\gamma \cos\theta}{D_p} \quad (3.3)$$

where γ is the equilibrium surface tension at the gas-liquid interface, θ is the contact angle, and D_p is the mean pore diameter. From this equation, P_{BP} can be estimated assuming that the contact angle is zero, due to the large number of hydroxyl groups on the membrane surface, which can be perfectly wetted by the aqueous phase [117]. The theoretical and measured bubble point pressures for the SPG membranes as function of pore diameter are listed in Table 1. For all experiments, the transmembrane pressure applied was such that the ratio between transmembrane pressure and bubble point pressure, $\Delta P/P_{BP}$, was in the range of 1.1-1.5. The dispersed gas phase flux, J , was calculated from the volumic flowrate, Q , measured using the flowmeter :

$$J = \frac{Q}{A} \quad (3.4)$$

where A is the effective membrane area (27.4 cm²).

3.4.5 Characterization of microbubbles

3.4.5.1 Laser diffraction measurement

The size and size distribution of microbubbles were measured using laser diffraction particle size analysis (Mastersizer 3000, Malvern Instrumentation, France) of a microbubbles sample diluted in a beaker of 500 ml under agitation at 1500 rpm. The technique is based on the measurement of the intensity of light scattered as a laser beam passes through a dispersed particulate sample. The Mie-scattering theory was used to convert light scattering data to microbubble size distribution. The refractive index was 1.0 for the gas phase [38] and 1.33 for the continuous phase. The microbubble size measurement was the average of three successive laser diffraction runs. The results were expressed by D_{50} , the median diameter.

Two parameters were used to characterize the width of the size distribution, first the span of the microbubble size distribution, expressed as :

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (3.5)$$

where D_{90} , D_{50} and D_{10} are the diameters corresponding to 90, 50, and 10 nb% on the relative cumulative microbubble size distribution curve, respectively. Then, the polydispersity was characterized by CV (coefficient variation) which is a measure of the standard deviation to D_{50} expressed in %, using the equation [62, 103, 177, 178] :

$$CV = \frac{\sum n_i |D_{50} - D_i|}{D_{50} \sum n_i} \times 100 \quad (3.6)$$

where D_i , is the mean diameter of the class i and n_i corresponds to the number of microbubbles of the class i .

To study stability, the microbubbles were collected at the membrane outlet and diluted into a beaker under agitation by a propeller to disperse homogeneously the MBs suspension. The microbubble suspension was the circulated in the measurement cell of the Mastersizer instrument

during 90 s and the size measured every 10 s.

3.4.5.2 Optical microscopy

Immediate observation and recording are important for accurately measuring the size and size distribution of microbubbles. After producing microbubbles, an aliquot of the dispersion was immediately diluted and added to a Malassez counting chamber (Marienfeld-Superior). The observations were carried out with a microscope (Leica DM LM, France). A CCD video camera (Leica MC120 HD) was connected to the microscope to capture images, which were visualized with Leica Application Suite (LAS EZ) software (Version 3.4.0).

3.5 Results and discussion

3.5.1 Comparison of sonication and membrane technique

Microbubbles were prepared by sonication and the membrane technique using a membrane with pore size of 1.1 μm , $\Delta P/P_{BP} = 1.1$ and 1.0 wt% SDS. The bubble size distributions are shown in figure 3.4. The microbubbles obtained had a mean size and span of $D_{50} : 13.3 \mu\text{m}$ and span : 0.527, $D_{50} : 14.3 \mu\text{m}$ and span : 1.11 using the membrane technique and sonication, respectively. The microbubble sizes were in the micrometric range size for both techniques, however, a narrower size distribution was obtained with the membrane than by sonication, which produced both smaller and larger bubbles. Figure 3.5 shows MBs obtained by the membrane technique and observed by optical microscopy just after their preparation.

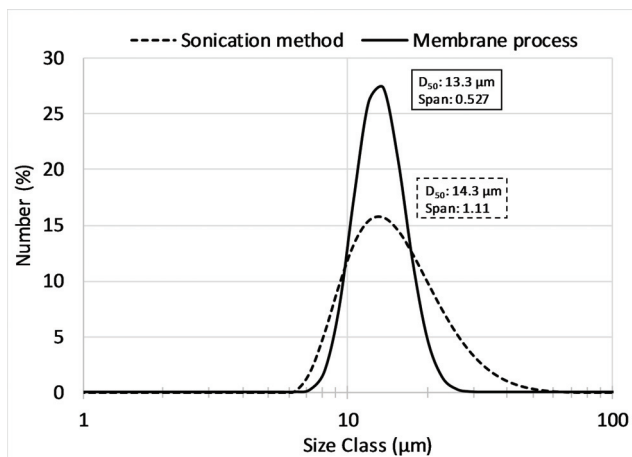


FIGURE 3.4 – Comparison of the size of microbubbles generated by sonication and membrane with a mean pore diameter of 1.1 μm . For both experiments, the continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8

Several techniques have also been compared by Stride [62] to produce microbubbles stabilized with L - α - phosphatidylcholine, Tween 80 and Polyethyleneglycol (PEG) 40 stearate : sonication, coaxial electrohydrodynamic atomization (CEHDA) and T-junction microfluidic. The CV% of microbubbles obtained were 150%, 38%, and 1%, for sonication, CEHDA and microfluidic, respecti-

vely. The CV% of microbubbles obtained by the membrane technique was around 17% and therefore was between the one obtained with CEHDA and microfluidic device as reported by Stride [62].

Indeed, the membrane technique can produce microbubbles with a span close to the span of the SPG membrane pore size distribution, in the range of 0.4-0.6. A similar observation was reported for the preparation of emulsions with droplet size of several microns by Vladislavljević et al. [136]. Monodispersed microbubbles can be produced with a membrane of narrow pore size distribution. However, the microbubbles size distribution depends on several other parameters, like the aqueous phase composition. Without surfactant, large polydisperse microbubbles were obtained due to microbubble coalescence at the pore opening by the membrane technique as shown by Kukizaki [124] or microchannel technique [178].

The yield of microbubbles obtained with the membrane was measured in the range $0.6-1.5 \times 10^{+10}$ MBs/min while the one reported by microfluidic techniques was around $2-6 \times 10^{+7}$ MBs/min. Our results are in agreement with previous studies reporting yields obtained by sonication [127].

Sonication has to be performed carefully in particular by considering the probe size compared to the vessel size, the position of the probe into the liquid, the frequency, the intensity and the time of sonication [187]. The membrane technique (environ 10^{+8} MBs/s) may give a better reproducibility between different operators due to fewer parameters involved. These differences between these two techniques are due to the mechanisms involved in microbubble formation. Sonication involves using high intensity ultrasound to produce a suspension of gas microbubbles in a liquid containing a suitable surfactant or polymer solution which adsorbs on the surfaces of the microbubbles to form a stabilizing coating. With the membrane technique, microbubbles are formed at the pore openings and can be detached by the continuous flowing aqueous phase. This technique involves much less energy, and the microbubbles size is controlled in part by the membrane pore size.

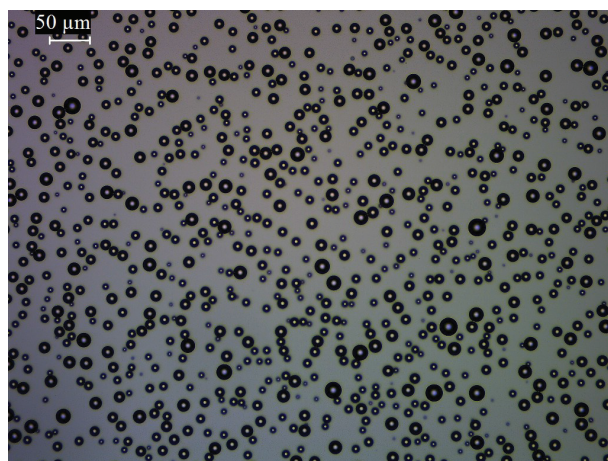


FIGURE 3.5 – Immediate observation by optical microscopy of the size distribution of microbubbles generated by the membrane with a mean pore diameter of $1.1 \mu\text{m}$. The continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8

3.5.2 Influence of process parameters

Microbubbles are formed in two steps, first microbubbles grow at the pore opening and then detach. The main forces that act on the microbubbles are the surface tension of the continuous phase, which is responsible for retaining the growing bubble at the pore opening, the static pressure difference force due to the pressure difference between the dispersed phase and the continuous phase at the membrane surface, and the drag force created by the continuous phase which detaches the microbubble from the membrane surface [144, 145]. The microbubble size is determined by the balance between these main forces. The surface tension force and the pressure difference force are opposite to each other.

During microbubble formation, the new interface created must be stabilized by surfactant molecules. Surfactants play two main roles : first, surfactant molecules adsorb at the new gas-liquid interface to reduce the surface tension and facilitate microbubble formation. Secondly, surfactants limit microbubble coalescence by stabilizing the newly created interface [144]. The adsorption kinetics of the surfactant at the gas-liquid interface is therefore a key factor which determines the microbubble size and size distribution [130]. To characterize the effect of the parameters that influence the microbubbles characteristics, we used SDS as the surfactant in the aqueous phase. This surfactant has a fast adsorption kinetics at the gas-liquid interface with a surface tension at $t=0$ s, γ_0 , equal to the surface tension at the equilibrium, γ_{eq} , (Table 1).

Surfactants	Gas	γ_0 ($mN.m^{-1}$)	γ_{eq} ($mN.m^{-1}$)	$P_{BP}(Theo)$ (Bar)	$P_{BP}(Exp)$ (Bar)
SDS	Air	30.2	30.2	1.10	1.05
	C ₃ F ₈	29.5	29.5	1.07	0.98
Tween 20	Air	42.0	37.5	1.36	1.35
	C ₃ F ₈	40.2	36.1	1.31	1.25
PEG40S	Air	49.4	47.3	1.72	1.55
	C ₃ F ₈	48.4	46.0	1.67	1.33

TABLEAU 3.1 – Measured values of surface tensions, γ_0 , at $t=0$ s, and at the equilibrium, γ_{eq} , between gas-liquid interface for surfactant solutions, and the calculated $P_{BP}(Theo)$ and the observed $P_{BP}(Exp)$ values of pression of bubble point with a mean pore size of 1.1 μm (Theo : Theoretical and Exp : Experimental)

3.5.2.1 Influence of the transmembrane pressure

For the three surfactants (SDS, Tween 20, and PEG40S) and the two gases (air and C₃F₈), P_{BP} was calculated from the Young-Laplace equation (Equation 3.3) and the results are presented in Table 1. For all systems, the measured P_{BP} values were close to the calculated values which assumed the contact angle between the membrane and the aqueous continuous phase was equal to zero. This indicates that the membranes used in this study were wetted correctly by the continuous aqueous solution. However, we noted a larger difference between theoretical and experimental P_{BP} values for the two non-ionic surfactants (Tween 20 and PEG40S). An electrostatic repulsive interaction exists between the anionic polar groups of the SDS molecules and the membrane surface (nega-

tively charged). While for non-ionic surfactants, although no strong repulsion exists between the hydrophilic groups of the molecules and the membrane surface, a surfactant layer covers the hydrophilic groups of the membrane. It could be explained by a hydrophilic interaction between the hydrophilic groups of the surfactant and the surface maintaining the surfactant at the membrane. This interaction may affect the hydrophilicity of the membrane surface and thus the contact angle formed between the membrane surface and the water phase. This results in a higher contact angle value, and therefore to higher theoretical P_{BP} values than experimental ones. Experimental values were slightly lower than theoretical values, probably due the presence of larger pores than the mean pore size of $1.1\ \mu\text{m}$ which was used in the calculations. Indeed, a lower transmembrane pressure is needed to produce microbubbles through larger pores which is present due to the span pore size distribution around 0.4-0.6.

We studied the influence of transmembrane pressure on the perfluorocarbon microbubbles formation. For a concentration of 1.0 wt% SDS and with the $1.1\ \mu\text{m}$ pore size membrane, the variations of microbubbles size, size distribution and dispersed phase flux versus the ratio of $\Delta P/P_{BP}$ are shown in Figure 3.6. At $\Delta P/P_{BP} < 1$, no microbubbles were observed. Perfluorocarbon monodispersed microbubbles were generated with the SPG membrane at transmembrane/bubble-point pressure ratio in the range of $1 < \Delta P/P_{BP} < 1.5$.

For a transmembrane/bubble point pressure ratio of $\Delta P/P_{BP} < 1.5$, the gaseous phase flux increased linearly with the ratio $\Delta P/P_{BP}$, while both mean microbubble size and size distribution were nearly constant (figure 3.6). This observed increase in gaseous phase influx is in agreement with Darcy's law, which suggests that the dispersed phase flux increases proportionally to the transmembrane pressure. Microbubbles grow until they reach a certain size and then detach at the pore opening. At these low pressures, the surface tension force dominates other forces and the microbubble size and size distribution are independent of the transmembrane pressure.

For $\Delta P/P_{BP} > 1.5$, the flux, microbubbles size and size distribution increased sharply, indicating the formation of larger microbubbles with a broad size distribution. This result can be explained by the static pressure difference force which dominates at these higher pressures.

The range of pressure for which no effect on droplet characteristics was observed was called the "size-stable zone" [130]. The "size-stable zone" was already observed by Kukizaki et Goto [134] for air bubbles, for a ratio $\Delta P/P_{BP} < 2$. For the same surfactant used in our experiments, SDS, Kukizaki et Goto [134] found that the size-stable zone existed at higher pressure. This can be explained by the comparison of the difference in surface tension at the equilibrium. Indeed, the surface tension was $36.5\ \text{mN.m}^{-1}$ in Kukizaki et Goto's article [134], while in our study, the surface tension was $29.5\ \text{mN.m}^{-1}$ which implies a lower surface tension force for keeping the microbubble at the pore opening and a thus a faster microbubble detachment. This result was also reported by Kukizaki et al. [130] for droplets formed with two different concentrations of SDS, for which the lower interfacial tension presented a size-stable zone which ends at lower pressure.

The dispersed phase flux was $1.28\text{-}2.55 \times 10^{-5}\ \text{m}^3\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at $\Delta P/P_{BP} < 1.5$ and for the $1.1\ \mu\text{m}$ pore size membrane. These values are in agreement with the results of Kukizaki [126] who found $6\text{-}15 \times 10^{-5}\ \text{m}^3\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for a symmetric SPG membrane with a size pore of $1.58\ \mu\text{m}$. The authors also showed that the use of asymmetric SPG membranes significantly increased the air flux (around 40 times) when compared to symmetric SPG membranes. The use of asymmetric SPG membranes

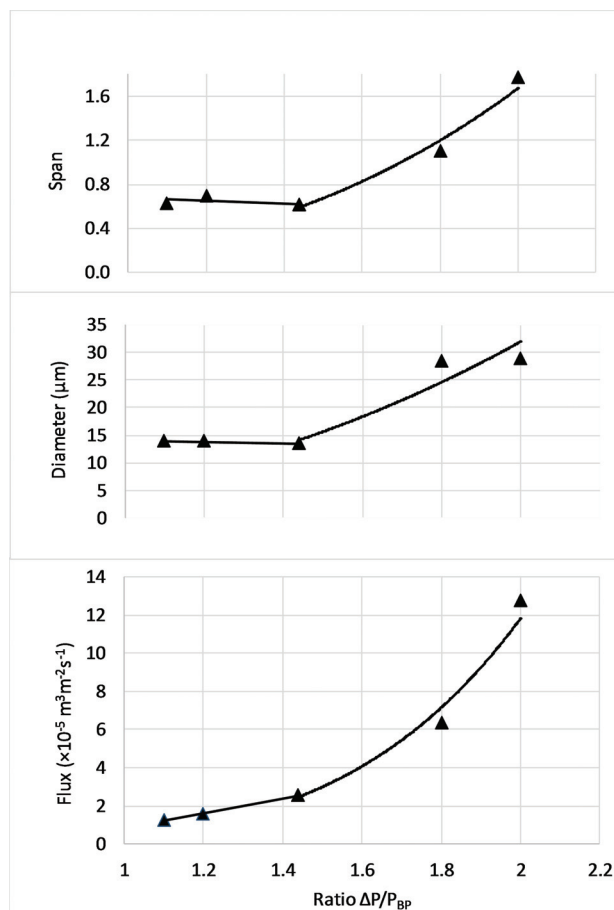


FIGURE 3.6 – Influence of transmembrane/bubble point pressure ratio, $\Delta P/P_{BP}$, on the gaseous phase flux, J , microbubble diameter, D_{50} , and span of the distribution. Experimental conditions : gaseous phase was C_3F_8 , mean pore of $1.1 \mu\text{m}$, with 1.0 wt% of SDS and a low shear stress

could be also an alternative to increase the production rate of perfluorocarbon microbubbles. The $\Delta P/P_{BP} = 1.1$ seems to be the best ratio to control the microbubble formation. Indeed, a ratio of 1 would be not necessary to activate a sufficient number of pores to obtain a great yield of microbubbles and a ratio around 1.4 or 1.5 produced a much higher gaseous flux which could lead to the loss of control of the microbubble formation.

3.5.2.2 Influence of the wall shear stress

The influence of shear stress of the continuous phase on microbubbles size and size distribution was measured for membranes with a mean pore size of $1.1 \mu\text{m}$ and $\Delta P/P_{BP} : 1.1$ (Figure 3.7). Perfluorocarbon microbubbles were prepared at two different shear stresses : 0.73 Pa (low shear stress) with a classical tubular module and 34.8 Pa (high shear stress) with an annular device. The low shear stress was used to recover the microbubbles at the membrane surface. With the $1.1 \mu\text{m}$ pore size membrane, when increasing the wall shear stress from 0.73 to 34.8 Pa, the microbubble size distribution was the same at $13.3 \mu\text{m}$ and $13.1 \mu\text{m}$, respectively. For both conditions, mono-dispersed microbubbles were produced with a CV% of 16% at low shear stress and 17% at high shear stress. However, we observed a better size repeatability at a high shear stress as shown by the error bars in Figure 3.7.

The influence of shear stress depends on other parameters like transmembrane pressure and interfacial tension. Vladislavljević [23] reported that two mechanisms of drop formation are possible : (1) a shear-controlled detachment as a result of shear stress on the membrane surface and (2) a spontaneous detachment driven by interfacial tension. For example, Kukizaki [126, 134] observed that when increasing the shear stress, the bubble size decreased to a limit value beyond which the size was independent of the applied shear stress. Generally, variation in size occurred at very low stress values and at high transmembrane pressures. When preparing emulsions, Vladislavljević et Schubert [120] showed that at high transmembrane pressures, the droplet size decreased when increasing the wall shear stress from 0.6 to 47 Pa, while at smaller transmembrane pressures, the size decreased very slightly, from 3.5 to 3.4 μm , for wall shear stress of 0.55 Pa and 91 Pa, respectively.

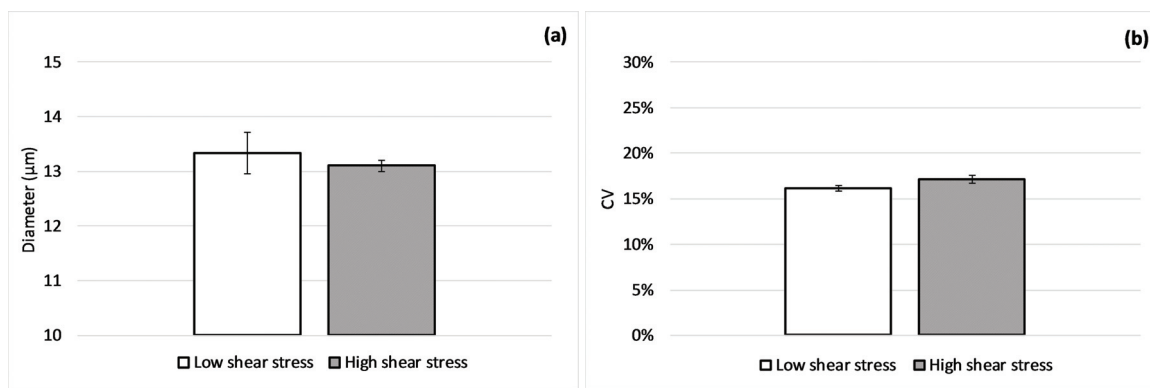


FIGURE 3.7 – Influence of shear stress, τ_w , (a) on the microbubble diameter and (b) on the CV% for membrane mean pore size 1.1 μm at experimental conditions : continuous phase 1.0 wt% SDS in water, gaseous phase C_3F_8 , and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1

In our study, the main principle to MBs formation at the tortuous and non-circular pores openings are driven by the second mechanism where the surface tension force dominates other forces (shear stress force, transmembrane pressure). In our case, the MBs size is independent on shear stress as we fixed a low transmembrane flux ($\Delta P/P_{BP}$: 1.1). The effect of the wall shear stress depends on the surface tension value. For example, Lepercq-Bost et al. [155] showed that at lower interfacial tension, the shear stress had a lower effect on the droplet diameter of emulsions generated by ceramic membranes. Indeed, at a lower surface tension, the force retaining the MBs or droplets at the pore opening is lower and the microbubble detachment is easier; this could explain the lower effect of shear stress on the droplet formation. In addition, our results show the same trend at a lower surface tension (1.0 wt% SDS; γ : 29.5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) compared with the higher surface tension used by Kukizaki et Goto [134] (0.3 wt% SDS; γ : 36.5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) who reported that the size was dependent on the shear stress. Indeed, the surfactant concentration influences considerably the surfactant adsorption kinetics and thus the dynamic surface tension [144]. At the higher surfactant concentration used in our study, the surface tension force dominated and the drag force created by the shear stress could not modify the microbubble size.

The mechanisms of microbubble production at low shear stress (0.73 Pa) may be compared to the ones suggested for spontaneous detachment of air MBs [117]. This detachment is governed by the surface tension at a low dispersed phase flux as explained above. The adsorption kinetics of

surfactant from bulk to the new gas-liquid interface is a key parameter in the spontaneous detachment due to the absence of continuous phase flux. In this case, the tortuous pores and irregular cross-section of the SPG membrane (Figure 3.2) facilitates the generation of the microbubbles. In addition, the dispersed phase deformation by the non-circular pores leads to the formation of a neck which may facilitate the MBs detachment, as observed for droplet production [203].

3.5.2.3 Influence of the pore size

Perfluorocarbon microbubbles were prepared with the 0.2, 0.5 and 1.1 μm pore size membranes. The three experiments were realized with a continuous phase containing 1.0 wt% SDS, $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 and at a low shear stress (0.73 Pa). The mean diameter of the microbubbles obtained is shown in Figure 3.8. As expected, the microbubble mean size decreased when the membrane pore size was decreased. We observed a relationship between MBs size and pore size that seems exponential, but this would have to be confirmed with other pore size membranes. Other studies have reported linear relations with pore sizes in the range of 1 to 10 μm , where the D_{MBs}/D_{Pore} ratio was between 7 and 10 depending of the surfactant used [124, 126]. In our study, we found a ratio of D_{MBs}/D_{Pore} around 12 for the 0.5 and 1.1 μm pore size membranes, in agreement with a possible linear relationship. But for the smallest pore size used of 0.2 μm , we found a ratio of 22. This result may be explained by an initial growth period due to the influx of air dissolved (N_2 and O_2) in water diffusing into the PFC MB [86]. Also the growth caused a decrease of the Laplace pressure, which is inversely proportional to the MBs radius. The Laplace pressure, δP , is the main mechanism which is responsible of the disappearance of a MB, given by the equation :

$$\delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (3.7)$$

where γ is the surface tension and r is the radius of the microbubble. The Laplace pressure is very high for microbubbles with small size. As a result, the microbubble size distribution changes over time, with the larger bubbles growing in size and the smaller microbubbles shrinking and then finally disappearing. This explains the polydisperse distribution, characterized by a coefficient of variation of 31%, of microbubbles obtained with the 0.2 μm pore size.

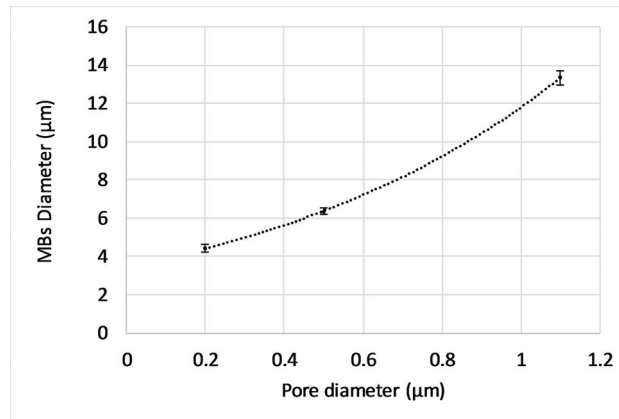


FIGURE 3.8 – Influence of mean pore size (0.2, 0.5 and 1.1 μm) on the microbubble diameter, D_{50} , at experimental conditions : continuous phase 1.0 wt% SDS in water and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1

For comparison, when preparing droplets by membrane emulsification, the $D_{Droplets}/D_{Pore}$ ratio was found lower, in the range of 3.1-3.7 [120]. Indeed, the oil droplet diameter decreased when increasing the dispersed phase viscosity [130]. Therefore, for the same membrane, the oil droplets size is expected to be lower than the microbubbles size. This results in a $D_{Droplets}/D_{Pore}$ ratio lower than the D_{MBs}/D_{Pore} ratio.

3.5.3 Influence of the surfactant type

Perfluorocarbon microbubbles were prepared with different surfactants : SDS, Tween 20, PEG40S in the continuous phase at 1.0 wt%. The 1.1 μm pore size membrane was used, at a low shear stress (0.75 m.s^{-1}), and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1. Uniform size distributions were obtained with the various surfactants as shown in Figure 3.9. The smallest size and narrower dispersity were obtained with SDS, followed by Tween 20 and PEG40S. These results can be related to the equilibrium and dynamic surface tension of the various solutions measured by the pendant drop method (Figure 3.10). The three surfactants showed different equilibrium surface tension, the lowest being obtained with SDS (29.5 mN.m^{-1}), then Tween 20 (36.1 mN.m^{-1}), and the highest with PEG40S (46.0 mN.m^{-1}). As explained previously, at a lower surface tension, the force retaining the microbubble at the pore opening is lower and the microbubble detachment is easier, resulting in microbubbles with smaller size and better monodispersity with SDS.

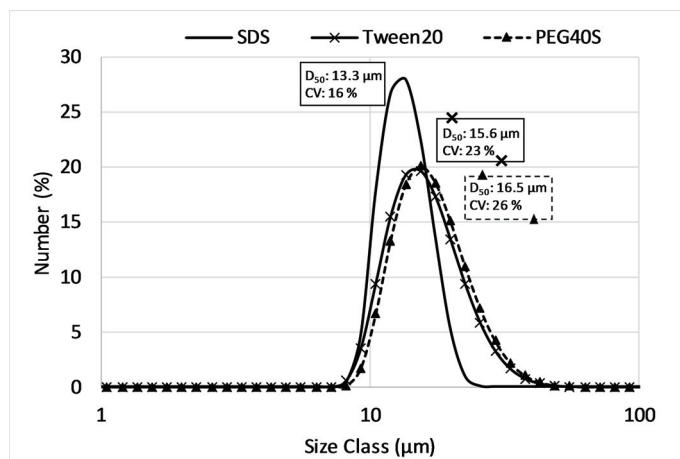


FIGURE 3.9 – Influence of the surfactants at a concentration of 1.0 wt% on the microbubble size distribution. Experimental conditions : gaseous phase was C_3F_8 , membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1

In addition, the three surfactants showed different adsorption kinetics, the fastest adsorption kinetics being obtained with SDS and the lowest with PEG40S. When a microbubble is formed, the equilibrium surface tension, γ_{eq} , of the surfactant solution is not reached instantaneously. The surfactant molecules must diffuse at the new interface from the bulk solution, their hydrophobic tails directed toward the gaseous phase. For a surfactant with a fast adsorption kinetic, such as SDS, the surface tension at $t=0$ s is close to the equilibrium surface tension and the microbubbles detach faster from the membrane surface. This results in microbubbles with smaller size and better uniformity. Therefore, larger and more polydisperse microbubbles were obtained with

surfactants having the slowest kinetics (Tween 20 and PEG40S). This result was also observed for oil droplets produced by membrane emulsification, as reported by Schröder et al. [144] : the faster a surfactant adsorbs at the new interface, the smaller the droplets produced. In addition, surfactants with faster adsorption kinetics help to reduce the probability of microbubbles coalescing at the pore opening, which also results in microbubbles with smaller size and better monodispersity.

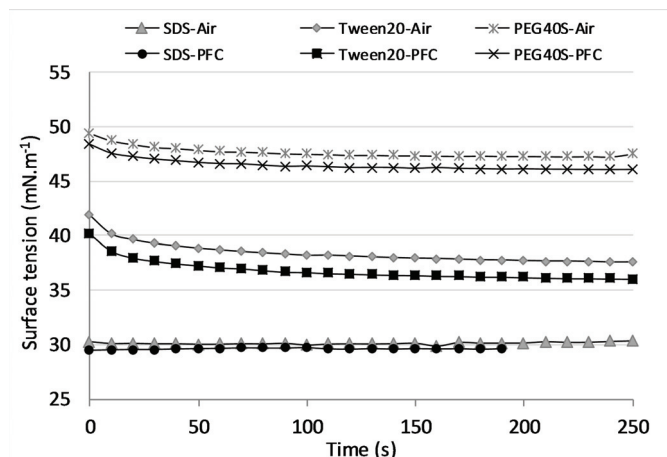


FIGURE 3.10 – Surface tension at the gaseous/liquid interface for various surfactants at 1.0 wt% and air or C_3F_8 at room temperature (PFC : Perfluorocarbon)

Another parameter that can influence coalescence is the interaction between the hydrophilic head groups of the surfactant and the membrane surface [124]. The surfactant molecules must not interact with the membrane surface by electrostatic interactions or Van der Waals forces, as this could result in a change of the membrane hydrophobicity. In the case of SDS, the presence of negative charges on the head groups of the SDS molecules and the membrane surface facilitates the microbubbles detachment by electrostatic repulsion and improves the size distribution compared to Tween 20 and PEG40S which do not present negative charges on their head groups. Overall, surfactants play an important role to produce monodisperse microbubbles by the membrane technique.

3.5.4 Influence of the gaseous phase

Figure 3.10 shows the dynamic surface tension of the bubbles as a function of time for the three surfactants at 1.0wt%. The decrease of the surface tension corresponds to the progressive adsorption of surfactant molecules at the gas-water interface until equilibrium. The initial surface tension value, γ_0 , is around 72 mN.m⁻¹ at the air-water interface and 70.1 mN.m⁻¹ at the perfluorocarbon-water interface in the absence of surfactant. These values at t=0 s were not measurable in presence of 1.0wt% surfactant due to rapid adsorption kinetics. The presence of perfluorocarbon in the microbubbles significantly decreased the interfacial tension at equilibrium, γ_{eq} , compared with air. A higher decrease of the surface tension at equilibrium was observed from 37.5 to 36.1 mN.m⁻¹ for Tween 20 and 47.3 to 46.3 mN.m⁻¹ for PEG40S after 4 min. For SDS, this effect was less pronounced due to the fast adsorption of the surfactant at the gas-liquid interface. As reported by

Nguyen [190] for phospholipids, the perfluorocarbon gas increased the adsorption kinetic of the surfactant and decreased the equilibrium surface tension. These authors concluded that perfluorocarbon acts as a cosurfactant at the gas-liquid interface, despite the absence of any amphiphilic character.

As explained in the previous sections, a lower surface tension allows obtaining smaller microbubbles, by decreasing the retention force which keeps the microbubble at the pore opening and thus facilitating the microbubble detachment. Indeed, we observed a decrease of the microbubble size with the use of perfluorocarbon gas compared with air for three surfactants (Figure 3.11). The decrease of microbubble size was less pronounced with SDS than for the two other surfactants, due to a smaller decrease of the equilibrium surface tension.

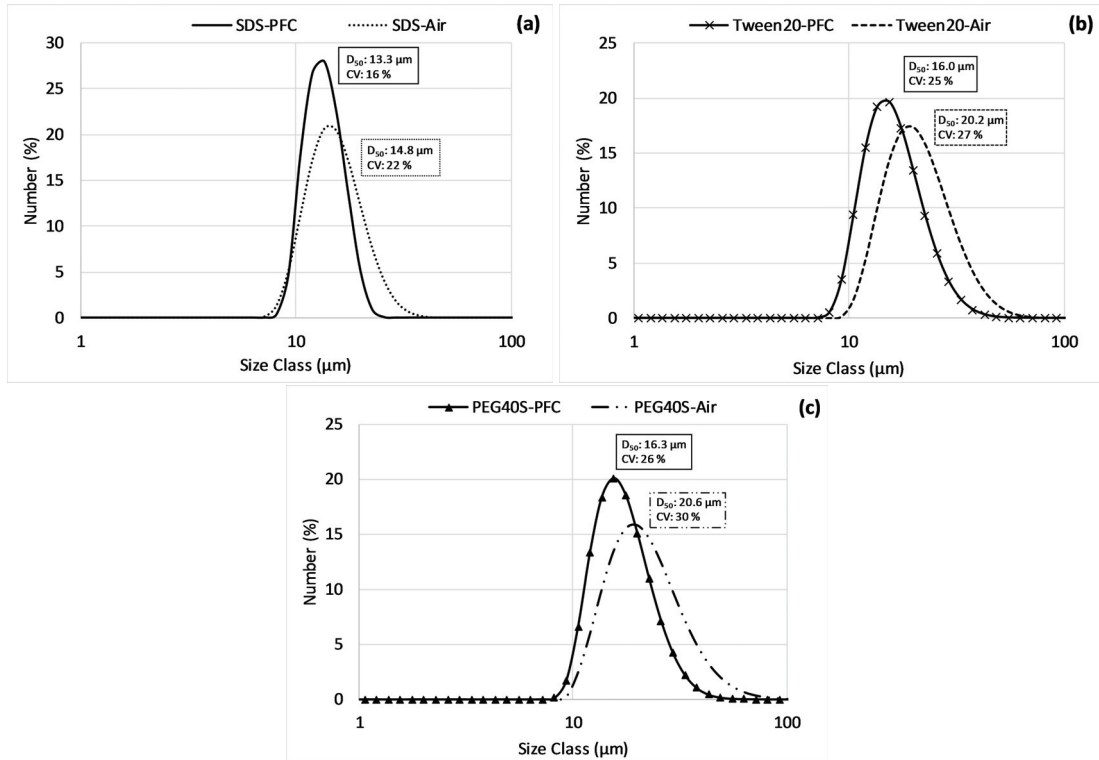


FIGURE 3.11 – Influence of the gaseous phase on the microbubble size distribution stabilized with 1.0 wt% (a) SDS, (b) Tween 20 and (c) PEG40S. Experimental conditions : membrane mean pore size $1.1 \mu\text{m}$ and ratio $\Delta P/P_{BP} : 1.1$ (PFC : Perfluorocarbon)

3.5.5 Microbubbles stability

Stability of perfluorocarbon microbubbles stabilized by the three surfactants at 1.0 wt% was measured during 90 s. The perfluorocarbon microbubbles were prepared with the membrane of pore size $1.1 \mu\text{m}$ and $\Delta P/P_{BP} : 1.1$ (Figure 3.12). Air microbubbles stabilized with SDS and prepared at the same experimental conditions were also tested. In all cases, the mean size of the microbubbles increased with time. This increase was less pronounced for perfluorocarbon microbubbles (1.2 for microbubbles stabilized with SDS between $t=0$ s and $t=90$ s) compared with air microbubbles (2.2 times size increase). For the three surfactants tested, the size of the perfluorocarbon microbubbles increased in a similar way, the increase being equal to 1.29 for Tween 20 and 1.33 for

PEG40S. Figures 3.12 and 3.13 show two main trends : an increase in microbubble size associated to a decrease in microbubbles concentration. This is the result of the disappearance of the smaller microbubbles while the larger microbubbles grow in size.

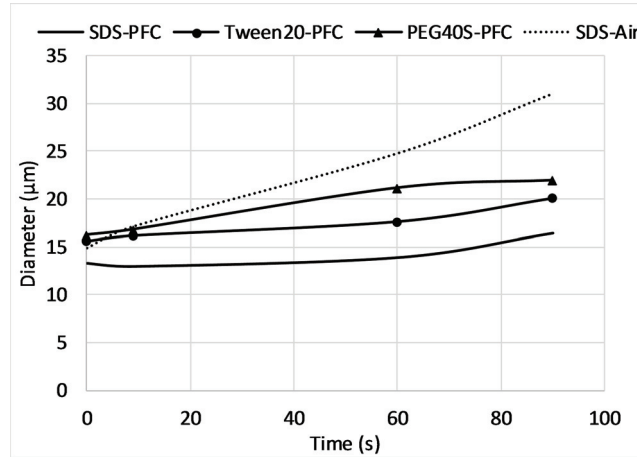


FIGURE 3.12 – Variation of microbubble diameter, D_{50} , as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions : membrane mean pore size $1.1 \mu m$ and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC : Perfluorocarbon)

The variation of microbubbles diameter over time presents two main stages : (1) an initial growth period, (2) followed by microbubble dissolution. The fast initial growth of the microbubble is due to the influx of air dissolved in water diffusing into the PFC microbubble [86]. The microbubble dissolution is mainly related to the Laplace pressure experienced by a gas microbubble, given by equation 3.7. As gas leaves the microbubble, due to the pressure gradient, the bubble shrinks and the Laplace pressure increases, which accelerates the rate of gas dissolution and the resulting bubble shrinkage. The surfactant at the gas/water interface reduces the gas/water surface tension and thus decreases the Laplace pressure, but does not eliminate it. The rate of bubble shrinkage as a function of time (t) resulting from the dissolution of the gas into the bloodstream is predicted by the equation 3.8 [21, 85] :

$$\frac{dr}{dt} = -LD_w \left[\frac{P^* + \frac{2\gamma}{r}}{P_{atm} + \frac{4\gamma}{3r}} \right] \left[\frac{1}{r} + \frac{1}{\sqrt{D_w t \pi}} \right] \quad (3.8)$$

where L is the Ostwald coefficient, D_w is the gas diffusivity in water, γ is the surface tension, P_{atm} is the atmospheric pressure, and P^* is the excess pressure [21, 47]. Equation 3.8 predicts that the inclusion of perfluorocarbon gas with low solubility in water (which gives a low Ostwald coefficient) increases the lifetime of a microbubble. The Ostwald coefficient is defined as the partition coefficient of the gas between the gaseous phase and aqueous phase (ratio of the solubility of the gas in the liquid to the density of the gas). The lower the Ostwald coefficient, the longer the lifetime of the microbubbles since perfluorocarbon gases ($L_{C_3F_8}$: 583×10^{-6} ; $25^\circ C$) are less water-soluble than the air (L_{O_2} : 31110×10^{-6} and L_{N_2} : 15880×10^{-6} ; $25^\circ C$) [201]. The gas diffusion coefficient, D_w , is inversely proportional to the gas molecules size, which results in a decrease in diffusivity for C_3F_8 (188 g.mol^{-1}) compared to air (28.9 g.mol^{-1}).

The concentration of perfluorocarbon microbubbles stabilized with SDS was constant during 60 s, before decreasing, while the air microbubbles concentration decreased from $t=0$ s (Figure 3.13). The mechanism by which larger microbubbles grow in size at the expense of smaller bubbles is called Ostwald ripening. The dissolution of the gas in the aqueous phase increases as the interfacial curvature increases and then the bubble size decreases quickly. Thus, perfluorocarbon microbubbles showed a better stability than air microbubbles.

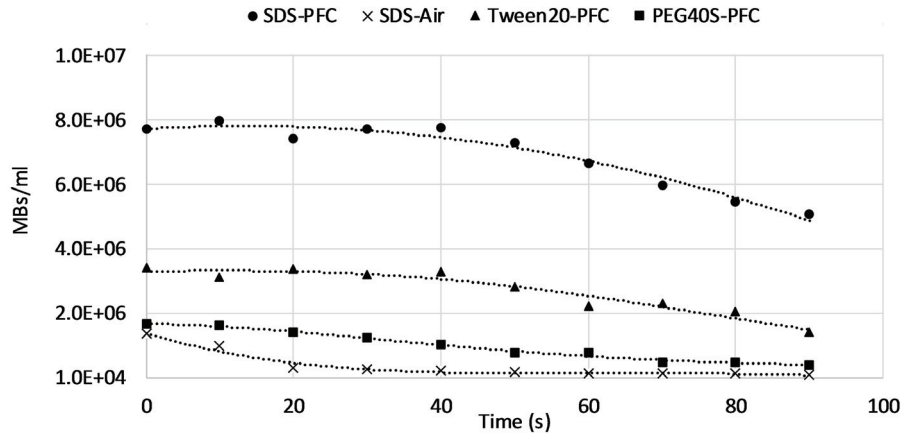


FIGURE 3.13 – Variation of concentration MBs/ml as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions : membrane mean pore size $1.1 \mu m$ and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC : Perfluorocarbon)

Another phenomenon occurs at the gas-liquid interface, where the dynamic adsorption and desorption of the surfactant molecules creates short spaces between molecules, facilitating the gas transfer [88]. In the case of perfluorocarbon microbubbles stabilized with PEG40S, the gas transfer into the aqueous phase could be increased, due to the low cohesive shell created by steric repulsion between the hydrophilic heads of the PEG40S macromolecules. This could explain the faster decrease of PEG40S perfluorocarbon microbubble concentration.

However, the lifetime of the microbubbles obtained with the surfactants was low compared with microbubbles stabilized by lipids [189]. These microbubbles could then be used as transiently stable microbubbles as shown by Dhanaliwala et al. [197], as large microbubbles ($19 \mu m$) produced by microfluidic process were administered *in vivo* in a mouse and shown to generate a large acoustic response in both the right and left ventricles.

3.6 Conclusion

In this study, we produced successfully perfluorocarbon microbubbles with the use of tubular SPG membranes with a $1.1 \mu m$ pore size and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1. The microbubbles were generated with a mean diameter of 13.3 , 15.6 and $16.5 \mu m$ with a narrow size distribution for the three surfactants SDS, Tween20 and PEG40S, respectively. The effect of transmembrane pressure, shear stress at the membrane surface due to the water phase flow, and pore size on the microbubbles size was investigated. The transmembrane pressure, until a threshold of $\Delta P/P_{BP} < 1.5$, and shear stress did not affect the size of the microbubbles which were produced at a high yield (environ 10^{+10} MBs/min).

As expected, the decrease of the pore size led to a decrease of the microbubble size, but the dilution of microbubbles into a beaker before the size measurement by laser diffraction increased their dissolution which impacted their size and size distribution. This study also showed that the perfluorocarbon gas decreased the surface tension at the gas-water interface to produce smaller microbubbles compared with air microbubbles and that the hydrophobicity properties of the perfluorocarbon gas increased the microbubbles stability. The main phenomenon governing the formation of monodispersed microbubbles by the membrane technique is the adsorption kinetics of the surfactant at the new gas-liquid interface at the pore opening.

Chapitre 4

Préparation de microbulles de PFC stabilisées par des phospholipides en utilisant un procédé membranaire

Contents

3.1	Préambule	80
3.2	Abstract	80
3.3	Introduction	81
3.4	Materials and methods	83
3.4.1	Materials	83
3.4.2	SPG membranes and membrane module	83
3.4.3	Surface tension measurements	83
3.4.4	Preparation of microbubbles	84
3.4.5	Characterization of microbubbles	86
3.5	Results and discussion	87
3.5.1	Comparison of sonication and membrane technique	87
3.5.2	Influence of process parameters	89
3.5.3	Influence of the surfactant type	94
3.5.4	Influence of the gaseous phase	95
3.5.5	Microbubbles stability	96
3.6	Conclusion	98

4.1 Introduction

La cinétique d'adsorption de tensioactifs insolubles sur une interface air/liquide présente un intérêt pour diverses applications, notamment dans la stabilisation de mousses et de microbulles, la formulation de particules lors du séchage par pulvérisation et la conception de tensioactifs pulmonaires thérapeutiques [204, 205, 206]. Les phospholipides ont la caractéristique d'être des molécules hydrophobes en raison de leurs deux chaînes hydrocarbonées. Ils ont une faible solubilité dans l'eau, avec une CMC d'environ 10^{-10} - 10^{-11} mol/L. Lorsqu'ils sont mélangés à l'eau, ces phospholipides s'agrègent pour former des vésicules lipidiques stables appelées liposomes. Ces vésicules sont composées d'une bicouche lipidique contrairement aux micelles.

Les tensioactifs solubles étudiés dans le chapitre précédent présentent un mécanisme d'adsorption impliquant un transfert de matière à partir de micelles lorsque des concentrations supérieures à la CMC sont utilisées. Les micelles se dissocient en monomères au voisinage de l'interface puis s'adsorbent à celle-ci [207, 208]. Il a également été suggéré que les micelles pourraient s'adsorber directement à l'interface pour former une monocouche [207, 209]. Des mécanismes semblables à l'adsorption à partir de micelles ont été proposés dans le processus de formation d'une monocouche à partir d'une dispersion de vésicules lipidiques (Figure 4.1) [17, 190, 210, 211] : soit l'interface est stabilisée par un mécanisme présentant un échange vésicule-monomère, où la molécule libre s'adsorbe; soit par une adsorption directe des vésicules dans laquelle la bicouche lipidique s'ouvre pour orienter les molécules, avec les chaînes hydrocarbonées en interaction avec la phase gazeuse hydrophobe. En raison de la nature insoluble des phospholipides, les vésicules lipidiques formées sont relativement stables avec une durée de vie beaucoup plus longue que les micelles. Grâce aux fortes interactions hydrophobiques entre les chaînes carbonées, la dynamique d'adsorption des liposomes est grandement réduite. En effet, il est attendu que la libération d'un monomère à partir d'un liposome se produise de manière plus lente réduisant la cinétique d'adsorption à l'interface.

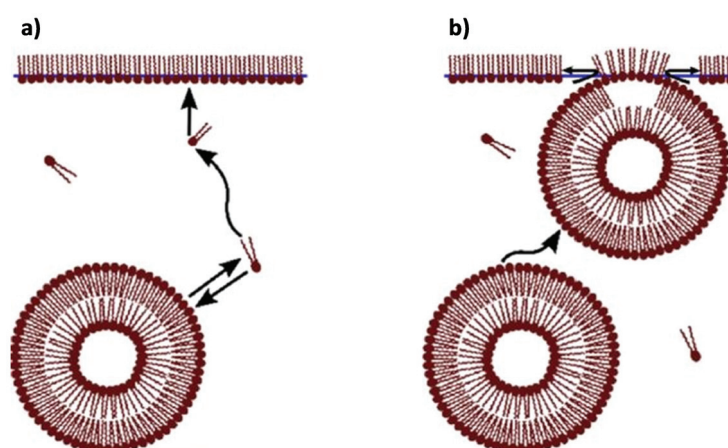


FIGURE 4.1 – Mécanismes d'adsorption de phospholipides à l'interface, a) adsorption d'un monomère via un échange vésicule-monomère et b) adsorption directe des vésicules à l'interface [17]

Cette étude s'est concentrée sur le développement d'un procédé membranaire pour la préparation de microbulles stabilisées par des phospholipides afin d'augmenter la durée de vie obtenue

avec des microbulles stabilisées par des molécules solubles. Le procédé membranaire développé a une configuration de type microkit. La description de cette configuration ainsi que la procédure de préparation des microbulles sont données dans le paragraphe 2.1.2. Dans cette configuration, le module membranaire était plongé dans un bécher contenant la totalité de la phase continue. Comme nous avons montré dans le chapitre précédent, la cinétique d'adsorption va déterminer la taille et la distribution en taille des microbulles. Afin d'accélérer cette dynamique d'adsorption des phospholipides, deux stratégies ont été adoptées. La première a été de modifier la composition de la formulation en ajoutant des tensioactifs et/ou des hydrotropes dans la phase aqueuse. Les hydrotropes ont une structure similaire à celle des tensioactifs solubles, mais présentent une partie hydrophobe bien plus courte, ce qui évite leur agrégation sous forme de micelles. Les tensioactifs et les hydrotropes devraient ainsi aider la formation et la stabilisation rapide de la nouvelle interface gaz/liquide, permettant dans un second temps leur remplacement par les phospholipides en raison d'une dynamique d'adsorption plus lente. La deuxième stratégie a été d'augmenter la température au-dessus de la température de transition de phase (T_m) du phospholipide utilisé ($T_m=41^\circ\text{C}$ pour le DPPG). Dans ces conditions, la structure de la bicouche lipidique passe de l'état gel, où les molécules sont ordonnées, à une structure désordonnée et fluide. L'augmentation de la température a donc pour effet d'avoir en suspension des vésicules lipidiques plus fluides pouvant générer des vitesses d'adsorption plus rapides en raison d'une diminution des interactions hydrophobiques au niveau des chaînes hydrocarbonées. Également, l'influence de trois tailles de pores a été étudiée, 0,6, 0,8 et 1,1 μm . Enfin, une première étude acoustique sur la réponse harmonique des microbulles a été menée à l'aide d'une sonde échographique connectée à un système Verasonics Vantage 256 générant les ondes ultrasonores.

4.2 Mesures de tensions superficielles

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux tensions superficielles (TS) des phases continues utilisées, afin de mieux comprendre les résultats obtenus lors de la préparation des microbulles avec le procédé membranaire. En effet, une faible tension superficielle permet la formation de microbulles plus petites grâce à la réduction de la force de rétention qui maintient la microbulle à l'ouverture des pores et facilite ainsi son détachement.

Sur la figure 4.2, nous pouvons observer l'influence de six phases continues sur la tension superficielle à l'équilibre à l'interface avec une bulle de PFC (méthode en 2.3.1). Pour l'étude à 50°C , la suspension de vésicules lipidiques a été chauffée au-dessus de la T_m (41°C) pour ainsi avoir des vésicules possédant une structure lipidique fluide au niveau de la bicouche. La courbe grise correspondant à la suspension de vésicules composées uniquement de DPPG, présente une tension superficielle élevée (environ $57,4 \text{ mN/m}$) qui décroît continuellement au cours du temps sans atteindre un équilibre comme observé sur les autres courbes. L'ajout du tensioactif PEG40S dans la formulation de la phase continue a permis de réduire de 5 mN/m la tension superficielle ($52,3 \text{ mN/m}$). Également, il est observé que les tensions à l'équilibre diminuent avec l'augmentation de la température. En effet, pour les températures étudiées (courbes orange : 25°C et bleu clair : 50°C), les valeurs de tensions superficielles à l'équilibre sont différentes. Une valeur de tension superficielle à l'équilibre de $45,5 \text{ mN/m}$ a été obtenue lorsque les températures étaient supérieures à la

T_m du DPPG. Dans ces conditions, la valeur de la tension superficielle se rapproche de celle obtenue avec une solution contenant uniquement du PEG40S (45,8 mN/m). Également, une solution contenant uniquement un hydrotrope (propylène glycol) présente une faible activité de surface, puisque la tension superficielle obtenue est de 60 mN/m. Cependant, un équilibre est très rapidement atteint puisque $TS_0 = TS_{eq}$, caractéristique d'une adsorption rapide des molécules à l'interface (courbe verte). Ce phénomène semble particulièrement intéressant puisqu'il permettra de rapidement stabiliser la nouvelle interface lors de la production de microbulles et ainsi réduire la probabilité de coalescence à la sortie des pores de la membrane et donc la polydispersité de l'échantillon préparé. Lorsque cet hydrotrope est ajouté à un mélange de DPPG :PEG40S (courbe jaune), la tension superficielle a été réduite à une valeur de 50,5 mN/m. La diminution de la tension superficielle à l'équilibre dans ces conditions semble encourageante pour la préparation de microbulles plus petites grâce à la réduction de la force de rétention à l'ouverture des pores de la membrane.

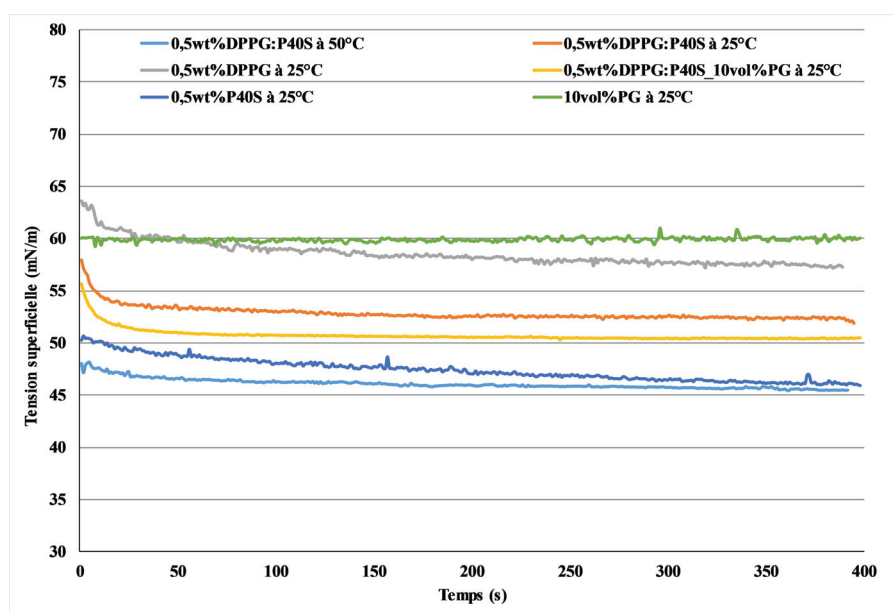


FIGURE 4.2 – Évolution de la tension superficielle en fonction du temps (PG : Propylène glycol)

La cinétique d'adsorption des molécules présentes dans les phases continues est donnée dans la figure 4.3. Le temps requis pour atteindre la tension superficielle à l'équilibre a été le plus long lorsque la phase continue était composée uniquement de DPPG (courbe grise). Les vitesses d'adsorption mesurées à 25°C et 50°C ont été identiques lorsque le mélange de DPPG :PEG40S a été utilisé (courbes orange et bleu). La structure fluide des bicouches à une température supérieure à la T_m a eu comme seul effet une réduction de la tension superficielle à l'équilibre, mais n'a eu aucune influence sur la vitesse d'adsorption à l'interface. Cependant, le temps requis pour atteindre la tension superficielle à l'équilibre a été fortement réduit en présence de propylène glycol (courbe jaune). Ces résultats montrent une adsorption plus rapide des molécules en présence du propylène glycol dans la phase continue. Nous suggérons que cela est dû à une adsorption rapide du propylène glycol qui favorise par la suite l'adsorption rapide du mélange DPPG :PEG40S. En effet, cette adsorption du propylène glycol pourrait créer un milieu favorable à l'interface pour

faciliter une adsorption rapide.

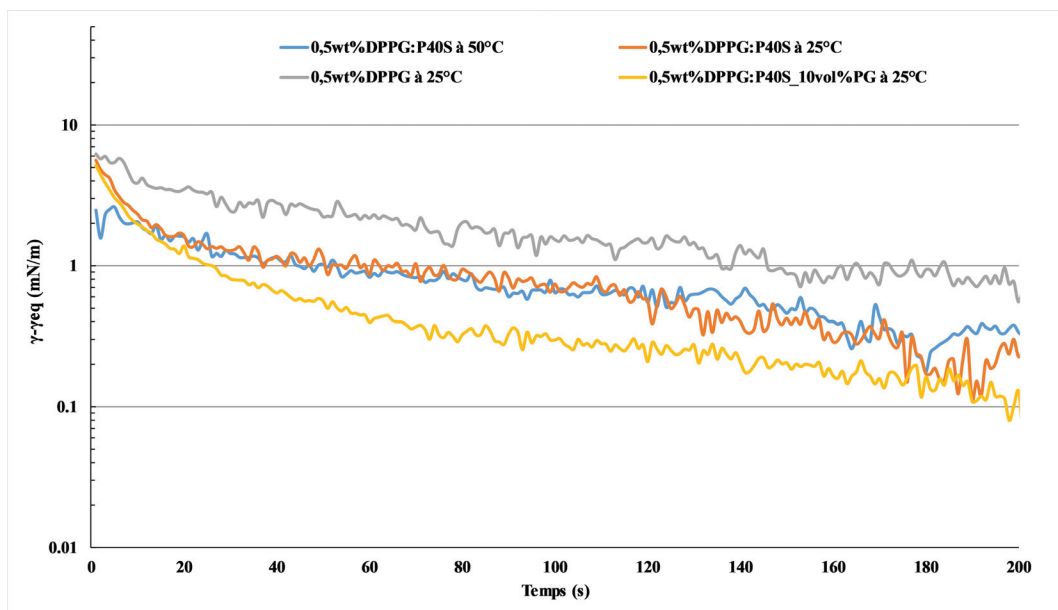


FIGURE 4.3 – Cinétique d'adsorption de différentes phases continue contenant le phospholipide DPPG à l'interface d'un gaz de PFC

4.3 Influence du PEG40S

Dans cette partie, nous comparons la préparation de microbulles à partir d'une phase continue contenant uniquement 0,5 wt% DPPG avec une phase continue composée d'un mélange de 0,5 wt% DPPG :PEG40S (rapport molaire 9 :1). Sur la figure 4.4, la formation de macrobulles est observée à partir de la phase continue contenant seulement du DPPG. Des macrobulles indiquées par des flèches rouge sont observables en surface.

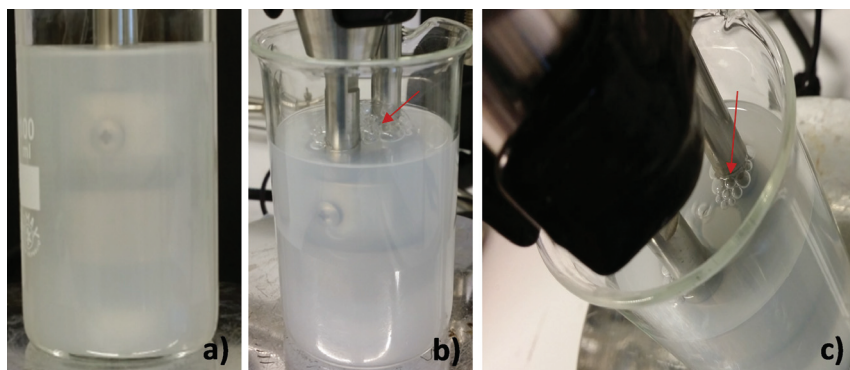


FIGURE 4.4 – Procédé membranaire en configuration microkit pour la préparation de bulles à partir d'une phase continue contenant seulement du DPPG avec une membrane présentant un diamètre de pore de 1,1 μ m, a) $\Delta P/P_{BP} < 1$: aucune microbulle n'est produite, b) et c) $\Delta P/P_{BP} > 1$: la pression de gaz exercée est supérieure à la pression de point de bulle. Les flèches rouges indiquent la formation de macrobulles

Dans cette configuration, une pression de point de bulle supérieure a été trouvée lorsque une phase continue contenant uniquement du DPPG était utilisée ($P_{BP}=1,9$ bar pour $D_{pore}=1,1$ μm). Ce résultat était attendu en raison d'une tension superficielle plus élevée avec le DPPG seul. L'ajout du PEG40S à cette phase continue a réduit la tension superficielle diminuant ainsi la pression de point de bulle à 1,55 bar pour un même D_{pore} . Sur la figure 4.5, la formation de microbulles stabilisées par un mélange de DPPG :PEG40S en fonction de la pression peut être observée ($D_{pore}=1,1$ μm). Lorsqu'un rapport de pression $\Delta P/P_{BP}<1$, aucune microbulle n'a été produite, car la pression de point de bulle n'a pas été atteinte (Figure 4.5 a). Lorsque P_{BP} est atteinte, une légère diminution de la pression appliquée à la membrane est observée et les premières microbulles apparaissent dans le bécher (Figure 4.5 b). Un rapport $\Delta P/P_{BP}=1,1$ a montré être le meilleur rapport pour la préparation de microbulles de PFC monodispersées et stabilisées par des tensioactifs solubles. Ce ratio a également été fixé afin de produire des microbulles de PFC stabilisées par les phospholipides, qui opacifient le bécher comme sur la figure 4.5 c).

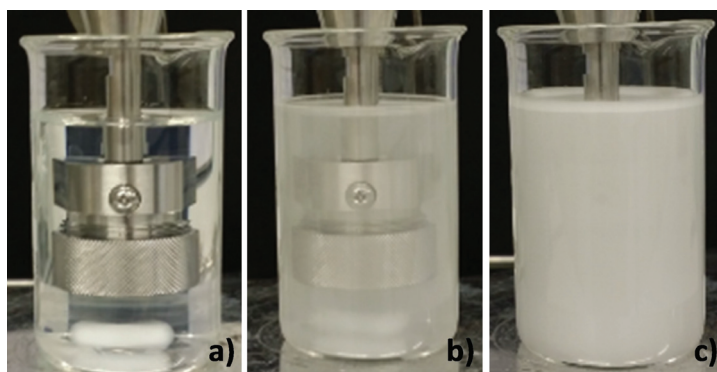


FIGURE 4.5 – Préparation de microbulles stabilisées par un mélange de 0,5 wt% DPPG :PEG40S (9 :1) avec une membrane présentant un diamètre de pore de 1,1 μm , a) $\Delta P/P_{BP}<1$: aucune microbulle n'est produite, b) $\Delta P/P_{BP}=1$: la pression de point de bulle minimale est atteinte et les première microbulles apparaissent, c) $\Delta P/P_{BP}=1,1$: production de microbulles

Les microbulles de PFC stabilisées par DPPG :PEG40S et préparées avec un $D_{pore}=1,1$ μm , ont un diamètre moyen de $10,9\pm3,7$ μm (Figure 4.6 a)). Dans ces conditions, une concentration de $1,85\cdot10^6$ MBs/mL a été obtenue dans le bécher contenant 80 mL de phase continue. En raison de la faible densité des microbulles, celle-ci remontent et se concentrent en surface. A l'aide d'une ampoule à décanter, il est ainsi possible de concentrer l'échantillon en microbulles, en diminuant le volume de la phase continue et ainsi retrouver une concentration similaire à celle obtenue par sonication (10^{+9} MBs/mL). Comme il peut être observé sur les images de la figure 4.6 b), la distribution en taille est légèrement polydisperse, caractérisée par un coefficient de variation de 34% en raison de la présence de microbulles de plus grand diamètre. Cette polydispersité provient d'une adsorption plus lente des phospholipides par rapport à l'adsorption de tensioactifs solubles présentée au chapitre 3, avec lesquels une meilleure monodispersité (CV inférieur à 20%) a été obtenue.

Cependant, il peut être remarqué que la distribution en taille des microbulles de PFC préparées avec ce procédé membranaire est plus étroite que les microbulles de PFC obtenues par sonication (Figure 4.7). Effectivement, un coefficient de variation de 110% a été trouvé lors de la préparation

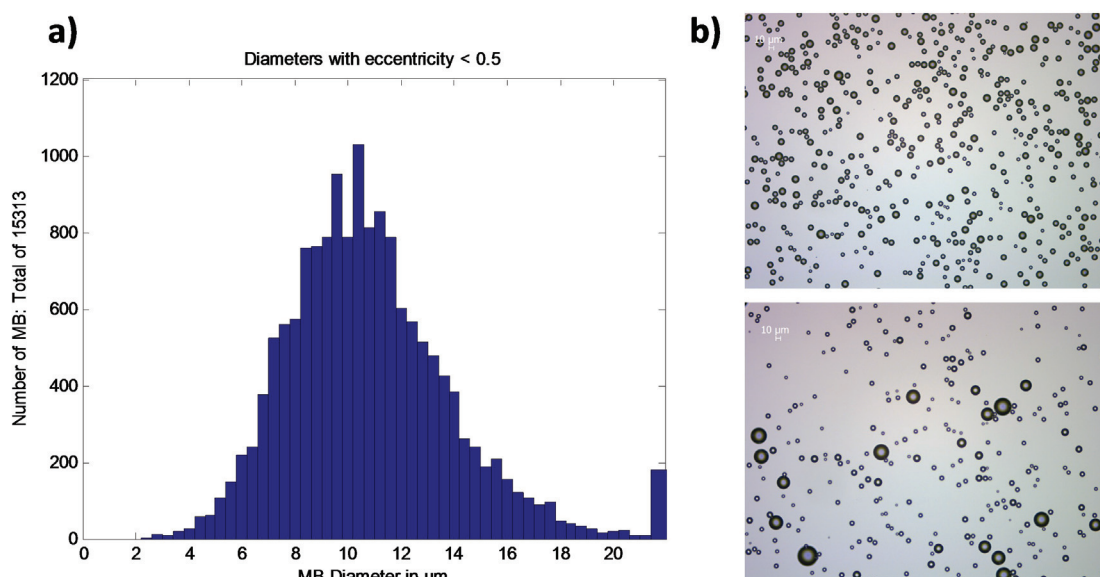


FIGURE 4.6 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire utilisant une membrane SPG avec un $D_{pore} = 1,1 \mu m$ et $\Delta P/P_{BP} = 1,1$ (0,5 wt% DPPG : PEG40S). a) graphique représentant le nombre de microbulles en fonction du diamètre à partir b) des images obtenues par microscopie optique (Objectif $\times 20$)

par ce procédé. Cette distribution en taille a été ensuite réduite à un coefficient de variation de 47% suite à une décantation dans laquelle seulement la couche intermédiaire présente entre la phase continue et la couche de mousse a été prélevée (Figure 4.7 b)). Malgré une meilleure distribution en taille des microbulles de PFC obtenues avec le procédé membranaire, celles-ci restent relativement grandes et polydisperses pour une injection intraveineuse, pour laquelle des diamètres inférieurs à $10 \mu m$ sont souhaités.

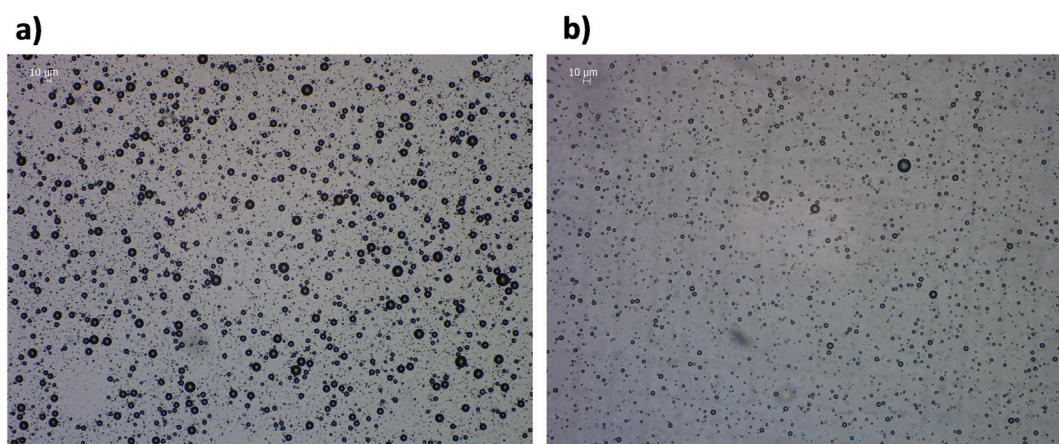


FIGURE 4.7 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par sonication (0,5 wt% DPPG : PEG40S). a) Avant b) Après décantation par une ampoule à décanter (Objectif $\times 20$)

4.4 Influence du diamètre des pores

Des microbulles de PFC ont été préparées avec les membranes SPG présentant un diamètre de pores de 0,6, 0,8 et 1,1 μm . Les trois expériences ont été réalisées à partir d'une phase continue contenant un mélange de 0,5 wt% DPPG :PEG40S. Le diamètre et la distribution en taille des microbulles de PFC en fonction des trois diamètres de pores sont observés dans la figure 4.8. Pour les trois membranes, il a été généré une concentration moyenne d'environ 10^{+6} MBs/mL. Comme prévu, le diamètre moyen des microbulles diminue de $10,9 \pm 3,7 \mu\text{m}$, $9,1 \pm 3,38 \mu\text{m}$ et $8,1 \pm 2,98 \mu\text{m}$ lorsque la taille des pores de la membrane diminue de 1,1, 0,8 et 0,6 μm , respectivement. Dans ces trois conditions, le coefficient de variation obtenu était inférieur à 40%, avec le plus grand coefficient de variation de 37% atteint avec un diamètre de pore de 0,6 μm . Cependant, la diminution du diamètre des pores n'a pas été assez suffisante pour réduire de manière significative le diamètre des microbulles de PFC pour une injection intraveineuse sans risque.

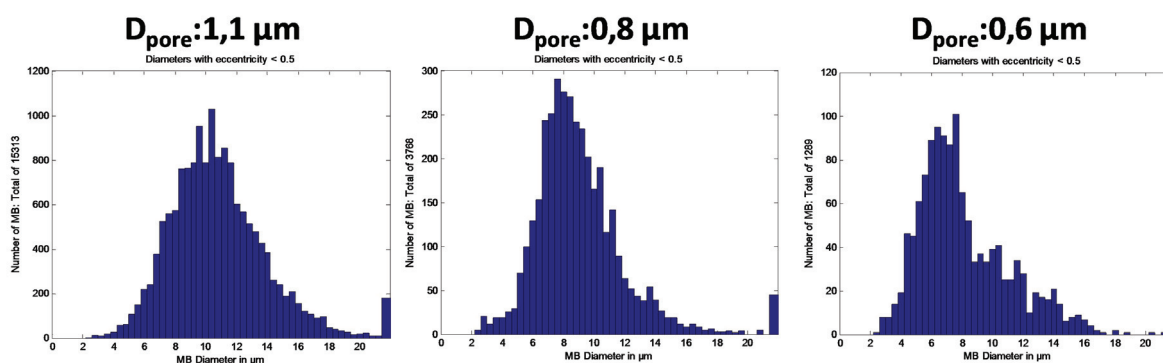


FIGURE 4.8 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire en fonction de trois diamètres de pore de membranes SPG 1,1 ; 0,8 et 0,6 μm (0,5 wt% DPPG :PEG40S)

4.5 Influence de la température

La distribution en taille des microbulles produites à deux températures 25°C et 50°C est donnée dans la figure 4.9. Comme mentionné précédemment, à une température supérieure à la T_m , la tension superficielle est plus faible en raison d'une structure plus fluide de la bicouche lipidique. Cette réduction de la tension superficielle a pour effet de diminuer la force de rétention de la microbulle à l'ouverture d'un pore et ainsi des microbulles de plus petites tailles devraient être générées. A 25°C, nous avons généré des microbulles de PFC présentant un diamètre moyen de $8,1 \pm 3,0 \mu\text{m}$ et un coefficient de variation de 37%. Lorsque la phase continue était chauffée à 50°C, une pression de point de bulle inférieure a été observée et des microbulles de PFC d'un diamètre moyen de $7,6 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ont été obtenues avec un coefficient de variation de 36%. Contrairement aux résultats obtenus par la mesure de la tension superficielle, seulement une très légère diminution du diamètre est observée. En effet, la température élevée peut contribuer à une déstabilisation plus rapide des microbulles de PFC, influençant ainsi le diamètre moyen rapporté. Une

déstabilisation, au niveau de la monocouche à la surface de la microbulle peut être envisagée, où une adsorption/désorption dynamique du phospholipide crée des courtes interfaces non stabilisées comme avec les tensioactifs solubles. Il pourrait être intéressant de développer un système capable de récupérer les microbulles en surface et de refroidir la suspension afin de réduire l'impact de la température sur la stabilité des microbulles produites.

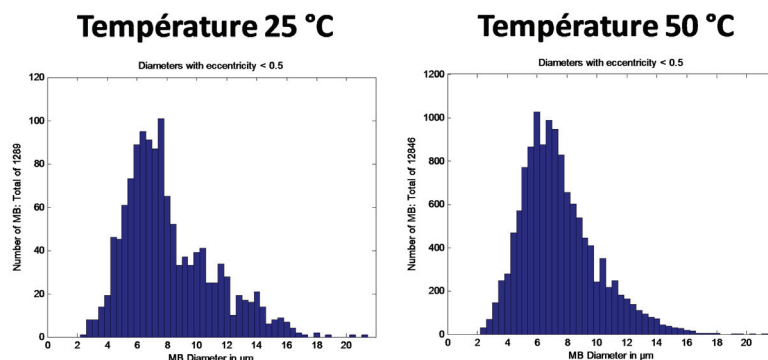


FIGURE 4.9 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC préparées par procédé membranaire en fonction de la température 25°C et 50°C (0,5 wt% DPPG :PEG40S et $D_{pore}=0,6 \mu\text{m}$)

4.6 Influence d'hydrotropes

Dans la littérature, il est décrit la préparation de microbulles à partir d'une phase continue composée d'un mélange de phospholipides et d'un mélange de type GPW, constitué de glycérol, propylène glycol et d'eau [Seger et al. 2016, Farook et al. 2009, Pancholi et al; 2008]. En général, ce mélange est ajouté dans un rapport de 10% en volume dans la phase continue contenant les phospholipides. Dans notre étude, l'influence de la présence de GPW dans la phase continue sur la préparation de microbulles de PFC est donnée dans la figure 4.10. Une très large dispersité en taille a été obtenue avec un coefficient de variation élevé de 98% ($D_{MB}=8,14\pm 7,9 \mu\text{m}$). Cette polydispersité des microbulles de PFC générées peut s'expliquer par une viscosité élevée de la phase continue en présence de GPW. En effet, le glycérol présente une viscosité 1000 fois plus grande (1,49 Pa.s) que celle de l'eau pure (1.10^{-3} Pa.s). Kukizaki et al. [117] ont montré qu'une viscosité élevée de la phase continue retarde le détachement des microbulles, ce qui entraîne le passage d'une plus grande quantité de gaz lors de leur formation. Ainsi, des microbulles plus grosses sont formées à partir des pores de la membrane. Également, un second phénomène pourrait être une diminution de la cinétique d'adsorption due à une réduction importante de la diffusion des molécules à l'interface. Cependant, il peut être observé sur la figure 4.10 b) et c), la présence de microbulles très petites, d'un diamètre d'environ $2 \mu\text{m}$. Ces nombreuses petites microbulles maintenues dans la phase continue, pourraient provenir d'une rapide adsorption des hydrotropes, glycérol et propylène glycol à l'interface. Par la suite, la présence d'une viscosité élevée pourrait augmenter leur temps de stabilisation dans la phase continue puisqu'elles sont observables après 5 min passées dans la cellule de Malassez.

Dans ce sens, nous avons ainsi retiré le glycérol, trop visqueux, afin de n'ajouter que du propylène

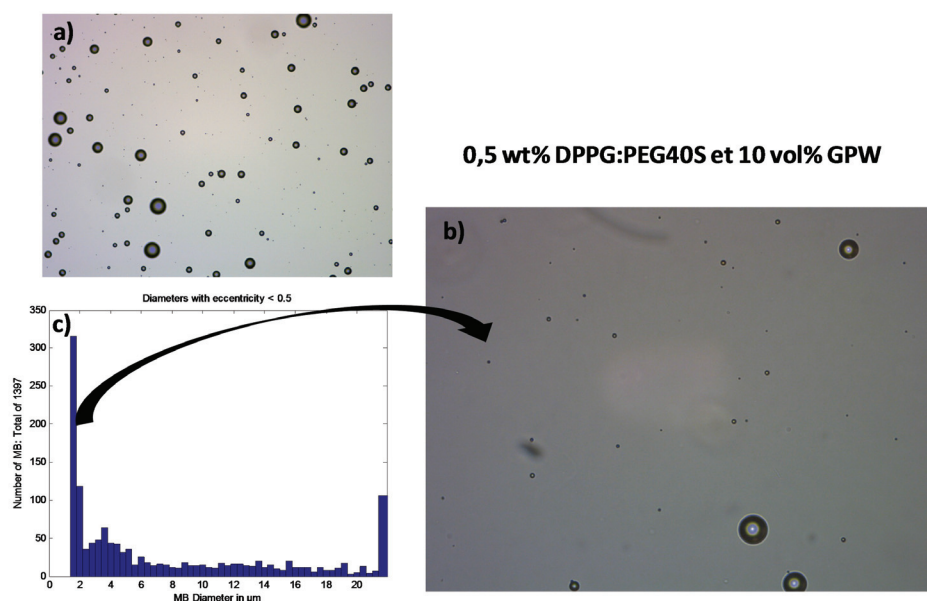


FIGURE 4.10 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d’une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S et 10 vol% GPW. a) objectif $\times 20$, b) objectif $\times 40$, c) distribution en taille des microbulles (GPW : Glycérol, Propylène glycol, eau; $D_{pore}=1,1 \mu\text{m}$)

glycol dans la phase continue (10 vol% PG). Les résultats de la préparation de microbulles avec cette composition sont représentés dans la figure 4.11, où un diamètre moyen de $16,2 \mu\text{m}$ et un coefficient de 54% ont été obtenus. Le propylène glycol présente lui aussi une viscosité 56 fois supérieure (56.10^{-3} Pa.s) à l’eau pure. Malgré une potentielle adsorption rapide des hydrotropes à l’interface, la viscosité de la phase continue était encore trop élevée avec cette formulation pour obtenir des microbulles de PFC monodispersées.

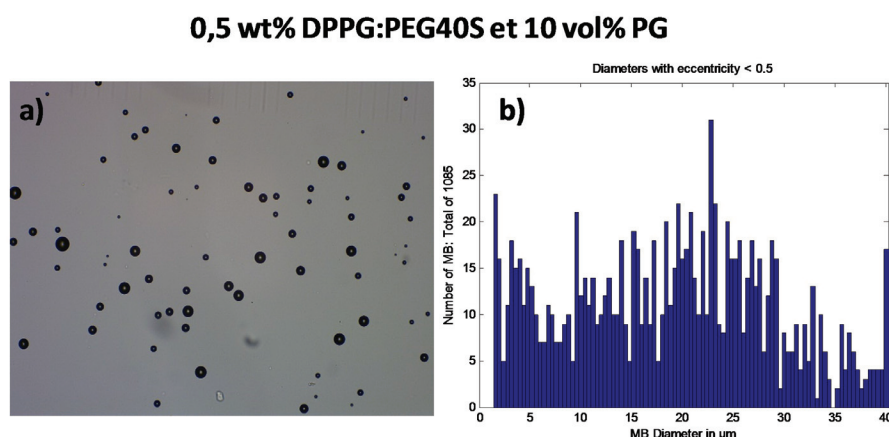


FIGURE 4.11 – Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d’une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S et 10 vol% PG. a) objectif $\times 20$, b) distribution en taille des microbulles (PG : Propylène glycol; $D_{pore}=1,1 \mu\text{m}$)

4.7 Stabilité des microbulles

L'échantillon choisi pour l'étude de la stabilité des microbulles a été celui préparé avec une phase continue composée de 0,5 wt% DPPG :PEG40S et un $D_{pore}=1,1 \mu\text{m}$. Cet échantillon a été ajouté dans un flacon saturé en PFC et présentait une concentration de $1,87 \cdot 10^{+6}$ MBs/mL, un diamètre moyen de $10,9 \pm 3,7 \mu\text{m}$ et un coefficient de variation de 34% avant d'être placé dans un réfrigérateur à 4°C. L'évolution de la distribution en taille après 7 jours à 4°C est illustrée à la figure 4.12. Il est constaté que la distribution en taille n'a pas évolué et que les diamètres moyens des microbulles sont restés constants durant ces 7 jours ($10,8 \pm 4 \mu\text{m}$). Le nombre de microbulles dans cet échantillon est également resté constant durant la période étudiée ($1,87 \cdot 10^{+6}$ MBs/mL). Ainsi, la présence de phospholipides dans la formulation a fortement augmenté la stabilité des microbulles, par rapport aux formulations proposées dans le chapitre précédent.

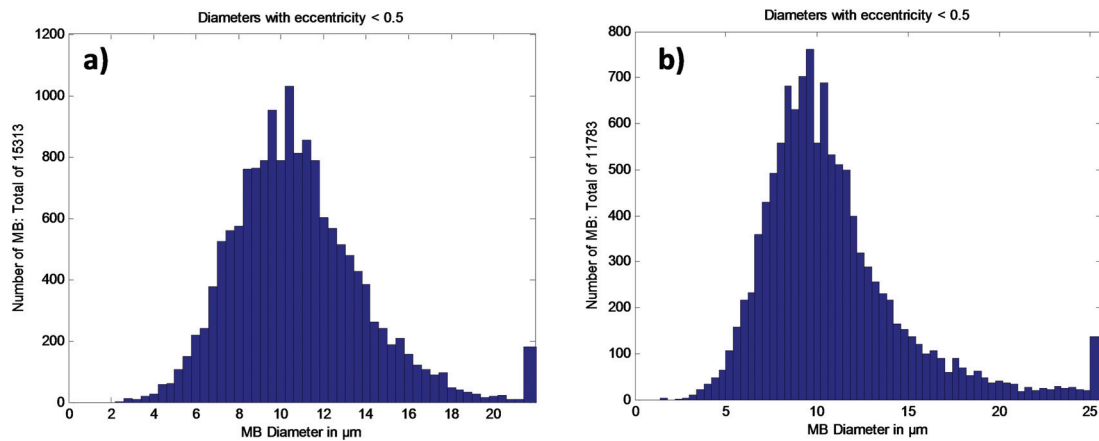


FIGURE 4.12 – a) Observation de la distribution en taille des microbulles de PFC composées d'une phase continue contenant 0,5 wt% DPPG :PEG40S, b) Observation de la distribution en taille du même échantillon après avoir été placé pendant 7 jours à 4°C

4.8 Réponse harmonique

Le comportement acoustique des microbulles préparées par un procédé membranaire en réponse à une impulsion acoustique a été étudié. En effet, une des techniques d'imagerie de contraste couramment utilisée est l'imagerie harmonique qui a pour principal bénéfice de discriminer le signal acoustique provenant des microbulles des signaux acoustiques provenant des tissus. Les microbulles sont d'excellents diffuseurs d'ultrasons en raison de leur compressibilité élevée. Dans un champ ultrasonore, ils agissent comme des systèmes résonants, générant une réponse harmonique dans le signal ultrasonore rétrodiffusé. C'est cette réponse harmonique qui est ensuite exploitée pour l'amélioration de l'imagerie par contraste afin de distinguer l'agent de contraste des tissus environnants. En fonction de la pression acoustique appliquée, les vibrations de la microbulle seront soit linéaires, soit non linéaires. Pour de faibles pressions acoustiques, la microbulle oscille linéairement par rapport à l'amplitude du champ de pression appliqué. Lorsque des amplitudes supérieures sont appliquées, la vibration des microbulles devient non linéaire, due à la

différence entre la dilatation et la compressibilité de la bulle. Le comportement non linéaire qui en résulte est l'apparition d'harmoniques d'ordre 2. En effet, les fréquences dites "harmoniques" sont des multiples de la fréquence fondamentale. Il suffit ensuite de filtrer, lors de la réception du signal, la fréquence fondamentale inférieure pour ne retenir que la fréquence harmonique pour construire une imagerie dite « harmonique ». En général, c'est la fréquence double de la fréquence d'émission, aussi appelée 2^{nde} harmonique, qui est exploitée en échographie.

Dans notre étude, une sonde échographique placée à la surface dans un bécher rempli d'eau matérialisant le fluide sanguin, a généré des ondes ultrasonores à une fréquence fondamentale de 5 MHz (méthode décrite dans le paragraphe 2.4.2). Deux conditions ont été testées, en absence et en présence de microbulles préparées par le procédé membranaire et présentant un diamètre de $8,1 \pm 2,98 \mu\text{m}$ et un coefficient de variation de 37%. Un premier tir à une pression acoustique de 16 Volts a été réalisé dans un bécher ne contenant que de l'eau (Figure 4.13 a)). En absence de microbulles, aucune réponse harmonique n'est visible, le milieu ne répond pas, ou très faiblement, dû au fond du bécher qui réfléchit les ondes ultrasonores, tandis qu'en présence des microbulles en suspension dans le bécher (Figure 4.13 b)), nous observons une réponse des microbulles à la fréquence fondamentale et une réponse à la seconde harmonique (flèche rouge). Ces résultats confirment ainsi la génération d'harmoniques par nos microbulles, et ainsi leur potentiel pour une utilisation en tant qu'ACUs.

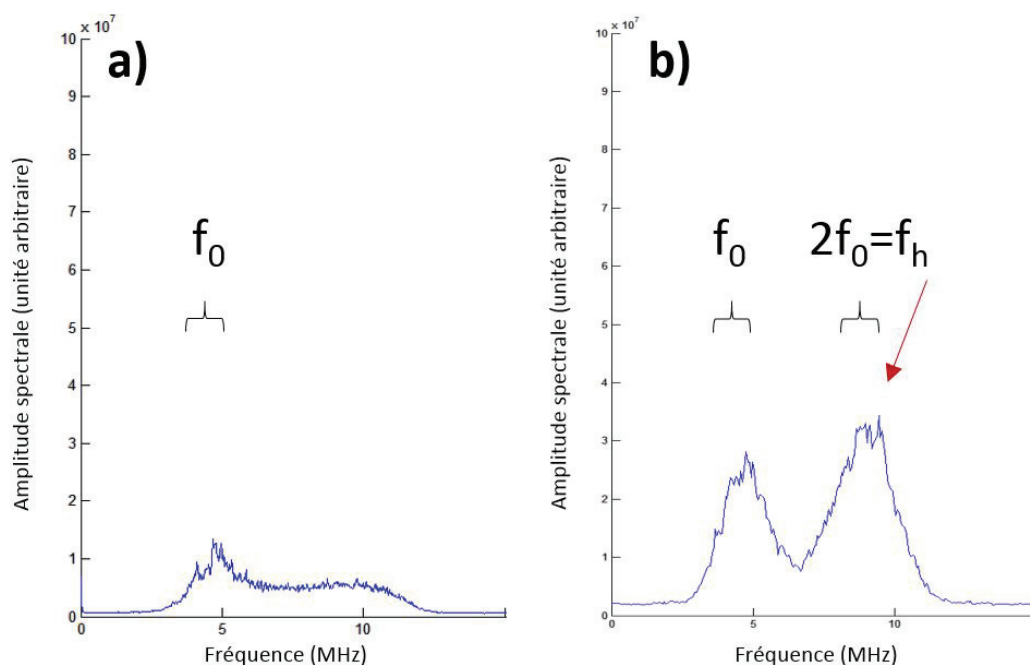


FIGURE 4.13 – Comparaison des réponses harmoniques dans un bécher rempli d'eau a) en absence, b) en présence de microbulles avec une pression acoustique de 16 Volts et une fréquence fondamentale émise à $f_0 = 5 \text{ MHz}$ (f_h : fréquence harmonique)

4.9 Conclusion

Cette étude reporte pour la première fois la préparation de microbulles de PFC stabilisées par des phospholipides par émulsification membranaire. En raison de la faible cinétique d'adsorption et de la tension superficielle élevée qui ont été mesurées avec ces molécules hydrophobes, diverses stratégies ont été mises en place afin d'obtenir un échantillon de microbulles comportant des caractéristiques intéressantes pour une application médicale. Ainsi, le procédé membranaire développé au laboratoire dans une configuration microkit a permis de produire des microbulles stabilisées par un mélange de 0,5 wt% DPPG :P40S (rapport molaire 9 :1). Dans cette configuration d'émulsification, un diamètre moyen de microbulles compris entre 8,11 et 10,9 μm en fonction du diamètre de pore a été obtenu. Cependant, une distribution en taille trop large a été observée pour ces préparations (CV : 34-37%). Une augmentation de la température et l'ajout d'hydrotropes comme le propylène glycol et le glycérol dans la phase continue n'ont pas permis d'optimiser la formation de microbulles plus petites et monodisperses. En effet, l'augmentation de la température de la phase continue a montré une diminution de la tension superficielle ayant pour effet de diminuer la force de rétention à la membrane et ainsi la réduction du diamètre des microbulles. Cependant, cette augmentation de la température a pu avoir un effet inverse, en augmentant les phénomènes de déstabilisation des microbulles puisqu'aucune différence n'a été observée entre une préparation à 25°C et une préparation à 50°C. La présence d'hydrotropes dans la phase continue semblait être une stratégie intéressante pour une stabilisation rapide de la nouvelle interface avec le gaz réduisant le diamètre et la polydispersité par diminution des phénomènes de coalescence à la surface de la membrane. Néanmoins, l'addition de ces hydrotropes dans les concentrations utilisées a fortement augmenté la viscosité des phases continues. Comme décrit dans la littérature, le diamètre moyen des microbulles augmente avec l'augmentation de la viscosité de la phase continue. Ainsi, il peut être supposé que la viscosité élevée a retardé le détachement des microbulles mais aussi a diminué la diffusion des molécules pour s'adsorber rapidement à l'interface, résultant en un échantillon de microbulles de PFC polydispersées. Une étude approfondie avec des concentrations moins élevées en hydrotrope, ou bien avec des hydrotropes qui n'augmentent pas la viscosité, pourrait être un axe de recherche intéressant pour la préparation de microbulles avec ce procédé membranaire.

Pour conclure, nous avons préparé des microbulles avec une taille légèrement plus grande que la taille préconisée pour une injection intraveineuse, néanmoins cette étude a montré une durée de vie plus longue lorsque les microbulles sont stabilisées avec un mélange de DPPG :PEG40S et une réponse harmonique suffisante pour leur détection par une sonde échographique, montrant leur réel intérêt en tant qu'ACU.

Chapitre 5

Preparation of perfluorocarbon emulsions by premix membrane emulsification for acoustic droplet vaporization in biomedical applications

Contents

4.1	Introduction	102
4.2	Mesures de tensions superficielles	103
4.3	Influence du PEG40S	105
4.4	Influence du diamètre des pores	108
4.5	Influence de la température	108
4.6	Influence d'hydrotropes	109
4.7	Stabilité des microbulles	111
4.8	Réponse harmonique	111
4.9	Conclusion	113

5.1 Préambule

Ce travail a pu être mis en place grâce à l'acquisition d'une pompe haute pression par le laboratoire, nous permettant ainsi d'explorer la seconde configuration possible avec les procédés membranaires : l'émulsification membranaire par prémix. Les principaux paramètres étudiés dans ce chapitre pour déterminer leur influence sur la formation de gouttelettes sont les paramètres du procédé, de la membrane et de la formulation.

Cette étude reporte pour la première fois la préparation par procédé membranaire de microgouttelettes de PFC monodispersées qui sous l'influence d'une pression acoustique seuil, ont la capacité de se vaporiser en microbulles.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « Preparation of perfluorocarbon emulsions by premix membrane emulsification for acoustic droplet vaporization in biomedical applications », soumise en octobre 2018 dans le *Journal of Materials Chemistry B*.

5.2 Abstract

Perfluorocarbon (PFC) droplets are used in acoustic droplet vaporization (ADV), a phenomenon where droplets vaporize into gas microbubbles under exposure to ultrasound. Monodispersed droplets are required to achieve the highest vaporization efficiency when applying acoustic pressure. In this study, we present a novel process to manufacture PFC droplets, and report their functionality for ADV. Premix membrane emulsification (PME) was investigated to produce monodispersed PFC emulsions at moderate pressure with Shirasu Porous Glass (SPG) membranes. With a 1.1 μm pore size membrane, perfluorohexane (PFHex) droplets were obtained with a mean size of 1.51 μm and a sharp distribution (CV and span respectively of 20% and 0.6). The droplet size was found to decrease linearly when decreasing the membrane pore size, and to decrease slightly with the flow rate. The addition of a medium-chain triglyceride (MCT) oil to PFC in the dispersed phase (50/50 vol%) allowed to decrease the resulting pressure required to push the premix emulsion through the membrane. Vaporization of the PFC emulsions was obtained using an imaging ultrasound transducer, and the ADV thresholds were quantified. Monodispersed ADV droplets showed a more homogeneous vaporization with an uniform response in the focal region of the transducer, while polydispersed droplets had a more diffuse response outside the focal region due to the presence of large droplets. The ADV threshold of PFHex droplets was found to increase with the droplet diameter, the bulk fluid temperature, the boiling temperature of PFC, and the presence of an oil layer surrounding the PFC core.

5.3 Introduction

In acoustic droplet vaporization (ADV), an emulsion is converted into gas bubbles upon exposure to energy ultrasound beyond a vaporization threshold (Figure 1.10) [40, 41]. Upon ultrasound exposure above the ADV threshold, gas nucleation and/or cavitation are initiated and trigger the phase transition. Ultrasounds serve as a remote detonator to trigger the vaporization of the dro-

plets in a controllable, non-invasive and also localized manner [82]. These emulsions usually consist of surfactant stabilized droplets with a perfluorocarbon (PFC) liquid such as perfluoropentane (PFP, C_5F_{12} , 29°C boiling point), perfluorohexane (PFHex, C_6F_{14} , 56°C boiling point) or perfluoroheptane (PFHep, C_7F_{16} , 80°C boiling point). PFC droplets are interesting alternatives to microbubbles, for both imaging and drug delivery applications, as they are more stable and can circulate longer in the bloodstream before vaporization [40, 212].

With droplets in the micron and sub-micron range, the Laplace pressure exerted on the PFC liquid core is increased, enabling small droplets to be maintained a liquid form even above their vaporization temperature, such as physiological body temperature (37°C) [82, 213]. After vaporization, the gas bubbles formed are approximately 5 times larger in diameter than the initial droplets [40, 81]. The expansion ratio decreases with decreasing droplet size because of increased Laplace pressure, which is an inverse function of droplet radius. During ADV, the PFC liquid is converted into a gas in a nanosecond timeframe [28].

These droplets can be selectively vaporized into highly echogenic gas bubbles, with numerous applications to diagnosis and therapy [65]. One of the most well studied applications of ADV is embolotherapy which enables vessel occlusion to limit blood flow in a specific tissue [69, 76]. This technique has been proposed to treat renal carcinoma and to reduce blood supply for hypervascular tumors [82]. A second application of ADV agents is drug delivery, where encapsulated drugs are released specifically to the disease site while minimizing systemic effects [83, 214, 215]. Other approaches include the use of droplets functionalized with molecular ligands to target specific cells, combining mechanical cell destruction with drug delivery [77].

The size and size distribution of ADV droplets is an important factor in determining the vaporization threshold as larger droplets require less energy to vaporize than smaller ones [82, 216]. Also, in a polydisperse sample, the vaporization of larger droplets at lower energies could influence the ADV threshold of the smaller droplets. Monodispersed droplets can use the lowest acoustic pressure possible for vaporization, since all droplets respond similarly, therefore achieving the highest vaporization efficiency at the lowest acoustic pressure [69]. In addition, for embolotherapy with ADV agents, monodispersed droplets are needed to target a specific vascular diameter while not affecting other vessels [82], and to avoid undesirable occlusion of vessels. When using ADV to enhance contrast in ultrasound imaging, the level of acoustic enhancement varies with droplet size [217].

Conventional methods for producing PFC droplets include sonication [95, 218] and high-speed mechanical agitation [42, 73, 219] of the liquid PFC and the surfactant aqueous solution. These methods typically result in polydispersed droplet populations, sometimes requiring filtrations to reduce the size polydispersity [73, 74]. Precise size control of ADV droplets can be achieved by using microfluidic techniques. For example, Martz et al. 2011 produced monodispersed liquid PFP droplets with smallest sizes around 7-20 μm through the use of a microfluidic device with flow focusing technology. Simons et al. [217] prepared monodispersed PFHex emulsions with size of 4 and 12 μm using photolithographic microsieves. The emulsions obtained enhanced echogenicity and the acoustic enhancement varied with the droplet size. However, microfluidic methods are limited by low production rates, where nearly 3 hours are necessary to manufacture 1×10^9 droplets, which is an order of magnitude below what is achieved in a few minutes with the me-

chanical agitation method [69, 220].

Membrane emulsification has emerged as an alternative technique to produce emulsions [23, 145] and microbubbles [124, 221] with controlled size. Two main configurations are used : direct membrane emulsification (DME) and premix membrane emulsification (PME). For the preparation of Oil/Water emulsions by DME, the dispersed phase (oil) is pushed through the membrane pores and the droplets formed at the pore outlets detached in a crossflowing or stirring continuous phase. In PME, a coarse emulsion (premix) is first prepared before being pushed through the membrane pores [23, 149]. Smaller droplets are formed by break-up of larger droplets in the membrane due to the shear stress at the pore walls. Higher flow rates are obtained in PME than DME, which is particularly attractive for the preparation of emulsions at large scales. Other advantages of PME over DME are the simplicity of the set-up and the easiest cleaning of the membrane. With PME, Oil/Water emulsions were obtained at high flow rates (up to 200 mL/min) and with Shirasu Porous Glass (SPG) membranes of pores down to 0.2 μm [171].

In this study, we report for the first time the preparation of emulsions for ADV by PME with SPG membranes. The experimental set-up developed previously [171] was used to produce monodispersed emulsions with formulations suitable for ADV. The set-up included a high pressure syringe pump connected to a SPG membrane module working at pressures up to 60 bar and flow rate of 200 mL/min. The effect of several parameters on the resulting pressure (ΔP_r) and the droplet size was investigated : process parameters (flow rate and membrane pore size) and formulation (the dispersed phase type). In a second part, these emulsions were characterized and tested for ADV. To summarize, we evaluated the feasibility of producing monodispersed ADV agents by membrane emulsification and measured the influence of formulation and acoustical parameters on the ADV threshold.

5.4 Experimental

5.4.1 Materials

Liquid PFHex and PFHep were purchased from Sigma Aldrich (France). The density of perfluorocarbon liquids are 1.68 g.cm^{-3} for PFHex and 1.72 g.cm^{-3} for PFHep. The oil phase Labrafac - Caprylic Capric Medium Chain Triglycerides (MCT oil) was purchased from Gattefossé (Saint-Priest, France) and has a density of 0.93-0.96 g.cm^{-3} . The surfactants Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) and Polyoxyethylene (40) stearate (PEG40S) were purchased from Sigma Aldrich (France). Ultrapure water was obtained using a Synergy unit system (Millipore, France).

5.4.2 SPG membranes and membrane module

Hydrophilic SPG membranes were purchased from SPG Technology Co. Ltd (Miyazaki, Japan). The tubular SPG membranes have a length of 125 mm and an inner diameter of 8.3 mm. These membranes are manufactured by a phase separation process of calcium aluminum borosilicate glass and subsequent acid leaching [117, 201] and have been widely used for production of emulsions and particles [23, 145]. Membranes with mean pore size of 3.1, 1.1 and 0.8 μm were investigated;

the mean pore size data are given by the manufacturer. In most experiments, the mean pore size used was 1.1 μm .

The microstructure of the SPG membranes was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a FEI Quanta 250 FEG microscope at the “Centre Technologique des Microstructures” at the University Lyon 1 (Villeurbanne, France). A fragment of the SPG membrane was deposited on a flat steel holder. The sample was coated under vacuum by cathodic sputtering with copper. The samples were observed by SEM under an accelerating voltage of 10 kV. SPG membranes have interconnected and cylindrical tortuous pores that form a three-dimensional network (Figure 5.1). The range of membrane porosity is 0.53-0.60 [120]. The SPG membrane surface is negatively charged and hydrophilic due to the presence of hydroxyl groups such as silanol groups. The dissociation of the silanol groups gives the negative charge of the SPG membrane surface [124].

The membrane was installed inside a cross-flow module in stainless steel supplied by SPG Technology and connected to a high pressure pump. The effective length of the membrane was reduced to 105 mm due to sealing rings placed at both ends of the membrane tube. The effective membrane area was then 27.4 cm^2 .

5.4.3 Experimental set-up and procedure

The experimental set-up used for the preparation of emulsions by PME was developed in our laboratory and is shown in Figure 5.1. The set-up included a high pressure single cylinder pump BTSP 500-5 (Floxlabs, Nanterre, France) connected to the SPG membrane module. The pump is composed of a motor-driven piston and is used to push the premix from a storage tank of 500 ml through the membrane pores. The flow rate, pressure and volume injected are recorded every second by a computer. Before each experiment, to ensure that the membrane had been cleaned properly, the hydrodynamic resistance to water (R_m) was measured and compared to the value obtained with an unused membrane.

5.4.4 Preparation of emulsions

The monodispersed emulsions stabilized with Tween 20 and PEG40S were obtained by PME in two steps : first, by preparing a premix, and then by passing this premix through the SPG membrane pores.

Premix preparation : The continuous phase was composed of 2.0wt% Tween20 :PEG40S at a molar ratio of 9 :1 in water. Four dispersed phases were tested : PFHex, PFHep, MCT oil and a mixture of PFHex and MCT oil (50/50 vol%). The premix emulsion was obtained by emulsification of 10 vol% of dispersed phase in the continuous phase. For that, the dispersed phase was added into the continuous phase and then mixed by a rotor stator homogenizer (T50 digital Ultra-turrax, S25N-18G, Ika) at 8000 rpm for 1 min. The beaker containing the premix was placed into an ice bath to avoid the evaporation of PFC caused by the temperature increase created by the ultra-turrax device.

Preparation of monodispersed emulsions : The SPG membrane was placed inside the membrane module, and the module connected to the syringe pump. The premix was then introduced into

the syringe pump tank at a flow rate of $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. In most experiments, the premix was injected through the membrane pores at a flow rate of $200 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. The monodispersed emulsion obtained was collected into a beaker placed under the membrane module.

In this study, we investigated the influence of process parameters (flow rate and membrane pore size) and formulation parameters (dispersed phase type) on the droplet size and on the pressure generated by the pump through the membrane pores.

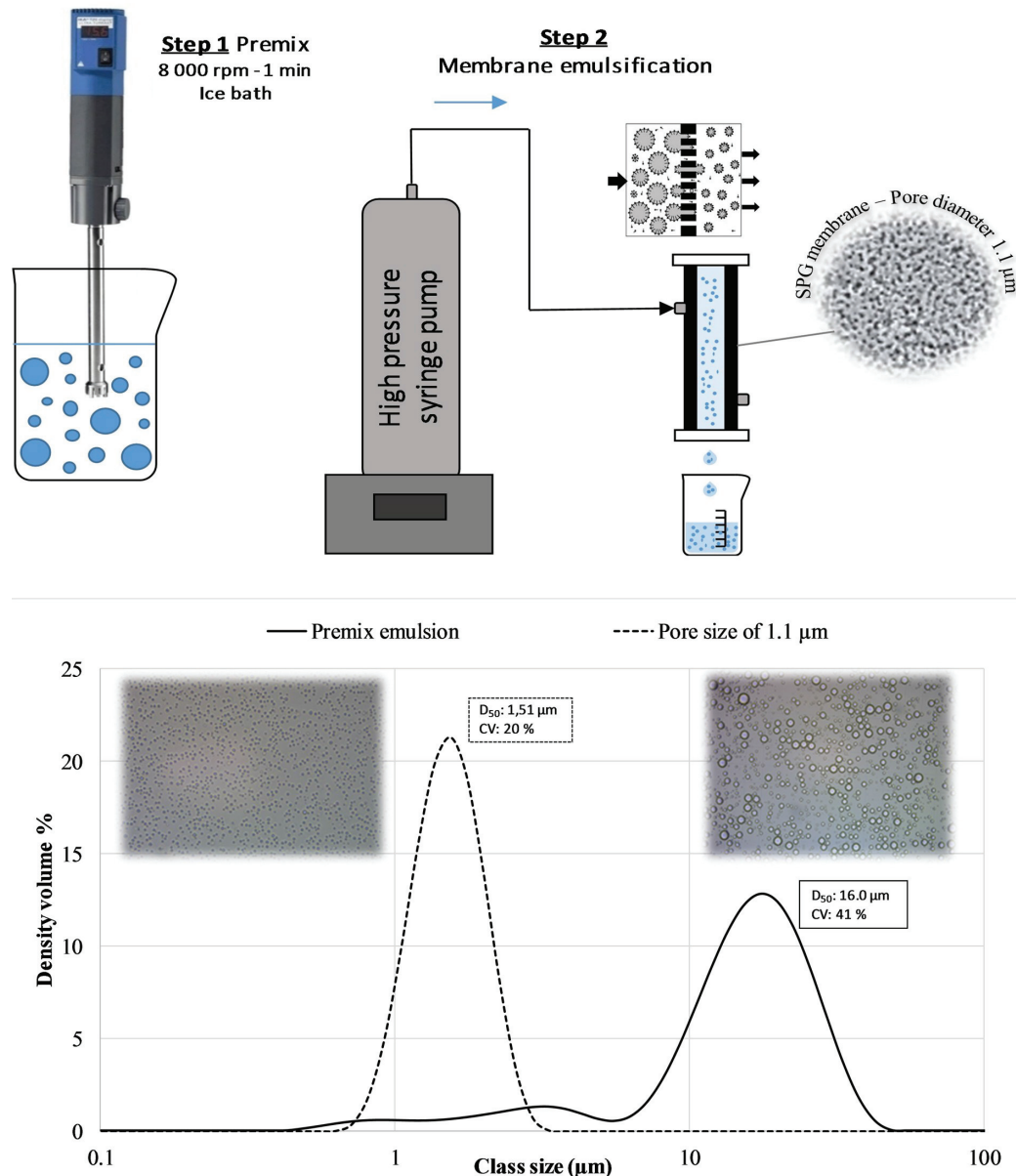


FIGURE 5.1 – Experimental set-up of premix membrane emulsification with a high pressure syringe pump and SPG membrane (top). Perfluorocarbon droplet size distribution of the premix emulsion obtained by ultra turrax and monodisperse emulsion obtained by premix membrane emulsification with a membrane pore size of $1.1 \mu\text{m}$ at 200 mL/min . Observation by optical microscopy of both emulsions with a optical objective ($40\times$) (bottom)

5.4.5 Physical characterization

5.4.5.1 Laser diffraction measurement

The diameter and size distribution of droplets were measured using laser diffraction measurement (Mastersizer 3000, Malvern Instrumentation, France). The technique is based on the measurement of the intensity of light scattered as a laser beam passes through a dispersed particulate sample. The Mie-scattering theory was used to convert light scattering data to droplet size distribution. The refractive index of the dispersed phase was 1.2515 for PFHex, 1.265 for PFHep and 1.445 for MCT oil. The aqueous continuous phase had refractive index of 1.33. The results were expressed by D_{50} , the diameter corresponding to 50 vol% on the relative cumulative size distribution curve. Two parameters were used to characterize the width of the size distribution, first, the span of the droplet size distribution, expressed as :

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (5.1)$$

where D_{90} and D_{10} are the diameters corresponding to 90 and 10 vol% on the relative cumulative droplet size distribution curve, respectively. Then, the polydispersity was characterized using the equation :

$$CV = \frac{\sum n_i |D_{50} - D_i|}{D_{50} \sum n_i} \times 100 \quad (5.2)$$

where D_i , is the mean diameter of class i and n_i the number of microbubbles in class i .

All measurements have been done in triplicate; the values reported were the average of the three measurements.

5.4.5.2 Optical characterization

For emulsions with the mix PFHex and MCT oil (50/50 vol%) as dispersed phase, optical microscopy was used to determine how the two phases were separated inside the droplets. For that, the orange 3G dye was solubilized into the MCT oil prior to droplets formation. After preparation of the emulsion, an aliquot of the emulsion was diluted and added to a Malassez counting chamber (Marienfeld-Superior) to observe the droplets by optical microscopy.

The observations were carried out with a microscope (Leica DM LM, France). A CCD video camera (Leica MC120 HD) was connected to the microscope to capture images, which were visualized with Leica Application Suite (LAS EZ) software (Version 3.4.0).

5.4.6 Interfacial surface measurement

The interfacial tensions of surfactant solutions with various dispersed phases were measured by the pendant drop method using a Drop Shape Analysis tensiometer model 100 DSA-10 Mk2 (Krüss). A rising droplet (volume approximately of 5 μ l) of PFC or oil (24 μ l) was formed at the extremity of a needle using a syringe inside a quartz cell (10 ml) containing 2.0wt% of surfactant solution at room temperature. The formation time of the droplet was about 1 s. The system was

calibrated using the outer diameter of the needle (1.507 mm). The shape of the droplet was imaged with a CMOS camera and extracted by image analysis, and the interfacial tension was obtained as the best fit of the theoretical drop shape to the experimental profile.

5.4.7 Acoustical characterization

5.4.7.1 Acoustical device

All vaporization experiments were performed in a beaker of 200 ml containing water and a suspension of droplets (10^{+10} Droplets/ml) diluted at 1/10. The solution was heated and maintained at 37°C, unless otherwise noted. The suspension was exposed to acoustic pulses emitted by a 7.813 MHz single-element transducer (Linear probe model L12-3V, 192 elements linear array, Verasonics, Kirkland WA, USA). The emitting surface of the probe was placed 1 cm below the water surface. The probe was connected to and driven by a Vantage system 256 (Verasonics, Kirkland WA, USA). Pulses were emitted using a beamforming sequence, in burst mode, 10 cycles per burst, at a pulse-repetition frequencies (PRF) of 1 kHz, for a total exposure time of 3 s. The suspension was stirred by magnetic agitation to ensure homogenization of the droplets distribution in the solution, as the droplets tend to accumulate at the bottom of the beaker because of their larger density than water. Incident acoustic pressure was increased between two successive sonication sequences, by increasing the voltage delivered to the imaging probe. To assess the formation of gas microbubbles from liquid droplets when the pressure reached the ADV threshold, B-mode imaging was performed in real time to detect the increase of echogenicity of the newly generated microbubbles. Gas microbubbles are hyper-echogenic because of the difference in acoustic impedance between droplets and bubbles in the water phase.

5.4.7.2 Determination of the vaporization threshold

The ADV threshold was determined using a methodology similar to that previously described by Kripfgans et al. [41] and Fabiilli et al. [42]. The recorded B-mode images were analyzed by ImageJ and converted to grayscale. For each vaporization measurement, a rectangular region of interest (ROI) 40 mm large by 5 mm depth (32132 px²), centered on the natural focus of the probe was selected. The mean echo amplitude (MEA) over the ROI was calculated as the sum of the gray values of all the pixels of the ROI divided by the number of pixel and was obtained by the equation :

$$MEA(n) = \frac{1}{NM} \sum_{j=1}^M \sum_{i=1}^N A(i, j) \quad (5.3)$$

where A is the signal at pixel (i,j) for frame number (n) that has dimensions M by N. Then, the relative echo amplitude (REA) was calculated as the difference between MEA (X) after and MEA (0) before acoustic pulse.

$$REA = MEA(X) - MEA(0) \quad (5.4)$$

An absence of change in REA between two successive sonications is indicative of the absence of droplets vaporization, while an increase of the echogenicity is characteristic of droplet vaporization.

zation. The resulting REA and its standard deviation were plotted as a function of the electrical voltage used to drive the emission by the ultrasound probe. The threshold vaporization was determined as the intersection of the baseline and the linear fit of the increase of echogenicity.

5.5 Results and discussion

5.5.1 Influence of process parameters

In this section, we investigated the influence of membrane pore size, flow rate and dispersed phase type on the resulting pressure and droplet size. The resulting pressure (ΔP_r) is the pressure required at constant flow rate to pass the premix emulsion through the membrane pores, and is the sum of three pressures [149, 171] :

$$\Delta P_r = \Delta P_{pipe} + \Delta P_{flow} + \Delta P_{disruption} \quad (5.5)$$

where the pipe pressure, ΔP_{pipe} is the pressure required to pass the premix through the pipe connecting the high pressure syringe pump to the membrane device. It increases with emulsion viscosity and flow rate. In our experimental conditions with emulsions of relative low viscosity, ΔP_{pipe} is low compared to the flow pressure, ΔP_{flow} , and disruption pressure, $\Delta P_{disruption}$. ΔP_{flow} is the pressure required for overcoming the flow resistance through the membrane pores; like ΔP_{pipe} , it increases with emulsion viscosity and flow rate. Lastly, $\Delta P_{disruption}$ is the pressure required to deform and break-up large droplets into smaller ones [121, 149].

As detailed in Materials and Methods, 2 wt% of surfactant were used in the aqueous continuous phase as a low amount of surfactant would be preferred for future in vivo use of the droplets. The droplet size of the premix emulsion was between 10 and 20 μm (D_{50} : 16 μm) with a large size distribution (span : 1.46 and CV : 41%). After being passed through the 1.1 μm membrane, the droplet size of the coarse emulsion was reduced to 1.51 μm and the size distribution was much sharper with a CV of 20% and a span of 0.6 (Figure 5.1). Only one pass through the SPG membrane was necessary to produce monodispersed droplets, thanks to the membrane thickness (1 mm), the highly interconnected and tortuosity of pores that break-up the droplets [115, 149]. The span of the droplets was in the range of that of the SPG membrane pore size distribution (0.4-0.6) [23]. Overall, these droplet size and size distribution were suitable for ADV applications.

5.5.1.1 Effect of membrane pore size

The influence of membrane pore size on droplet size and resulting pressure was investigated with the 3.1, 1.1 and 0.8 μm pore size membranes. The droplet size was found to decrease with the membrane pore size, being equal to 4.41, 1.51 and 1.19 μm , respectively (Figure 5.2). Therefore, the droplet size, $D_{droplet}$ was a linear function of the membrane pore size, D_{pore} , with $D_{droplet}/D_{pore}$: 1.42 and R^2 : 0.99 (Figure 5.2). Similar results have been reported for other emulsions obtained by PME with $D_{droplet}/D_{pore}$ in the range of 1.0-1.5 [23, 171], this ratio is lower than those reported in DME, for example 3 [23]. The CV and span were not impacted by the membrane

pore size, and were respectively equal to 0.6 and 20%, indicating a rather homogeneous droplet size distribution.

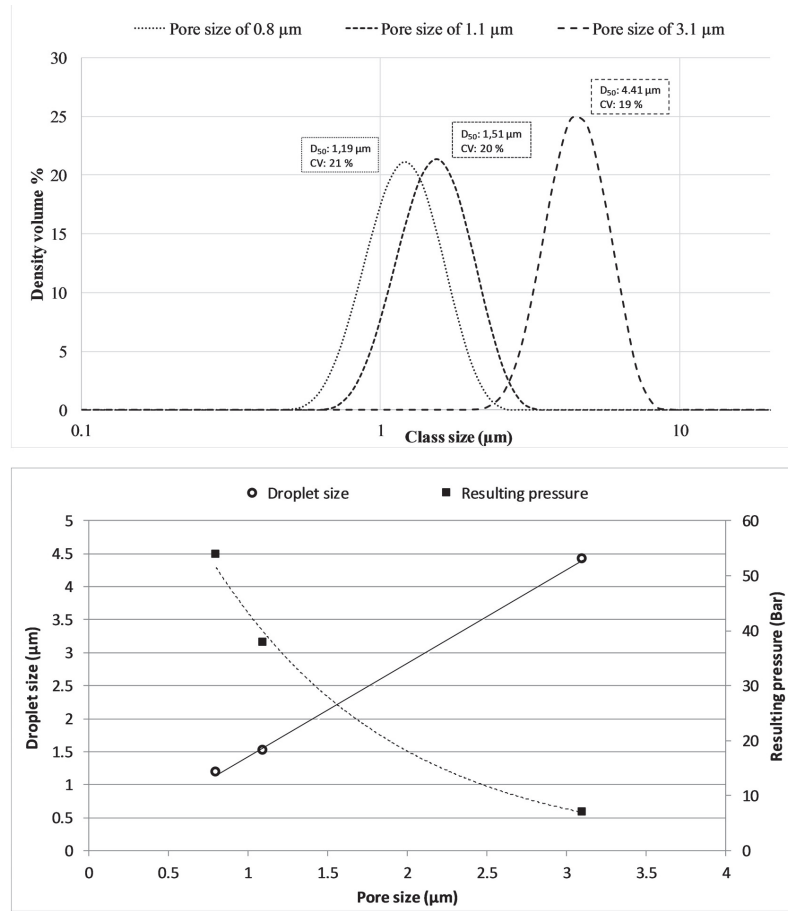


FIGURE 5.2 – Perfluorocarbon droplet size distribution (top), droplet size and resulting pressure (bottom) of monodisperse emulsions obtained at different pore sizes 3.1, 1.1 and 0.8 μm by membrane emulsification at 200 mL/min (top)

In addition, the resulting pressure was found to increase with a decrease in membrane pore size (Figure 5.2). This drastic increase of the resulting pressure is caused by the increase of ΔP_{flow} because of the increase of membrane resistance with smaller pores and of ΔP_{dis} caused by the force necessary to fractionate smaller droplets into smaller pores. For the 0.8 μm pore size membrane, the resulting pressure was equal to 53.8 bars. We tried to use even smaller pores, with a 0.6 μm membrane. But even at 60 bars and low flow rates (down to 10 mL/min), the premix could not be forced through the pores, and the membrane was eventually damaged.

5.5.1.2 Effect of flow rate

The effect of flow rate on MCT oil droplet size and resulting pressure is shown in Figure 5.3. Flow rates between 10 and 200 mL/min were investigated. The droplet size decreased slightly with increased flow rate, from 1.49 μm to 1.38 μm at 10 and 200 mL/min, respectively. Indeed, a higher flow rate leads to a higher wall shear stress into the membrane pores, that facilitates droplet disruption. The wall shear stress is given by the following equation :

$$\tau_{w,p} = \frac{8\eta_e J \xi}{\varepsilon D_p} \quad (5.6)$$

where, η_e is the viscosity of the emulsion, J is the transmembrane flux, ξ is the pore tortuosity, ε is the membrane porosity and D_p is the pore diameter. The CV and span also decreased slightly when increasing the flow rate, and thus the wall shear stress.

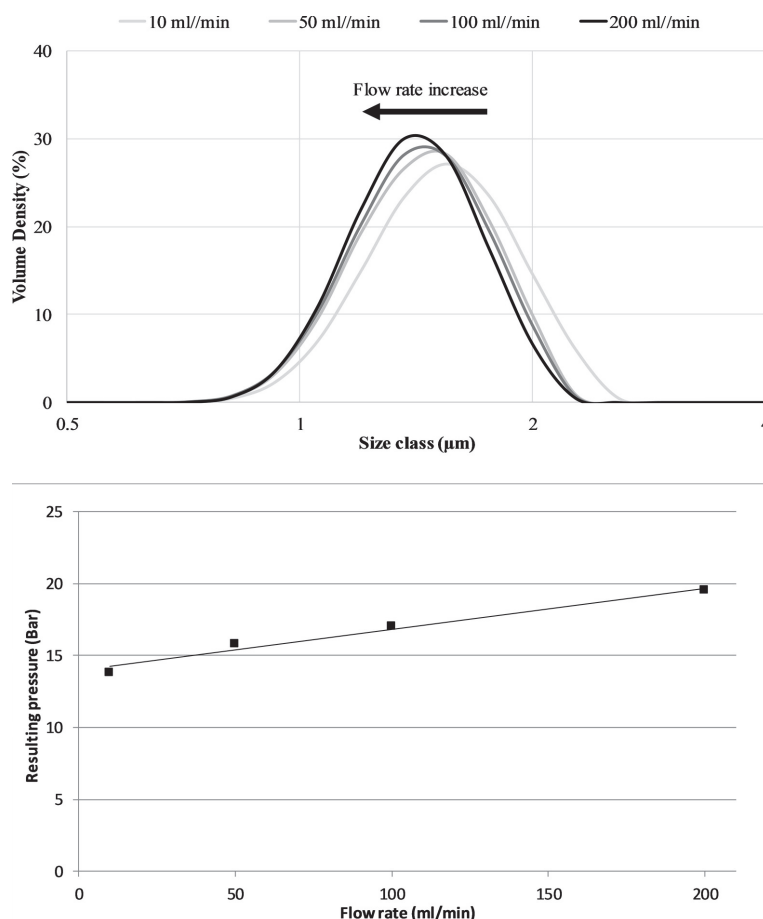


FIGURE 5.3 – Effect of flow rate on the droplet size distribution (top) and the resulting pressure (bottom) for the preparation of MCT oil droplets by premix emulsification with membrane of 1.1 μm pore size, for flow rates of 10, 50, 100, 200 ml/min

The resulting pressure for the preparation of monodispersed droplets is shown in Figure 5.3. At higher flow rates, the pressure increase was proportional to the flow rate [121, 149] as expected from Darcy's law. The main advantage of working at high flow rate is to produce emulsions at high rate. In PME, high flow rates can be set, without negative effects on droplet size and size distribution, even if lower surfactant concentrations are used. Indeed, the yield obtained for PME were 10^{+13} Droplets/min compared to $1-10 \times 10^6$ Droplets/min with microfluidic device which is a major limitation of this method [69, 220]. Furthermore, larger volumes can be manipulated with the PME (10-200 ml/min), while the microfluidic devices have the ability to flow only smaller volumes in the order of μl/min. These membrane emulsification devices seem therefore to be very promising techniques to scale up the production of ADV emulsion for pharmaceutical manufacturers.

5.5.1.3 Effect of dispersed phase type

The effect of the dispersed phase type was investigated for PFHex, PFHep, MCT oil and a mix of PFHex :MCT oil (50/50 vol%). The variation of the resulting pressure and the droplet size versus the dispersed phase type is shown in Figure 5.4 and Figure 5.5, respectively.

The resulting pressure was the same for both PFCs, with 38.4 bars for PFHex and 37.8 bars for PFHep, but lower for the MCT oil with 19.5 bars. As detailed previously, the resulting pressure is mainly the sum of ΔP_{flow} and $\Delta P_{disruption}$, given by the following equations [149] :

$$\Delta P_{flow} = \eta_e R_m J \quad (5.7)$$

where η_e is the emulsion viscosity in the pores, R_m is the membrane resistance, J is the transmembrane flux.

$$\Delta P_{disruption} = \frac{C\phi\gamma_{eq}}{D_{50}} \quad (5.8)$$

where C is a constant, ϕ is the volume fraction of the dispersed phase in the emulsion, γ_{eq} is the interfacial tension at the equilibrium between dispersed phase and continuous phase, and D_{50} is the droplet size. The viscosity is in the range of 25-32 mPa.s for MCT oil, 0.69 mPa.s for PFHex and 0.9 mPa.s for PFHep (data provided by the manufacturer). The higher viscosity of the MCT oil is expected to increase ΔP_{flow} and so ΔP_r . However, the interfacial tension of the MCT oil, $\gamma_{eq} = 6.0$ mN/m, is lower, than for PFCs, typically 16 mN/m (Figure 5.4). The lower interfacial tension of MCT oil facilitates the droplets break-up leading to a decrease in $\Delta P_{disruption}$. The interfacial tension effect seems to exceed the viscosity effect and appears as a key parameter that governs the resulting pressure in PME.

Simultaneously, smaller droplet size and narrow size distribution were obtained with MCT oil as the dispersed phase with a droplet size of 1.41 μm and CV : 16%, while 1.51 μm with PFHex and 1.53 μm with PFHep were obtained (Figure 5.5). This slight decrease of MCT oil droplet size and size distribution are due to the lower interfacial tension and higher viscosity leading to a higher wall shear stress at the membrane pores walls, similarly to the effect observed for flow rates (Equation 5.6).

Finally, we prepared emulsions with a mixture of PFHex and MCT oil (50/50 vol%) as dispersed phase, to reduce the disruption pressure and so the overall resulting pressure. As expected, the resulting pressure was lower for these dual phases droplets thanks to the MCT oil (Figure 5.4). Dual phases droplets decrease the resulting pressure and so make possible the use of membranes with smaller pore size. Another advantage is the possible use of the oil phase to encapsulate hydrophobic drugs as shown by Fabiili et al. [83].

5.5.2 Acoustical droplet vaporization

We then demonstrated the functionality of our droplets to provide ADV. We observed the influence of various parameters on the ADV threshold : droplet size, temperature, PFC type, addition of oil to PFC. All parameters and results are summarized in Table 5.1. Each parameter's influence are described below. At 37°C and without ultrasound, PFC droplets in water did not vaporize, demonstra-

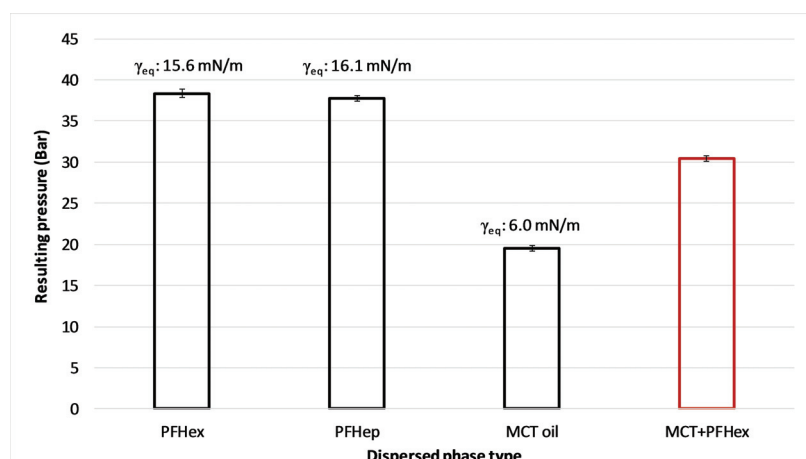


FIGURE 5.4 – Resulting pressure as function of the dispersed phase type for the preparation of droplets by premix emulsification with pore size of 1.1 μm , for PFHex : PFHexane (C_6F_{14}), PFHep : PFHeptane (C_7F_{16}), MCT oil, and a mix of PFHex :MCT oil (50/50vol%). On the histogram bars is the interfacial tension at the equilibrium, γ_{eq} , between the dispersed phase and the continuous phase of 2.0 wt% Tween :PEG40S

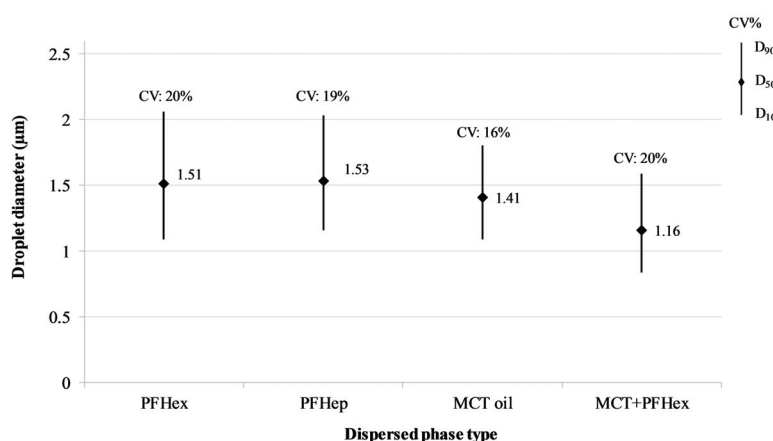


FIGURE 5.5 – Droplet size as function of various dispersed phase types PFHex, PFHep, MCT oil and mixture of PFHex :MCT oil (50/50 vol%) prepared by premix emulsification with pore size of 1.1 μm at 200 mL/min. Above the histogram bars are the coefficient of variation of the droplet size distribution

ting the stability of the droplets. Indeed, it is important to avoid droplet vaporization during the injection into the bloodstream, to provide control over the vaporization process by ultrasound.

PFC droplets were exposed to increased ultrasound power delivered by the imaging probe. Figure 5.6 shows that before the ADV threshold, there was no contrast enhancement indicating the absence of microbubbles. Indeed, the PFC liquid droplets have very low echogenicity and cannot be observed in water because both liquids have similar acoustic impedance. The signal intensity was low and constant without vaporization of droplets until the ADV threshold, where microbubbles were formed and the signal intensity increased. The change of phase from liquid to gas can be easily detected by the pulse-echo method. In contrast, bubbles are stronger scatterers, with responses several orders of magnitude higher compared with droplets. The phase change of dro-

plets into microbubbles leads to increased echogenicity due to the ultrasound waves. Droplets can be vaporized in a medium at a temperature below their boiling point (56°C). Microbubbles then formed a microbubbles cloud that rose-up at the water surface when the ultrasound pulses are stopped.

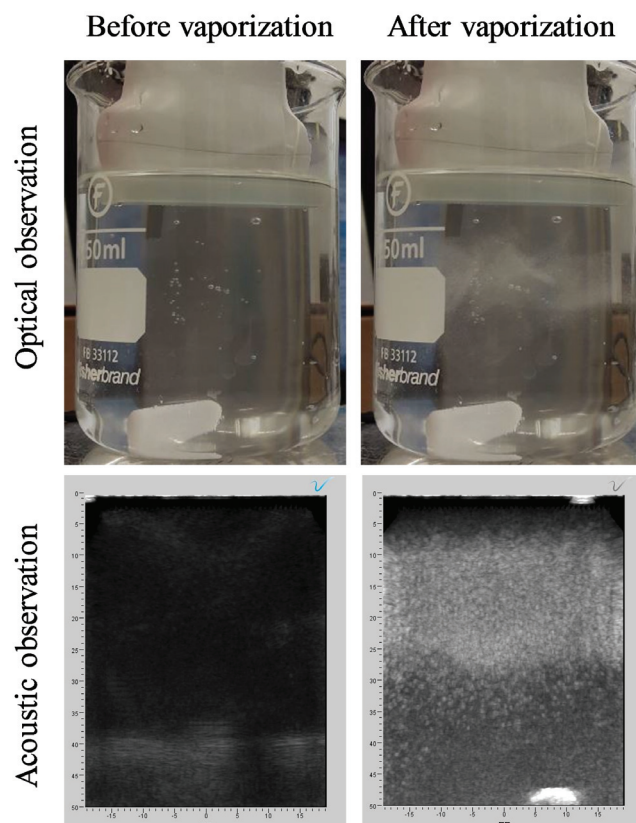


FIGURE 5.6 – Optical and acoustic images of beaker filled with a PFHex droplet solution at 37°C before and after the ADV threshold vaporization. The droplet vaporization and formation of microbubbles opacified the solution and increased the echogenicity

TABLEAU 5.1 – Influence of the various parameters on the ADV threshold ($D_{droplet}$: Droplet diameter)

Continuous phase	Dispersed phase	Parameters studied	Droplet size	ADV threshold
2wt% Tween20 :PEG40S	PFHexane	$D_{droplet}$	1.19 μm	22.47 V
			1.51 μm	21.15 V
			4.41 μm	18.96 V
	PFHeptane	Temperature (37°C or 25°C)	1.51 μm	Not reached at 25°C
		PFC (PFHep)	1.53 μm	27.48 V
		PfHex :MCT oil	1.16 μm	33.73 V

5.5.2.1 Effect of process on the droplet vaporization threshold

The size and size distribution of ADV droplets are important factors that determine the ADV threshold, and will also influence the biodistribution in the bloodstream during future pre-clinical studies. Generally, the ADV threshold is measured with polydispersed droplets obtained by conventional processes [41, 42]. As smaller droplets require more ultrasound energy to be vaporized, the large size distribution can influence the threshold energy for smaller droplets. The microbubble formation from large droplets may have an impact on the vaporization of smaller droplets due to the attenuation of the incident ultrasound waves by the bubble cloud, or could trigger the vaporization of smaller droplets, resulting in an apparent lower threshold that would be expected. In that sense, the narrow size distribution will provide a tight control over the vaporization process, to avoid undesirable effects, such as occlusion of unwanted vessels if ADV is used for embolotherapy.

Figure 5.7 shows the acoustic response of polydispersed and monodispersed droplets. The polydispersed emulsion was produced by ultra-turrax (premix emulsion) and had a mean droplet size of 16.0 μm and coefficient of variation of 41%. The monodispersed emulsion was obtained by membrane emulsification ($D_{pore} : 1.1 \mu\text{m}$) with a mean droplet size of 1.51 μm and coefficient of variation of 20%. The narrow size distribution of ADV droplets led to a uniform response in the focal region of the transducer, while polydispersed droplets showed a more diffuse response with the vaporization of droplets outside the focal region.

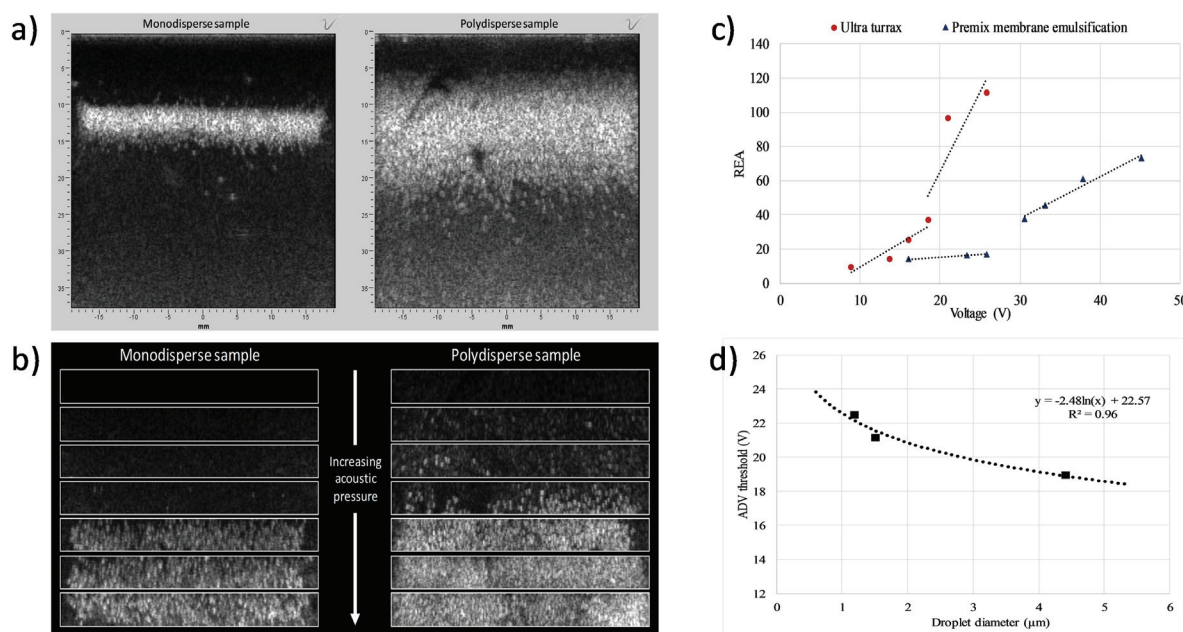


FIGURE 5.7 – a) Acoustic observation of the vaporization of monodispersed and polydispersed sample containing PFHex droplets in the region of interest of the transducer at ultrasound pressure corresponding at 50 V, and b) at increasing ultrasound pressure. c) Relative echo amplitude (REA) for monodispersed and polydispersed sample containing PFHex droplets as function of ultrasound probe driving voltage. d) Influence of PFHex droplet size on the ADV threshold at 37°C prepared by premix emulsification at 200 mL/min

Figure 5.7 shows droplet vaporization in this interest zone with the increasing acoustic pressure

for monodispersed and polydispersed droplets. In this comparison, we do not observe the influence of droplet size but only the size distribution on the ADV threshold. For the monodispersed sample, no microbubbles were detected at low acoustic pressure, indicating the absence of droplet phase change under exposure to ultrasound. In the polydispersed sample however, echogenic microbubbles were observed at lower acoustic pressure, probably due to the vaporization of larger droplets.

Indeed on the Figure 5.7, the REA value increased sharply (leading coefficient : 2.78) while the applied pressure was below the ADV threshold for polydispersed droplets, while for the monodispersed sample, a slight increase of REA was observed with a leading coefficient around 0.32.

For all experiments with monodispersed droplets, the REA was found to increase slightly before the ADV threshold, with a leading coefficient around 0.8. Kripfgans et al. [41] observed similar phenomenon with dodecafluoropentane droplets stabilized with bovine serum albumin and produced by a high-speed vial shaker. In our case, the slight increase of REA could be due to the high frequency of the probe (7.813 MHz) that provided additional scattering noise. The use of monodispersed droplets allowed the control of droplet vaporization at the ADV threshold. The ADV threshold obtained for the premix emulsion with a droplet size of 16 μm was 15.7 V and 21.15 V for the monodispersed droplets (D_{droplet} : 1.57 μm). Despite the different size distribution, the droplet size seems to have an impact on the ADV threshold, as a lower acoustic pressure was necessary to vaporize larger droplets. Monodispersed droplets may both increase the vaporization efficiency by the echo-pulse method in a local area and avoid the unwanted phase change of droplets.

5.5.2.2 Effect of diameter

PFHex monodispersed droplets were prepared with the 0.8, 1.1 and 3.1 μm pore size membranes as previously described. The influence of droplet size on the ADV threshold is shown in Figure 5.7. Smaller PFHex droplets required higher acoustic intensity to vaporize than larger droplets. Indeed, droplets with radii of 1.19, 1.51, and 4.41 μm were vaporized at an ADV threshold of 22.47, 21.15 and 18.96 V, respectively. On Figure 5.7, we observed a negative logarithmic relation between droplet size and vaporization energy ($Y = -2.48\ln(X) + 22.57$, $R^2 = 0.96$) as predicted by the Antoine's equation linking the pressure and the temperature of vaporization [67, 68, 69] :

$$\text{Log}P = A - \frac{B}{T + C} \quad (5.9)$$

where P is pressure, T is temperature and A, B, and C are gas-dependent constants. Furthermore, the Laplace pressure is an inverse function of droplet size, thus smaller droplets have a higher boiling temperature than larger droplets. Thus, monodispersed droplets produced by PME responded similarly to the same acoustic parameters in the focal region of the transducer. As suggested by Martz et al. [69], other advantages of monodispersed droplets could be the ability to adapt ADV droplet sizes for applications such as specific vessel occlusion or on-demand drug release.

5.5.2.3 Effect of the temperature

In the literature, PFP droplets vaporization (perfluoropentane, 29°C boiling point) has been generally performed at 37°C. In this case, PFP droplets are in superheated state, the boiling point of the PFP droplets is lower than body temperature, and no vaporization occurs due to the Laplace pressure. Here, since the boiling temperature of PFHex (56°C) is higher than the two temperatures investigated (25°C and 37°C), droplets are not in a superheated state.

Figures 5.8 shows that droplets vaporization was affected by temperature. Vaporization was observed at 37°C, while at 25°C, the ADV threshold was not reached as shown by the absence of a sharp increase of REA. Similar results were reported by Fabiilli et al. [42], where no ADV was observed for PFHex droplets at 25°C below the boiling point. Also, these authors showed a decrease of the ADV threshold when increasing the sample temperature. Once the superheated state was reached, the sample temperature had no effect on the ADV threshold. Our study shows the possible vaporization of ADV droplets with a high boiling temperature of PFC at body temperature but not at room temperature.

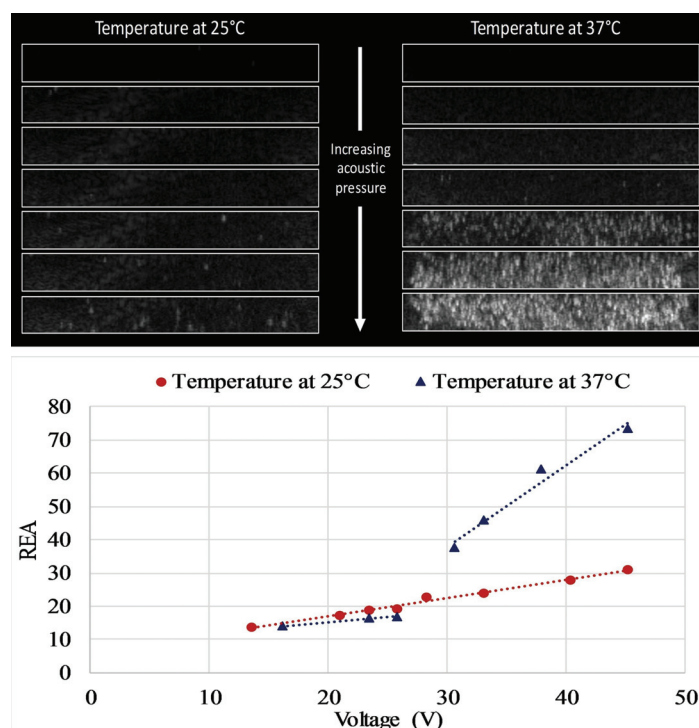


FIGURE 5.8 – Influence of temperature on the ADV process : Vaporization response in the region of the interest of PFHex droplets (top) and Relative echo amplitude (REA) (bottom) as function of ultrasound propbe driving voltage, at 25°C and 37°C

5.5.2.4 Effect of perfluorocarbon type

The ADV thresholds for the different PFCs (PFHex or PFHep) at 37°C are presented in Table 5.1. For similar droplets size (1.51 μm for PFHex and 1.53 μm for PFHep), the ADV threshold was lower for PFHex droplets with an ADV threshold of 21.15 V, than PFHep droplet with an ADV threshold of 27.48 V. Despite the high boiling point of PFHep (80°C), we observed the vaporization of PFHep

droplets. PFC droplets being in a non superheated state, their ADV threshold was proportional to their boiling temperature. Indeed, the PFC with a higher boiling point requires more activation energy to vaporize the droplets as predicted by Antoine's equation (Equation 5.9). In therapeutic applications of ultrasound, high pressures are used to create desired bioeffects, thus PFC with a high boiling temperature may be more suitable, as droplets should remain stable until their activation.

5.5.2.5 Effect of the presence of oil

Dual-phase droplets were prepared by the premix emulsification using a PFHex :MCT oil mixture (50/50 vol%) stabilized by 2.0wt% Tween20 :PEG40S solution (molar ratio 9 :1). Figure 5.9 shows these dual-phase droplets observed by optical microscopy with two distinct phases. Indeed, a MCT oil layer envelops the PFHex phase due to their difference of hydrophobicity. As reported by Riess 2001 [222], PFCs are significantly more hydrophobic than hydrocarbons compounds and are not only hydrophobic but lipophobic as well. This emulsion was obtained with the premix technique, as the small droplets obtained by PME were not observable by optical microscopy.

Table 5.1 summarizes the ADV thresholds obtained for droplets with similar size : around $1.16\ \mu\text{m}$ for dual-phase droplets and $1.19\ \mu\text{m}$ for PFHex droplets. The ADV threshold for the dual-phase droplets was 33.73 V, while PFHex droplets had a lowerer ADV threshold of 22.47 V. Indeed, droplets with an oil layer require more activation energy for vaporization. This oil layer of PFHex core seems to have an influence on the ADV threshold. This may result from the presence of medium chain triglycerides within the dual-phase droplets that helps to stabilize the PFHex phase. An explanation of the increase of ADV threshold for dual-phase droplets, could be the inhibition of the expansion of any gas nuclei generated within the PFHex phase during the ultrasound waves exposure, leading to a possible recondensation of PFHex. Fabiilli et al. [42] observed similar results, with an increase of the ADV threshold by increasing the viscosity of the bulk fluid by adding glycerol in the water phase. For future experiments where the droplets will be loaded with drugs, it would be interesting to observe the effect of vaporization on the drug activity, as a possible damage of the drug within the oil phase could occur during the vaporization of the PFHex core.

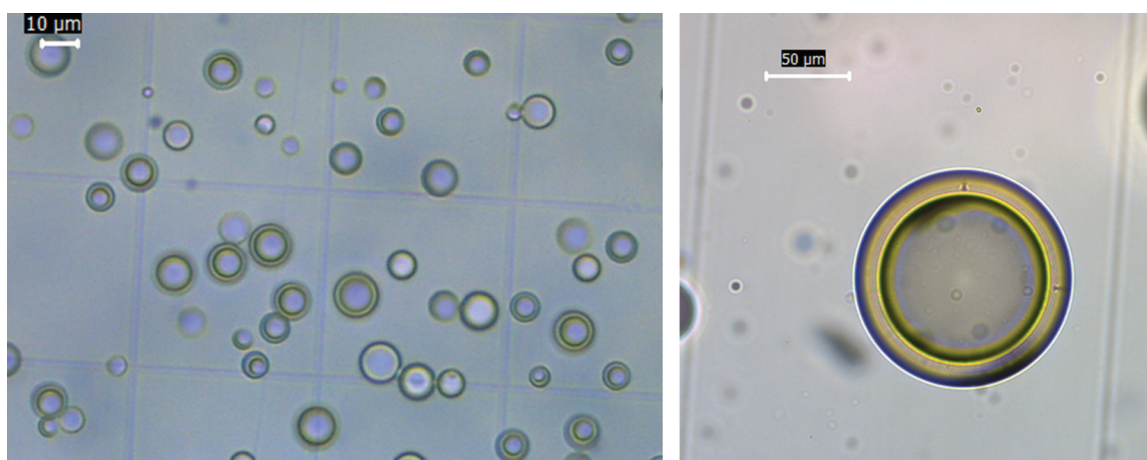


FIGURE 5.9 – Optical microscopy observation of the dual-phase (PFHex :MCT oil) droplets from premix emulsion sample

5.6 Conclusion

This work described the production of monodispersed PFC droplets for acoustic droplet vaporization by PME. PFC droplets were formed by break-up of larger droplets in a SPG membrane at high flow rate (200 mL/min). The high yield of droplets obtained is one key advantage of the proposed process for large scale preparation of PFC emulsions 10^{+13} Droplets/min. The droplet size, CV and span were respectively 1-5 μm , 20 % and 0.6. The three emulsions obtained had droplet size distribution below 10 μm and so would be suitable for bloodstream injection for pre-clinical ADV studies. We investigated the effect of several process parameters on the resulting pressure and droplet size : membrane pore size, flow rate, and dispersed phase type. A slight decrease of droplet size with flow rate was obtained due to a higher wall shear stress at the membrane pore walls, which facilitates droplet disruption. Moreover, a linear relationship between droplet size and pore size was found while a sharp increase of the resulting pressure was observed when decreasing the membrane pore size. The addition of MCT oil in the dispersed phase allowed to reduce and minimize the resulting pressure in order to use membranes with smaller pore size. This mixture of PFHex :MCT oil (50/50 vol%) allows the preparation of dual-phase droplets, where a MCT oil surrounds the PFC core as observed by optical microscopy. The size and size distribution of ADV droplets is a major factor determining the vaporization threshold, the acoustic pressure required to induce droplets vaporization. Monodispersed PFC droplets exposed to ultrasound showed a uniform ADV response, while polydispersed droplets presented a more diffuse response outside the focal region of the transducer. The relationship between droplet size and the ADV threshold was in agreement with the expected negative logarithmic response based on the diameter of the droplets. PFC droplets being in a non superheated state, the bulk fluid temperature had an influence on the ADV threshold, and vaporization was observed only at a physiological temperature, but not at ambient temperature. The ADV threshold, though, was proportional to the boiling temperature of PFC, with higher ADV threshold for PFHep than for PFHex. The dual-phase droplets is an interesting alternative monophase droplets. That will allow the encapsulation of hydrophobic drugs for therapeutic applications. In this sense, the oil layer could also be used to add a hydrophobic surfactant to the dispersed phase in order to decrease the interfacial tension and facilitate droplet disruption through the membrane pores, making possible the use of membranes with smaller pores size to obtain smaller droplets.

Conclusion générale

Ce travail de thèse décrit le développement original de procédés membranaires pour la préparation de microbulles et microgouttelettes pouvant être utilisées comme ACUs en imagerie médicale ultrasonore. Les systèmes dispersés ont été préparés avec deux configurations d'émulsification membranaire différentes, les microbulles formées par émulsification membranaire directe et les microgouttelettes par émulsification membranaire par prémix. Dans les deux cas, des membranes SPG tubulaires ont été utilisées avec des diamètres de pore allant de 0,2 à 3,1 μm .

La première partie de la thèse a décrit la préparation de microbulles, dans un premier temps stabilisées par des tensioactifs solubles, puis dans un second temps par des tensioactifs insolubles. Dans la première étude, nous avons réussi à produire des microbulles de PFC monodispersées en utilisant un procédé membranaire dans une configuration crossflow. Pour les trois tensioactifs utilisés, SDS, Tween20 et PEG40S, les microbulles obtenues, à partir d'un diamètre de pore de 1,1 μm , présentaient un diamètre moyen de 13,3, 15,6 et 16,5 μm avec une distribution de taille étroite (CV : 16%, 23%, 26%), respectivement. En utilisant des diamètres de pores plus petits, de 0,2 et 0,5 μm , des diamètres de bulles de 4,42 μm et 6,36 μm ont pu être obtenus, diamètres compatibles avec de futures applications en imagerie ultrasonore. Avec le procédé développé, un haut rendement de production des microbulles ($\sim 10^{+10}$ MBs/min) a pu être atteint, lorsqu'un rapport de pression transmembranaires/pression de point de bulle était compris entre $1 < \Delta P/P_{BP} < 1,5$. Nous avons pu observer que lorsque $\Delta P/P_{BP} < 1,5$, le flux de phase gazeuse augmentait linéairement avec le rapport $\Delta P/P_{BP}$, n'influençant ni le diamètre, ni la distribution en taille des microbulles. Dans cette configuration, les microbulles grossissent jusqu'à atteindre une certaine taille, puis se détachent au niveau de l'ouverture du pore. Dans cette gamme de pression, nous avons mis en évidence, que la contrainte de cisaillement n'affectait pas la taille des microbulles. Lorsque $\Delta P/P_{BP} > 1,5$, de grosses microbulles polydisperses ont été produites, principalement en raison de l'augmentation du flux de gaz à travers la membrane créant un flux continu à la sortie des pores de la membrane. Dans cette configuration, nous avons pu montrer que le principal phénomène, régissant la formation de microbulles monodispersées, était la cinétique d'absorption du tensioactif à l'interface gaz-liquide à l'ouverture des pores de la membrane. Plus cette cinétique d'absorption était rapide, plus les microbulles formées étaient petites et monodisperses. En effet, lorsque de faibles rapports de pressions ont été utilisés, la force de tension superficielle dominait les autres forces et la taille et la distribution de la taille des microbulles étaient indépendantes de la pression transmembranaire. Nous avons mis en évidence que la phase dispersée pouvait également influencer la formation des microbulles. Une tension superficielle plus faible a été mesurée lorsque les gaz perfluorés étaient utilisés en comparaison avec l'air, entraînant une diminution de la force de tension superficielle et facilitant ainsi le détachement des microbulles. Cette activité co-tensioactive a donc permis de réduire le diamètre des microbulles formées à l'ouverture des pores. Comme attendu, du fait de la plus faible solubilité des PFC dans l'eau comparé à l'air, les microbulles de PFC ont aussi montré une durée de vie plus grande en comparaison avec les microbulles d'air. Cependant, cette durée de vie des microbulles stabilisées avec ces tensioactifs reste relativement faible. Dans une deuxième étude, des microbulles stabilisées par les lipides ont été produites. Une stabilité plus importante, sur plusieurs jours, a pu être obtenue. Des microbulles stabilisées par le DPPG et P40S dans un rapport molaire de 9 :1 ont été préparées par émulsification membranaire avec un module de type microkit. Dans cette configuration d'émulsification,

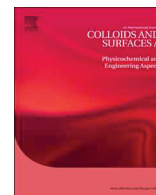
un diamètre moyen de microbulles entre 8,11 et 10,9 μm en fonction du diamètre de pore utilisé a été obtenu.

Cependant, le caractère hydrophobe des molécules de phospholipides résultant des deux chaînes carbonées, favorise la formation d'agrégats lipidiques dans une solution aqueuse, sous la forme de vésicules lipidiques, ce qui empêche une adsorption directe à l'interface gaz/liquide à la surface des membranes. Trois stratégies ont été utilisées afin de permettre l'adsorption à l'interface de ces molécules lipidiques pour réduire le diamètre et la distribution en taille. L'ajout d'un tensioactif, le PEG40S a montré la possibilité de générer des microbulles par ce procédé membranaire. Cependant une distribution en taille relativement large a été observée (CV : 34-37%). L'effet de la température et de l'ajout d'hydrotropes comme le propylène glycol et le glycérol dans la phase continue ont été étudiés comme facteurs pouvant influencer la tailles des microbulles formées, mais n'ont pas permis pour l'instant d'optimiser la préparation afin de réduire leur taille à des tailles compatibles avec des applications médicales. D'un point de vue fonctionnel cependant, une caractérisation acoustique de ces microbulles a montré qu'elles génèrent une réponse harmonique, propriétés essentielles pour leur emploi en tant qu'ACUs.

Le deuxième axe de recherche a porté sur la préparation par procédé membranaire de microgouttelettes de PFC, avec la capacité de se vaporiser à partir d'une impulsion acoustique. La méthode de préparation choisie a été l'émulsification membranaire par prémix, avec laquelle un haut rendement en gouttelettes a été obtenu (10^{13} gouttes/min). Les diamètres des gouttelettes et les coefficients de variation étaient respectivement compris entre 1-5 μm et 20%, pouvant être appropriés pour une injection sanguine dans de futures études précliniques. L'influence de plusieurs paramètres du procédé sur la pression résultante et la taille des gouttelettes a montré une relation linéaire entre le diamètre des pores et le diamètre des microgouttelettes avec un rapport d'environ 3, ce qui correspond aux valeurs de la littérature. L'augmentation de la contrainte de cisaillement sur les parois des pores de la membrane par l'augmentation du flux transmembranaire a facilité la rupture des gouttelettes en gouttelettes plus petites. Également, le développement de ce procédé membranaire a permis de préparer des microgouttelettes composées d'une double phase dispersée, dans laquelle une gouttelette de PFC était entourée par une couche d'huile. La fonctionnalité des gouttelettes de PFC a été démontrée par des expériences de vaporisation avec une sonde d'imagerie ultrasonore. La taille et la distribution de la taille se révèlent être des facteurs majeurs influençant le seuil de vaporisation. Aussi, nous avons pu mettre en évidence qu'un échantillon de gouttelettes de PFC monodispersées exposées aux ultrasons génère une réponse ADV uniforme, tandis que les gouttelettes polydispersées ont présenté une réponse plus diffuse en dehors de la région focale du transducteur. L'efficacité de la vaporisation pour les microgouttelettes monodispersées pourrait éviter le changement de phase indésirable des gouttelettes adjacentes comme observé avec l'échantillon polydispersé. La préparation des microgouttelettes composées d'une double phase constitue une approche intéressante pour l'encapsulation de molécules hydrophobes à visées thérapeutiques.

Les futures études et applications à la suite de ces travaux de thèse pourraient concerner le développement de nouvelles formulations de microbulles avec l'utilisation de tensioactifs fluorés. Ces tensioactifs ont montré, dans la littérature, une adsorption relativement plus rapide à l'interface, réduisant la tension superficielle et donc la taille des microbulles formées, tout en augmentant la

stabilité des microbulles grâce à l'interaction entre les fluors des deux phases. Également, l'utilisation combinée d'un tensioactif et/ou d'un hydrotrope ayant une adsorption plus rapide que le PEG40S, sans modifier la viscosité de la phase continue pourrait être une voie de recherche intéressante afin de réduire la distribution en taille des microbulles. Dans ce sens, une meilleure compréhension des mécanismes d'adsorption des tensioactifs insolubles permettrait d'optimiser la préparation d'ACUs par procédé membranaire. L'utilisation d'une couche d'huile pourrait, en plus d'être une phase véhiculant un principe actif, permettre d'ajouter un agent tensioactif hydrophobe réduisant fortement la tension interfaciale. Cette diminution pourrait ainsi faciliter la rupture des gouttelettes à travers les pores de la membrane, et rendre possible l'utilisation de membranes avec des tailles de pores plus petites. Ce procédé membranaire pourrait ainsi être utilisé pour la formation de gouttelettes de PFC de taille nanométrique. De plus, une étude sur l'influence de l'impact de la vaporisation sur la dégradation de la molécule encapsulée pourrait constituer une recherche intéressante afin d'optimiser une application thérapeutique. Enfin, des études précliniques pourraient déjà être envisagées afin de tester leur potentiel en tant qu'ACUs.



Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes

Romain Melich^{a,b}, Jean-Pierre Valour^a, Sébastien Urbaniak^a, Frédéric Padilla^{b,c,d}, Catherine Charcosset^{a,*}

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69100 Villeurbanne, France

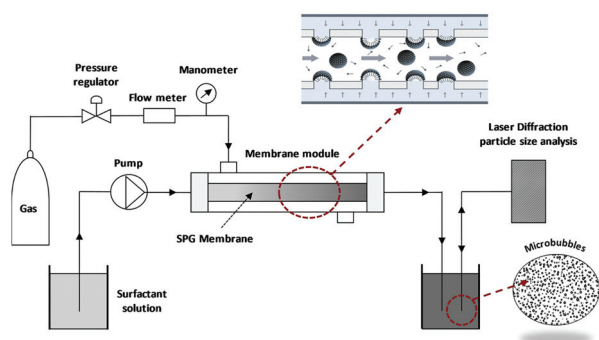
^b LabTAU, INSERM, Centre Léon Bérard, Université Lyon 1, Univ-Lyon, F-69003 Lyon, France

^c Department of Radiation Oncology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA

^d Focused Ultrasound Foundation, 1230 Cedars Court, Suite 206, Charlottesville, VA, USA



GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Microbubble
Shirasu Porous Glass membrane
Membrane emulsification
Perfluorocarbon gas

ABSTRACT

Microbubbles are increasingly used in several fields, such as medical imaging for enhanced contrast ultrasound imaging. These microbubbles usually consist of a gas core stabilized by surfactant molecules. In this study, a technique using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes was used to produce perfluorocarbon microbubbles. The microbubbles obtained were characterized by their size, size distribution, and stability. The effect of several parameters on the microbubble's size was investigated related to the process (transmembrane pressure, ΔP , bubble point pressure, P_{BP} , shear stress, τ_w), membrane pore size, D_p , and formulation (gas, surfactants in the aqueous phase). The transmembrane pressure nor the shear stress (τ_w) had influence on the microbubble's size or size distribution for $\Delta P/P_{BP} < 1.5$. The decrease of the membrane pore size from 1.1, 0.5, to 0.2 μm led to lower microbubble size 13.3, 6.36, and 4.42 μm , respectively, which was associated with higher size distribution 16%, 24% and 31%, respectively due to the higher Laplace pressure exerted on smaller microbubbles leading to their destabilization. With the 1.1 μm pore size membrane, perfluorocarbon microbubbles were obtained with a diameter of 13.3 μm and coefficient of variation (CV) of 16% when stabilized by sodium dodecyl sulfate (SDS), 15.6 μm with CV% of 23% when stabilized by Tween20, and 16.5 μm with CV% of 26% when stabilized by Polyoxyethylene (40) stearate (PEG40S). These low CV were indication of monodispersity. Perfluorocarbon microbubbles had a smaller size than air microbubbles due to the lower surface tension that decreased the retention force, keeping the microbubbles at the pore opening. The stability study showed that the perfluorocarbon gas greatly increased the lifetime of the microbubbles with a slight increase in size of 1.3

* Corresponding author.

E-mail address: catherine.charcosset@univ-lyon1.fr (C. Charcosset).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.058>

Received 8 June 2018; Received in revised form 19 September 2018; Accepted 19 September 2018

Available online 26 September 2018

0927-7757/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

after 90 s compared to 2.2 for air microbubbles. Overall, the membrane technique proved to be an effective, controlled and reproducible method to produce perfluorocarbon microbubbles at a high rate $\sim 0.6 - 1.5 \times 10^{+10}$ microbubbles/min. The key factor that determines the microbubbles formation is the adsorption kinetics of the surfactant at the new gas–liquid interface at the pore opening.

Nomenclature		V_d	mean velocity of the continuous phase in the tube (m s^{-1})
A	effective membrane area (m^2)	<i>Greek symbols</i>	
D_i	mean diameter in the class i (μm)	γ_0	surface tension at $t = 0 \text{ s}$ (mN m^{-1})
D_n	microbubble diameter at $n\%$ of the cumulative number (μm)	γ_{eq}	surface tension at the equilibrium (mN m^{-1})
D_p	pore diameter (μm)	μ	dynamic viscosity (Pa s)
D_w	gas diffusivity in water ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	τ_w	shear stress at the membrane surface (Pa)
J	phase flux of the gaseous phase ($\text{m}^3 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Θ	contact angle
L	Ostwald's coefficient	<i>Abbreviations</i>	
n_i	number of microbubbles in the class i	C_3F_8	octafluoropropane
P_{atm}	atmospheric pressure (Pa)	CEHDA	coaxial electrohydrodynamic atomisation
P^*	excess pressure (Pa)	CMC	critical micelle concentration
P_{PB}	bubble point pressure (Bar)	CV	coefficient variation
ΔP	transmembrane pressure (Bar)	PEG40S	polyoxyethylene (40) stearate
δP	Laplace pressure (Pa)	PTFE	polytetrafluorethylene
Q	volumic flowrate of the gaseous phase ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	Tween20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
r	radius of the microbubble	SDS	sodium dodecyl sulfate
R and R_2	inner radius of the membrane tube (m)	SPG	Shirasu Porous Glass
R_1	rod radius (m)		
t	time (s)		

1. Introduction

Microbubbles have many potential applications in chemical and food industries, process engineering, water treatment, pharmaceutical and medicine. Due to their small size (typically around some microns), microbubbles have a very large gas–liquid interface area per unit volume. Microbubbles can thus increase the efficiency of gas–liquid contacting devices, such as bubble columns, chemical reactors and fermenters [1]. In chemical industries, many gas–liquid reactions are based on the dispersion of gas bubbles in a continuous liquid phase to improve both hydrodynamics and mass transfer [2]. In the food industry, the density and texture of products such gel and cream-based foods can be improved by monodisperse gas microbubbles in these materials [1]. In wastewater treatments, microbubble aeration can enhance ozone and oxygen gas–liquid mass transfer [3]. In biomedical applications, microbubbles of 1–10 μm in diameter (sized to flow safely through a patients smallest capillaries) are used as ultrasound contrast agent for imaging, and are also studied for drug, gene and metabolic gas delivery [4–7]. For these applications, monodispersity can be essential to improve echographic image quality [8], and also to limit Ostwald ripening effect by reducing effective Laplace pressure difference between polydisperse microbubbles, leading to better microbubble stability.

To design these gas–liquid contacting devices, the control of the size and size distribution of microbubbles generated is very important. To improve the manufacturing process, gases with reduced solubility in water, such as fluorocarbons can be used [9–11]. Perfluorocarbons gases reduce the osmotic pressure [12], allowing an increase in the microbubble stability [13,14] and presenting a lower surface tension [15]. The shell composition is also a key determinant for microbubble's physical properties as well as their acoustic behavior and imaging time. The shell core serves to prevent gas escaping from the core and avoid microbubbles coalescence [16,17]. While for biomedical applications, microbubbles are shelled with phospholipids or albumin [18], soluble surfactants are also advisable for the production of microbubbles with

perfluorocarbon, as they are easy to implement due to a rapid adsorption at gas–liquid interface, such as mixture of sorbitan monostearate Span 60 and polyoxyethylene 40 stearate (PEG40S) in aqueous media to produce perfluorocarbon-filled microbubbles by sonication [19]. Other possible shell materials include proteins, and biocompatible polymers such as Pluronic F68 [20].

The main techniques used to generate microbubbles are mechanical agitation or sonication and microfluidic technologies [7,21–24]. In mechanical agitation, the hydrophobic gas is dispersed within an aqueous surfactant solution by disruption of the interface via high-shear mixing. Mechanical agitation is highly efficient at generating microbubbles at a high production rate, however the size distribution is highly polydisperse which requires further fractionation, for example by centrifugation [14], decantation [25] or flotation under gravity [11]. These methods are not ideally adapted for physicochemical investigations [10]. Microfluidic technologies include flow-focusing [26–28], T-junctions [29,30] and electrodynamic atomization [31]. These techniques provide microbubbles with very low polydispersity by a precise control of their size, however, microbubbles are produced at a very low rate and microchannels tend to clog when preparing microbubbles smaller than 10 μm . The microfluidic methods are time-consuming [22], which requires new microfluidic strategies in order to improve the production yield.

A membrane technique is an alternative to generate monodisperse microbubbles. This method was first proposed by Kukizaki et al. [1,32–35]. With this technique, monodisperse microbubble are produced by pushing air through a Shirasu porous glass (SPG) membrane (Fig. 1). Air microbubbles were formed at the pore outlets and detached from the membrane by the shear force exerted by the continuous phase containing surfactant(s) flowing along the surface. The size and size distribution of the microbubbles depended on several parameters related to the membrane pore size [34], surface wettability of the SPG membrane [1], symmetry/asymmetry [33], process parameters such as shear stress [32,34], transmembrane pressure [34], and surfactants in the aqueous phase [35]. SPG membranes have also been used for

microbubble aeration in a biofilm reactor for wastewater treatment [3]. Other membranes were used such as ceramic tubular membranes (PALL, France) to generate air or nitrogen microbubbles in aqueous or organic phase (water or heptane) for gas–liquid reactors [2]. Other advantages of using the membrane technique are low energy consumption, simplicity of design, easy scale-up, and reproducibility [36].

In this study, we considered the membrane technique to produce perfluorocarbon microbubbles. The microbubbles obtained with three different types of surfactants were characterized by their mean size and size distribution. The influence of the dispersed gaseous phase on microbubble formation was investigated. In addition, the microbubbles stability with each surfactant was observed. Surface tensions were also measured. The effect of several parameters on microbubbles characteristics were investigated such as shear stress, transmembrane pressure as well as surfactant types in the aqueous phase. In addition, perfluorocarbon microbubbles produced by the membrane technique versus sonication were compared.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The gas–liquid dispersion system was composed of perfluorocarbon or air as the dispersed gaseous phase and a continuous aqueous phase. Octafluoropropane (C_3F_8) is a hydrophobic gas (vapor pressure of 792 kPa and water solubility at 25 °C of 0.19 mol m^{-3}) [37] purchased from F2 Chemicals Ltd (Preston, United Kingdom).

Three surfactants were used in this study: an anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), and two non-ionic surfactants, Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) and

Polyoxyethylene (40) stearate (PEG40S) purchased from Sigma Aldrich (France). Ultrapure water was obtained using a Synergy unit system (Millipore, France) to prepare the aqueous solutions. The continuous phase was composed of 1.0 wt% surfactant in saline solution at 0.9% of NaCl for parenteral solution, since the microbubble preparation was found to be improved with the addition of NaCl [38]. Microbubble diameter was found to decrease when surfactant concentration increased, to achieve a minimum diameter for a concentration above the critical micelle concentration (CMC). Surfactants were therefore used at concentration above CMC to achieve maximum effect [39].

2.2. SPG membranes and membrane module

Hydrophilic tubular SPG membranes were provided by SPG Technology Co. Ltd (Miyazaki, Japan). The SPG membranes had a length of 125 mm and an inner diameter of 8.3 mm. These membranes are manufactured by a phase separation process of calcium aluminum borosilicate glass and subsequent acid leaching [32,40], and have been widely used for production of emulsions and particles [41,42]. Membrane with a mean pore size of 1.1, 0.8 and $0.5 \mu\text{m}$ were used. The mean pore size data was provided by the manufacturer.

The microstructure of the membranes was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a FEI Quanta 250 FEG microscope at the “Centre Technologique des Microstructures” at the University of Lyon (Villeurbanne, France). A fragment of SPG membrane was deposited on a flat steel holder. The sample was coated under vacuum by cathodic sputtering with copper. The samples were observed by SEM under an accelerating voltage of 10 kV. SPG membranes have cylindrical tortuous pores that form a three-dimensional network (Fig. 2). The membrane porosity is in the range of 0.53–0.60 [43]. SPG membranes are negatively charged and hydrophilic due to the presence of hydroxyl groups such as silanol groups on their surface. The dissociation of the silanol groups gives the negative charge of the SPG membrane surface [35].

2.3. Surface tension measurements

The surface tension of surfactant solutions was measured by the pendant drop method using a Drop Shape Analysis tensiometer model DSA-10 Mk2 (Krüss). A rising bubble (volume approximately of $6 \mu\text{l}$) of air or C_3F_8 was formed at the extremity of a needle using a syringe inside a quartz cell (10 ml) containing 1.0 wt% of surfactant solution at room temperature. The formation time of the bubble was about 1 s. The system was calibrated using the outer diameter of the needle (outer diameter of 1.507 mm). The bubble was imaged with a CMOS camera, and its shape was then extracted by image analysis, and the surface tension, γ , was obtained as the best fit of the theoretical drop shape to the experimental profile [44].

2.4. Preparation of microbubbles

2.4.1. Probe-type sonication method

Sonication is the most commonly used method for producing microbubbles which involves dispersing gas or liquid in a suspension of a suitable coating material using a high intensity ultrasound probe. The microbubble samples were prepared according to the method described by Ando et al. [20] by submitting a 1.0 wt% surfactant solution to brief sonication. The sonicator (Qsonica Q55 Sonicator, Newtown, USA) was equipped with a 3.2 mm probe and operated at 20 kHz. A surfactant solution of 6 ml was added to a 10 ml vial, and the atmosphere above the solution in the vial was filled with C_3F_8 for 5 min. Then, microbubbles were formed by bringing the probe sonifier tip at around 5 mm below the gas–liquid interface of the solution and sonicating (amplitude 100%) for 15 s keeping a C_3F_8 atmosphere above the solution.

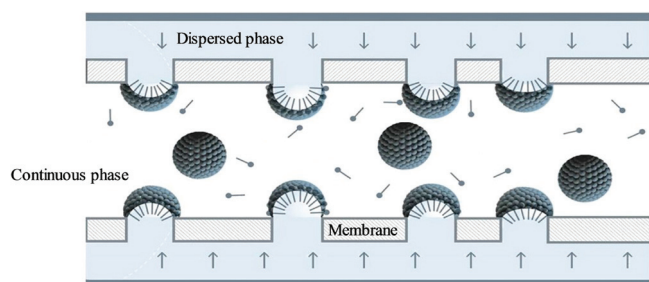


Fig. 1. Schematic diagram of the membrane process principle where a gaseous phase is injected into the continuous phase composed of surfactants which stabilized the new interface.

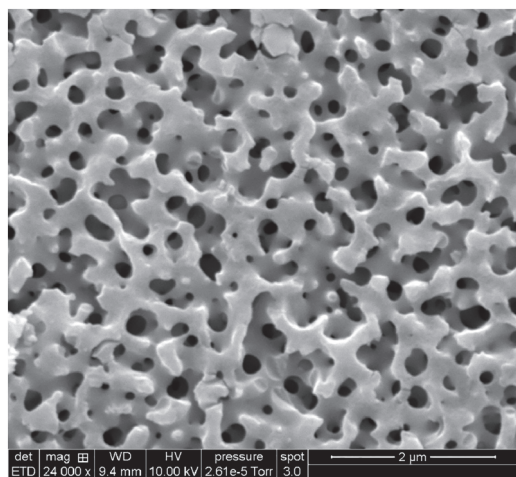


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the surface of the hydrophilic SPG membrane with a mean pore diameter of $0.2 \mu\text{m}$.

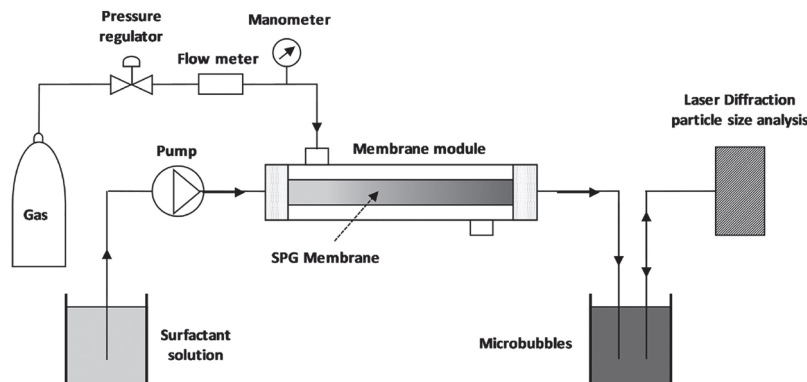


Fig. 3. Experimental set-up to produce microbubbles using a tubular SPG membrane and to measure their size distribution by laser diffraction particle size analysis.

2.4.2. Membrane process using a cross-flow system

The experimental set-up used for the microbubble formation experiments is shown in Fig. 3. In this cross-flow system, the gas was used as the dispersed phase and a solution containing 1.0 wt% surfactant was used as the continuous phase and circulated to create a shear stress at the membrane surface to detach microbubbles. Before each experiment, the SPG membrane was placed in the beaker containing the continuous water phase and sonicated for 5 min to ensure complete membrane wettability. Indeed, Kukizaki et Wada [1] have reported the influence of the surface wettability on the microbubble formation, and only monodispersed microbubbles are created with a totally wet membrane characterized by a contact angle, θ , smaller than 45° . The membrane was installed inside a cross-flow module of stainless steel supplied by SPG Technology. The effective length of the membrane was reduced to 105 mm due to sealing rings placed at both ends of the membrane tube. The new effective membrane area was then 27.4 cm^2 . Then, the membrane module was placed horizontally and the continuous phase was circulated inside the membrane tube using a pump (Quattroflow 150S, Pall, France). Two conditions of shear stress were tested, corresponding to a fluid pressure of 0.73 Pa (with no rod inside the membrane) and 34.8 Pa (when a rod was inserted inside the tubular membrane). The shear stress at the membrane wall, τ_w , for a tubular membrane with a circular section was calculated using the equation:

$$\tau_w = \frac{4\mu V_d}{R} \quad (1)$$

where R is the inner radius of the membrane tube (m), μ is the dynamic viscosity (Pa s) and V_d is the mean velocity of the continuous phase in the tube (m s^{-1}).

To obtain a high shear stress, a PTFE (polytetrafluoroethylene) rod with a diameter of 6.35 mm was introduced inside the tubular membrane. In this case, the shear stress at the membrane wall, τ_w , was calculated using the following equation:

$$\tau = 4\mu V_d \frac{R_2 - R_1}{R_1^2 + R_2^2 - \frac{R_2^2 - R_1^2}{\ln(R_2/R_1)}} \quad (2)$$

where R_1 is the rod radius (m) and R_2 is the inner membrane radius (m) [45]. Under these conditions, the mean velocity of the aqueous phase was 0.75 m s^{-1} (with no rod inside the membrane) and 5.18 m s^{-1} when a rod was inserted inside the tubular membrane.

The gas was introduced on the external side and forced through the microporous membrane. At a pressure higher than the bubble point pressure, the gas that passed through the membrane generated microbubbles at the internal surface of the membrane. A pressure regulator (KPR1FRL412A20000, Swagelok), flowmeter (Model SLA5850S, Brooks instrument) and manometer (PGI-63B-BG2.5-LASX, Swagelok) were added to the set-up to control the gas pressure. The bubble point pressure was defined as the minimum transmembrane pressure, ΔP , needed to generate the first microbubbles appearing at the membrane

surface. The bubble point pressure, P_{BP} , can be estimated from Young-Laplace equation:

$$P_{BP} = \frac{4\gamma \cos \theta}{D_p} \quad (3)$$

where γ is the equilibrium surface tension at the gas-liquid interface, θ is the contact angle, and D_p is the mean pore diameter. From this equation, P_{BP} can be estimated assuming that the contact angle is zero, due to the large number of hydroxyl groups on the membrane surface, which can be perfectly wetted by the aqueous phase [32]. The theoretical and measured bubble point pressures for the SPG membranes as function of pore diameter are listed in Table 1. For all experiments, the transmembrane pressure applied was such that the ratio between transmembrane pressure and bubble point pressure, $\Delta P/P_{BP}$, was in the range of 1.1–1.5. The dispersed gas phase flux, J , was calculated from the volumic flowrate, Q , measured using the flowmeter:

$$J = \frac{Q}{A} \quad (4)$$

where A is the effective membrane area (27.4 cm^2).

2.5. Characterization of microbubbles

2.5.1. Laser diffraction measurement

The size and size distribution of microbubbles were measured using laser diffraction particle size analysis (Mastersizer 3000, Malvern Instrumentation, France) of a microbubbles sample diluted in a beaker of 500 ml under agitation at 1500 rpm. The technique is based on the measurement of the intensity of light scattered as a laser beam passes through a dispersed particulate sample. The Mie-scattering theory was used to convert light scattering data to microbubble size distribution. The refractive index was 1.0 for the gas phase [46] and 1.33 for the continuous phase. The microbubble size measurement was the average of three successive laser diffraction runs. The results were expressed by

Table 1

Measured values of surface tensions, γ_0 , at $t = 0 \text{ s}$, and at the equilibrium, γ_{eq} , between gas-liquid interface for surfactant solutions, and the calculated $P_{BP}(\text{Theo})$ and the observed $P_{BP}(\text{Exp})$ values of pressure of bubble point with a mean pore size of $1.1 \mu\text{m}$ (theo: Theoretical and Exp: Experimental).

Surfactants	Gas	γ_0 (mN m ⁻¹)	γ_{eq} (mN m ⁻¹)	$P_{BP}(\text{Theo})$ (Bar)	$P_{BP}(\text{Exp})$ (Bar)
SDS	Air	30.2	30.2	1.10	1.05
	C ₃ F ₈	29.5	29.5	1.07	0.98
Tween 20	Air	42.0	37.5	1.36	1.35
	C ₃ F ₈	40.2	36.1	1.31	1.25
PEG40S	Air	49.4	47.3	1.72	1.55
	C ₃ F ₈	48.4	46.0	1.67	1.33

D_{50} , the median diameter.

Two parameters were used to characterize the width of the size distribution, first the span of the microbubble size distribution, expressed as:

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (5)$$

where D_{90} , D_{50} and D_{10} are the diameters corresponding to 90, 50, and 10 nb% on the relative cumulative microbubble size distribution curve, respectively. Then, the polydispersity was characterized by CV (coefficient variation) which is a measure of the standard deviation to D_{50} expressed in %, using the equation [22,29,47,48]:

$$\text{CV} = \frac{\sum n_i |D_{50} - D_i|}{D_{50} \sum n_i} \times 100 \quad (6)$$

where D_i is the mean diameter of the class i and n_i corresponds to the number of microbubbles of the class i .

To study stability, the microbubbles were collected at the membrane outlet and diluted into a beaker under agitation by a propeller to disperse homogeneously the MBs suspension. The microbubble suspension was circulated in the measurement cell of the Mastersizer instrument during 90 s and the size measured every 10 s.

2.5.2. Optical microscopy

Immediate observation and recording are important for accurately measuring the size and size distribution of microbubbles. After producing microbubbles, an aliquot of the dispersion was immediately diluted and added to a Malassez counting chamber (Marienfeld-Superior). The observations were carried out with a microscope (Leica DM LM, France). A CCD video camera (Leica MC120 HD) was connected to the microscope to capture images, which were visualized with Leica Application Suite (LAS EZ) software (Version 3.4.0).

3. Results and discussion

3.1. Comparison of sonication and membrane technique

Microbubbles were prepared by sonication and the membrane technique using a membrane with pore size of 1.1 μm , $\Delta P/P_{BP} = 1.1$ and 1.0 wt% SDS. The bubble size distributions are shown in Fig. 4. The microbubbles obtained had a mean size and span of D_{50} : 13.3 μm and span: 0.527, D_{50} : 14.3 μm and span: 1.11 using the membrane technique and sonication, respectively. The microbubble sizes were in the

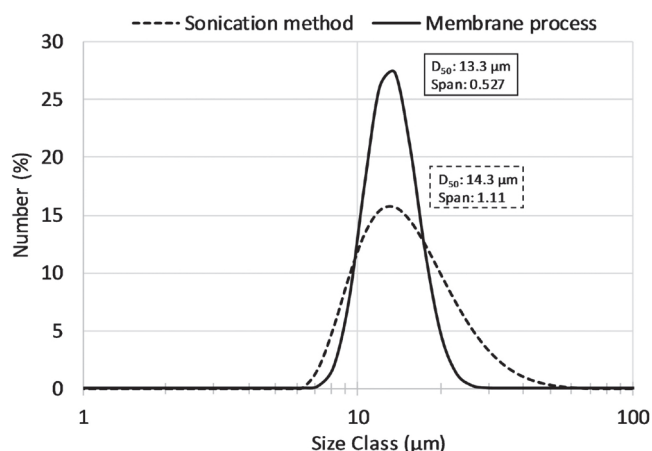


Fig. 4. Comparison of the size of microbubbles generated by sonication and membrane with a mean pore diameter of 1.1 μm . For both experiments, the continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8 .

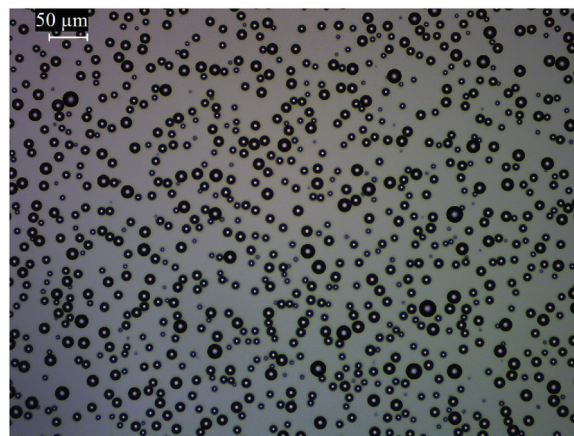


Fig. 5. Immediate observation by optical microscopy of the size distribution of microbubbles generated by the membrane with a mean pore diameter of 1.1 μm . The continuous phase used was 1.0 wt% SDS in water and the dispersed phase was C_3F_8 .

micrometric range size for both techniques, however, a narrower size distribution was obtained with the membrane than by sonication, which produced both smaller and larger bubbles. Fig. 5 shows MBs obtained by the membrane technique and observed by optical microscopy just after their preparation.

Several techniques have also been compared by Stride [22] to produce microbubbles stabilized with L - α - phosphatidylcholine, Tween 80 and Polyethyleneglycol (PEG) 40 stearate: sonication, coaxial electrohydrodynamic atomisation (CEHDA) and T-junction microfluidic. The CV% of microbubbles obtained were 150%, 38%, and 1%, for sonication, CEHDA and microfluidic, respectively. The CV% of microbubbles obtained by the membrane technique was around 17% and therefore was between the one obtained with CEHDA and microfluidic device as reported by Stride [22].

Indeed, the membrane technique can produce microbubbles with a span close to the span of the SPG membrane pore size distribution, in the range of 0.4–0.6. A similar observation was reported for the preparation of emulsions with droplet size of several microns by Vladislavljević et al. [49]. Monodispersed microbubbles can be produced with a membrane of narrow pore size distribution. However, the microbubbles size distribution depends on several other parameters, like the aqueous phase composition. Without surfactant, large poly-disperse microbubbles were obtained due to microbubble coalescence at the pore opening by the membrane technique as shown by Kukizaki [35] or microchannel technique [48].

The yield of microbubbles obtained with the membrane was measured in the range $0.6\text{--}1.5 \times 10^{+10}$ MBs/min while the one reported by microfluidic techniques was around $2\text{--}6 \times 10^{+7}$ MBs/min. Our results are in agreement with previous studies reporting yields obtained by sonication [21].

Sonication has to be performed carefully in particular by considering the probe size compared to the vessel size, the position of the probe into the liquid, the frequency, the intensity and the time of sonication [11]. The membrane technique ($\sim 10^{+8}$ MBs/s) may give a better reproducibility between different operators due to fewer parameters involved. These differences between these two techniques are due to the mechanisms involved in microbubble formation. Sonication involves using high intensity ultrasound to produce a suspension of gas microbubbles in a liquid containing a suitable surfactant or polymer solution which adsorbs on the surfaces of the microbubbles to form a stabilizing coating. With the membrane technique, microbubbles are formed at the pore openings and can be detached by the continuous flowing aqueous phase. This technique involves much less energy, and the microbubbles size is controlled in part by the membrane pore size.

3.2. Influence of process parameters

Microbubbles are formed in two steps, first microbubbles grow at the pore opening and then detach. The main forces that act on the microbubbles are the surface tension of the continuous phase, which is responsible for retaining the growing bubble at the pore opening, the static pressure difference force due to the pressure difference between the dispersed phase and the continuous phase at the membrane surface, and the drag force created by the continuous phase which detaches the microbubble from the membrane surface [42,50]. The microbubble size is determined by the balance between these main forces. The surface tension force and the pressure difference force are opposite to each other.

During microbubble formation, the new interface created must be stabilized by surfactant molecules. Surfactants play two main roles: first, surfactant molecules adsorb at the new gas–liquid interface to reduce the surface tension and facilitate microbubble formation. Secondly, surfactants limit microbubble coalescence by stabilizing the newly created interface [50]. The adsorption kinetics of the surfactant at the gas–liquid interface is therefore a key factor which determines the microbubble size and size distribution [51]. To characterize the effect of the parameters that influence the microbubbles characteristics, we used SDS as the surfactant in the aqueous phase. This surfactant has a fast adsorption kinetics at the gas–liquid interface with a surface tension at $t = 0$ s, γ_0 , equal to the surface tension at the equilibrium, γ_{eq} , (Table 1).

3.2.1. Influence of the transmembrane pressure

For the three surfactants (SDS, Tween 20, and PEG40S) and the two gases (air and C_3F_8), P_{BP} was calculated from the Young-Laplace equation (3) and the results are presented in Table 1. For all systems, the measured P_{BP} values were close to the calculated values which assumed the contact angle between the membrane and the aqueous continuous phase was equal to zero. This indicates that the membranes used in this study were wetted correctly by the continuous aqueous solution. However, we noted a larger difference between theoretical and experimental P_{BP} values for the two non-ionic surfactants (Tween 20 and PEG40S). An electrostatic repulsive interaction exists between the anionic polar groups of the SDS molecules and the membrane surface (negatively charged). While for non-ionic surfactants, although no strong repulsion exists between the hydrophilic groups of the molecules and the membrane surface, a surfactant layer covers the hydrophilic groups of the membrane. It could be explained by a hydrophilic interaction between the hydrophilic groups of the surfactant and the surface maintaining the surfactant at the membrane. This interaction may affect the hydrophilicity of the membrane surface and thus the contact angle formed between the membrane surface and the water phase. This results in a higher contact angle value, and therefore to higher theoretical P_{BP} values than experimental ones. Experimental values were slightly lower than theoretical values, probably due the presence of larger pores than the mean pore size of 1.1 μm which was used in the calculations. Indeed, a lower transmembrane pressure is needed to produce microbubbles through larger pores which is present due to the span pore size distribution around 0.4–0.6.

We studied the influence of transmembrane pressure on the perfluorocarbon microbubbles formation. For a concentration of 1.0 wt% SDS and with the 1.1 μm pore size membrane, the variations of microbubbles size, size distribution and dispersed phase flux versus the ratio of $\Delta P/P_{BP}$ are shown in Fig. 6. At $\Delta P/P_{BP} < 1$, no microbubbles were observed. Perfluorocarbon monodispersed microbubbles were generated with the SPG membrane at transmembrane/bubble-point pressure ratio in the range of $1 < \Delta P/P_{BP} < 1.5$.

For a transmembrane/bubble point pressure ratio of $\Delta P/P_{BP} < 1.5$, the gaseous phase flux increased linearly with the ratio $\Delta P/P_{BP}$, while both mean microbubble size and size distribution were nearly constant (Fig. 6). This observed increase in gaseous phase influx is in agreement

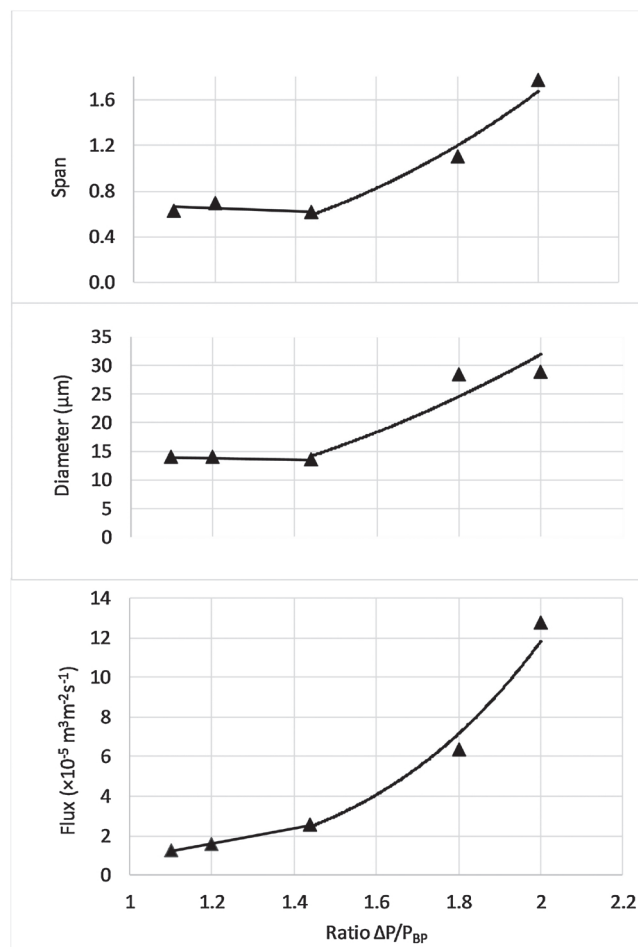


Fig. 6. Influence of transmembrane/bubble point pressure ratio, $\Delta P/P_{BP}$, on the gaseous phase flux, J , microbubble diameter, D_{50} , and span of the distribution. Experimental conditions: gaseous phase was C_3F_8 , mean pore of 1.1 μm , with 1.0 wt% of SDS and a low shear stress.

with Darcy's law, which suggests that the dispersed phase flux increases proportionally to the transmembrane pressure. Microbubbles grow until they reach a certain size and then detach at the pore opening. At these low pressures, the surface tension force dominates other forces and the microbubble size and size distribution are independent of the transmembrane pressure.

For $\Delta P/P_{BP} > 1.5$, the flux, microbubbles size and size distribution increased sharply, indicating the formation of larger microbubbles with a broad size distribution. This result can be explained by the static pressure difference force which dominates at these higher pressures.

The range of pressure for which no effect on droplet characteristics was observed was called the “size-stable zone” [51]. The “size-stable zone” was already observed by Kukizaki et Goto [34] for air bubbles, for a ratio $\Delta P/P_{BP} < 2$. For the same surfactant used in our experiments, SDS, Kukizaki et Goto [34] found that the size-stable zone existed at higher pressure. This can be explained by the comparison of the difference in surface tension at the equilibrium. Indeed, the surface tension was 36.5 mN m^{-1} in Kukizaki et Goto's article [34], while in our study, the surface tension was 29.5 mN m^{-1} which implies a lower surface tension force for keeping the microbubble at the pore opening and a thus a faster microbubble detachment. This result was also reported by Kukizaki et al. [51] for droplets formed with two different concentrations of SDS, for which the lower interfacial tension presented a size-stable zone which ends at lower pressure.

The dispersed phase flux was $1.28\text{--}2.55 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ at $\Delta P/P_{BP} < 1.5$ and for the 1.1 μm for pore size membrane. These values are

in agreement with the results of Kukizaki [33] who found $6\text{--}15 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for a symmetric SPG membrane with a size pore of $1.58 \mu\text{m}$. The authors also showed that the use of asymmetric SPG membranes significantly increased the air flux (around 40 times) when compared to symmetric SPG membranes. The use of asymmetric SPG membranes could be also an alternative to increase the production rate of perfluorocarbon microbubbles.

The $\Delta P/P_{BP} = 1.1$ seems to be the best ratio to control the microbubble formation. Indeed, a ratio of 1 would be not necessary to activate a sufficient number of pores to obtain a great yield of microbubbles and a ratio around 1.4 or 1.5 produced a much higher gaseous flux which could lead to the loss of control of the microbubble formation.

3.2.2. Influence of the wall shear stress

The influence of shear stress of the continuous phase on microbubbles size and size distribution was measured for membranes with a mean pore size of $1.1 \mu\text{m}$ and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (Fig. 7). Perfluorocarbon microbubbles were prepared at two different shear stresses: 0.73 Pa (low shear stress) with a classical tubular module and 34.8 Pa (high shear stress) with an annular device. The low shear stress was used to recover the microbubbles at the membrane surface. With the $1.1 \mu\text{m}$ pore size membrane, when increasing the wall shear stress from 0.73 to 34.8 Pa, the microbubble size distribution was the same at $13.3 \mu\text{m}$ and $13.1 \mu\text{m}$, respectively. For both conditions, monodispersed microbubbles were produced with a CV% of 16% at low shear stress and 17% at high shear stress. However, we observed a better size repeatability at a high shear stress as shown by the error bars in Fig. 7.

The influence of shear stress depends on other parameters like transmembrane pressure and interfacial tension. Vladislavljević [41] reported that two mechanisms of drop formation are possible: (1) a shear-controlled detachment as a result of shear stress on the membrane surface and (2) a spontaneous detachment driven by interfacial tension. For example, Kukizaki [33,34] observed that when increasing the shear stress, the bubble size decreased to a limit value beyond which the size was independent of the applied shear stress. Generally, variation in size occurred at very low stress values and at high transmembrane pressures. When preparing emulsions, Vladislavljević et Schubert [43] showed that at high transmembrane pressures, the droplet size decreased when increasing the wall shear stress from 0.6 to 47 Pa, while at smaller transmembrane pressures, the size decreased very slightly, from 3.5 to $3.4 \mu\text{m}$, for wall shear stress of 0.55 Pa and 91 Pa, respectively.

In our study, the main principle to MBs formation at the tortuous and non-circular pores openings are driven by the second mechanism where the surface tension force dominates other forces (shear stress force, transmembrane pressure). In our case, the MBs size is independent on shear stress as we fixed a low transmembrane flux ($\Delta P/P_{BP}$: 1.1). The effect of the wall shear stress depends on the surface

tension value. For example, Lepercq-Bost et al. [52] showed that at lower interfacial tension, the shear stress had a lower effect on the droplet diameter of emulsions generated by ceramic membranes. Indeed, at a lower surface tension, the force retaining the MBs or droplets at the pore opening is lower and the microbubble detachment is easier; this could explain the lower effect of shear stress on the droplet formation. In addition, our results show the same trend at a lower surface tension (1.0 wt% SDS; γ : 29.5 mN m^{-1}) compared with the higher surface tension used by Kukizaki et Goto [34] (0.3 wt% SDS; γ : 36.5 mN m^{-1}) who reported that the size was dependent on the shear stress. Indeed, the surfactant concentration influences considerably the surfactant adsorption kinetics and thus the dynamic surface tension [50]. At the higher surfactant concentration used in our study, the surface tension force dominated and the drag force created by the shear stress could not modify the microbubble size.

The mechanisms of microbubble production at low shear stress (0.73 Pa) may be compared to the ones suggested for spontaneous detachment of air MBs [32]. This detachment is governed by the surface tension at a low dispersed phase flux as explained above. The adsorption kinetics of surfactant from bulk to the new gas–liquid interface is a key parameter in the spontaneous detachment due to the absence of continuous phase flux. In this case, the tortuous pores and irregular cross-section of the SPG membrane (Fig. 2) facilitates the generation of the microbubbles. In addition, the dispersed phase deformation by the non-circular pores leads to the formation of a neck which may facilitate the MBs detachment, as observed for droplet production [53].

3.2.3. Influence of the pore size

Perfluorocarbon microbubbles were prepared with the 0.2, 0.5 and $1.1 \mu\text{m}$ pore size membranes. The three experiments were realized with a continuous phase containing 1.0 wt% SDS, $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 and at a low shear stress (0.73 Pa). The mean diameter of the microbubbles obtained is shown in Fig. 8. As expected, the microbubble mean size decreased when the membrane pore size was decreased. We observed a relationship between MBs size and pore size that seems exponential, but this would have to be confirmed with other pore size membranes. Other studies have reported linear relations with pore sizes in the range of 1 to $10 \mu\text{m}$, where the D_{MBs}/D_{Pore} ratio was between 7 and 10 depending of the surfactant used [33,35]. In our study, we found a ratio of D_{MBs}/D_{Pore} around 12 for the 0.5 and $1.1 \mu\text{m}$ pore size membranes, in agreement with a possible linear relationship. But for the smallest pore size used of $0.2 \mu\text{m}$, we found a ratio of 22. This result may be explained by an initial growth period due to the influx of air dissolved (N_2 and O_2) in water diffusing into the PFC MB [54]. Also the growth caused a decrease of the Laplace pressure, which is inversely proportional to the MBs radius. The Laplace pressure, δP , is the main mechanism which is responsible of the disappearance of a MB, given by the equation:

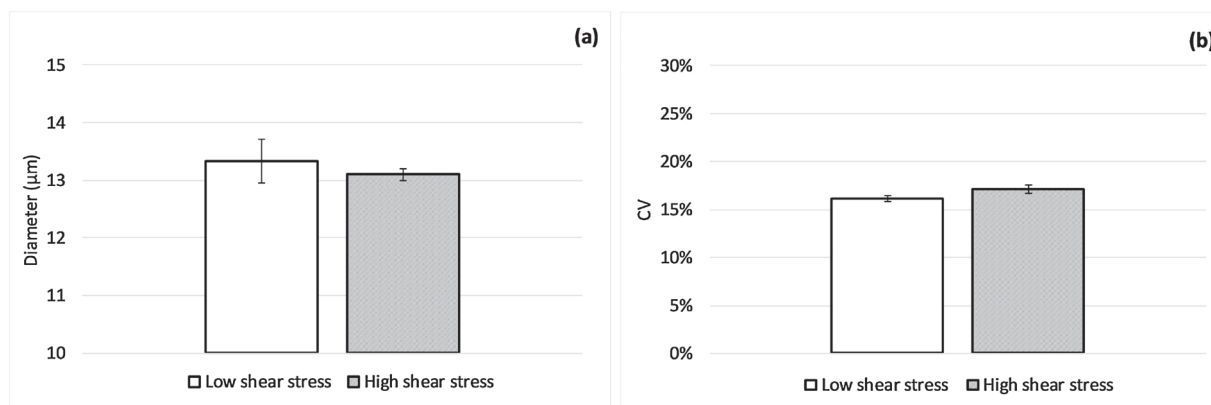


Fig. 7. Influence of shear stress, τ_w , (a) on the microbubble diameter and (b) on the CV% for membrane mean pore size $1.1 \mu\text{m}$ at experimental conditions: continuous phase 1.0 wt% SDS in water, gaseous phase C_3F_8 , and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1.

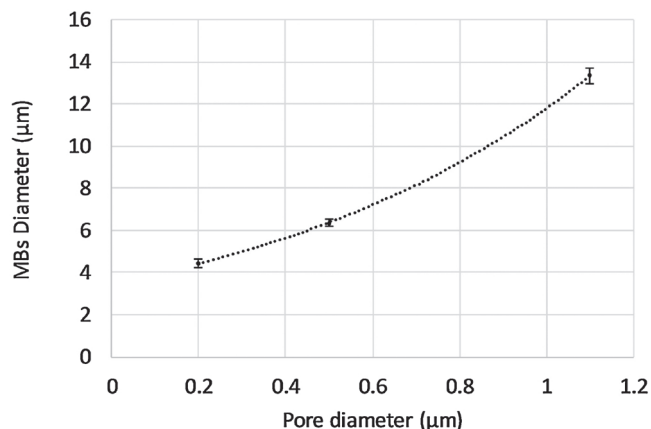


Fig. 8. Influence of mean pore size (0.2, 0.5 and 1.1 μm) on the microbubble diameter, D_{50} , at experimental conditions: continuous phase 1.0 wt% SDS in water and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1.

$$\delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (7)$$

where γ is the surface tension and r is the radius of the microbubble. The Laplace pressure is very high for microbubbles with small size. As a result, the microbubble size distribution changes over time, with the larger bubbles growing in size and the smaller microbubbles shrinking and then finally disappearing. This explains the polydisperse distribution, characterized by a coefficient of variation of 31%, of microbubbles obtained with the 0.2 μm pore size.

For comparison, when preparing droplets by membrane emulsification, the $D_{Droplets}/D_{Pore}$ ratio was found lower, in the range of 3.1–3.7 [43]. Indeed, the oil droplet diameter decreased when increasing the dispersed phase viscosity [51]. Therefore, for the same membrane, the oil droplets size is expected to be lower than the microbubbles size. This results in a $D_{Droplets}/D_{Pore}$ ratio lower than the D_{MBS}/D_{Pore} ratio.

3.3. Influence of the surfactant type

Perfluorocarbon microbubbles were prepared with different surfactants: SDS, Tween 20, PEG40S in the continuous phase at 1.0 wt%. The 1.1 μm pore size membrane was used, at a low shear stress (0.75 m s^{-1}), and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1. Uniform size distributions were obtained with the various surfactants as shown in Fig. 9. The smallest size and narrower dispersity were obtained with SDS, followed by Tween 20 and PEG40S. These results can be related to the equilibrium and dynamic surface tension of the various solutions measured by the pendant drop method (Fig. 10). The three surfactants showed different equilibrium surface tension, the lowest being obtained with SDS (29.5 mN m^{-1}), then Tween 20 (36.1 mN m^{-1}), and the highest with PEG40S (46.0 mN m^{-1}). As explained previously, at a lower surface tension, the force retaining the microbubble at the pore opening is lower and the microbubble detachment is easier, resulting in microbubbles with smaller size and better monodispersity with SDS.

In addition, the three surfactants showed different adsorption kinetics, the fastest adsorption kinetics being obtained with SDS and the lowest with PEG40S. When a microbubble is formed, the equilibrium surface tension, γ_{eq} , of the surfactant solution is not reached instantaneously. The surfactant molecules must diffuse at the new interface from the bulk solution, their hydrophobic tails directed toward the gaseous phase. For a surfactant with a fast adsorption kinetic, such as SDS, the surface tension at $t = 0 \text{ s}$ is close to the equilibrium surface tension and the microbubbles detach faster from the membrane surface. This results in microbubbles with smaller size and better uniformity. Therefore, larger and more polydisperse microbubbles were obtained with surfactants having the slowest kinetics (Tween 20 and PEG40S).

This result was also observed for oil droplets produced by membrane emulsification, as reported by Schröder et al. [50]: the faster a surfactant adsorbs at the new interface, the smaller the droplets produced. In addition, surfactants with faster adsorption kinetics help to reduce the probability of microbubbles coalescing at the pore opening, which also results in microbubbles with smaller size and better monodispersity.

Another parameter that can influence coalescence is the interaction between the hydrophilic head groups of the surfactant and the membrane surface [35]. The surfactant molecules must not interact with the membrane surface by electrostatic interactions or Van der Waals forces, as this could result in a change of the membrane hydrophobicity. In the case of SDS, the presence of negative charges on the head groups of the SDS molecules and the membrane surface facilitates the microbubbles detachment by electrostatic repulsion and improves the size distribution compared to Tween 20 and PEG40S which do not present negative charges on their head groups. Overall, surfactants play an important role to produce monodisperse microbubbles by the membrane technique.

3.4. Influence of the gaseous phase

Fig. 10 shows the dynamic surface tension of the bubbles as a function of time for the three surfactants at 1.0 wt%. The decrease of the surface tension corresponds to the progressive adsorption of surfactant molecules at the gas–water interface until equilibrium. The initial surface tension value, γ_0 , is around 72 mN m^{-1} at the air–water interface and 70.1 mN m^{-1} at the perfluorocarbon–water interface in the absence of surfactant. These values at $t = 0 \text{ s}$ were not measurable in presence of 1.0 wt% surfactant due to rapid adsorption kinetics. The presence of perfluorocarbon in the microbubbles significantly decreased the interfacial tension at equilibrium, γ_{eq} , compared with air. A higher decrease of the surface tension at equilibrium was observed from 37.5 to 36.1 mN m^{-1} for Tween 20 and 47.3 to 46.3 mN m^{-1} for PEG40S after 4 min. For SDS, this effect was less pronounced due to the fast adsorption of the surfactant at the gas–liquid interface. As reported by Nguyen [15] for phospholipids, the perfluorocarbon gas increased the adsorption kinetic of the surfactant and decreased the equilibrium surface tension. These authors concluded that perfluorocarbon acts as a cosurfactant at the gas–liquid interface, despite the absence of any amphiphilic character.

As explained in the previous sections, a lower surface tension allows obtaining smaller microbubbles, by decreasing the retention force which keeps the microbubble at the pore opening and thus facilitating the microbubble detachment. Indeed, we observed a decrease of the microbubble size with the use of perfluorocarbon gas compared with air

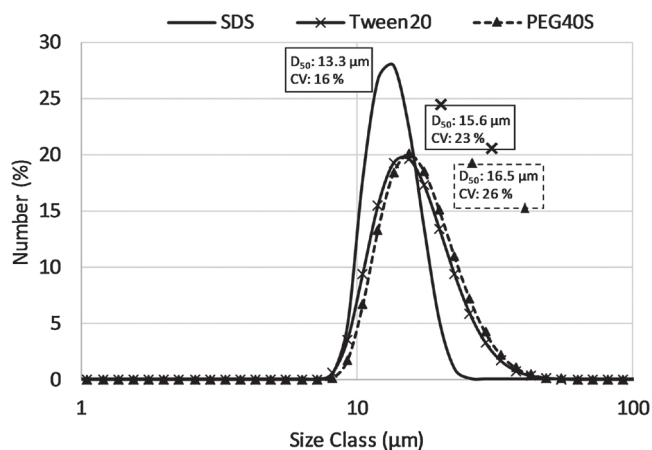


Fig. 9. Influence of the surfactants at a concentration of 1.0 wt% on the microbubble size distribution. Experimental conditions: gaseous phase was C_3F_8 , membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1.

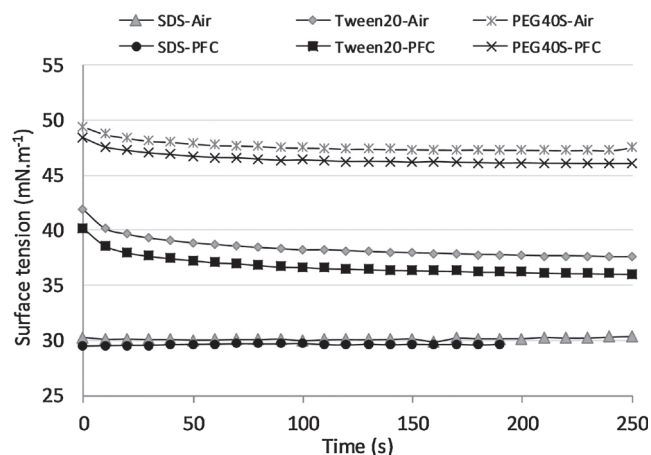


Fig. 10. Surface tension at the gaseous/liquid interface for various surfactants at 1.0 wt% and air or C_3F_8 at room temperature (PFC: Perfluorocarbon).

for three surfactants (Fig. 11). The decrease of microbubble size was less pronounced with SDS than for the two other surfactants, due to a smaller decrease of the equilibrium surface tension.

3.5. Microbubbles stability

Stability of perfluorocarbon microbubbles stabilized by the three surfactants at 1.0 wt% was measured during 90 s. The perfluorocarbon microbubbles were prepared with the membrane of pore size 1.1 μm and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (Fig. 12). Air microbubbles stabilized with SDS and prepared at the same experimental conditions were also tested. In all cases, the mean size of the microbubbles increased with time. This

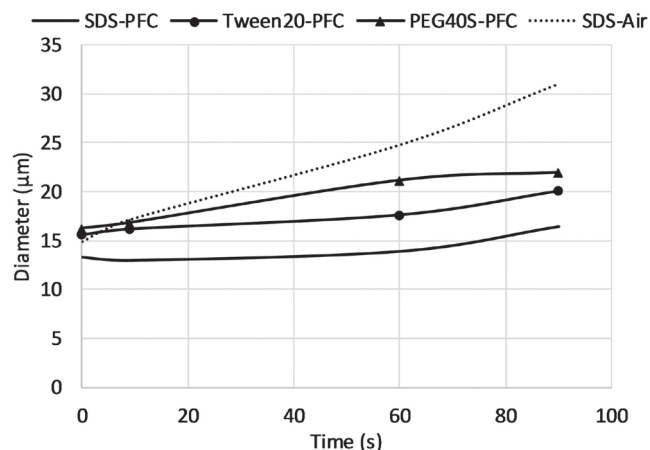


Fig. 12. Variation of microbubble diameter, D_{50} , as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions: membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC: Perfluorocarbon).

increase was less pronounced for perfluorocarbon microbubbles (1.2 for microbubbles stabilized with SDS between $t = 0$ s and $t = 90$ s) compared with air microbubbles (2.2 times size increase). For the three surfactants tested, the size of the perfluorocarbon microbubbles increased in a similar way, the increase being equal to 1.29 for Tween 20 and 1.33 for PEG40S. Figs. 12 and 13 show two main trends: an increase in microbubble size associated to a decrease in microbubbles concentration. This is the result of the disappearance of the smaller microbubbles while the larger microbubbles grow in size.

The variation of microbubbles diameter over time presents two main stages: (1) an initial growth period, (2) followed by microbubble

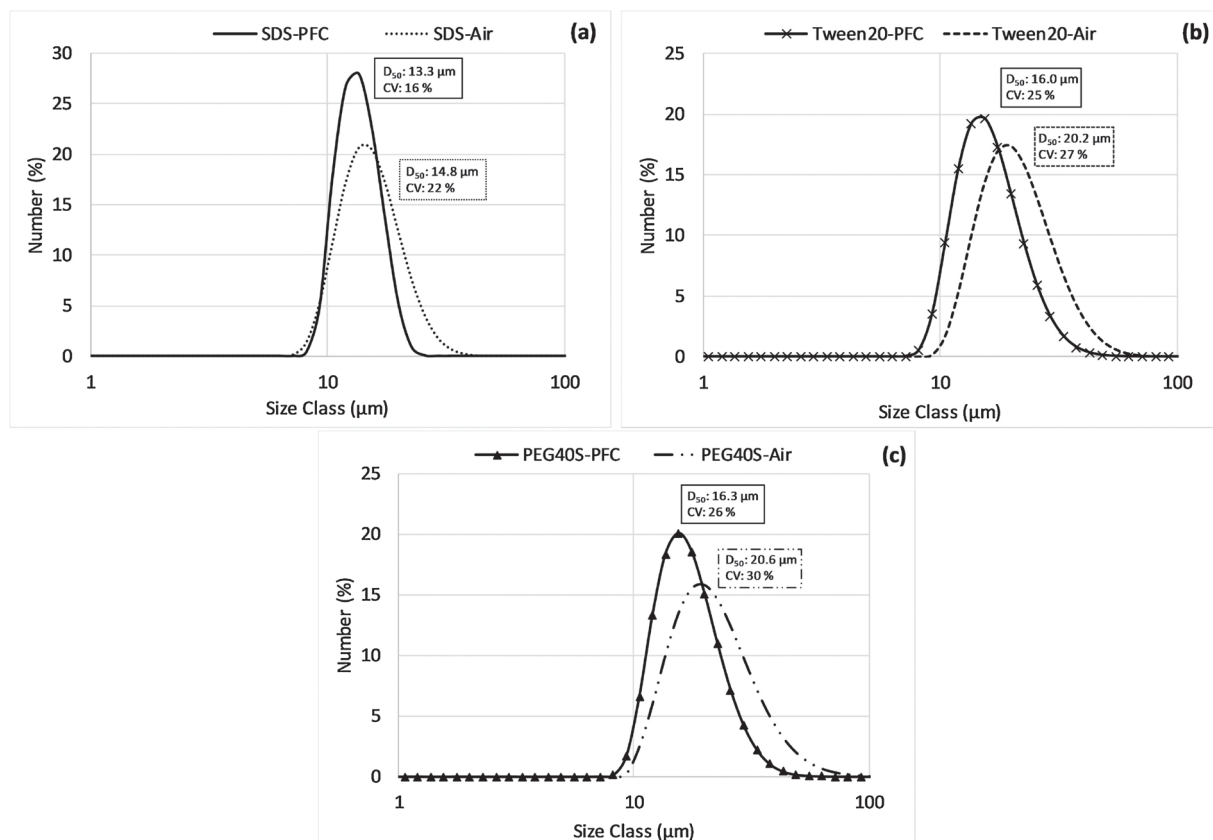


Fig. 11. Influence of the gaseous phase on the microbubble size distribution stabilized with 1.0 wt% (a) SDS, (b) Tween 20 and (c) PEG40S. Experimental conditions: membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC: Perfluorocarbon).

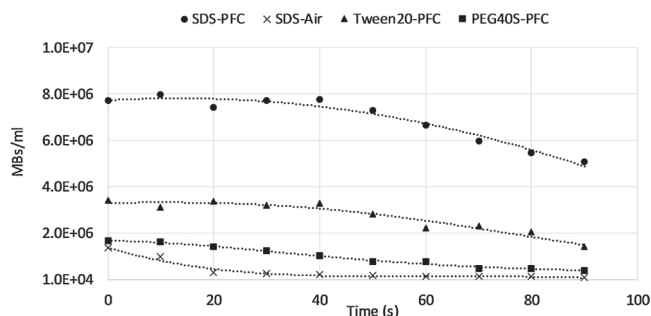


Fig. 13. Variation of concentration MBs/ml as a function of time for various surfactants with C_3F_8 or air. Experimental conditions: membrane mean pore size 1.1 μm and ratio $\Delta P/P_{BP}$: 1.1 (PFC: Perfluorocarbon).

dissolution. The fast initial growth of the microbubble is due to the influx of air dissolved in water diffusing into the PFC microbubble [54]. The microbubble dissolution is mainly related to the Laplace pressure experienced by a gas microbubble, given by equation (7). As gas leaves the microbubble, due to the pressure gradient, the bubble shrinks and the Laplace pressure increases, which accelerates the rate of gas dissolution and the resulting bubble shrinkage. The surfactant at the gas/water interface reduces the gas/water surface tension and thus decreases the Laplace pressure, but does not eliminate it. The rate of bubble shrinkage as a function of time (t) resulting from the dissolution of the gas into the bloodstream is predicted by the equation (8) [12,55]:

$$\frac{dr}{dt} = -LD_w \left[\frac{P^* + \frac{2\gamma}{r}}{P_{\text{atm}} + \frac{4\gamma}{3r}} \right] \left[\frac{1}{r} + \frac{1}{\sqrt{D_w t \pi}} \right] \quad (8)$$

where L is the Ostwald coefficient, D_w is the gas diffusivity in water, γ is the surface tension, P_{atm} is the atmospheric pressure, and P^* is the excess pressure [12,37]. Equation (8) predicts that the inclusion of perfluorocarbon gas with low solubility in water (which gives a low Ostwald coefficient) increases the lifetime of a microbubble. The Ostwald coefficient is defined as the partition coefficient of the gas between the gaseous phase and aqueous phase (ratio of the solubility of the gas in the liquid to the density of the gas). The lower the Ostwald coefficient, the longer the lifetime of the microbubbles since perfluorocarbon gases ($L_{C_3F_8}$: 583×10^{-6} ; 25 °C) are less water-soluble than the air (L_{O_2} : $31, 110 \times 10^{-6}$ and L_{N_2} : $15, 880 \times 10^{-6}$; 25 °C)[40]. The gas diffusion coefficient, D_w , is inversely proportional to the gas molecules size, which results in a decrease in diffusivity for C_3F_8 (188 g mol^{-1}) compared to air (28.9 g mol^{-1}).

The concentration of perfluorocarbon microbubbles stabilized with SDS was constant during 60 s, before decreasing, while the air microbubbles concentration decreased from $t = 0 \text{ s}$ (Fig. 13). The mechanism by which larger microbubbles grow in size at the expense of smaller bubbles is called Ostwald ripening. The dissolution of the gas in the aqueous phase increases as the interfacial curvature increases and then the bubble size decreases quickly. Thus, perfluorocarbon microbubbles showed a better stability than air microbubbles.

Another phenomenon occurs at the gas–liquid interface, where the dynamic adsorption and desorption of the surfactant molecules creates short spaces between molecules, facilitating the gas transfer [56]. In the case of perfluorocarbon microbubbles stabilized with PEG40S, the gas transfer into the aqueous phase could be increased, due to the low cohesive shell created by steric repulsion between the hydrophilic heads of the PEG40S macromolecules. This could explain the faster decrease of PEG40S perfluorocarbon microbubble concentration.

However, the lifetime of the microbubbles obtained with the surfactants was low compared with microbubbles stabilized by lipids [14]. These microbubbles could then be used as transiently stable microbubbles as shown by Dhanaliwala et al. [27], as large microbubbles (19 μm) produced by microfluidic process were administered *in vivo* in a

mouse and shown to generate a large acoustic response in both the right and left ventricles.

4. Conclusion

In this study, we produced successfully perfluorocarbon microbubbles with the use of tubular SPG membranes with a 1.1 μm pore size and $\Delta P/P_{BP}$: 1.1. The microbubbles were generated with a mean diameter of 13.3, 15.6 and 16.5 μm with a narrow size distribution for the three surfactants SDS, Tween20 and PEG40S, respectively. The effect of transmembrane pressure, shear stress at the membrane surface due to the water phase flow, and pore size on the microbubbles size was investigated. The transmembrane pressure, until a threshold of $\Delta P/P_{BP} < 1.5$, and shear stress did not affect the size of the microbubbles which were produced at a high yield ($\sim 10^{+10}$ MBs/min). As expected, the decrease of the pore size led to a decrease of the microbubble size, but the dilution of microbubbles into a beaker before the size measurement by laser diffraction increased their dissolution which impacted their size and size distribution. This study also showed that the perfluorocarbon gas decreased the surface tension at the gas–water interface to produce smaller microbubbles compared with air microbubbles and that the hydrophobicity properties of the perfluorocarbon gas increased the microbubbles stability. The main phenomenon governing the formation of monodispersed microbubbles by the membrane technique is the adsorption kinetics of the surfactant at the new gas–liquid interface at the pore opening.

References

- [1] M. Kukizaki, T. Wada, Effect of the membrane wettability on the size and size distribution of microbubbles formed from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 317 (1–3) (2008) 146–154, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.005> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775707009168>.
- [2] S. Khirani, P. Kunwapanitchakul, F. Augier, C. Guigui, P. Guiraud, G. Hébrard, Microbubble generation through porous membrane under aqueous or organic liquid shear flow, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51 (4) (2012) 1997–2009, <https://doi.org/10.1021/ie200604g>.
- [3] Effect of membrane wettability on membrane fouling and chemical durability of SPG membranes used in a microbubble-aerated biofilm reactor.
- [4] W. Krause (Ed.), *Optical, Ultrasound, X-ray and Radiopharmaceutical Imaging*, No. 2.2002 in *Contrast Agents*, Springer, Berlin, 2002, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-96713-3>.
- [5] K. Ferrara, R. Pollard, M. Borden, Ultrasound Microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9 (1) (2007) 415–447, <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852>.
- [6] S. Tinkov, R. Bekeredjian, G. Winter, C. Coester, Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers, *J. Pharm. Sci.* 98 (6) (2009) 1935–1961, <https://doi.org/10.1002/jps.21571> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916329835>.
- [7] J.A. Feshitan, C.C. Chen, J.J. Kwan, M.A. Borden, Microbubble size isolation by differential centrifugation, *J. Colloid Interface Sci.* 329 (2) (2009) 316–324, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.066> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00221979708012149>.
- [8] M.A. Parrales, J.M. Fernandez, M. Perez-Saborid, J.A. Kopechek, T.M. Porter, Acoustic characterization of monodisperse lipid-coated microbubbles: relationship between size and shell viscoelastic properties, *J. Acoust. Soc. Am.* 136 (3) (2014) 1077–1084, <https://doi.org/10.1121/1.4890643>.
- [9] Michel Schneider, BR1: A new ultrasonographic contrast agent based on sulfur hexafluoride-filled microbubbles, *Investigate radiology*.
- [10] S. Rossi, C. Szijjártó, F. Gerber, G. Waton, M.P. Krafft, Fluorous materials in microbubble engineering science and technology – design and development of new bubble preparation and sizing technologies, *J. Fluor. Chem.* 132 (12) (2011) 1102–1109, <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.06.032> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002211391100220X>.
- [11] M.P. Krafft, Fluorine in medical microbubbles – methodologies implemented for engineering and investigating fluorocarbon-based microbubbles, *J. Fluor. Chem.* 177 (2015) 19–28, <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2015.02.013> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113915000585>.
- [12] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, J. Weers, Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. theory, *Ultrasound Med. Biol.* 24 (5) (1998) 739–749, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562998000349>.
- [13] S. Rossi, G. Waton, M.P. Krafft, Small phospholipid-coated gas bubbles can last longer than larger ones, *ChemPhysChem* 9 (14) (2008) 1982–1985, <https://doi.org/10.1002/cphc.200800386>.
- [14] C. Szijjártó, S. Rossi, G. Waton, M.P. Krafft, Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles: osmotic effect versus interfacial film stabilization, *Langmuir* 28 (2) (2012) 1182–1189,

- <https://doi.org/10.1021/la2043944>.
- [15] P.N. Nguyen, T.T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme, M.P. Krafft, Nonamphiphilic molecule can accelerate adsorption of phospholipids and lower their surface tension at the air/water interface, *ChemPhysChem* 12 (14) (2011) 2646–2652, <https://doi.org/10.1002/cphc.201100425>.
 - [16] S.R. Sirsi, M.A. Borden, Microbubble compositions, properties and biomedical applications, *Bubble Sci. Eng. Technol.* 1 (1–2) (2009) 3–17, <https://doi.org/10.1179/175889709X446507>.
 - [17] V. Sanna, G. Pintus, P. Bandiera, R. Anedda, S. Punzoni, B. Sanna, V. Migaletto, S. Uzzau, M. Sechi, Development of polymeric microbubbles targeted to prostate-specific membrane antigen as prototype of novel ultrasound contrast agents, *Mol. Pharm.* 8 (3) (2011) 748–757, <https://doi.org/10.1021/mp100360g>.
 - [18] R. Shih, A.P. Lee, Post-formation shrinkage and stabilization of microfluidic bubbles in lipid solution, *Langmuir* 32 (8) (2016) 1939–1946, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03948>.
 - [19] Z. Xing, H. Ke, J. Wang, B. Zhao, X. Yue, Z. Dai, J. Liu, Novel ultrasound contrast agent based on microbubbles generated from surfactant mixtures of Span 60 and polyoxyethylene 40 stearate, *Acta Biomater.* 6 (9) (2010) 3542–3549, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.007> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110001339>.
 - [20] Y. Ando, H. Tabata, M. Sanchez, A. Cagna, D. Koyama, M.P. Krafft, Microbubbles with a self-assembled poloxamer shell and a fluorocarbon inner gas, *Langmuir* 32 (47) (2016) 12461–12467, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01883>.
 - [21] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel microbubble preparation technologies, *Soft Matter* 4 (12) (2008) 2350, <https://doi.org/10.1039/b809517p>.
 - [22] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison, *Med. Biol. Eng. Comput.* 47 (8) (2009) 883–892, <https://doi.org/10.1007/s11517-009-0490-8>.
 - [23] R. Parmar, S.K. Majumder, Microbubble generation and microbubble-aided transport process intensification-A state-of-the-art report, *Chem. Eng. Process.: Process Intens.* 64 (2013) 79–97, <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.12.002> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270112002292>.
 - [24] M.P. Krafft, Fluorine in medical microbubbles? Methodologies implemented for engineering and investigating fluorocarbon-based microbubbles, *J. Fluor. Chem.* 177 (2015) 19–28, <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2015.02.013> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113915000585>.
 - [25] J.-M. Gorce, M. Arditi, M. Schneider, Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents: a study of SonoVue(tm), *Invest. Radiol.* 35 (11) (2000) 661–671.
 - [26] A.M. Gañán-Calvo, J.M. Gordillo, Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing, *Phys. Rev. Lett.* 87 (27) (2001), <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.274501>.
 - [27] A.H. Dhanaliwala, A.J. Dixon, D. Lin, J.L. Chen, A.L. Klibanov, J.A. Hossack, In vivo imaging of microfluidic-produced microbubbles, *Biomed. Microdev.* 17 (1) (2015), <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9914-9>.
 - [28] E. Castro-Hernandez, W. van Hoeve, D. Lohse, J.M. Gordillo, Microbubble generation in a co-flow device operated in a new regime, *Lab Chip* 11 (2011) 2023–2029, <https://doi.org/10.1039/C0LC00731E>.
 - [29] J.H. Xu, S.W. Li, G.G. Chen, G.S. Luo, Formation of monodisperse microbubbles in a microfluidic device, *AIChE J.* 52 (6) (2006) 2254–2259, <https://doi.org/10.1002/aic.10824>.
 - [30] M. Parhizkar, M. Edirisinghe, E. Stride, The effect of surfactant type and concentration on the size and stability of microbubbles produced in a capillary embedded T-junction device, *RSC Adv.* 5 (14) (2015) 10751–10762, <https://doi.org/10.1039/C4RA15167D>.
 - [31] U. Farook, E. Stride, M. Edirisinghe, Preparation of suspensions of phospholipid-coated microbubbles by coaxial electrohydrodynamic atomization, *J. R. Soc. Interface* 6 (32) (2009) 271–277, <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0225>.
 - [32] M. Kukizaki, M. Goto, Spontaneous formation behavior of uniform-sized microbubbles from Shirasu porous glass (SPG) membranes in the absence of water-phase flow, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 296 (1–3) (2007) 174–181, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.09.042> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570600731X>.
 - [33] M. Kukizaki, Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes – a comparative study, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 340 (1–3) (2009) 20–32, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.033> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709001095>.
 - [34] M. Kukizaki, M. Goto, Size control of nanobubbles generated from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes, *J. Membr. Sci.* 281 (1–2) (2006) 386–396, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.007> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738806002432>.
 - [35] M. Kukizaki, Y. Baba, Effect of surfactant type on microbubble formation behavior using Shirasu porous glass (SPG) membranes, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 326 (3) (2008) 129–137, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.05.025> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708003452>.
 - [36] S.M. Joscelynne, G. Trägårdh, Membrane emulsification – a literature review, *J. Membr. Sci.* 169 (1) (2000) 107–117 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738899003348>.
 - [37] E.G. Schutt, D.H. Klein, R.M. Mattrey, J.G. Riess, Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (28) (2003) 3218–3235, <https://doi.org/10.1002/anie.200200550>.
 - [38] Q. Xu, M. Nakajima, S. Ichikawa, N. Nakamura, P. Roy, H. Okadome, T. Shiina, Effects of surfactant and electrolyte concentrations on bubble formation and stabilization, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (1) (2009) 208–214, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.044> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708016810>.
 - [39] M.S. Kalekar, S.S. Bhagwat, Dynamic behavior of surfactants in solution, *J. Dispers. Sci. Technol.* 27 (7) (2006) 1027–1034, <https://doi.org/10.1080/01932690600767080>.
 - [40] T. Nakashima, M. Kawano, M. Shimizu, Articles of porous glass and process for preparing the same, US Patent No. 4,657,875, 1987.
 - [41] G.T. Vladislavljević, Integrated membrane processes for the preparation of emulsions, particles and bubbles, *Integrated Membrane Systems and Process*, Wiley, 2015, pp. 79–140, <https://doi.org/10.1002/9781118739167.ch5>.
 - [42] C. Charcosset, Membranes for the preparation of emulsions and particles, *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceuticals*, Elsevier, 2012, pp. 213–251, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56334-7.00006-X> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044456334700006X>.
 - [43] H.S. Goran, T. Vladislavljević, Preparation and analysis of oil-in-water emulsions with a narrow droplet size distribution using Shirasu-porous-glass (SPG) membranes, *Desalination* 144 (2002) 167–172, [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00307-7).
 - [44] J. Benjamins, A. Cagna, E.H. Lucassen-Reynders, Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 114 (1996) 245–254, [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03533-9](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03533-9).
 - [45] Talleyrand, *Fluides en écoulement méthodes et modèles – chapitre 6 Ecoulement Interne*, (1991).
 - [46] B.E. Oeffinger, M.A. Wheatley, Development and characterization of a nano-scale contrast agent, *Ultrasonics* 42 (1–9) (2004) 343–347, <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2003.11.011> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X03002117>.
 - [47] R. Liu, G. Ma, F.-T. Meng, Z.-G. Su, Preparation of uniform-sized PLA microcapsules by combining Shirasu Porous Glass membrane emulsification technique and multiple emulsion-solvent evaporation method, *J. Control. Release* 103 (1) (2005) 31–43, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.025> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904005863>.
 - [48] M. Yasuno, S. Sugiura, S. Iwamoto, M. Nakajima, A. Shono, K. Satoh, Monodispersed microbubble formation using microchannel technique, *AIChE J.* 50 (12) (2004) 3227–3233, <https://doi.org/10.1002/aic.10276>.
 - [49] G. Vladislavljević, M. Shimizu, T. Nakashima, Permeability of hydrophilic and hydrophobic Shirasu-porous-glass (SPG) membranes to pure liquids and its microstructure, *J. Membr. Sci.* 250 (1–2) (2005) 69–77, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.10.017> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738804007112>.
 - [50] V. Schröder, O. Behrend, H. Schubert, Effect of dynamic interfacial tension on the emulsification process using microporous, ceramic membranes, *J. Colloid Interface Sci.* 202 (2) (1998) 334–340, <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5429>.
 - [51] M. Kukizaki, Shirasu porous glass (SPG) membrane emulsification in the absence of shear flow at the membrane surface: influence of surfactant type and concentration, viscosities of dispersed and continuous phases, and transmembrane pressure, *J. Membr. Sci.* 327 (1–2) (2009) 234–243, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.11.026> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808009903>.
 - [52] M. Lepercq-Bost, M.-L. Giorgi, A. Isambert, C. Arnaud, Use of the capillary number for the prediction of droplet size in membrane emulsification, *J. Membr. Sci.* 314 (1–2) (2008) 76–89, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.01.023> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808000719>.
 - [53] M. Yasuno, M. Nakajima, S. Iwamoto, T. Maruyama, S. Sugiura, I. Kobayashi, A. Shono, K. Satoh, Visualization and characterization of SPG membrane emulsification, *J. Membr. Sci.* 210 (1) (2002) 29–37 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037673880200371X>.
 - [54] J.J. Kwan, M.A. Borden, Microbubble dissolution in a multigas environment, *Langmuir* 26 (9) (2010) 6542–6548, <https://doi.org/10.1021/la904088p>.
 - [55] P.S. Epstein, M.S. Plesset, On the stability of gas bubbles in liquid–gas solutions, *J. Chem. Phys.* 18 (11) (1950) 1505–1509, <https://doi.org/10.1063/1.1747520>.
 - [56] J. Hanwright, J. Zhou, G.M. Evans, K.P. Galvin, Influence of surfactant on gas bubble stability, *Langmuir* 21 (11) (2005) 4912–4920, <https://doi.org/10.1021/la050294>.

Bibliographie

- [1] Siemens, Observation d'un fœtus de 10 semaines avec une sonde 8C3 HD, Echographe ACUSON S3000 Touch.
URL <https://www.healthcare.siemens.fr/ultrasound/general-imaging/acuson-s3000-ultrasound-machine/use>
- [2] Centre Hospitalier de Perpignan - l'échographie.
URL <http://www.ch-perpignan.fr/preparer-votre-examen/imagerie-medicale/echographie-330.html>
- [3] S. R. Wilson, P. N. Burns, Microbubble-enhanced US in body imaging: what role, Radiology 257 (1) (2010) 24–39.
URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20851938>
- [4] S. R. Sirsi, M. A. Borden, Microbubble compositions, properties and biomedical applications, Bubble Science, Engineering & Technology 1 (1-2) (2009) 3–17. doi:10.1179/175889709X446507.
URL <http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/175889709X446507>
- [5] C. A. Sennoga, E. Kanbar, L. Auboire, P.-A. Dujardin, D. Fouan, J.-M. Escoffre, A. Bouakaz, Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring, Expert Opinion on Drug Delivery 14 (9) (2017) 1031–1043. doi:10.1080/17425247.2017.1266328.
URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2017.1266328>
- [6] A. Tressaud, G. Haufe, Fluorine and health : Molecular imaging, Biomedical materials and Pharmaceuticals, Elsevier, (2008).
- [7] P. Dubuisson, Influence de la phase grasse et des polymères naturels sur les paramètres physicochimiques en lien avec la perception tactile de l'émulsion, PhD Thesis, Normandie Université (2017).
- [8] M. A. Borden, S. Qin, K. W. Ferrara, Ultrasound contrast agents, Molecular Imaging : principles and practice (2010) 425–444.
- [9] M. T. Stillwell, R. G. Holdich, S. R. Kosvintsev, G. Gasparini, I. W. Cumming, Stirred cell membrane emulsification and factors influencing dispersion drop size and uniformity, Industrial & Engineering Chemistry Research 46 (3) (2007) 965–972. doi:10.1021/ie0611094.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie0611094>
- [10] S. Gehrman, H. Bunjes, Influence of membrane material on the production of colloidal emulsions by premix membrane emulsification, European Journal of Pharmaceutics and

- Biopharmaceutics 126 (2018) 140–148. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.006.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641116304301>
- [11] SPG membrane / SPG Technology Co.,Ltd.
URL http://www.spg-techno.co.jp/english/contents/spg_membrane.shtml
- [12] S. J. Peng, R. A. Williams, Controlled production of emulsions using a crossflow membrane, part1 : droplet formation from a single pore, (1998), Institution of Chemical Engineers 76, Part A (1998) 902–910.
- [13] G. T. Vladislavljević, Structured microparticles with tailored properties produced by membrane emulsification, *Advances in Colloid and Interface Science* 225 (2015) 53–87. doi:10.1016/j.cis.2015.07.013.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000186861500144X>
- [14] P. Mukerjee, K.J. Mysels, Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems, National Bureau of Standards, 1971.
- [15] C. Kim, Y.-L. Hsieh, Wetting and absorbency of nonionic surfactant solutions on cotton fabrics, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and engineering aspects* 187 (2001) 385–397.
- [16] Verasonics, Vantage research ultrasound.
URL <http://verasonics.com/>
- [17] J. A. Staton, S. R. Dungan, Mechanism of time dependent adsorption for dilauroyl phosphatidylcholine onto a clean air–water interface from a dispersion of vesicles, *Langmuir* 34 (2018) 9961–9973. doi:10.1021/acs.langmuir.8b00595.
URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.8b00595>
- [18] F. Rousseau, Méthodes d’analyse d’images et de calibration pour l’échographie 3D en mode main-libre, Ph.D. thesis, Université de Rennes I (2003).
- [19] V. Paefgen, D. Doleschel, F. Kiessling, Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery, *Frontiers in Pharmacology* 6 (197). doi:10.3389/fphar.2015.00197.
URL <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00197/abstract>
- [20] European Medicines Agency - SonoVue (2014).
- [21] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, J. Weers, Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory, *Ultrasound in medicine & biology* 24 (5) (1998) 739–749.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562998000349>
- [22] K. Sarkar, A. Katiyar, P. Jain, Growth and dissolution of an encapsulated contrast microbubble: effects of encapsulation permeability, *Ultrasound in Medicine & Biology* 35 (8) (2009) 1385–1396. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2009.04.010.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562909001756>

- [23] G. T. Vladislavljević, Integrated membrane processes for the preparation of emulsions, particles and bubbles, Elsevier, 2015.
- [24] D. Cosco, E. Fattal, M. Fresta, N. Tsapis, Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art, *Journal of Fluorine Chemistry* 171 (2015) 18–26. doi: 10.1016/j.jfluchem.2014.10.013.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113914003364>
- [25] L. Caschera, A. Lazzara, L. Piergallini, D. Ricci, B. Tuscano, A. Vanzulli, Contrast agents in diagnostic imaging: Present and future, *Pharmacological Research* 110 (2016) 65–75. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.023.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661816302675>
- [26] K. K. Shung, *Diagnostic ultrasound : Imaging and blood flow measurements* (2017).
- [27] T. Szabo, *Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside Out - 2nd Edition* (2013).
URL <https://www.elsevier.com/books/diagnostic-ultrasound-imaging-inside-out/szabo/978-0-12-396487-8>
- [28] T. Segers, *Monodisperse bubbles and droplets for medical applications*, University of Twente, Enschede, (2015).
- [29] F. Tranquart, J.-M. Correas, A. Bouakaz, *Échographie de contraste : Méthodologie et applications cliniques*, Springer Science & Business Media, (2007).
- [30] M. Schneider, Characteristics of Sonovue, *Échocardiography : Journal of CV Ultrasound and Allied Technique* 16 (7), (1999).
URL <https://onlinelibrary-wiley-com.docelec.univ-lyon1.fr/doi/epdf/10.1111/j.1540-8175.1999.tb00144.x>
- [31] R. Gramiak, P. M. Shah, Echocardiography of the aortic root, *Investigative Radiology* 3 (5) (1968) 356–66. doi:10.1097/00004424-196809000-00011.
- [32] K. J. Parker, T. A. Tuthill, R. M. Lerner, M. R. Violante, A particulate contrast agent with potential for ultrasound imaging of liver, *Ultrasound in Medicine and Biology* 13 (9) (1987) 555–566.
- [33] J. A. Straub, D. E. Chickering, C. C. Church, B. Shah, T. Hanlon, H. Bernstein, Porous plga microparticles ai-700, an intravenously administered ultrasound contrast agent for use in echocardiography, *Journal of Controlled Release* 108 (1) (2005) 21–32. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.020.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836590500338X>
- [34] S.-L. Huang, A. J. Hamilton, A. Nagaraj, S. D. Tiukinhoy, M. E. Klegerman, D. D. Mcpherson, R. C. Macdonald, Improving ultrasound reflectivity and stability of echogenic liposomal dispersions for use as targeted ultrasound contrast agents, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (12) (2001) 1917–1926.
- [35] H. Alkan-Onyuksel, S. M. Demos, G. M. Lanza, M. J. Vonesh, M. E. Klegerman, B. J. Kane, J. Kuszak, D. D. McPherson, Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (5) (1996) 486–490.

- [36] P. H. Kee, T. A. Abruzzo, D. A. Smith, J. A. Kopechek, B. Wang, S. L. Huang, R. C. MacDonald, C. K. Holland, D. D. McPherson, Synthesis, acoustic stability, and pharmacologic activities of papaverine-loaded echogenic liposomes for ultrasound controlled drug delivery, *Journal of Liposome Research* 18 (4) (2008) 263–277. doi:10.1080/08982100802354558.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08982100802354558>
- [37] C. C. Coussios, C. K. Holland, L. Jakubowska, S.-L. Huang, R. C. MacDonald, A. Nagaraj, D. D. McPherson, In vitro characterization of liposomes and Optison by acoustic scattering at 3.5 MHz, *Ultrasound in Medicine & Biology* 30 (2) (2004) 181–190. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2003.10.015.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562903011499>
- [38] B. E. Oeffinger, M. A. Wheatley, Development and characterization of a nano-scale contrast agent, *Ultrasonics* 42 (1-9) (2004) 343–347. doi:10.1016/j.ultras.2003.11.011.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041624X03002117>
- [39] R. Cavalli, M. Soster, M. Argenziano, Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery, *Therapeutic Delivery* 7 (2) (2016) 117–138. doi:10.4155/tde.15.92.
URL <http://www.future-science.com/doi/10.4155/tde.15.92>
- [40] Mark T. Burgess, Tyrone M. Porter, On-Demand cavitation from bursting droplets, *Acoustics Today* 11 (2015) 35–41.
- [41] O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, D. L. Miller, O. P. Eldevik, P. L. Carson, Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications, *Ultrasound in Medicine & Biology* 26 (7) (2000) 1177–1189.
- [42] M. L. Fabiilli, K. J. Haworth, N. H. Fakhri, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, J. B. Fowlkes, The role of inertial cavitation in acoustic droplet vaporization, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 56 (5) (2009) 1006–1017.
- [43] G. M. Campbell, E. Mougeot, Creation and characterisation of aerated food products, *Trends in Food Science & Technology* 10 (9) (1999) 283–296.
- [44] A. Agarwal, W. J. Ng, Y. Liu, Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment, *Chemosphere* 84 (9) (2011) 1175–1180. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511006242>
- [45] D.R. Ketkar, R. MaUikarjunan, S. Venkatachalam, Electroflotation of quartz fines, *International Journal of Mineral Processing* 31 (1991) 127–138.
- [46] L. B. Chu, X. H. Xing, A. F. Yu, Y. N. Zhou, X. L. Sun, B. Jurcik, Enhanced ozonation of simulated dyestuff wastewater by microbubbles, *Chemosphere* 68 (10) (2007) 1854–1860. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.014.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507003712>
- [47] E. G. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey, J. G. Riess, Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals, *Angewandte*

- Chemie International Edition 42 (28) (2003) 3218–3235. doi:10.1002/anie.200200550.
URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200200550/abstract>
- [48] R. S. Meltzer, P. W. Serruys, J. McGhie, N. Verbaan, J. Roelandt, Pulmonary wedge injections yielding left-sided echocardiographic contrast, *Heart* 44 (4) (1980) 390–394.
- [49] J. G. Riess, Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8 (3) (2003) 259–266.
- [50] M. W. Grinstaff, K. S. Suslick, Air-filled proteinaceous microbubbles : synthesis of an echo-contrast agent, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (17) (1991) 7708–7710.
- [51] D. M. El-Sherif, M. A. Wheatley, Development of a novel method for synthesis of a polymeric ultrasound contrast agent, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66 (2) (2003) 347–355.
- [52] Z. Hou, C. Lin, Q. Zhang, X. Tang, Y. Wang, Preparation and characterization of PLA ultrasound contrast agents by combining an ultrasound method and a shirasu porous glass spg membrane emulsification technique, in : *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on, IEEE, 2009, pp. 1–4.
- [53] M. A. Wheatley, F. Forsberg, N. Dube, M. Patel, B. E. Oeffinger, Surfactant-stabilized contrast agent on the nanoscale for diagnostic ultrasound imaging, *Ultrasound in Medicine & Biology* 32 (1) (2006) 83–93. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2005.08.009.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562905003558>
- [54] S. Singhal, C. C. Moser, M. A. Wheatley, Surfactant-stabilized microbubbles as ultrasound contrast agents: stability study of span 60 and tween 80 mixtures using a langmuir trough, *Langmuir* 9 (9) (1993) 2426–2429.
URL <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la00033a027>
- [55] Z. Xing, H. Ke, J. Wang, B. Zhao, X. Yue, Z. Dai, J. Liu, Novel ultrasound contrast agent based on microbubbles generated from surfactant mixtures of span 60 and polyoxyethylene 40 stearate, *Acta Biomaterialia* 6 (9) (2010) 3542–3549. doi:10.1016/j.actbio.2010.03.007.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110001339>
- [56] J. R. Lindner, Microbubbles in medical imaging : current applications and future directions, *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (6) (2004) 527.
- [57] A. L. Klibanov, M. S. Hughes, J. N. Marsh, C. S. Hall, J. G. Miller, J. H. Wible, G. H. Brandenburger, Targeting of ultrasound contrast material. An in vitro feasibility study, *Acta Radiologica* 412 (1997) 113–120.
- [58] S. Pochon, I. Tardy, P. Bussat, T. Bettinger, J. Brochot, M. von Wronski, L. Passantino, M. Schneider, BR55 : a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis, *Investigative Radiology* 45 (2) (2010) 89–95.
- [59] J. Wischhusen, F. Padilla, Microbubble enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of targeted microbubbles in vitro static binding assays, *Ultrasound in Medicine & Bio-*

- logy 43 (7) (2017) 1506–1519. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.004.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562917301047>
- [60] I. Bracco Diagnostics, A Pilot Trial Using BR55 Ultrasound Contrast Agent in the Assessment of Prostate Cancer - ClinicalTrials (2015).
URL <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02142608>
- [61] J. M. Escoffre, A. Zeghimi, A. Novell, A. Bouakaz, In-vivo gene delivery by sonoporation : recent progress and prospects, *Current Gene Therapy* 13 (1) (2013) 2–14.
- [62] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison, *Medical Biological Engineering Computing* 47 (8) (2009) 883–892. doi:10.1007/s11517-009-0490-8.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s11517-009-0490-8>
- [63] A. Carpentier, M. Canney, A. Vignot, V. Reina, K. Beccaria, C. Horodyckid, C. Karachi, D. Lelercq, C. Lafon, J.-Y. Chapelon, L. Capelle, P. Cornu, M. Sanson, K. Hoang-Xuan, J.-Y. Delattre, A. Idhah, Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound, *Science Translational Medicine* 8 (343).
- [64] O. D. Kripfgans, M. L. Fabiilli, P. L. Carson, J. B. Fowlkes, On the acoustic vaporization of micrometer-sized droplets, *The Journal of the Acoustical Society of America* 116 (1) (2004) 272–281. doi:10.1121/1.1755236.
URL <http://asa.scitation.org/doi/10.1121/1.1755236>
- [65] P. S. Sheeran, P. A. Dayton, Phase-change contrast agents for imaging and therapy, *Current Pharmaceutical Design* 18 (15) (2012) 2152–2165.
- [66] Y. Zhou, Application of acoustic droplet vaporization in ultrasound therapy, *Journal of Therapeutic Ultrasound*, (2015) 3. doi:10.1186/s40349-015-0041-8.
URL <http://www.jtultrasound.com/content/3/1/20>
- [67] P. S. Sheeran, V. P. Wong, S. Luois, R. J. McFarland, W. D. Ross, S. Feingold, T. O. Matsunaga, P. A. Dayton, Decafluorobutane as a phase change contrast agent for low energy extravascular ultrasonic imaging, *Ultrasound in Medicine & Biology* 37 (9) (2011) 1518–1530. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.05.021.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562911002833>
- [68] N. Y. Rapoport, A. L. Efros, D. A. Christensen, A. M. Kennedy, K.-H. Nam, Microbubble generation in phase-shift nanoemulsions used as anticancer drug carriers, *Bubble Science, Engineering & Technology* 1 (1-2) (2009) 31–39. doi:10.1179/175889709X446516.
URL <http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/175889709X446516>
- [69] T. D. Martz, P. S. Sheeran, D. Bardin, A. P. Lee, P. A. Dayton, Precision manufacture of phase-change perfluorocarbon droplets using microfluidics, *Ultrasound in Medicine & Biology* 37 (11) (2011) 1952–1957. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.08.012.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562911013081>
- [70] N. Y. Rapoport, A. M. Kennedy, J. E. Shea, C. L. Scaife, K.-H. Nam, Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles, *Journal*

- of Controlled Release 138 (3) (2009) 268–276. doi:10.1016/j.jconrel.2009.05.026.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365909003599>
- [71] N. Reznik, R. Williams, P. N. Burns, Investigation of vaporized submicron perfluorocarbon droplets as an ultrasound contrast agent, *Ultrasound in Medicine and Biology* 37 (8) (2011) 1271–1279. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.05.001.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562911002432>
- [72] K. C. Schad, K. Hynnen, In vitro characterization of perfluorocarbon droplets for focused ultrasound therapy, *Physics in Medicine and Biology* 55 (2010) 4933–4947.
- [73] T. Giesecke, K. Hynnen, Ultrasound-mediated cavitation thresholds of liquid perfluorocarbon droplets in vitro, *Ultrasound in Medicine & Biology* 29 (9) (2003) 1359–1365. doi:10.1016/S0301-5629(03)00980-3.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562903009803>
- [74] A. Lo, O. Kripfgans, P. Carson, E. Rothman, J. Fowlkes, Acoustic droplet vaporization threshold: effects of pulse duration and contrast agent, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 54 (5) (2007) 933–946. doi:10.1109/TUFFC.2007.339.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/4225305/>
- [75] Z. Z. Wong, O. D. Kripfgans, A. Qamar, J. B. Fowlkes, J. L. Bull, Bubble evolution in acoustic droplet vaporization at physiological temperature via ultra-high speed imaging, *Soft Matter* 7 (8) (2011) 4009. doi:10.1039/c1sm00007a.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1sm00007a>
- [76] O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, M. Woydt, O. P. Eldevik, P. L. Carson, In vivo droplet vaporization for occlusion therapy and phase aberration correction, *IEEE transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 49 (6) (2002) 726–738.
- [77] C.-H. Wang, S.-T. Kang, Y.-H. Lee, Y.-L. Luo, Y.-F. Huang, C.-K. Yeh, Aptamer-conjugated and drug-loaded acoustic droplets for ultrasound theranosis, *Biomaterials* 33 (6) (2012) 1939–1947. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.036.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211013901>
- [78] J. Huang, J. S. Xu, R. X. Xu, Heat-sensitive microbubbles for intraoperative assessment of cancer ablation margins, *Biomaterials* 31 (6) (2010) 1278–1286. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.008.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209012204>
- [79] K.-i. Kawabata, N. Sugita, H. Yoshikawa, T. Azuma, S.-i. Umemura, Nanoparticles with multiple perfluorocarbons for controllable ultrasonically induced phase shifting, *Japanese Journal of Applied Physics* 44 (6) (2005) 4548–4552.
- [80] P. Zhang, T. Porter, An in vitro study of a phase-shift nanoemulsion: A potential nucleation agent for bubble-enhanced hifu tumor ablation, *Ultrasound in Medicine & Biology* 36 (11) (2010) 1856–1866. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.001.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562910003509>

- [81] M. Zhang, M. L. Fabiilli, K. J. Haworth, F. Padilla, S. D. Swanson, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, J. B. Fowlkes, Acoustic droplet vaporization for enhancement of thermal ablation by high intensity focused ultrasound, *Academic Radiology* 18 (9) (2011) 1123–1132. doi:10.1016/j.acra.2011.04.012.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1076633211002170>
- [82] O. Kripfgans, C. Orifici, P. Carson, K. Ives, O. Eldevik, J. Fowlkes, Acoustic droplet vaporization for temporal and spatial control of tissue occlusion: a kidney study, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 52 (7) (2005) 1101–1110. doi:10.1109/TUFFC.2005.1503996.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/1503996/>
- [83] M. L. Fabiilli, K. J. Haworth, I. E. Sebastian, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, J. B. Fowlkes, Delivery of Chlorambucil Using an Acoustically-Triggered Perfluoropentane Emulsion, *Ultrasound in Medicine & Biology* 36 (8) (2010) 1364–1375. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.04.019.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562910002188>
- [84] P. Brochette, Émulsification - Élaboration et étude des émulsions, *Techniques de l'ingénieur* (1999).
URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-formulation-tiajc/archive-1/emulsification-j2150/>
- [85] P. S. Epstein, M. S. Plesset, On the stability of gas bubbles in liquid-gas solutions, *The Journal of Chemical Physics* 18 (11) (1950) 1505–1509. doi:10.1063/1.1747520.
URL <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1747520>
- [86] J. J. Kwan, M. A. Borden, Microbubble dissolution in a multigas environment, *Langmuir* 26 (9) (2010) 6542–6548. doi:10.1021/la904088p.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la904088p>
- [87] P. B. Duncan, D. Needham, Test of the Epstein Plesset Model for Gas Microparticle Dissolution in Aqueous Media: Effect of Surface Tension and Gas Undersaturation in Solution, *Langmuir* 20 (7) (2004) 2567–2578. doi:10.1021/la034930i.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la034930i>
- [88] J. Hanwright, J. Zhou, G. M. Evans, K. P. Galvin, Influence of surfactant on gas bubble stability, *Langmuir* 21 (11) (2005) 4912–4920. doi:10.1021/la0502894.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0502894>
- [89] M. A. Borden, M. L. Longo, Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length, *Langmuir* 18 (24) (2002) 9225–9233. doi:10.1021/la026082h.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la026082h>
- [90] M. Schneider, Ultrasound contrast agents and process for the preparation thereof, US10544123 (2004).

- [91] K. Bjerknes, K. Dyrstad, G. Smistad, I. Agerkvist, Preparation of polymeric microcapsules: Formulation studies, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 26 (8) (2000) 847–856. doi:10.1081/DDC-100101308.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-100101308>
- [92] B. Jiang, C. Gao, J. Shen, Polylactide hollow spheres fabricated by interfacial polymerization in an oil-in-water emulsion system, *Colloid and Polymer Science* 284 (5) (2006) 513–519. doi:10.1007/s00396-005-1415-1.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00396-005-1415-1>
- [93] J. A. Feshitan, C. C. Chen, J. J. Kwan, M. A. Borden, Microbubble size isolation by differential centrifugation, *Journal of Colloid and Interface Science* 329 (2) (2009) 316–324. doi:10.1016/j.jcis.2008.09.066.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708012149>
- [94] Y.-Z. Zhao, H.-D. Liang, X.-G. Mei, M. Halliwell, Preparation, characterization and in vivo observation of phospholipid-based gas-filled microbubbles containing hirudin, *Ultrasound in Medicine & Biology* 31 (9) (2005) 1237–1243. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2005.05.007.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562905002413>
- [95] R. Williams, C. Wright, E. Cherin, N. Reznik, M. Lee, I. Gorelikov, F. S. Foster, N. Matsuura, P. N. Burns, Characterization of submicron phase-change perfluorocarbon droplets for extravascular ultrasound imaging of cancer, *Ultrasound in Medicine & Biology* 39 (3) (2013) 475–489. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.10.004.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030156291200614X>
- [96] S. Kvaale, H. A. Jakobsen, O. A. Asbjørnsen, T. Omtveit, Size fractionation of gas-filled microspheres by flotation, *Separations Technology* 6 (4) (1996) 219–226.
- [97] W. J. Duncanson, L. R. Arriaga, W. L. Ung, J. A. Kopechek, T. M. Porter, D. A. Weitz, Microfluidic fabrication of perfluorohexane-shelled double emulsions for controlled loading and acoustic-triggered release of hydrophilic agents, *Langmuir* 30 (46) (2014) 13765–13770. doi:10.1021/la502473w.
URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/la502473w>
- [98] P. Garstecki, I. Gitlin, W. DiLuzio, G. M. Whitesides, E. Kumacheva, H. A. Stone, Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device, *Applied Physics Letters* 85 (13) (2004) 2649–2651. doi:10.1063/1.1796526.
URL <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1796526>
- [99] K. Hettiarachchi, E. Talu, M. L. Longo, P. A. Dayton, A. P. Lee, On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging, *Lab Chip* 7 (4) (2007) 463–468.
URL <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/lc/b701481n>
- [100] K. P. Pancholi, U. Farook, R. Moaleji, E. Stride, M. J. Edirisinghe, Novel methods for preparing phospholipid coated microbubbles, *European Biophysics Journal* 37 (4) (2008) 515–520.

- doi:10.1007/s00249-007-0211-x.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00249-007-0211-x>
- [101] E. Talu, Lipid-stabilized monodisperse microbubbles produced by flow focusing for use as ultrasound contrast agents and targeted drug delivery, University of California, 2007.
URL <http://search.proquest.com/openview/a5a1cb6c11df442999d9c50f659283b2/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- [102] P. Zhu, L. Wang, Passive and active droplet generation with microfluidics: a review, *Lab on a Chip* 17 (1) (2017) 34–75. doi:10.1039/C6LC01018K.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6LC01018K>
- [103] J. H. Xu, S. W. Li, G. G. Chen, G. S. Luo, Formation of monodisperse microbubbles in a microfluidic device, *AIChE Journal* 52 (6) (2006) 2254–2259. doi:10.1002/aic.10824.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/aic.10824>
- [104] M. Stang, H. Karbstein, H. Schubert, Adsorption kinetics of emulsifiers at oil-water interfaces and their effect on mechanical emulsification, *Chemical Engineering and Processing* 33 (5) (1994) 307–311. doi:10.1016/0255-2701(94)02000-0.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0255270194020000>
- [105] U. Farook, E. Stride, M. Edirisinghe, Preparation of suspensions of phospholipid-coated microbubbles by coaxial electrohydrodynamic atomization, *Journal of The Royal Society Interface* 6 (32) (2009) 271–277. doi:10.1098/rsif.2008.0225.
URL <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2008.0225>
- [106] P. S. Sheeran, S. Luo, P. A. Dayton, T. O. Matsunaga, Formulation and acoustic studies of a new phase shift agent for diagnostic and therapeutic ultrasound, *Langmuir* 27 (17) (2011) 10412–10420. doi:10.1021/la2013705.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la2013705>
- [107] K. C. van Dijke, K. Schroën, A. van der Padt, R. Boom, EDGE emulsification for food-grade dispersions, *Journal of Food Engineering* 97 (3) (2010) 348–354. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.10.028.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409005354>
- [108] C. Charcosset, I. Limayem, H. Fessi, The membrane emulsification process a review, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79 (3) (2004) 209–218. doi:10.1002/jctb.969.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.969>
- [109] S. M. Joscelyne, G. Trägårdh, Membrane emulsification a literature review, *Journal of Membrane Science* 169 (1) (2000) 107–117.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738899003348>
- [110] M. Lee, E. Y. Lee, D. Lee, B. J. Park, Stabilization and fabrication of microbubbles: applications for medical purposes and functional materials, *Soft Matter* 11 (11) (2015) 2067–2079. doi:10.1039/C5SM00113G.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SM00113G>

- [111] T. Nakashima, M. Shimizu, M. Kukizaki, Membrane Emulsification by Microporous Glass, *Key Engineering Materials* 61-62 (1992) 513–516. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.61-62.513.
URL <https://www.scientific.net/KEM.61-62.513>
- [112] T. Nakashima, M. Shimizu, M. Kukizaki, Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 45 (1) (2000) 47–56.
- [113] K. Suzuki, I. Shuto, Y. Hagura, Characteristics of the membrane emulsification method combined with preliminary emulsification for preparing corn oil-in-water emulsions, *Food Science and Technology International*, Tokyo 2 (1) (1996) 43–47.
URL https://www.jstage.jst.go.jp/article/fsti9596t9798/2/1/2_1_43/_article/-char/ja/
- [114] C. J. Cheng, L. Y. Chu, R. Xie, Preparation of highly monodisperse W-O emulsions with hydrophobically modified SPG membranes, *Journal of Colloid and Interface Science* 300 (1) (2006) 375–382. doi:10.1016/j.jcis.2006.03.056.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706002451>
- [115] Q.-Z. Zhou, G.-H. Ma, Z.-G. Su, Effect of membrane parameters on the size and uniformity in preparing agarose beads by premix membrane emulsification, *Journal of Membrane Science* 326 (2) (2009) 694–700. doi:10.1016/j.memsci.2008.11.012.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808009629>
- [116] W. Wei, P.-P. Lv, X.-M. Chen, Z.-G. Yue, Q. Fu, S.-Y. Liu, H. Yue, G.-H. Ma, Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression, *Biomaterials* 34 (15) (2013) 3912–3923. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.030.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213001993>
- [117] M. Kukizaki, M. Goto, Spontaneous formation behavior of uniform-sized microbubbles from Shirasu porous glass (SPG) membranes in the absence of water-phase flow, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 296 (1-3) (2007) 174–181. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.09.042.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570600731X>
- [118] G. T. Vladislavljević, U. Lambrich, M. Nakajima, H. Schubert, Production of O/W emulsions using SPG membranes, ceramic α -aluminium oxide membranes, microfluidizer and a silicon microchannel plate—a comparative study, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 232 (2-3) (2004) 199–207. doi:10.1016/j.colsurfa.2003.10.026.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775703006137>
- [119] H. S. Ribeiro, L. G. Rico, G. G. Badolato, H. Schubert, Production of o/w emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification, *Journal of food science* 70 (2).

- [120] G. Vladisavljević, H. Schubert, Preparation and analysis of oil-in-water emulsions with a narrow droplet size distribution using shirasu porous glass (spg) membranes, *Desalination* 144 (2002) 167–172. doi:10.1016/S0011-9164(02)00307-7.
- [121] G. T. Vladisavljević, M. Shimizu, T. Nakashima, Preparation of monodisperse multiple emulsions at high production rates by multi-stage premix membrane emulsification, *Journal of Membrane Science* 244 (1-2) (2004) 97–106. doi:10.1016/j.memsci.2004.07.008.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738804005058>
- [122] G. T. Vladisavljević, M. Shimizu, T. Nakashima, Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated spg membrane homogenization: influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity, *Journal of Membrane Science* 284 (1-2) (2006) 373–383. doi:10.1016/j.memsci.2006.08.003.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738806005370>
- [123] G. T. Vladisavljević, A. Laouini, C. Charcosset, H. Fessi, H. C. Bandulasena, R. G. Holdich, Production of liposomes using microengineered membrane and co-flow microfluidic device, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 458 (2014) 168–177. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.03.016.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775714002386>
- [124] M. Kukizaki, Y. Baba, Effect of surfactant type on microbubble formation behavior using Shirasu porous glass (SPG) membranes, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 326 (3) (2008) 129–137. doi:10.1016/j.colsurfa.2008.05.025.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708003452>
- [125] M. Kukizaki, T. Wada, Effect of the membrane wettability on the size and size distribution of microbubbles formed from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 317 (1-3) (2008) 146–154. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.10.005.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775707009168>
- [126] M. Kukizaki, Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes: A comparative study, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 340 (1-3) (2009) 20–32. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.02.033.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709001095>
- [127] E. Stride, M. Edirisinghe, Novel microbubble preparation technologies, *Soft Matter* 4 (12) (2008) 2350. doi:10.1039/b809517p.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=b809517p>
- [128] A. J. Gijsbertsen-Abrahamse, Membrane emulsification : process principles, *Journal of Membrane Science* 204 (2002) 125–137.
- [129] Ryoh Katoh, Yuzoh Asano, Atusi Furuya, Kazuyoshi Sotoyama, Mamoru Tomita, Preparation of food emulsions using a membrane emulsification system, *Journal of Membrane Science* 113 (1996) 131–135.

- [130] M. Kukizaki, Shirasu porous glass (SPG) membrane emulsification in the absence of shear flow at the membrane surface: Influence of surfactant type and concentration, viscosities of dispersed and continuous phases, and transmembrane pressure, *Journal of Membrane Science* 327 (1-2) (2009) 234–243. doi:10.1016/j.memsci.2008.11.026.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808009903>
- [131] H. Karbstein, H. Schubert, Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions, *Chemical Engineering and Processing : Process Intensification* 34 (3) (1995) 205–211.
- [132] G. T. Vladislavljević, R. A. Williams, Recent developments in manufacturing particulate products from double-emulsion templates using membrane and microfluidic devices, in: *Multiple Emulsions*, Wiley-Blackwell, 2007, pp. 121–164. doi:10.1002/9780470209264.ch6.
URL <https://onlinelibrary-wiley-com.docelec.univ-lyon1.fr/doi/abs/10.1002/9780470209264.ch6>
- [133] M. M. Dragosavac, R. G. Holdich, G. T. Vladislavljević, M. N. Sovilj, Stirred cell membrane emulsification for multiple emulsions containing unrefined pumpkin seed oil with uniform droplet size, *Journal of Membrane Science* 392-393 (2012) 122–129. doi:10.1016/j.memsci.2011.12.009.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738811009008>
- [134] M. Kukizaki, M. Goto, Size control of nanobubbles generated from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes, *Journal of Membrane Science* 281 (1-2) (2006) 386–396. doi:10.1016/j.memsci.2006.04.007.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738806002432>
- [135] S. R. Kosvintsev, G. Gasparini, R. G. Holdich, Membrane emulsification: Droplet size and uniformity in the absence of surface shear, *Journal of Membrane Science* 313 (1-2) (2008) 182–189. doi:10.1016/j.memsci.2008.01.009.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808000318>
- [136] G. Vladislavljević, M. Shimizu, T. Nakashima, Permeability of hydrophilic and hydrophobic Shirasu-porous-glass (SPG) membranes to pure liquids and its microstructure, *Journal of Membrane Science* 250 (1-2) (2005) 69–77. doi:10.1016/j.memsci.2004.10.017.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738804007112>
- [137] S. R. Kosvintsev, G. Gasparini, R. G. Holdich, I. W. Cumming, M. T. Stillwell, Liquid-liquid membrane dispersion in a stirred cell with and without controlled shear, *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44 (24) (2005) 9323–9330. doi:10.1021/ie0504699.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie0504699>
- [138] A. Nazir, K. Schroën, R. Boom, The effect of pore geometry on premix membrane emulsification using nickel sieves having uniform pores, *Chemical Engineering Science* 93 (2013) 173–180. doi:10.1016/j.ces.2013.01.029.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250913000420>

- [139] W. Yafei, Z. Tao, H. Gang, Structural evolution of polymer-stabilized double emulsions, *Langmuir* 22 (1) (2006) 67–73. doi:10.1021/la0523255.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0523255>
- [140] T. Kai, Y. Suma, S. Ono, T. Yamaguchi, S.-i. Nakao, Effect of the pore surface modification of an inorganic substrate on the plasma-grafting behavior of pore-filling-type organic/inorganic composite membranes, *Journal of Polymer Science Part A : Polymer Chemistry* 44 (2) (2006) 846–856. doi:10.1002/pola.21168.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.21168>
- [141] R. Hancocks, F. Spyropoulos, I. Norton, The effects of membrane composition and morphology on the rotating membrane emulsification technique for food grade emulsions, *Journal of Membrane Science* 497 (2016) 29–35. doi:10.1016/j.memsci.2015.09.033.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738815301964>
- [142] A. K. Pawlik, I. T. Norton, SPG rotating membrane technique for production of food grade emulsions, *Journal of Food Engineering* 114 (4) (2013) 530–537. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.09.008.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412004426>
- [143] J. Zhu, D. Barrow, Analysis of droplet size during crossflow membrane emulsification using stationary and vibrating micromachined silicon nitride membranes, *Journal of Membrane Science* 261 (1-2) (2005) 136–144. doi:10.1016/j.memsci.2005.02.038.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738805002693>
- [144] V. Schröder, O. Behrend, H. Schubert, Effect of dynamic interfacial tension on the emulsification process using microporous, ceramic membranes, *Journal of Colloid and Interface Science* 202 (2) (1998) 334–340. doi:10.1006/jcis.1998.5429.
- [145] C. Charcosset, Membranes for the preparation of emulsions and particles, in : *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceuticals*, Elsevier, 2012, pp. 213–251. doi:10.1016/B978-0-444-56334-7.00006-X.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044456334700006X>
- [146] M. Mulder, *Basic principles of membrane technology*, Springer, 2017.
- [147] F. Spyropoulos, R. D. Hancocks, I. T. Norton, Food-grade emulsions prepared by membrane emulsification techniques, *Procedia Food Science* 1 (2011) 920–926. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.139.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11001404>
- [148] C. Charcosset, Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry, *Journal of Food Engineering* 92 (3) (2009) 241–249. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.11.017.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877408005700>
- [149] A. Nazir, K. Schroën, R. Boom, Premix emulsification: A review, *Journal of Membrane Science* 362 (1-2) (2010) 1–11. doi:10.1016/j.memsci.2010.06.044.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738810005119>

- [150] L. Sang, Y. Hong, F. Wang, Lattice boltzmann simulations of droplet formation in a coflowing microchannel, ASME/JSME 2007 5th Joint Fluids Engineering Conference 2 (2006) 415–421. doi:10.1115/FEDSM2007-37445.
- [151] S. Sugiura, M. Nakajima, N. Kumazawa, S. Iwamoto, M. Seki, Characterization of spontaneous transformation-based droplet formation during microchannel emulsification, The Journal of Physical Chemistry B 106 (36) (2002) 9405–9409. doi:10.1021/jp0259871. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0259871>
- [152] S. Omi, Preparation of monodisperse microspheres using the Shirasu porous glass emulsification technique, Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects 109 (1996) 97–107.
- [153] S. van der Graaf, C. Schroën, R. van der Sman, R. Boom, Influence of dynamic interfacial tension on droplet formation during membrane emulsification, Journal of Colloid and Interface Science 277 (2) (2004) 456–463. doi:10.1016/j.jcis.2004.04.033. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979704003972>
- [154] M. Rayner, G. Trägårdh, C. Trägårdh, The impact of mass transfer and interfacial expansion rate on droplet size in membrane emulsification processes, Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects 266 (1-3) (2005) 1–17. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.05.025. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775705003675>
- [155] E. Lepercq-Bost, M.-L. Giorgi, A. Isambert, C. Arnaud, Use of the capillary number for the prediction of droplet size in membrane emulsification, Journal of Membrane Science 314 (1-2) (2008) 76–89. doi:10.1016/j.memsci.2008.01.023. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738808000719>
- [156] R. Hancocks, F. Spyropoulos, I. Norton, Comparisons between membranes for use in cross flow membrane emulsification, Journal of Food Engineering 116 (2) (2013) 382–389. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.11.032. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087741200605X>
- [157] E. van der Zwan, K. Schroën, K. van Dijke, R. Boom, Visualization of droplet break-up in pre-mix membrane emulsification using microfluidic devices, Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects 277 (1-3) (2006) 223–229. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.11.064. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570500912X>
- [158] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, H. A. Stone, Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices, Physical Review Letters 92 (5). doi:10.1103/PhysRevLett.92.054503. URL <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.92.054503>
- [159] T. G. Mason, J. Bibette, Shear rupturing of droplets in complex fluids, Langmuir 13 (17) (1997) 4600–4613.

- [160] S. Joseph, H. Bunjes, Evaluation of Shirasu Porous Glass (SPG) membrane emulsification for the preparation of colloidal lipid drug carrier dispersions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (1) (2014) 178–186. doi:10.1016/j.ejpb.2013.11.010. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641113003822>
- [161] J. Surh, Y. G. Jeong, G. Vladislavljević, On the preparation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions by multi-stage premix membrane emulsification, *Journal of Food Engineering* 89 (2) (2008) 164–170. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.04.023. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087740800191X>
- [162] Q. Xu, M. Nakajima, S. Ichikawa, N. Nakamura, P. Roy, H. Okadome, T. Shiina, Effects of surfactant and electrolyte concentrations on bubble formation and stabilization, *Journal of Colloid and Interface Science* 332 (1) (2009) 208–214. doi:10.1016/j.jcis.2008.12.044. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708016810>
- [163] E. C. Unger, T. Porter, W. Culp, R. Labell, T. Matsunaga, R. Zutshi, Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (9) (2004) 1291–1314. doi:10.1016/j.addr.2003.12.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X04000444>
- [164] A. L. Klibanov, P. T. Rasche, M. S. Hughes, J. K. Wojdyla, K. P. Galen, J. H. Wible, G. H. Brandenburger, Detection of Individual Microbubbles of Ultrasound Contrast Agents: Imaging of Free-Floating and Targeted Bubbles, *Investigative Radiology* 39 (3) (2004) 187–195. doi:10.1097/01.rli.0000115926.96796.75. URL <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004424-200403000-00008>
- [165] G. Montalvo, R. Pons, G. Zhang, M. Díaz, M. Valiente, Structure and phase equilibria of the soybean lecithin/peg 40 monostearate/water system, *Langmuir* 29 (47) (2013) 14369–14379.
- [166] M. A. Borden, G. Pu, G. J. Runner, M. L. Longo, Surface phase behavior and microstructure of lipid/PEG-emulsifier monolayer-coated microbubbles, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 35 (3-4) (2004) 209–223. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.03.007. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776504000888>
- [167] A. Upadhyay, S. V. Dalvi, G. Gupta, N. Khanna, Effect of PEGylation on performance of protein microbubbles and its comparison with lipid microbubbles, *Materials Science and Engineering* 71 (2017) 425–430. doi:10.1016/j.msec.2016.10.021. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116317702>
- [168] D. Carugo, M. Aron, E. Sezgin, J. Bernardino de la Serna, M. K. Kuimova, C. Eggeling, E. Stride, Modulation of the molecular arrangement in artificial and biological membranes by phospholipid-shelled microbubbles, *Biomaterials* 113 (2017) 105–117. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.10.034. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961216305853>
- [169] Talleyrand, Chapitre 6 : Écoulement interne, in : *Fluides en écoulement méthodes et modèles*, Masson, 2000.

- [170] J. G. Riess, Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective, *Tetrahedron* (58) (2002) 4113–4131.
- [171] O. Alliod, J.-P. Valour, S. Urbaniak, H. Fessi, D. Dupin, C. Charcosset, Preparation of oil-in-water nanoemulsions at large-scale using premix membrane emulsification and Shirasu Porous Glass (SPG) membranes, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*.doi:10.1016/j.colsurfa.2018.04.045.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775718303212>
- [172] S. H. Silalahi, T. Leiknes, Cleaning strategies in ceramic microfiltration membranes fouled by oil and particulate matter in produced water, *Desalination* 236 (1-3) (2009) 160–169. doi : 10.1016/j.desal.2007.10.063.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916408006395>
- [173] P.-G. De Gennes, F. Brochard-Wyart, Gouttes, bulles, perles et ondes, Belin, 2015.
- [174] C. A. Sennoga, J. S. Yeh, J. Alter, E. Stride, P. Nihoyannopoulos, J. M. Seddon, D. O. Haskard, J. V. Hajnal, M.-X. Tang, R. J. Eckersley, Evaluation of methods for sizing and counting of ultrasound contrast agents, *Ultrasound in Medicine & Biology* 38 (5) (2012) 834–845. doi : 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.01.012.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562912000208>
- [175] C. A. Sennoga, V. Mahue, J. Loughran, J. Casey, J. M. Seddon, M. Tang, R. J. Eckersley, On sizing and counting of microbubbles using optical microscopy, *Ultrasound in Medicine & Biology* 36 (12) (2010) 2093–2096. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.09.004.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562910005004>
- [176] E. Stride, Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy, *Cerebrovascular Diseases* 27 (2) (2009) 1–13. doi:10.1159/000203122.
URL <https://www.karger.com/Article/FullText/203122>
- [177] R. Liu, G. Ma, F.-T. Meng, Z.-G. Su, Preparation of uniform-sized PLA microcapsules by combining Shirasu Porous Glass membrane emulsification technique and multiple emulsion-solvent evaporation method, *Journal of Controlled Release* 103 (1) (2005) 31–43. doi : 10.1016/j.jconrel.2004.11.025.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904005863>
- [178] M. Yasuno, S. Sugiura, S. Iwamoto, M. Nakajima, A. Shono, K. Satoh, Monodispersed microbubble formation using microchannel technique, *AIChE Journal* 50 (12) (2004) 3227–3233. doi:10.1002/aic.10276.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/aic.10276>
- [179] S. Khirani, P. Kunwapanitchakul, F. Augier, C. Guigui, P. Guiraud, G. Hébrard, Microbubble Generation through Porous Membrane under Aqueous or Organic Liquid Shear Flow, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (4) (2012) 1997–2009. doi : 10.1021/ie200604g.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie200604g>
- [180] C. Liu, T.-M. Xiao, J. Zhang, L. Zhang, J.-L. Yang, M. Zhang, Effect of membrane wettability on membrane fouling and chemical durability of SPG membranes used in a microbubble-

- aerated biofilm reactor, *Separation and Purification Technology* 127 (2014) 157–164. doi: 10.1016/j.seppur.2014.03.001.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586614001439>
- [181] W. Krause, *Optical, ultrasound, x-ray and radiopharmaceutical imaging*, Springer, 2002.
- [182] K. Ferrara, R. Pollard, M. Borden, *Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery*, *Annual Review of Biomedical Engineering* 9 (1) (2007) 415–447. doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852.
URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852>
- [183] S. Tinkov, R. Bekerredjian, G. Winter, C. Coester, *Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (6) (2009) 1935–1961. doi:10.1002/jps.21571.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916329835>
- [184] M. A. Parrales, J. M. Fernandez, M. Perez-Saborid, J. A. Kopechek, T. M. Porter, *Acoustic characterization of monodisperse lipid-coated microbubbles: Relationship between size and shell viscoelastic properties*, *The Journal of the Acoustical Society of America* 136 (3) (2014) 1077–1084. doi:10.1121/1.4890643.
URL <http://asa.scitation.org/doi/10.1121/1.4890643>
- [185] M. Schneider, *Br1 : a new ultrasonographic contrast agent based on sulfur hexafluoride-filled microbubbles*, *Investigate radiology*, (1995).
- [186] S. Rossi, C. Szíjjártó, F. Gerber, G. Waton, M. P. Krafft, *Fluororous materials in microbubble engineering science and technology design and development of new bubble preparation and sizing technologies*, *Journal of Fluorine Chemistry* 132 (12) (2011) 1102–1109. doi: 10.1016/j.jfluchem.2011.06.032.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002211391100220X>
- [187] M. P. Krafft, *Fluorine in medical microbubbles Methodologies implemented for engineering and investigating fluorocarbon-based microbubbles*, *Journal of Fluorine Chemistry* 177 (2015) 19–28. doi:10.1016/j.jfluchem.2015.02.013.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022113915000585>
- [188] S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Small phospholipid coated gas bubbles can last longer than larger ones*, *ChemPhysChem* 9 (14) (2008) 1982–1985. doi: 10.1002/cphc.200800386.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200800386>
- [189] C. Szíjjártó, S. Rossi, G. Waton, M. P. Krafft, *Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of phospholipid-coated microbubbles: osmotic effect versus interfacial film stabilization*, *Langmuir* 28 (2) (2012) 1182–1189. doi:10.1021/la2043944.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la2043944>
- [190] P. N. Nguyen, T. T. Trinh Dang, G. Waton, T. Vandamme, M. P. Krafft, *A Nonpolar, Nonamphiphilic Molecule Can Accelerate Adsorption of Phospholipids and Lower Their Surface Tension at the Air-Water Interface*, *ChemPhysChem* 12 (14) (2011) 2646–2652. doi:

- 10.1002/cphc.201100425.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.201100425>
- [191] V. Sanna, G. Pintus, P. Bandiera, R. Anedda, S. Punzoni, B. Sanna, V. Migaleddu, S. Uzzau, M. Sechi, Development of polymeric microbubbles targeted to prostate specific membrane antigen as prototype of novel ultrasound contrast agents, *Molecular Pharmaceutics* 8 (3) (2011) 748–757. doi:10.1021/mp100360g.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp100360g>
- [192] R. Shih, A. P. Lee, Post formation shrinkage and stabilization of microfluidic bubbles in lipid solution, *Langmuir* 32 (8) (2016) 1939–1946. doi:10.1021/acs.langmuir.5b03948.
URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.5b03948>
- [193] Y. Ando, H. Tabata, M. Sanchez, A. Cagna, D. Koyama, M. P. Krafft, Microbubbles with a Self Assembled Poloxamer Shell and a Fluorocarbon Inner Gas, *Langmuir* 32 (47) (2016) 12461–12467. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01883.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.6b01883>
- [194] R. Parmar, S. K. Majumder, Microbubble generation and microbubble-aided transport process intensification—A state-of-the-art report, *Chemical Engineering and Processing : Process Intensification* 64 (2013) 79–97. doi:10.1016/j.cep.2012.12.002.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270112002292>
- [195] J.-M. Gorce, M. Arditi, M. Schneider, Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents : A study of SonoVue, *Investigative Radiology* 35 (11) (2000) 661–671.
- [196] A. M. Gañán Calvo, J. M. Gordillo, Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing, *Physical Review Letters* 87 (27). doi:10.1103/PhysRevLett.87.274501.
URL <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.87.274501>
- [197] A. H. Dhanaliwala, A. J. Dixon, D. Lin, J. L. Chen, A. L. Klibanov, J. A. Hossack, In vivo imaging of microfluidic-produced microbubbles, *Biomedical Microdevices* 17 (1). doi:10.1007/s10544-014-9914-9.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s10544-014-9914-9>
- [198] Elena Castro-Hernandez, Wim van Hoeve, Detlef Lohse, Jose M. Gordillo, Microbubble generation in a co-flow device operated in a new regime, *Lab on a Chip* 11 (2011) 2023–2029. doi:10.1039/C0LC00731E.
- [199] M. Parhizkar, M. Edirisinghe, E. Stride, The effect of surfactant type and concentration on the size and stability of microbubbles produced in a capillary embedded T-junction device, *RSC Advances* 5 (14) (2015) 10751–10762. doi:10.1039/C4RA15167D.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA15167D>
- [200] M. S. Kalekar, S. S. Bhagwat, Dynamic Behavior of Surfactants in Solution, *Journal of Dispersion Science and Technology* 27 (7) (2006) 1027–1034. doi:10.1080/01932690600767080.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690600767080>

- [201] T. Nakashima, M. Kawano, M. Shimizu, Articles of porous glass and process for preparing the same (Apr. 1987).
- [202] J. Benjamins, A. Cagna, E. H. Lucassen Reynders, Viscoelastic properties of triacylglycerol-water interfaces covered by proteins, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 114 (1996) 245–254. doi:10.1016/0927-7757(96)03533-9.
- [203] M. Yasuno, M. Nakajima, S. Iwamoto, T. Maruyama, S. Sugiura, I. Kobayashi, A. Shono, K. Satoh, Visualization and characterization of SPG membrane emulsification, *Journal of Membrane Science* 210 (1) (2002) 29–37.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037673880200371X>
- [204] D. Beneventi, B. Carre, A. Gandini, Role of surfactant structure on surface and foaming properties, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 189 (2001) 65–73.
- [205] R. W. Walters, R. R. Jenq, S. B. Hall, Distinct steps in the adsorption of pulmonary surfactant to an air-liquid interface, *Biophysical Journal* 78 (2000) 257–266.
- [206] I. Kralova, J. Sjöblom, Surfactants used in food industry: a review, *Journal of Dispersion Science and Technology* 30 (9) (2009) 1363–1383. doi:10.1080/01932690902735561.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690902735561>
- [207] Q. Song, A. Couzis, P. Somasundaran, C. Maldarelli, A transport model for the adsorption of surfactant from micelle solutions onto a clean air-water interface in the limit of rapid aggregate disassembly relative to diffusion and supporting dynamic tension experiments, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 282-283 (2006) 162–182. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.03.006.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775706002123>
- [208] A. Kabalnov, J. Weers, Kinetics of mass transfer in micellar systems : surfactant adsorption, solubilization kinetics, and ripening, *Langmuir* 12 (14) (1996) 3442–3448.
- [209] A. Kabalnov, Ostwald Ripening and Related Phenomena, *Journal of Dispersion Science and Technology* 22 (1) (2001) 1–12. doi:10.1081/DIS-100102675.
URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DIS-100102675>
- [210] S. Lee, D. H. Kim, D. Needham, Equilibrium and dynamic interfacial tension measurements at microscopic interfaces using a micropipet technique 2 dynamics of phospholipid monolayer formation and equilibrium tensions at the water-air interface, *Langmuir* 17 (18) (2001) 5544–5550. doi:10.1021/la0103261.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0103261>
- [211] A. Pinazo, X. Wen, Y.-C. Liao, A. J. Prosser, E. I. Franses, Comparison of dlpc and dppc in controlling the dynamic adsorption and surface tension of their aqueous dispersions, *Langmuir* 18 (23) (2002) 8888–8896. doi:10.1021/la020476r.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la020476r>
- [212] G. M. Lanza, S. A. Wickline, Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy, *Progress in Cardiovascular Diseases* 44 (1) (2001) 13–31. doi:10.1053/pcad.

- 2001.26440.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033062001000160>
- [213] D. R. Evans, D. F. Parsons, V. S. J. Craig, Physical properties of phase-change emulsions, *Langmuir* 22 (23) (2006) 9538–9545. doi:10.1021/la062097u.
URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la062097u>
- [214] M. L. Fabiilli, C. G. Wilson, F. Padilla, F. M. Martín-Saavedra, J. B. Fowlkes, R. T. Franceschi, Acoustic droplet–hydrogel composites for spatial and temporal control of growth factor delivery and scaffold stiffness, *Acta Biomaterialia* 9 (7) (2013) 7399–7409. doi:10.1016/j.actbio.2013.03.027.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113001451>
- [215] J. R. Rajian, M. L. Fabiilli, J. B. Fowlkes, P. L. Carson, X. Wang, Drug delivery monitoring by photoacoustic tomography with an icg encapsulated double emulsion, *Optics Express* 19 (2011) 14335–14347. doi:10.1364/OE.19.014335.
- [216] O. Shpak, L. Stricker, T. Kokhuis, Y. Luan, B. Fowlkes, M. Fabiilli, D. Lohse, N. de Jong, M. Versluis, Ultrafast dynamics of the acoustic vaporization of phase-change microdroplets, *The Journal of the Acoustical Society of America* 133 (5) (2013) 3586–3586. doi:10.1121/1.4806609.
URL <http://asa.scitation.org/doi/10.1121/1.4806609>
- [217] J. M. M. Simons, L. M. Kornmann, K. D. Reesink, A. P. G. Hoeks, M. F. Kemmere, J. Meuldijk, J. T. F. Keurentjes, Monodisperse perfluorohexane emulsions for targeted ultrasound contrast imaging, *Journal of Materials Chemistry* 20 (19) (2010) 3918. doi:10.1039/b922437h.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=b922437h>
- [218] S.-T. Kang, Y.-L. Huang, C.-K. Yeh, Characterization of acoustic droplet vaporization for control of bubble generation under flow conditions, *Ultrasound in Medicine & Biology* 40 (3) (2014) 551–561. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.10.020.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562913011137>
- [219] M. L. Fabiilli, J. A. Lee, O. D. Kripfgans, P. L. Carson, J. B. Fowlkes, Delivery of water-soluble drugs using acoustically triggered perfluorocarbon double emulsions, *Pharmaceutical Research* 27 (12) (2010) 2753–2765. doi:10.1007/s11095-010-0277-5.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s11095-010-0277-5>
- [220] D. Bardin, T. D. Martz, P. S. Sheeran, R. Shih, P. A. Dayton, A. P. Lee, High-speed, clinical scale microfluidic generation of stable phase change droplets for gas embolotherapy, *Lab on a Chip* 11 (23) (2011) 3990. doi:10.1039/c1lc20615j.
URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1lc20615j>
- [221] R. Melich, J.-P. Valour, S. Urbaniak, F. Padilla, C. Charcosset, Preparation and characterization of perfluorocarbon microbubbles using Shirasu Porous Glass (SPG) membranes, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 560 (2019) 233–243.

doi:10.1016/j.colsurfa.2018.09.058.

URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775718311658>

- [222] J. G. Riess, Oxygen carriers (blood substitutes), chemistry, and some physiology, *Chemical Reviews* 101 (9) (2001) 2797–2920. doi:10.1021/cr970143c.

URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr970143c>