



**HAL**  
open science

## Microbulles de gaz comme vecteur de médicament

Celia Rosemonde Mouzouvi

► **To cite this version:**

Celia Rosemonde Mouzouvi. Microbulles de gaz comme vecteur de médicament. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2017. Français. NNT : 2017ANGE0066 . tel-02073613

**HAL Id: tel-02073613**

**<https://theses.hal.science/tel-02073613>**

Submitted on 20 Mar 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.

## Thèse de Doctorat

**Celia Rosemonde Ablavi MOUZOUVI**

*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de :*

**Docteur de l'Université d'Angers**

**Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi**

*sous les sceaux des Universités Bretagne Loire et d'Abomey-Calavi*

**Écoles doctorales :** Biologie Santé (Univ Angers) / Faculté des Sciences de la Santé (UAC)

**Discipline :** Recherche clinique, Innovation technologique (Univ Bretagne Loire),

**Spécialité :** Pharmacie Galénique (UAC)

**Unité de recherche :** MINT, INSERM 1066, CNRS 6021, Univ Angers, Université Bretagne Loire, IBSS-CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers Cedex France

**Soutenue le** 15 Mai 2017

**Thèse N° :** 108335

## Microbulles de gaz comme vecteurs de médicament

### JURY

Rapporteurs : **Armand Angely KOFFI**, Maître de conférences agrégé, Université Félix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire  
**Luc GRISLAIN**, Professeur, Université de Bordeaux, France

Examineurs : **Anatole LALEYE**, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin  
**Rasmané SEMDE**, Professeur, Université de Ouga I Pr Joseph Ky-Zerbo, Burkina Faso  
**Brigitte EVRARD**, Professeur, Université de Liège, Belgique

Directeur de Thèse : **Patrick SAULNIER**, Professeur, Université d'Angers, France

Co-directeur de Thèse : **Koffi André BIGOT**, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

## Thèse de Doctorat

**Celia Rosemonde Ablavi MOUZOUVI**

*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de :*

**Docteur de l'Université d'Angers**

**Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi**

*sous les sceaux des Universités Bretagne Loire et d'Abomey-calavi*

**Écoles doctorales :** Biologie Santé (Univ Angers) / Faculté des Sciences de la Santé (UAC)

**Discipline :** Recherche clinique, Innovation technologique (Univ Bretagne Loire),

**Spécialité :** Pharmacie Galénique (UAC)

**Unité de recherche :** MINT, INSERM 1066, CNRS 6021, Univ Angers, Université Bretagne Loire, IBSS-CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers Cedex France

**Soutenue le** 15 Mai 2017

**Thèse N° :** 108335

## Microbulles de gaz comme vecteurs de médicament

### JURY

Rapporteurs : **Armand Angely KOFFI**, Maître de conférences agrégé, Université Félix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire  
**Luc GRISLAIN**, Professeur, Université de Bordeaux, France

Examineurs : **Anatole LALEYE**, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin  
**Rasmané SEMDE**, Professeur, Université de Ouga I Pr Joseph Ky-Zerbo, Burkina Faso  
**Brigitte EVRARD**, Professeur, Université de Liège, Belgique

Directeur de Thèse : **Patrick SAULNIER**, Professeur, Université d'Angers, France

Co-directeur de Thèse : **Koffi André BIGOT**, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin

## *Remerciements*

## **REMERCIEMENTS**

*A DIEU le conducteur de ma vie, je te dédis encore ce travail car tout ce que je possède vient de toi. Tu conduis mes pas doucement vers ta destinée divine. Merci pour ta fidélité, donne-moi de persévérer avec toi et d'apprendre à te connaître d'avantage.*

*Au Professeur Jean-Pierre BENOIT, je voudrais particulièrement dire merci de m'avoir acceptée comme doctorante au sein du laboratoire dont vous étiez le Directeur. J'ai eu l'opportunité de discuter avec vous et de bénéficier de vos conseils.*

*Au Professeur Franck BOURRY, je vous suis très reconnaissante de m'avoir accordé l'inscription en première année de thèse.*

*A mon maître et Directeur de thèse, le Professeur Patrick SAULNIER, je voudrais spécialement témoigner toute ma reconnaissance. Vous m'avez recueillie dans notre recherche désespérée d'un laboratoire d'accueil et m'avez fait confiance durant le parcours et bien que ne me connaissant pas auparavant. Malgré vos multiples occupations vous avez toujours trouvé durant ces trois années, du temps à me consacrer en partageant avec moi vos connaissances scientifiques et pratiques. Je ne finirai jamais de vous être reconnaissante pour avoir mis mes pieds à l'étrier dans la carrière de chercheur et d'avoir été un bon berger durant cette belle expérience. Votre simplicité, votre sociabilité et surtout votre sens de stimulation à l'autoformation ont été pour moi d'un grand secours et m'ont aidé à produire un travail que je pense être de qualité. Avec vous c'est le début d'une collaboration interuniversitaire.*

*A mon maître et Co-Directeur de thèse le Professeur Koffi André BIGOT. Vous avez eu à cœur la constitution du corps enseignant local de notre jeune faculté de pharmacie. Vous avez cru et continue de croire en moi. Vous êtes aujourd'hui pour moi plus qu'un papa, et à ce titre, vous vous êtes toujours battu et continuez de vous battre contre vents et marées pour me hisser haut dans la société. Je voudrais aussi sincèrement vous remercier pour votre humanité et pour le temps que vous avez consacré pour encadrer ce travail. Cher papa, mes mots sont peu pour témoigner de ma gratitude envers vous. Dieu vous le rende au centuple.*

*A mon maître le Professeur Anatole LALAYE. Cher Professeur, vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury de thèse, soyez- en infiniment remercié. C'est*

*aussi le moment de vous témoigner toute ma sincère gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi au cours de ma formation.*

***A mon maître Professeur Brigitte EVRARD.** Vous avez accepté de faire partie du comité de thèse et nous fait également l'honneur de siéger dans le jury afin d'examiner ce travail, soyez remerciée pour tout.*

***A mon maître le Professeur Rasmané SEMDE.** Vous ne nous avez pas marchandé votre disponibilité lorsque nous vous avons sollicité pour être membre du comité de thèse. Vous avez aussi accepté d'examiner ce travail. Je vous remercie sincèrement.*

***To my master the Professor Kolawole Timothy JAIYEoba.** I would like to cordially thank for agreeing to set in this jury as examiner. Thanks you also very much for your availability.*

***A mon maître le Professeur Paul Armand KOFFI.** Vous me faites l'honneur d'accepté d'être le rapporteur de ce travail. Sincèrement merci pour le temps que vous y avez consacré.*

***A mon maître le Professeur Luc GRISLAIN.** Je voudrais honnêtement vous remercier pour le grand honneur que vous me faites d'évaluer cette thèse en tant que rapporteur.*

***Au Docteur Anita UMERska.** Tu as été associée en tant que post-doctorante pour contribuer à la réalisation de ce travail. Chère Anita, tu es plus qu'une collaboratrice, je voudrais par ce canal te dire que les discussions que nous avons souvent eues ont été fructueuses pour moi, même si parfois nous n'avons pas toujours eu les mêmes points de vue. Laisse-moi te dire que tu détiens des connaissances indéniables et j'ai beaucoup appris de toi. Je suis sidérée par ta perspicacité et ton immense savoir. Merci infiniment pour m'avoir initiée à la rédaction en anglais en acceptant de rédiger mon premier article. Merci encore pour les services rendus.*

***Au Professeur Jacques AUBRY,** Cher maître, grâce à vos relations humaines et à votre bonne volonté, j'ai pu intégrer ce laboratoire de recherche de renom. Vous n'avez pas hésité à soutenir et à défendre ma candidature auprès du Directeur d'alors du laboratoire. Vous avez également disposé de votre temps pour me faire connaître les lieux touristiques et les spécialités de la région Loire Atlantique. Cela m'a énormément touché. Je vous sais gré pour tout.*

***A l'ambassade de la France au Bénin,** je voudrais témoigner toute ma reconnaissance pour ces trois années de financement.*

*A mes maitres les professeurs **Gaudence DJEGO** et **Jean SEHONOU**. Vous avez su m'encourager de diverses manières durant cette formation. Je ne finirai jamais de vous être reconnaissante.*

*A mes maitres les Professeurs **Guata yoro SY**, **Ahmedou Bamba Koueimel FALL** et **Serigne Omar Sarr du Sénégal**. Recevez ma profonde gratitude pour avoir recommandé ma candidature pour la bourse de l'ambassade de France au Bénin.*

*Je tiens à remercier sincèrement les docteurs **Laurent LEMAIRE** (pour m'avoir prodigué beaucoup de conseils, suggéré certaines expériences et aidé à leur réalisation) et **Guillaume BASTIAT** pour les assistances en cas de panne technique et pour les expériences qu'il a bien voulu réaliser pour moi.*

*J'adresse un grand merci au **Docteur Brice CALVIGNAC** pour sa collaboration dans le cadre du développement d'une nouvelle technologie de formulation. Merci pour votre précieux temps consacré à nos réunions de discussions et de réflexion même si le temps ne nous a pas permis de concrétiser les décisions prises.*

*Je voudrais sincèrement remercier **Florian FOUCHET** pour la réalisation de l'expérience d'encapsulation d'actif dans les bulles.*

*Je remercie sincèrement le **Docteur Jérémie RIOU** et le **Docteur Jean-Christophe GIMEL** pour m'avoir respectivement aidé à l'utilisation du logiciel R studio et pour ces explications sur la diffusion de la lumière.*

*Je voudrais cordialement dire mes mots de remerciements à l'endroit du **Docteur Stéphanie PACE** qui a accepté volontiers de m'aider pour l'expérience de fonctionnalisation des nanocapsules lipidiques.*

*Je remercie le **Docteur Elise LEPELTIER** pour les contributions apportées concernant l'utilisation de la balance de Langmuir.*

*Mes sincères remerciements vont à l'endroit des **Professeurs Marie-Claire VENIER**, **Brigitte PECH** et du **maître de conférences Emilie ROGER**. Merci de m'avoir permis d'assister aux séances de travaux pratiques de pharmacie galénique et d'acquérir de nouvelles connaissances. Je n'oublie pas le bon déjeuner que vous m'aviez offert et vous suis reconnaissante pour votre amitié sincère.*

*Mes sincères remerciements aux **Docteurs Nicolas DAVIAUD**, **Thomas CORDONNIER**, **Anne-Laure LAINE** et **Anita UMERSKA** avec lesquels j'ai partagé le bureau. Ce fut un moment agréable. Ces blagues et jeux de distractions organisés pendant les pauses m'ont enlevé le stress. Merci pour l'ambiance qui régnait dans notre bureau. Merci d'avoir accepté que je vous dérange de temps en temps. Merci pour tout ce que vous m'avez appris comme astuces sur la réalisation des figures. Et un grand merci pour ce beau tee-shirt griffé « Rosedescience » que vous m'avez offert à la fin de*

*mon premier séjour. **Anne - Laure** merci pour ce don de DSPEG-2000. **Anita** merci pour le don des réactifs de Zcube.*

*Merci **Aux Docteurs Amine SWED et Leila HASSANI** d'avoir accepté d'être mes compagnons de laboratoire à des heures induis et les weekends. Un grand merci pour vos conseils et aides précieuses.*

***Merci à Emilie ANDRE et son conjoint Kevine.** Chers amis, vous m'avez pris comme votre sœur et membre de votre famille. Emilie, tu t'es toujours rendue disponible pour m'aider lorsque j'étais bloquée dans mes réflexions. Les moments de distractions passés avec vous autour d'un verre au restaurant ou d'un plat chez vous, histoire de changer d'air m'ont enlevé la solitude. Cette surprise que vous m'avez faite à l'occasion de mon anniversaire en 2015 reste à jamais gravée dans mon esprit. Je vous souhaite par anticipation un heureux mariage.*

***Merci à Marjorie TENDERO et son compagnon.** Nous nous sommes connues pendant les formations doctorales et tu n'as pas hésité à faire le premier pas en m'approchant. Merci pour ces moments de convivialité et de sympathie que j'ai eus en votre compagnie. Merci aussi pour m'avoir reçue chez vous et pour votre sympathie.*

*Mes remerciements vont à l'endroit des docteurs et doctorant(e)s **Hélène MALHAIRE, Marion PITTORE, Bathabile ELI, Chantal VALCOURT, Fabien VIOLET, Anita UMERSKA, Elise VERGER, Shubaash ANTHIYA, Khaled MESSAOUDI, Angélique MONTAGU, Nada MATOUGUI, Pauline RESNIER, Anne-Claire GROO, Thomas BRIOT, Aurélien CONTINI, Florence DUMAS, Emma DONZ, Alison DENARNAUD, Milad POURBAGHIMAS** pour ces moments d'échanges scientifiques et pour votre sympathie. Marion c'est le moment de te remercier pour les nombreuses invitations et pour ta sollicitude ; Helene, merci pour ta contribution, tes suggestions et pour les verres partagés ; Angélique, merci pour les amicons offerts ; Nada, merci pour tant de sollicitations auxquelles tu as répondu favorablement ; Thomas merci pour avoir facilité la commande de sonovue® ; Florence merci pour avoir aidé à récupérer certains résultats ; Aurélien merci pour ta compréhension concernant l'utilisation du master sizer 2000 ; Fabien merci de m'avoir initiée l'utilisation du tensiomètre à goutte ; Emma, merci pour l'initiation à l'utilisation du master sizer2000 ; Bathabilie, merci pour m'avoir aidé à pratiquer l'anglais ; Anita, Pauline et Chantale merci de m'avoir initiée à la formulation des Nanocapsules lipidiques ; Shubaash merci pour ces moments consacrés pour le réglage du microscope ; Anne-Claire, Merci pour les membranes de dialyses, les amicons et le formulaire d'inscription à la formation d'expérimentation animale ; Elise, merci pour les logiciels de traitement des références bibliographiques et pour les moments de déjeuner au resto universitaire.*

*Merci à tous les autres **doctorant(e)s, post- doctorant(e)s** pour les échanges, surtout pour les moments passés ensemble et les cadeaux offerts à chaque séjour.*



*Mille mercis à tout le personnel du laboratoire pour les dérangements que je leur ai occasionnés et qui ne les ont pas gênés.*

*Je dis merci à mes collègues de l'école doctorale de la FSS/ UAC benin : Les docteurs **Sekossounon SANNI, Abdoul-Razack OSSENI, Tatiana HOUNTOHOTEGBE, Gisèle AMOUSSOU et Carl KPADONOU.***

*Toute ma profonde reconnaissance à **Josette TERRIER** que j'appelle affectueusement Jojo. Très chère JOJO c'est en acceptant mon mari que tu m'as aussi acceptée. Aujourd'hui nous comptons parmi ta famille. Jojo mes mots sont insignifiants pour dire tout ce que tu es pour nous.*

*Je tiens à dire un grand merci à **Hélène MALHAIRE, Leila HASSANI, Kelly Maeva AMEKUDJI, Florence DUMAS, Naila BOU HAIDAR, Oussama BAKHTA, Ting CHITHDAVONE, Jamal WAKIM, Trang PHAM, Lousineh ARAKELIAN, Kelly MUSSUNDA MOUSSOUNDA, Minh QUAN, Hamma MAIGA, Joakim MAHE, Mathie NAJBERG, Katya SANSONE, Adélie MELLINGER,** qui ne m'ont pas marchandé leur amitié.*

*Je veux dire toute ma gratitude à **Adjélé DJOBOKOU, Ami GAMEDA, à Clémence MONTCO et à Achille BADERA** qui ont acceptés de m'héberger gratuitement et ont été aux petits soins pour moi durant mes séjours. Cher(es) ami(es), grandes sœurs et grand-frère, le Seigneur saura vous récompenser à sa juste valeur.*

*Je remercie infiniment ma famille : **mon papa, ma maman, mes frères et sœurs, mes nièces, mes beaux-parents, mes pasteurs, mes parrains et marraines** qui m'ont toujours soutenu malgré les péripéties et ces années d'études interminables. Vos mots d'encouragements renouvelés m'ont relevé le moral et donner un coup de pouce à chaque fois. Longévité à vous.*

*Je vais finir ces remerciements en m'adressant à **mon cher époux Boladji** qui a été patient pendant ces moments de séparation. Je te remercie aussi d'avoir mis ton ingéniosité au profit de l'amélioration de ce travail.*

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

Ac	Fusidate sodique
Al	Alginate de sodium ou sodique
ANOVA	Analysis Of Variance
BPM	Bas poids moléculaire
CGB	Capsular gas bubbles
CLSM	Fluorescence confocal laser scanning microscopy
CMC	Concentration micellaire critique
CMC Na	Carboxyméthylcellulose sodique
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
CoEHA	Co-axial Electro hydrodynamic atomization
CoGB	Coated gas bubbles
CSI	Concentration de saturation interfaciale
DLE	Drug loading efficiency
DLS	Dynamic light scattering
DP	Drug payload
DSGB	Dispersed systems as gas bubbles
DSPE-PEG 2000- biotin	[(1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phospho- ethanolamine-N- (Biotinyl(Polyethylene Glycol)2000)]
E	Encapsulation
EBS	Electrostatic binding system
EDTA	Ethylene-diamine-tetra acetic acid
EE	Encapsulation efficiency
Ee	Elasticité concervative
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Ene	Elasticité dissipative
G	Module d'élasticité complexe
G'	Partie réelle du module d'élasticité complexe
G''	Partie imaginaire module d'élasticité complexe

GB	Gas bubbles
GBM	Gas bubbles obtained from micelle suspensions
HA	Hyaluronic acide
HCT	10-hydroxycamptothecine
HD	Hydrophilic drug
HLB	Hydrophilic lipophilic balance
HPE	Handbook of Pharmaceutical Excipients
HpD	Hydrophobic drug
KD	Kilo Dalton
LDV	Laser doppler velocimetry
LGB	Liposomes gas bubbles
LMB	Liposome microbubbles
LNCs or LNC	Lipid nanocapsules
Lp-GB	Active molecules-loaded liposomes cross-linked to gas bubbles
MB	Microbubbles
MHS	Macrogol 15 hydroxystearate
MI	Mechanical index
MIBK	Methylisobutylketone
Min	Minute ou minimum
MINT	Micro et Nanomédecines Translationnelles
MLL	Methotrexate-loaded liposomes
mN/m	Millinewton par mètre
MP	Matricial particles containing gases,
MRI	Magnetic resonance imagery
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor
mV	Millivolts
N <sub>2</sub>	Dinitrogen
NCL	Nanocapsules lipidiques
NF	Neurotrophic factor
NLC	Nanocapsules lipidiques
Nm	Nanometer

NO	Nitric oxide
o/w	Oil/water
O <sub>2</sub>	Dioxygen
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydispersity index
PEG 660	Polyethylene glycol 660
PF	Perfluoro
PF68	Pluronic F68
PFC	Perfluorocarbons
PFCE	Perfluoro-15-crown-5-ether
PFP	Perfluoropentane
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
PMM	Poids moléculaire moyen
PVA	Poly (vinyl alcohol)
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PXL-L	Liposomes loaded with paclitaxel
RF	Resonance frequency (
Rpm	Rotation par minute
SF6	Sulfur hexafluoride
SIC	Saturated interfacial concentration
SPG	Shirasu porous glass membranes
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide
T-JMD	T-junction microfluidic device
US	Ultrasounds
ZP	Zeta potential
T	Temps de relaxation

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>Figure 1</b> : Schéma d'une microbulle classique	<b>21</b>
<b>Figure 2</b> : applications cliniques de la sonoporation	<b>22</b>
<b>Figure 3</b> : représentation schématique d'une NCL	<b>25</b>
<b>Figure 4</b> : représentation schématique du concept à la base de la formulation du système développé	<b>26</b>
<b>Figure 5</b> : Evolution de l'élasticité en fonction de la concentration en Solutol® pour la solution de Solutol®	<b>124</b>
<b>Figure 6</b> : Evolution de l'élasticité en fonction de la concentration en Solutol®	<b>125</b>
<b>Figure 7</b> : Evolution de l'élasticité conservative en fonction des différentes concentrations.	<b>128</b>
<b>Figure 8</b> : Evolution de l'élasticité dissipative en fonction des différentes concentrations.	<b>129</b>
<b>Figure 9</b> : Evolution du temps de relaxation en fonction des différentes concentrations.	<b>130</b>
<b>Figure 10</b> : Dépôt des particules de NCL sur la balance de Langmuir	<b>134</b>
<b>Figure 11</b> : Adsorption des particules de NCL sur la balance de Langmuir	<b>135</b>
<b>Figure 12</b> : Evolution de pression de surface en fonction du temps	<b>135</b>
<b>Figure 13</b> : Aspect de l'échantillon avant (à gauche) et après application de la pression (à droite)	<b>168</b>
<b>Figure 14</b> : observations des bulles au microscope optique avant et après modification de la pression extérieure.	<b>169</b>
<b>Figure 15</b> : photographies des bulles observées en microscopie confocale.	<b>172</b>
<b>Figure 16</b> : photographies des bulles formulées avec des m élanges « NCL+ surfactants hydrophiles »	<b>194</b>
<b>Figure 17</b> : Chromatogramme de l' Ac dans l'eau	<b>213</b>
<b>Figure 18</b> : Chromatogramme de l'Ac dans le mélange Méthanol+eau+NCL	<b>213</b>
<b>Figure 19</b> : tension superficielle d'équilibre d'un mélange à $6.10^{-3}$ molaire de tween et $5,3.10^{-3}$ molaire de Solutol®	<b>220</b>
<b>Figure 20</b> : évolution de la tension superficielle en fonction du temps après addition de sel	<b>221</b>
<b>Figure 21</b> : Images prises au microscope optique des bulles obtenues par production in situ de CO <sub>2</sub> .	<b>225</b>
<b>Figure 22</b> : Caractéristiques de taille des bulles obtenues suivant la méthode de sonication	<b>227</b>

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau 1 :</b> Caractéristiques des bulles générées en utilisant différentes tailles ou différentes dilutions de NCL. dil= dilution	<b>166</b>
<b>Tableau 2 :</b> Liste des tensioactifs lipophiles et les proportions évaluées.	<b>177</b>
<b>Tableau 3 :</b> Tensioactifs hydrophiles et concentrations (m/m) utilisées.	<b>178</b>
<b>Tableau 4 :</b> Récapitulatif des caractéristiques des viscosifiants utilisés.	<b>180</b>
<b>Tableau 5 :</b> Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL après ajout de tensioactifs hydrophiles.	<b>183</b>
<b>Tableau 6 :</b> Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL après ajout de viscosifiant.	<b>184</b>
<b>Tableau 7 :</b> Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL formulées avec les tensioactifs lipophiles	<b>185</b>
<b>Tableau 8 :</b> Tailles hydrodynamiques des NCL formulées avec les surfactants lipophiles. Tailles mesurées à J7.	<b>186</b>
<b>Tableau 9 :</b> Températures d'inversion de phase détectées lors du refroidissement	<b>187</b>
<b>Tableau 10 :</b> Effet des viscosifiants sur le temps de migration	<b>188</b>
<b>Tableau 11 :</b> Caractéristiques des bulles formulées à partir des NCL modifiées	<b>189</b>
<b>Tableau 12 :</b> Tailles des bulles formulées en utilisant les NCL modifiées ou les mélanges de NCL + tensioactifs hydrophiles.	<b>190</b>
<b>Tableau 13 :</b> Composition des NCL contenant du Span® ou du SPEG	<b>190</b>
<b>Tableau 14 :</b> Tailles des NCL contenant des proportions variables de Span® ou de SPEG.	<b>191</b>
<b>Tableau 15 :</b> Cycles d'inversion de phase des NCL contenant du Span® ou du SPEG	<b>191</b>
<b>Tableau 16 :</b> Volume total de bulles obtenu en utilisant les NCL Span® ou NCL SPEG.	<b>192</b>
<b>Tableau 17 :</b> Caractéristiques des bulles formulées à partir des mélanges de NCL+surfactants hydrophiles.	<b>195</b>
<b>Tableau 18 :</b> Tailles des bulles formulées en utilisant les mélanges de NCL + viscosifiants	<b>196</b>
<b>Tableau 19 :</b> Tailles des bulles formulées en utilisant les mélanges de NCL+viscosifiants	<b>197</b>

<b>Tableau 20</b> : Composition des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence du Solutol®, du Lipoid® et du Labrafac®	<b>199</b>
<b>Tableau 21</b> : Températures d'inversion de phase des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence des différents constituants.	<b>200</b>
<b>Tableau 22</b> : Caractéristiques physicochimiques des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence de chaque constituant.	<b>200</b>
<b>Tableau 23</b> : Caractéristiques des bulles formulées pour l'évaluation de l'influence des constituants contenus dans les NCL.	<b>201</b>
<b>Tableau 24</b> : Distribution des bulles obtenues en modifiant la quantité de chaque constituant présent dans les NCL.	<b>202</b>
<b>Tableau 25</b> : Gamme de concentration pour la détermination du taux d'encapsulation	<b>210</b>
<b>Tableau 26</b> : Gamme de concentrations pour la détermination de la droite de calibration.	<b>211</b>
<b>Tableau 27</b> : Vérification de passage de l'actif	<b>212</b>
<b>Tableau 28</b> : Proportions utilisées pour l'évaluation de l'influence des interférences	<b>213</b>
<b>Tableau 29</b> : Résultats de l'encapsulation de l'actif pharmaceutique dans les NCL et les bulles (méthode directe)	<b>216</b>
<b>Tableau 30</b> : résultats de l'encapsulation de l'actif pharmaceutique dans les NCL et les bulles (méthode indirecte)	<b>216</b>
<b>Tableau 31</b> : Résultats de l'étude de libération.	<b>216</b>
<b>Tableau 32</b> : Propriétés physicochimiques du bicarbonate de sodium et de l'acide citrique	<b>223</b>
<b>Tableau 33</b> : Récapitulatif des différents essais de formulation et leurs résultats.	<b>224</b>
<b>Tableau 34</b> : Condition opératoire pour la formulation des bulles par sonication	<b>226</b>

## ***SOMMAIRE***

<b>Liste des excipients utilisés</b>	<b>15</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>17</b>
<b>Revue Bibliographique</b>	<b>28</b>
Revue bibliographique- article 1: microbulles utilisées comme vecteurs de médicaments	
<b>Chapitre 1 : Evaluation des propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques- article 2</b>	<b>61</b>
<b>Chapitre 2 : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau</b>	<b>102</b>
Diffusion de nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau- <b>article 3</b>	<b>104</b>
Rhéologie interfaciale de nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau	<b>120</b>
Comportement des nanocapsules lipidiques et qualité du film formé à l'interface air/eau évaluée par balance de Langmuir.	<b>131</b>
<b>Chapitre 3 : formulation des microbulles d'air</b>	<b>137</b>
Microbubbles stabilisées par des nanocapsules lipidiques(LNC)- <b>article 4</b>	<b>138</b>
Informations complémentaires	<b>165</b>
<b>Chapitre4 : Amélioration de la formulation des microbulles d'air</b>	<b>173</b>
<b>Chapitre 5 : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique</b>	<b>204</b>
<b>Discussion générale</b>	<b>218</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>232</b>
<b>Références</b>	<b>236</b>
<b>Annexes</b>	<b>258</b>
Curriculum vitae	<b>258</b>
Article 5:Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers	<b>264</b>



## ***LISTE DES EXCIPIENTS***

<b>Nom commercial utilisé</b>	<b>Appellation pharmacopée et/ ou désignations utilisé(s)</b>
Solutol® HS 15, Kolliphor HS 15, Labrafac® WL 1349 ou Labrafac® CC Lipoïd® S75-3	Hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660, macrogol 15 hydroxystéarate, polyoxyl 15 hydroxystéarate, Solutol® Triglycérides de l'acide caprylique /caprique, Labrafac®  Phosphatidylcholine /phosphatidyléthanolamine, lecithine de soja, Lipoïd®
DIO 275 DID 7775	3, 3'-dioctadécylloxacarboaniline perchlorate 1, 1'-dioctadécyl-3, 3, 3', 3'tetraméthylindodicarboaniline-4-chlorobenzènesulfonate
Top Fluor PC 810181	1-palmitoyl-2-(dipyrroéthèneborondifluoride)undecanoyl-sn-glycérophosphocholine
Cholesteryl Bodipy® FL C <sub>12</sub>	CholEsteryl 4, 4-Difluoro-5, 7-Diméthyl-4-Bora- 3a, 4a-Diaza-s-Indacène-3-Dodécanoate
Nile Red	Nile blue oxazone, 9-diéthylamino-5-benzo[α]phénoxazinone
Transcutol® HP Labrafil® M 1944 CS Captex® 8000 Cremophor A 25 Cremophor A6 Miglyol® 812 Plurol® Tween® 20,40 Tween® 60,80 Span® 20, 40, 60,80	Monoéthyl éther de diéthylène glycol Oleoyl macrogol -6 glycérides, oleoyl polyoxyl-6 glycérides Glycéryl tricaprilate, tricaprilate de glycérol Polyoxyl 25 cetostéaryl éther, Cetareth-25 ; Polyoxyl 6 cetostéaryl éther, Cetareth-6/ stéaryl alcool Triglycérides de chaîne moyenne Plurol® oléique, 6-dioléate Polysorbate 20, Polysorbate 40 Polysorbate 60, Polysorbate 80 Laurate de sorbitane, palmitate de sorbitane, stéarate de sorbitane, oléate de sorbitane
Lauroglycol™90 Capryol PGMG Sucoesters docusate de sodium	Monolaurate de Propylène glycol monocaprilate de propylène glycol type I Suco Es, esters de saccharose, esters de sucrose Diocetyl Sulfosuccinate de sodium
stéarate de PEG300, 400, 600 Lutrol®F68	Stéarate de Polyoxyéthylène, SPEG,  Poloxamer 188, F68

Lutrol® F127	Poloxamer 407, F 127
Capmul MCM EP	Caprylocaprate de glycerol
Capmul 907 P	monoheptanoate de Propylène glycol
Capmul MGO-50	Oléate de glycerol
Capmul MCM C8 EP.	Caprylate de glycérol
PEG 200, 300, 400,4000	Macrogol 200, 300, 400, 4000
Alginate de sodium	Alginate de sodium
Acide hyaluronique	
Chitosan	Chlorhydrate de chitosan
Carboxyméthylcellulose sodique	Carmellose sodique

*Introduction générale*

### Aspect pharmacologique

Comme l'énonce le philosophe Paracelse, « tout médicament est un poison, c'est la dose qui fait la différence ». Aussi, la prise de tout médicament comporte un risque inhérent qui pourrait être réduit lorsque la dose est optimisée. En effet, la plupart des substances à effet thérapeutique, ont besoin d'interagir avec des récepteurs pour être internalisées dans une cellule et atteindre si nécessaire les organites cellulaires. Ces récepteurs sont généralement localisés à la surface des cellules et sont de nature variable permettant de les classer en différentes catégories. Ces dernières permettent de définir les grandes classes pharmacologiques du médicament. Une substance active sera donc avantageusement utilisée pour traiter un site qui comportera le maximum de récepteurs sur lesquels elle est sensée agir. En situation pathologique, la liaison au site d'intérêt, va produire l'effet thérapeutique escompté tandis que d'éventuelles interactions avec d'autres sites peuvent provoquer des effets secondaires ou notoires.

### Historique des nanotechnologies

Jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle, les stratégies de traitement reposent principalement sur des approches qui consistent à administrer le médicament dans l'objectif de maximiser l'effet thérapeutique sans forcément parvenir à contrôler les effets secondaires. Ces derniers sont classés selon leur gravité. Ceux liés à l'administration des anticancéreux, de certains Anti-inflammatoires [1–5] et anti-infectieux (bactériens et fongiques) [4,5] sont réputés être les plus dangereux. Comment maximiser l'effet thérapeutique tout en réduisant ou au mieux supprimer les effets secondaires est entre autres une interrogation qui a longtemps occupé l'esprit des chercheurs. De plus, ces derniers doivent aussi se préoccuper de problèmes comme la biodisponibilité du médicament et la dégradation *in vivo* de certaines molécules actives. Les chercheurs se sont trouvés démunis face à ces limitations importantes limitant sensiblement l'efficacité des stratégies thérapeutiques.

A la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation des nanotechnologies s'est imposée dans de nombreux domaines scientifiques et donc aussi celui de la médecine. Progressivement, la nanomédecine a fourni des solutions intéressantes face aux multiples défis restés jusque-là sans réponse [6–10]. Grâce à ce concept novateur, la recherche médicale a pris une nouvelle tournure ayant pour seul et commun objectif l'amélioration des médicaments existants et dont l'utilisation comporte un risque notable pour le patient. Cependant ce n'est qu'en 1974 que le terme nanotechnologie a été suggéré et se définit par « The National Nanotechnology Initiative » comme étant la manipulation de matériau à l'échelle nanométrique de taille comprise entre 1 nm et 100 nm [11,12]. Par déduction, la nanomedecine est considérée comme l'application des nanotechnologies à la médecine.

Des vecteurs issus de la nanomedecine et appelés nanovecteurs ont été développés parmi lesquels les liposomes se placent comme chefs de file et ont vu le jour en 1960. On peut citer aussi les nanoparticules (nanocapsules et nanosphères) et les microbulles de gaz. La vectorisation à l'aide de nanovecteurs permet d'incorporer le médicament au sein du vecteur afin de l'adresser spécifiquement aux organes/cellules malades tout en préservant les organes/cellules sain(e)s. Bon nombre de médicaments ont été développés et commercialisés depuis la découverte des liposomes. C'est l'exemple des spécialités Myocet<sup>®</sup> et Ambisome<sup>®</sup> contenant respectivement la doxorubicine et l'amphotéricine B qui ont permis de réduire les effets notoires de ces molécules.

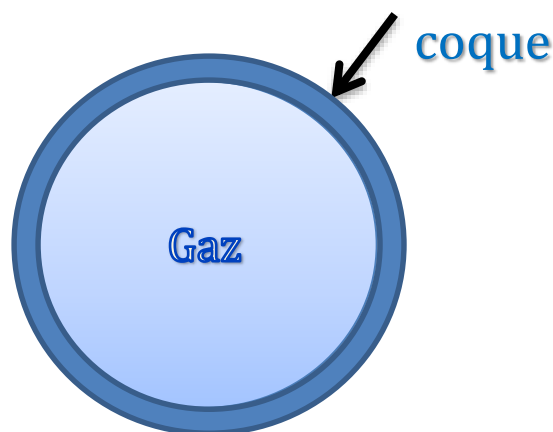
Mais les chercheurs n'ont pas été au bout de leur peine du fait de la difficulté de contrôler la libération du principe actif véhiculé par le vecteur. Pour venir à bout de cette difficulté, on a pu formuler des liposomes dont les propriétés physico-chimiques se prêtent à certaines modifications chimiques ou physiques afin de pallier la libération aléatoire du médicament vectorisé. Plus tard, d'autres chercheurs ont eu recours avec succès aux ondes électromagnétiques (dont les rayons X) ou ultrasonores pour contrôler la libération du médicament. C'est dans cette optique que les microbulles de

gaz ont été proposées comme une alternative à la libération non contrôlée du médicament. Parmi les avantages liés à leur utilisation, nous citons entre autres, la libération *in situ* du principe actif à un moment désiré en appliquant les ondes ultrasonores au plus proche (sonde US sur la peau, ou internalisée) de la cible.

### Notions sur les microbulles de gaz

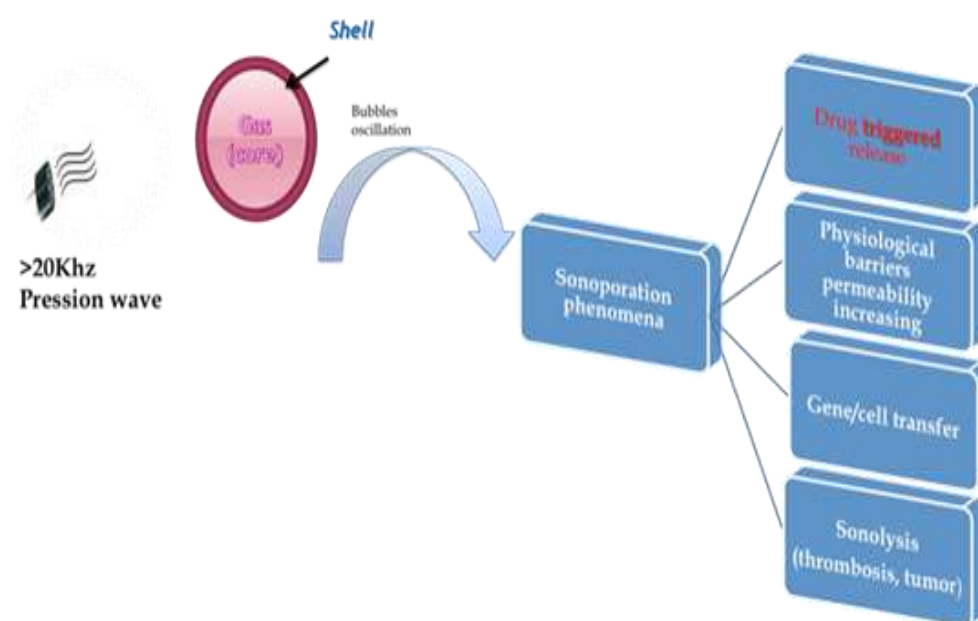
Les microbulles de gaz peuvent être définies comme des systèmes sphériques à cœur gazeux entouré d'une coque et dont la taille ne doit pas dépasser 10  $\mu\text{m}$  (figure 1) [13,14]. Elles sont utilisées depuis 1968 comme des agents de contraste en échographie [15]. A l'origine, des microbulles de dioxyde de carbone ont d'abord été utilisées, suivies par des microbulles d'air. Récemment, ce sont des microbulles contenant des gaz plus denses que l'air tels que les dérivées du perfluorocarbone qui font l'objet d'une attention particulière [15,16]. Les premières microbulles étaient assez rudimentaires avant que celles à coque ne viennent les remplacer définitivement car plus stables et résistant mieux à l'ensemble des phénomènes liés aux conditions d'utilisation physiologique. La caractéristique échogénique des microbulles de gaz résulte de leur capacité à renvoyer l'écho ultrasonore à une fréquence proche de leur fréquence de résonance. Elles sont aussi capables d'osciller sous l'effet d'une onde de pression appliquée à une fréquence et à une intensité bien définies. On parle donc du phénomène de cavitation qui survient à partir d'une valeur seuil d'index mécanique appelée seuil de cavitation. Le seuil de cavitation dépend aussi bien des facteurs propres à la microbulle (son rayon, la nature de sa coque, le type de gaz) mais aussi des facteurs environnementaux (pression acoustique locale, densité du milieu etc) [17,18]. Trois types de cavitation avec des résultats très différents sont distingués en fonction de la valeur de l'index mécanique (IM). La cavitation acoustique survient lorsque la valeur de l'IM est au-dessus de 1 et est responsable de la genèse des bulles. Pour des valeurs d'IM comprises entre 0,1-0,5 ; on assiste plutôt à une cavitation stable conduisant à l'oscillation stable des bulles. Lorsque l'IM est supérieur à 0,6, la cavitation est de type transitoire ou inertielle avec pour conséquence la diffusion du

gaz ou encore une destruction complète des bulles [16,18,19]. Les cavitations (stable et inertielle) sont responsables de plusieurs phénomènes qui ont été depuis longtemps mis à profit en échographie médicale et dans bien d'autres domaines (figure 2) [20]. Récemment, l'application thérapeutique de certains de ces phénomènes a été mise en lumière. En effet, il a été constaté que l'association des microbulles et des ultrasons augmente la perméabilité de nombreuses barrières physiologiques telles que les membranes cellulaires, l'endothélium capillaire et la barrière hémato encéphalique (figure 2). La perméabilité est favorisée par la création des pores au niveau membranaire qui est connue sous l'appellation de « sonoporation » [21,22]. Grâce à la découverte de la sonoporation, les tentatives d'utiliser les microbulles comme systèmes thérapeutiques afin de contrôler de manière efficace la libération du médicament ont été jalonnées de succès. C'est l'exemple de Li et al. qui ont rapporté une meilleure accumulation du 10-hydroxycamptothecine (HCT) dans les cellules cancéreuses excitées par des ultrasons comparativement au cas contrôle sans utilisation d'ultrasons [23]. La combinaison des microbulles et des ultrasons serait donc une alternative non invasive pour une libération locale et ciblée du médicament.



**Figure 1** : Schéma d'une microbulle classique

## Sonoporation application



**Figure 2 : applications cliniques de la sonoporation et de la cavitation des bulles.**

La théranostique consiste à combiner le diagnostic et le traitement en associant un agent thérapeutique ciblé à un agent à visée diagnostique [13,24–27]. La théranostique est donc un domaine en plein essor mais malheureusement la taille micrométrique de la plupart des microbulles limite parfois leur adressage à certains organes en absence d'ondes ultrasonores focalisées. En effet lorsque le vecteur est administré, il doit pouvoir atteindre sa cible (organe, tissu, cellule) avant de libérer son contenu. Une fois dans la circulation sanguine, le vecteur peut se retrouver dans l'organe cible (via une vectorisation passive ou active) s'il peut traverser les capillaires qui sont soit fenêtrés (dotées de pores de 70 nm de diamètre) soit sinusoïdaux (pores de 1-3  $\mu\text{m}$ ) ou pénétré via la sonoporation. Dans le cas contraire et avant son élimination, le vecteur restera dans la circulation où il pourra servir à diagnostiquer et/ou à traiter des affections vasculaires.

Dans l'organisme sain les capillaires fenêtrés se retrouvent notamment dans l'intestin, les glomérules rénaux, les glandes endocrines, le foie). Les capillaires



sinusoïdaux concernent notamment le foie, la rate, la moelle osseuse. Toutefois lorsqu'un organe est sujet à une affection inflammatoire (cancer, infection bactérienne ou fongique), les capillaires peuvent devenir fenêtrés permettant au nanovecteur d'atteindre plus facilement sa cible si sa taille et sa forme le lui autorisent. Or, au regard des données de la littérature la plupart des microbulles formulées ont une taille qui dépasse considérablement la taille limite de 100 nm qui leur permettrait de traverser les capillaires fenêtrés [19,28,29]. Cela complique le ciblage passif des organes autres que le foie et la rate lorsque les ondes ultrasonores ne leur sont pas associées. C'est ainsi que certains auteurs ont démontré l'efficacité thérapeutique de microbulles de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$  et chargées en anticancéreux évaluées in vivo sur des modèles d'animaux de cancer du sein et du pancréas en appliquant des ondes ultrasonores sur l'organe cible [30–32]. La pénétration dans l'organe serait assurée par la création de pores au niveau de l'endothélium capillaire une fois la source d'ondes est appliquée. L'efficacité pourrait être majorée si les microbulles étaient de taille nanométrique. Or il reste difficile de mettre au point des nanobulles pour cibler des organes autres que le foie, le rein, la rate et les vaisseaux périphériques. Un autre obstacle réside dans les moyens de stabilisation des microbulles dont la stabilité cinétique est constamment remise en question du fait de l'importance de la pression de Laplace (différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur des bulles).

### **Justification du système développé**

Malgré les difficultés auxquelles font face les chercheurs lors de la mise au point des microbulles, plusieurs types ont été développés. Les systèmes thérapeutiques existants ont fait l'objet d'une revue présentée dans cette thèse. En procédant à un état des lieux de la littérature, nous avons constaté que la plupart des microbulles contiennent comme gaz un dérivé de perfluorocarbone. La plupart des travaux portent sur la thérapie génique et il existe un nombre réduit de microbulles chargées en substance active. Parmi ces systèmes thérapeutiques, les systèmes de liposome-microbulles sont les plus fréquents alors qu'ils ne sont pas dénués de certains

inconvenients inhérents à la structuration liposomale. De plus, le risque d'échappement du gaz de l'intérieur de ces systèmes, amène certains chercheurs à ajouter d'autres surfactants ou des polymères pour renforcer la coque. L'utilisation des polymères comme co-stabilisateurs n'est pas sans risque pour la santé du patient. A l'opposé, les formes capsules-microbulles chargées en principe actif sont rares. Le choix des constituants de la coque ainsi que de la méthode permettant d'incorporer simultanément le gaz et le principe actif ne sont pas chose facile.

En outre il y a peu de chercheurs qui ont réussi à développer des nanobulles ou des microbulles stables dans le temps et constituées d'air. La stabilité des bulles formulées est souvent peu discutée.

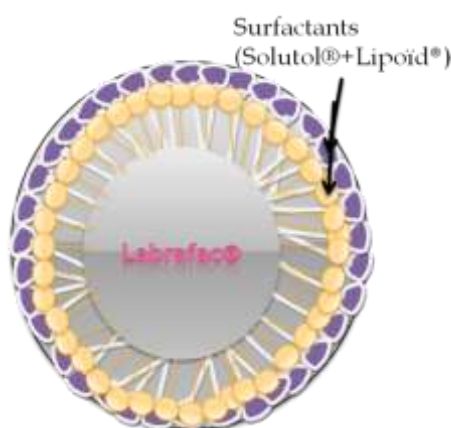
Développer une forme stable qui aurait des avantages sur les formes existantes est aujourd'hui de mise. C'est dans cette lancée que s'inscrit ce sujet de thèse qui vise à développer soit un système « Pickering » soit un système « Pickering Like » en se basant sur le concept des systèmes Pickering pour les systèmes émulsionnés. Les systèmes Pickering sont des systèmes dispersés dans lesquels le stabilisant classique est remplacé par une particule solide ou colloïdale, des microgels, des cristaux liquides, du latex et même par des bactéries ou des spores [33–39]. La stabilisation du système est dans le cas d'espèce assuré de façon irréversible par l'effet de mouillabilité de la particule stabilisante.

### **Système stabilisant (Les nanocapsules lipidiques : NCL)**

Nous avons pensé utiliser des nanocapsules lipidiques pour stabiliser des microbulles d'air espérant que ces dernières soient plus stables tout en maîtrisant leur distribution de taille.

Les NCL sont des nano vecteurs ayant vu le jour dans les années 2000. Il s'agit d'un système très monodisperse en taille à cœur huileux avec une coque lipidique (figure 3) [40–43]. Les principaux excipients utilisés pour leur formulation sont biocompatibles et biodégradables. Le labrafac WL1349 constitue le cœur huileux et l'association

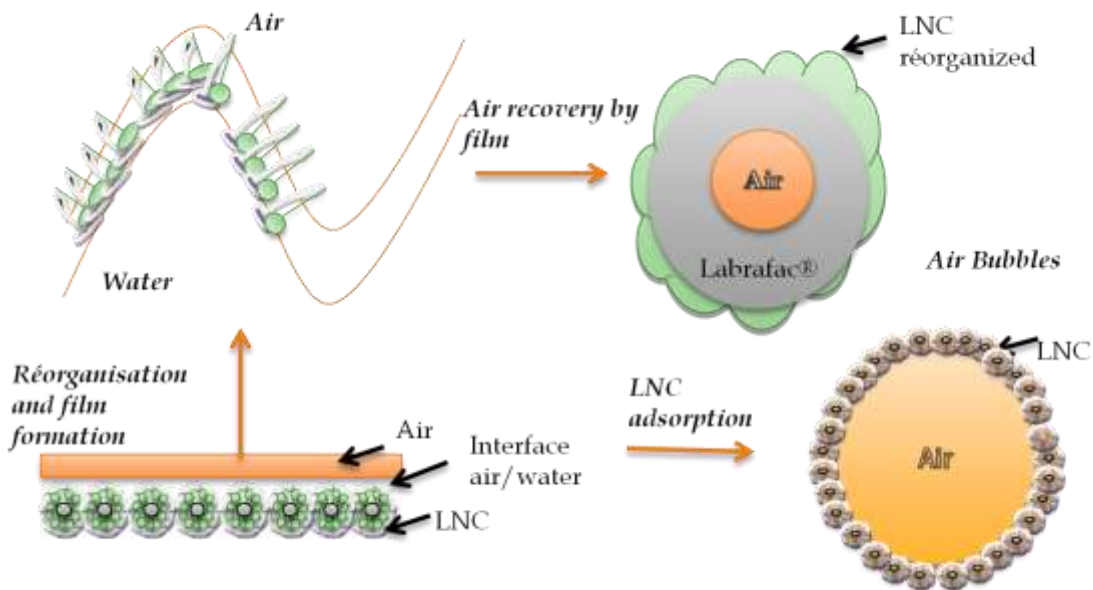
Solutol® HS 15 avec le lipoid® S75-3 forme la coque capsulaire. Elles sont préparées par une méthode rapide à basse énergie appelée méthode par inversion de phase de systèmes émulsionnés induite par effet thermique. En fonction de la quantité de chaque ingrédient incorporé on peut formuler trois tailles de nanoparticules : 25 nm, 50 nm et 100 nm [44]. La capacité des NCL à vectoriser (avec un très bon taux d'encapsulation) des substances actives de natures variées (hydrophiles comme hydrophobes) [45–47], des radioéléments [46,48], des fragments de gènes [49,49,50], des cellules souches [51,52] et tout récemment des huiles essentielles [53,54] a été largement étudiée au sein du laboratoire MINT.



**Figure 3** : représentation schématique d'une NCL

Toutefois les mécanismes de libération du principe actif par les NCL ne sont pas totalement élucidés. Un système NCL-microbulles pourrait permettre de mieux contrôler cette libération.

Par ailleurs, les études de Minkov et al. portant sur la stabilité interfaciale des NCL ont permis de conclure que certains types de NCL sont capables de former des films lipidiques lorsqu'ils se retrouvent à l'interface air/eau tandis que d'autres demeurent intacts [55,56]. L'utilisation des NCL comme stabilisateurs des microbulles aurait deux avantages : leur comportement filmogène à l'interface air/eau, et donc leur pouvoir de protection des bulles mais aussi leur pouvoir vectorisant d'actifs pharmaceutiques (figure 4).



**Figure 4** : représentation schématique du concept à la base de la formulation du système développé.

## Choix de la molécule encapsulée

Nous avons décidé d'incorporer dans les microbulles un modèle d'actif pour pouvoir évaluer l'influence des ondes ultrasonores sur sa libération. Le fusidate sodique a été choisi comme un bon modèle de médicament pour plusieurs raisons. D'abord il est doté intrinsèquement d'une certaine activité tensioactive, ce qui constitue un atout pour son intégration dans les NCL et donc pour son incorporation à la surface des bulles. Sa solubilité élevée dans l'eau facilitera son encapsulation. Il s'agit d'une molécule pas chère et facile à doser. C'est un antibiotique bactériostatique avec une concentration minimale inhibitrice faible (2mg/L pour germes sensibles), il serait donc possible d'envisager une évaluation in vitro sur des cultures bactériennes.

### **Objectifs de la thèse**

Il s'agit d'utiliser les nanocapsules lipidiques (NCL) pour développer les microbulles de gaz capables de libérer le médicament sous ondes ultrasonores. De cet objectif principal en découlent les spécifiques suivants :

- Etudier les propriétés tensioactives et rhéologiques des NCL,
- Mettre au point un système optimal de microbulles d'air
- Caractériser le système développé et étudier sa stabilité,
- Améliorer la méthode de formulation du système,
- Evaluer le système dans un champ ultrasonore à partir de l'encapsulation d'un traceur.

La présentation de ce travail se fera comme suit : après cette introduction, on présentera l'article de revue qui fait le point sur les systèmes thérapeutiques de microbulles développés au cours de ces dernières années. Dans le premier chapitre seront présentés les résultats sur le screening des surfactants et l'évaluation des propriétés tensioactives des NCL (article 2) à l'interface eau/air. Le second chapitre sera consacré à l'explication détaillée des propriétés rhéologiques et des mécanismes de stabilisation des bulles par les NCL. La 3<sup>ème</sup> publication portant sur une partie de ces résultats sera présentée. Le procédé de mise au point des microbulles sera présenté dans le chapitre 3 suivi de l'article 3. Dans le chapitre 4 il sera question des possibilités d'amélioration de la formulation des bulles. Le chapitre 5 traitera des tentatives d'encapsulation et de libération du principe actif dans un champ ultrasonore. Enfin viendront la discussion et la conclusion générales.

*Revue bibliographique-Article 1*

## **Revue bibliographique- article 1: microbulles de gaz utilisées comme vecteurs de médicaments**

### **Résumé**

Dans cette revue nous avons fait un état des lieux des microbulles développées pour être utilisées comme systèmes thérapeutiques.

Nous avons choisi de ne pas traiter des systèmes diagnostiques car ils sont intensivement décrits dans la littérature. Nous nous sommes donc limités aux formes thérapeutiques en nous intéressant à la description des différents modèles mis au point, aux stratégies d'incorporation du (des) principe(s) actif(s), aux avantages et inconvénients inhérents à chaque modèle. Enfin, nous proposons une discussion sur les principales applications thérapeutiques impliquant les microbulles. Cet état de l'art a préfiguré le choix des stratégies à privilégier pour aborder au mieux et dans sa globalité les objectifs de thèse.

## **A review: microbubbles used as drug delivery systems.**

C. Rosemonde .A. Mouzouvi <sup>1,2\*</sup>, Anita Umerska <sup>1</sup>, André K. Bigot <sup>3</sup>, Patrick Saulnier <sup>1</sup>

- 1) MINT, INSERM 1066, CNRS 6021, Univ Angers, Université Bretagne Loire, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers cedex France
- 2) Laboratoire de Pharmacie Galénique et de technologie Pharmaceutique, UFR Pharmacie, FSS, Université d'Abomey-calavi, Cotonou, Benin
- 3) Service de la Banque de Sang du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou, Benin

To whom correspondence should be addressed: [rosedescience@yahoo.fr](mailto:rosedescience@yahoo.fr)

Phone: 0022995566814

Present address: laboratoire de pharmacie galénique (Rosemonde MOUZOUVI)

05 BP 657 cotonou

Bénin

### **Abstract**

In the simplest and general case, gas bubbles are constituted by a gaseous core surrounded by a more or less sophisticated shell (thickness, type of molecular assemblies, external surface properties). In therapeutic applications, their size must not exceed 10  $\mu\text{m}$  to ensure a sufficient capillary vessels passage. Microbubbles are generally formulated even though some nanobubbles applications have been studied so far. They are commonly used as positive contrast agent in ultrasound imaging but also as contrast agents in Magnetic Resonance Imagery (negative susceptibility). Recently the sonoporation effect based on cavitation phenomena upper ultrasounds was discovered making gas bubbles able to modify the permeability of the cell plasmatic membrane. Gas bubbles can also constitute interesting drug carriers and we propose to review those used as therapeutic keys.



**Keywords:** Gas bubbles; sonoporation; theranostics, ultrasounds, therapeutic keys, drug carriers.

## **1. Introduction**

Gas bubbles (GB) are used as diagnostic tools but also in a lesser extent, as therapeutic ones. So far ago, they were used as diagnosis keys in ultrasonography since they can be visualized *in situ* by ultrasounds after transmission or reflection of appropriated ultrasonic waves [57]. These latter are also able to promote bubble oscillations that can transform the GB in ultrasonic sources. The total scan signal intensity is consequently enhanced during the scan progression [15,18,58,59].

The possibility to use GB in Magnetic Resonance Imagery (MRI) has been investigated due to the induction of large local magnetic susceptibility differences by the gas–liquid interface and to the local cavitation in an appropriated magnetic field [59–62]. Recently, the sonoporation phenomena resulting from inertial and stable cavitation were discovered and applied when GB are used as therapeutic agents for monitoring triggered drug release systems [22]; or in the field of gene or protein delivery [21]; or for the ultrasonotherapy (rheumatology, ophthalmology) and for the sonothrombolysis [21,22,63,64]. Regarding these applications, GB offer also the possibility to combine their diagnostic and therapeutic properties (theranostic systems) [24,65]. As other Drug Delivery Systems, GB can be functionalized to allow a specific targeting. A well-defined intensity of ultrasound exposition can release the drug only at the level of the concerned portion [26,66].

To prepare gas bubbles, sonication and agitation are the classical methods [67] even if co-axial electrodynamic atomization [68] and membrane methods [69,70] have been developed recently. Most of these methods produce bubbles with a mean diameter closed to 2 micrometers. Gases are either synthetic like heavy gases with a high density as perfluorocarbons derivatives or natural such as air, dioxygen (O<sub>2</sub>), dinitrogen (N<sub>2</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Concerning perfluorocarbons, most of them are gaseous at room temperature but some of them can be liquid (perfluoropentane).

In this case they become gaseous at body temperature or under an *in situ* insonation [71]. Thus, the stability and the behavior of bubbles will depend not only on their physicochemical properties (size, kind of the gas, etc.) but also on their shell composition.

Regarding literature, GB can be coated with albumin, dextrose [66,72], Chitosan [73,74], phospholipids [75,76], surfactants [77,78] or polymers[31,79] or again by combination of these components.

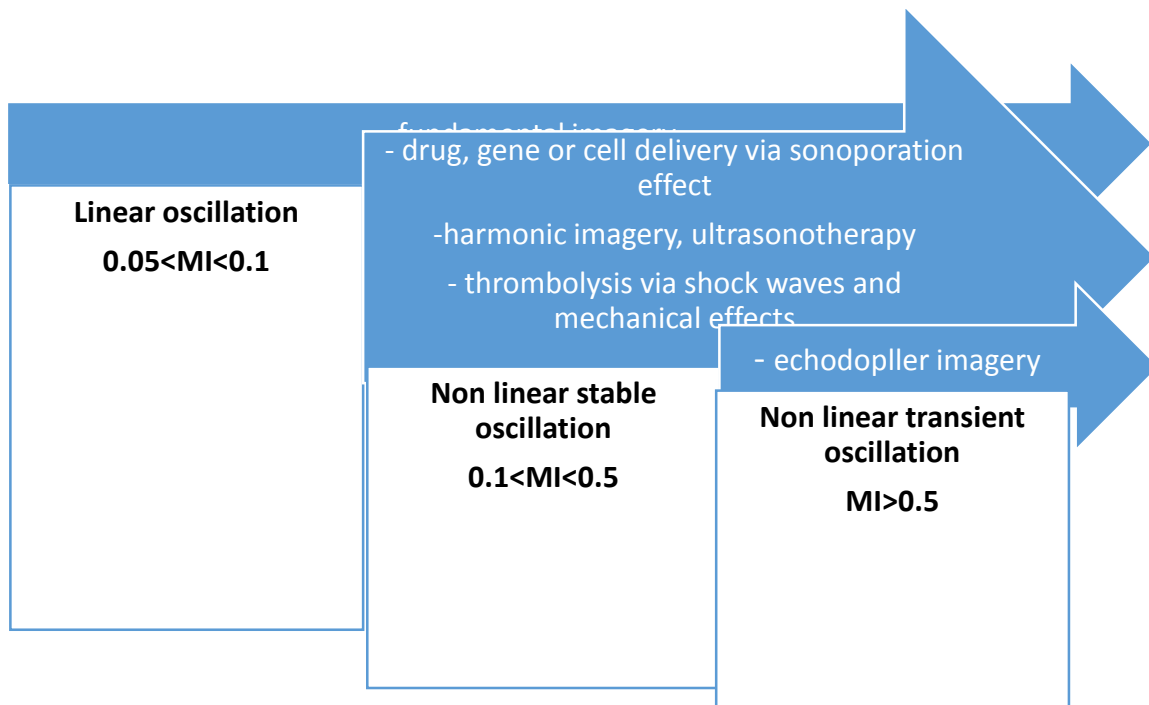
## **2. Cavitation phenomenon and consequences**

Cavitation is defined as a radial oscillation of gas bubble or streams bubbles in a liquid due to a rapid and irreversible pressure decrease at constant temperature. It is named acoustic cavitation when the pressure decrease is caused by an ultrasounds source with low frequency.

Except the cavitation consequently occurring to form new bubbles, there is also a bubble cavitation phenomena observed after applying ultrasounds with high frequency on preformed gas bubbles. Generally, bubbles cavitation is classified taking into account the mechanical index (MI) given by the following equation:

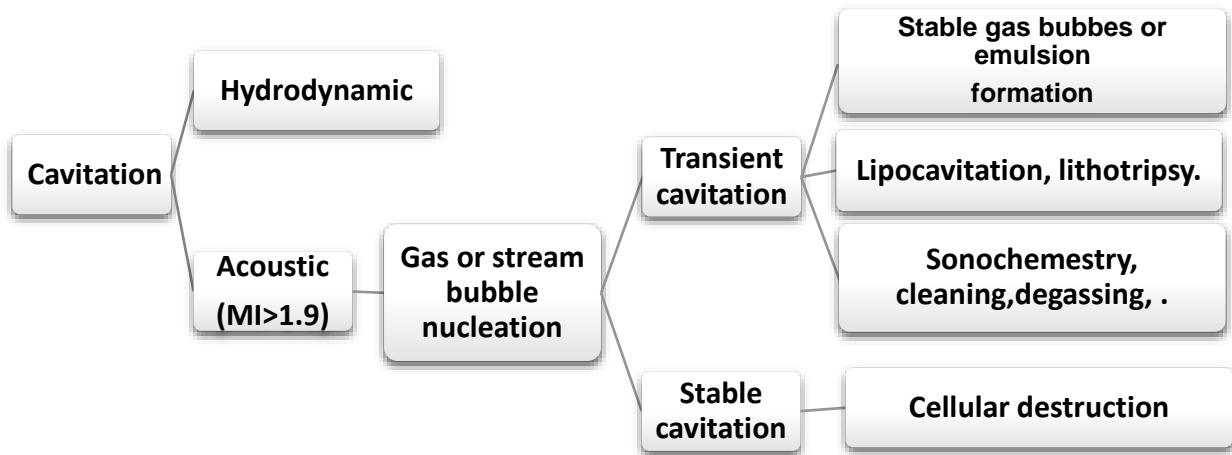
$$MI = \sqrt{\frac{P\text{-[MPa]}}{f\text{[MHz]}}}$$

**P** is the negative pressure amplitude at one point of the sample. **f** is the applied ultrasound frequency. Based on the MI values, different type of oscillation can be distinguished such as linear oscillation which occurs at  $0.05 < MI < 0.1$  and non-linear ones ( $MI > 0.1$ ). The non-linear oscillations include the stable or non-inertial one ( $0.1 < MI < 0.5$ ) and the inertial ones ( $MI > 0.5$ ) (fig1).



**Figure 1: Gas bubble oscillations under high frequency ultrasounds**

As described above, each type of oscillations corresponds to different medical applications [15,57]. The oscillation can be stable (stable cavitation) or not (transient cavitation). Once new-formed bubbles become unstable, they begin to oscillate (stable cavitation) and break up (transient cavitation) when they meet a hard surface. Their oscillation is responsible of many others effects. For example, in condition of stable cavitation, bubbles are known to induce micro electrical currents involved in the good internalization of drugs.



**Figure 2:** Acoustic cavitation phenomena under low frequency ultrasounds.

The transient cavitation can induce several phenomena like the formation of a liquid jet, the generation of shock waves, a local pressure and temperature increase and a generation of free radicals. These effects possess many applications in different fields. The cellular enhanced permeability is due to the micro-current, the liquid jet is used in the cleaning, lithotripsy and free radicals are used in sono-chemistry. The pressure and temperature increase can be used to entrap the soluble gas into stream bubbles previously formed. Then, under temperature and pressure modifications, surfactant molecules can form a shell around the GB increasing their stability [80]. Bubble nucleation generally starts from a standard value of pressure named cavitation threshold [81]. Indeed, this latter depends not only on the ultrasounds generator features (frequency, power) but also on the insonated medium characteristics (nature, composition, viscosity).

### 3. Formulation of bubbles

#### 3.1. Film hydration-sonication and single sonication method

In the case of sonication methods, ultrasound frequencies are ranged between 20 and 22 kHz with acoustic powers between 7 W and 300 W. The duration period of the insonation is generally from 20 seconds to 10 minutes. Without additional

operation, GB obtained from this method [82] are often polydispersed. The principle of film hydration-sonication is quite similar to the formulation of classical liposomes. Briefly, ingredients are dispersed in the solvent and a film is obtained after solvent evaporation. This film is then sonicated under gas purge to form liposomes gas bubbles (LGB) [66,83].

The mechanism that sustains the bubbles generation by single sonication method is the transient acoustic cavitation able to generate coated gas bubbles (CoGB) [67]. Indeed, firstly, the gas is dispersed to form a suspension of gas bubbles on which a coating of shell ingredients is rapidly adsorbed. Secondly, the high temperatures and pressures generated by inertial cavitation, leads to the chemical modification of the surface layer increasing its stability. In the case of protein-coated gas bubbles, the coating is induced by cross-linking catalyzed by the presence of superoxide from the sonolysis of water [84].

Bubbles can be produced by mechanical agitation following shearing, bubbling or cross-linking mechanisms. Different options can be used as high-shear stirring, single stirring, baffled high intensity agitation, mechanical vibration technique and mechanical agitation [30,85].

To overcome the problem of size polydispersity, some teams used various separating methods such as centrifugation, decantation (on a separator funnel or a syringe), filtration to eliminate biggest bubbles [67,86–88].

### **3.2. Continuous bubbling based on the Co-axial Electro Hydrodynamic Atomization**

This is a method recently and firstly developed by Farook [68,89] that allows the generation of more monodispersed microbubbles in a single step. Two coaxial needles compose the apparatus. Both are connected to an electrical generator. The gas is introduced through the inner needle whereas the outer needle is filled with the flowing liquid that can be charged in coating components. Both liquid and gas flows are regulated by syringe pumps. At the tip of the needles, the flowing liquid can

encapsulate the gas giving a jet with a conical form. This jet becomes unstable and breaks into many smallest gas bubbles. According to this approach, gas bubbles diameter ( $d$ ) are theoretically expressed by the following equation:

$$d = \left(\frac{Q\varepsilon_0\varepsilon_r}{k}\right)^{1/3}$$

$\varepsilon_0$  is the vacuum permittivity,  $\varepsilon_r$  is the relative permittivity of the liquid,

$k$  is the liquid conductivity,  $Q$  is the flow rate.

Indeed, the operation parameters such as the gas or liquid flow rates, the liquid density, the liquid viscosity and the electrical conductivity of both inner and outer phases must be carefully mastered. A study revealed that when the viscosity value was high, no conical jet was formed. Moreover, its formation was hindered with a decrease of the electrical conductivity or with an electrical voltage interruption [74]. According to the same study, the diameter of the outer and inner needles must be carefully chosen to expect a good formulation.

Gas bubbles coated by surfactants, phospholipids [90], polymers [91] and even dispersed gases (gas in glycerol) [68] were successfully formulated by this approach. This method can constitute an interesting alternative to produce multilayer particles just by using an adequate needles number [92]. Another great advantage of this method is the generation of particles with narrow size distributions. Unfortunately, these bubbles were not stable enough to enable measurements of echogenic properties although surfactants as polyethylene glycol stearate or tween 80 were added to reinforce the stability [74,90,93,94].

### **3.3. Membrane methods**

Various membranes were used to produce CoGB. Shirasu porous glass membranes (SPG) are the most common as the porous ceramic ones. The gas is injected under pressure through the membrane. GB are collected in the container filled with various liquids. Many conditions are required to obtain GB with suitable and

adequate size distributions. The type of surfactant is a decisive factor in the bubble size distribution. Cationic surfactants could cause a SPG plugging due to the electrostatic attraction between their positive charge and the negative charge of the membrane. It results in the generation of polydispersed particles with important mean diameters. On the contrary, anionic surfactant gives mono-dispersed particles with a smallest size due to the repulsion phenomena between them and the membrane. Other factors as surfactant concentration, liquid and gas flow rates, surface tensions, trans membrane/bubbles point pressure rate and membrane pores diameters could impact the GB size distribution and polydispersity [70,95–97].

### **3.4. T-junction microfluidic devices (T-JMD)**

Microfluidics is the science of handling and processing fluids in microchannels with narrow dimensions (one dimension smaller than 1 mm) [98]. In microfluidic methods, microchannel assemblages were used to produce GB with smallest polydispersity index values. Microchannels can be assembled in different ways as the T-junction design. The generation of gas bubbles with compatible sizes for an intravenous administration is possible when choosing channels with an inner average diameter lower than 5  $\mu\text{m}$ . Dispersed gas and coated gas bubbles are often produced using this method [99–101].

### **3.5. Other method**

Other methods can be found as nanoprecipitation [102], double emulsification–solvent evaporation [103,104], microemulsion [73,105]. It is important to note that in practice, several methods are combined for a better GB production as summarized in table 1.

**Table 1:** main methods of gas bubbles formulation used in therapeutic applications

	Agitation	Sonication	Membrane methods	CoEHA	T-junction microfluidic device
Advantages	Easy, quick, no costly	Easy, quick, less expensive	Generate monodispersed particles	Gives a small size distribution, possible multilayer particles generation	Gives a smallest polydispersity index
Inconvenient	Polydispersed Particles obtained without additional processing,	Polydispersed Particles obtained without additional processing,	Membrane characteristics and the type of shell ingredients to check	Particles unstable over time, many features to control	Gas flow to control
Type of particles generated	LGB, DSGB	LGB, DSGB	DSGB	DSGB, LGB, ,CGB	DSGB
Risk for hydrophilic drug encapsulation	No risk possible ,E*	No risk	Drug will be put only onto particles	Drug will be linked only onto particles, risk of denaturation	Only onto particles ,possible deterioration for the drug
Risk for hydrophobic drug encapsulation	No risk , possible E	No risk	No risk if PFC used	Easy , possible denaturation	Easy ,Risk of drug deterioration
Gas incorporation	Easy, higher gas holdup given	Easy	Easy	Easy	Easy

E= encapsulation PFC= Perfluorocarbons, CoEHA =Co-axial Electro hydrodynamic atomization, DSGB= Dispersed systems as gas bubbles, LGB=liposome gas bubbles, CGB=capsular gas bubbles, MP= matricial particles containing gases,

#### 4. Different designs of drug-loaded gas bubbles

##### 4.1. Liposomes gas bubbles (LGB)

Liposomes are vesicles constituted by two or several layers of phospholipids (depending on their formulation process) surrounding an aqueous core [106]. These layers delimit two kinds of compartments: two hydrophilic and one hydrophobic. There are mentioned among the earlier colloidal drug delivery systems that have been developed. LGB are formulated in addition with a gas, with the same components used



for classical liposomes and formed by film hydration-sonication or by film hydration-agitation method [23,30,107]. Some authors have introduced into the shell some excipients such as polyethylene glycol stearate, polyvinyl pyrrolidone to make shell more tight and resistant. Many teams reported that when molecules loaded-LGB and focused ultrasounds (US) were used, the drug delivery and drug effect were improved compared to other approaches as:

- i) co-injection of non-encapsulated molecules with blank gas bubbles and with US focusing,
- ii) non encapsulated molecules administration operating in the presence of focused US [65,108,109].

#### **4.2. Gas bubbles obtained from micelle suspensions (GBM)**

Micelles can also be considered as nanoparticles constituted by the self-assembling of amphiphilic molecules (phospholipids, ionic surfactants, proteins, non-ionic surfactants or polymers) forming one single layer [81]. The core can be hydrophilic or hydrophobic depending on the dispersion solvent. Based on the shell composition and the kind of solvent, micelles could be classified as normal or reversed. Many drugs can be entrapped into micelle however few data relating to GBM are available. Pharmaceuticals could be inserted inside, or onto micelles.

Phillips et al. [108] demonstrated that the rapamycin + US was able to penetrate in the aortic smooth muscle cells and cause 72 % of smooth cell proliferation reduction in comparison to controls. According to their study, anti-proliferative effect of GBM containing the perfluorobutane and prepared by sonication method was enhanced when combined with US. In their study the design of gas bubbles formulated was not specified clearly.

#### **4.3. Gas bubbles from polymeric or lipidic particles : MP and CGB**

These systems include usual capsular gas bubbles (CGB) or matricial particles containing gases (MP). The shell can have variable natures (lipids, polymers, proteins,

macromolecules or the mixture of two or several of these components). Matricial systems with many holes are obtained after solvent elimination via evaporation or freeze drying. In both cases, the drug is incorporated within the particles or at the surface after adsorption. For both systems, the gas incorporation remains a challenge where the bubble stability depends strongly on the shell composition. Therefore, lipidic surfactants were associated with polymers or straight multilayer systems were developed. In some cases, polymeric shells do not allow a sufficient stabilization if not associated with phospholipids. In addition, polymer coated bubbles have another major drawback because their shell is less elastic than lipidic ones. Consequently, very weak echoes are emitted during the sonication and their detection at low concentrations may be critical [79].

Bjerknes et al. [102] produced polymeric microspheres for imaging applications. They used an “in-house method” based on emulsification and freeze-drying to formulate hollow microspheres with high echogenic properties. However, these microspheres were prepared using camphene derivatives which are today forbidden because of their potential toxic effects.

Wheatley et al. [110] generated hollow poly (lactic-co-glycolic acid) (50:50) (PLGA) microcapsules with a size of 1.2  $\mu\text{m}$  by double emulsification solvent evaporation method. The acoustic properties of the particles were investigated *in vitro* in PBS and *in vivo* by imaging the rabbit kidney after measuring the dose-response, the time-response and the frequency-response. After 20 min of ultrasonication at 25°C , the signal attenuation and the resonance frequency (RF) were low respectively (4dB) and  $3.09 < \text{RF} < 3.49$  MHz. This RF value was lower than the expected value of particles with the same size but without a shell. This could mean that, when the shell is present, the response to the insonation frequency is impacted. The limit of their study is the presence of several toxic solvents and camphor representing a risk for an eventual blood administration.

Olbrich et al. [111] formulated air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles by three different methods: an one-step process, an one-step hydrolyzed method and

a two-step method. Particles obtained by the one-step process had the biggest size and a good shell thickness. Ultrasounds attenuation under different static pressure was assessed *in vitro* measuring two parameters after exposing particles suspension to different ultrasound frequencies:

- i) the degradation rate in the medium evaluated by  $T_{50\%}$  (as an acoustic half-life of particles in different media),
- ii) the mechanical stability to the medium static pressure evaluated by the  $P_{50\%}$  (The static pressure at which the area under the frequency-dependent ultrasound attenuation curve decreased to 50 % in comparison to the ultrasound attenuation curve measured at atmospheric pressure).

According to the authors, the observed high attenuation level of ultrasounds could be in relation with the microparticle destruction. They concluded that particles with large diameter (except those obtained by polymer hydrolyzed) presented the highest  $P_{50\%}$ . Furthermore, between the same particles sizes, the  $P_{50\%}$  was higher for those with more important shell thickness. To simulate *in vivo* medium, particles suspension were added to human serum, plasma or fresh blood and exposed again to the US waves. PBS (Phosphate buffered saline) + triton X 100 solution was used as a control medium. For the *in vivo* assessment, particles with higher shell thickness and formulated by the one-step method were most resistant to the degradation processes (maximum time to obtain an attenuation signal is greater than the limit of quantification: 5 dB/cm) which exceed 500 min in PBS medium. Particles obtained by a two-step method with lower thickness shell had the shortest time persistence in PBS but adverse results were observed in human serum or in the whole blood. The more stable formulation with the longest persistence time was the one prepared by the one-step method. The attenuation time (gas bubbles degradation time) is proportional to the polymer chains length, its weight and the pH of the medium. For example, gas bubbles coated with surfactant were able to oscillate at lower frequency in comparison to those coated with polymer and this despite the same size of both of them. [111].

Sciallero et al. [79] generated air drops, stabilized by poly (vinyl alcohol) (PVA) using the cross-linking method with a mean diameter of  $(4\pm 0.5)$   $\mu\text{m}$  and a shell thickness of  $(0.5\pm 0.3)$  nm. They assessed particles behavior via ultrasound imaging. A pressure amplitude of 23 KPa with a frequency range between 3.5-4.5 MHz was applied to start the bubbles oscillations whereas, breaking them required a pressure amplitude of 320 KPa. In the case of PVA-coated gas bubbles, the threshold pressure amplitude (23 KPa) to initiate their oscillation is more important than the one obtained in the case of lipid-coated gas bubbles.

Unloaded-MP can also be generated with a different protocol. In this aim, Liu et al. [112] conceived a hollow spheres gas bubbles using nanoparticles with a silica core and chitosan shell. At first, the authors prepared modified silica nanoparticles by mixing [4-Isocyanato-4-(3, 3-dimethyl-2, 4-dioxo-azetidino) diphenylmethane with a different commercial product, MIBK-ST in which 30 wt % of silica were dispersed in methylisobutylketone (MIBK). Modified silica nanoparticles were then cross-linked to chitosan leading to core-shell silica-chitosan nanoparticles. Finally, the silica was removed using a hydro fluoride gas producing holes into the particles. This step leads to microspheres, which were later filled with perfluoropropane. Once more, in this study, a derivate of chloroform was used requiring reinforced controls to avoid eventual toxicity to animals or humans.

Some authors have developed a device able to release *in situ* the gas. Min et al. [113] discovered a gas-generating device from a polymer where a carbonate function is able to produce carbon dioxide gas in contact with water. They synthesized [poly (cholesteryl  $\gamma$ -butyrolactone-b-propylene oxide)] used to develop polymer microsphere by double emulsification method. The *in vivo* echogenic property of the microspheres was performed on rat hearts. Results from this study highlighted that particles were able to release carbon dioxide within 70 minutes in comparison to 15 minutes for the brand contrast agent (Sonovue®). This difference was due to the gas retention in the holes of the microspheres surface after their release. Biocompatible ingredients were used as raw materials for the polymer synthesis, but the inconvenient

remains on use of toluene as solvent. Residues of such component could cause cancer after a long period exposition [113].

#### **4.4. Dispersed systems as gas bubbles: dispersed gas or coated gas bubbles**

Perfluorocarbons emulsions are systems constituted by a liquid derivate of perfluorocarbon in which the drug is solubilized. Both the perfluorocarbon derivate and the drug are dispersed in aqueous solution and stabilized by surfactants. In the gas aqueous suspensions, the gas (air, perfluorocarbons gases, etc.) is dispersed in water containing surfactants.

Some teams generated a Perfluoropentane (PFP) or Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) nanodroplets stabilized by block copolymers and containing the paclitaxel as a drug. Nanoemulsions (nanodroplets) were obtained under sonication of the micelle suspensions previously formed. Finally, the bubbles underwent a stable acoustic cavitation. Both of the two formulations were evaluated in animal models of breast and pancreatic cancers. Results showed an important regression of the tumor and a metastasis suppression [31].

The different designs of gas bubbles enumerated above are summarized in the tables 2 and 3.

To conclude, matricial particles are preferable as contrast agents whereas liposome gas bubbles can be used as interesting drug delivery systems. Liposomes gas bubbles are easy to produce compared with matricial particles. For their formulation, sonication, stirring or shaking are required to entrap the gas whereas in the case of the matricial particles, the gas introduction does not necessitate additional steps since holes generated during the solvent evaporation allow the gas locking up [112].

The other drawback of liposome gas bubbles is the use of co-stabilizers such as polydimethylsiloxane [114], Tween 80 [115] polyethylene glycol stearate [74,90] or polyvinylpyrrolidone [116] that were commonly added to the shell ingredients

compared with simple liposomes. These molecules reinforce the shell avoiding any gas escape and thus prolonging the liposome gas bubbles lifetime in the bloodstream.

Different designs are compared in the table 4.

**Table 2: Designs of Liposomes gas bubbles (LGB) used in therapeutic field and their characteristics**

Encapsulated Molecule	Gaseous core/ generation Approach	Shell Composition	Assessments	FU Frequency used	Md* and ZP*	DP* or EE*
Oxygen	PFpentane/ Sonication	Phospholipids +dextran +PVP	In vitro on cells	2.5±0.1 MHz	500 nm	
Neurotrophic factor	PFpropane/ sonication -incubation	Phospholipids	In vivo		2.5µm (radius)	
Hirudin	Sonication -lyophilization -passive encapsulation	Phospholipids	In vitro (physical properties versus salt amount) and in vivo			EE:(26.7-5.8) %
Hydrocamptothecin	PFpropane/ Film hydration	Phospholipids	tumor imaging, biodistribution, in vivo antitumor evaluation	1 MHz, duty cycle of 50 %, intensity of 2 w/cm <sup>2</sup> , duration of 6 min	(1.48 ±0.16) µm	EE=85.2 % and 12.8 %
Roziglitazone	Air/film hydration+ mechanic vibration	Phospholipids	In vitro (Drug release)			EE Superior to 90%
Calcein	Air/film -hydration +mechanic Vibration	Phospholipids	In vitro (Drug release)			

\*Md= mean diameter, PF= perfluoro , DP=drug payload, EE= encapsulation efficiency, FU= focused ultrasounds, ZP= zeta potential, LGB=liposomes gas bubbles, + means improved by US focused, - means efficacy not significantly improved by US focused, PVP=polyvinylpyrrolidone.

**Table 2: Designs of liposomes gas bubbles (LGB) used in therapeutic field and their characteristics (continued)**

Encapsulated Molecule	Gaseous core/ generation Approach	Shell composition	Assessments	FU Frequency Used	Md* and ZP*	DP* or EE*
Doxetacel	Hexafluoro sulfide ( SF6)/ film hydration	Phospholipids	In vitro Antitumor effect	0.8 Hz, 2.56 W/cm <sup>2</sup> , 50 % cycle Duty	Depending on the drug loaded	EE: (54.9±6.21) % and (46.3± 5.69) %
Resveratrol	PFC/ film hydration	Phospholipids +F68	Composition influence on physicchemical properties			> 90 %
Paclitaxel	PFpentane/ emulsification method	Phospholipids	In vitro (Apoptosis, viability assays) test	300 kHz, 0.5W/cm <sup>2</sup> , 30 seconds	(1.8±1.2) μm , zeta potential of (-9.6 ±3. 2) mV	(73. 1±1. 6) %.
Paclitaxel	PFpropane/ film hydration -mechanic vibration technique	Phospholipids	Particles destructibility, cellular uptake, in vitro antiproliferative effect	1 MHz, 4 W/cm <sup>2</sup> Each sonication cycle comprised five frames of 120 s at a duty cycle of 50 %	(1.07-1.33) μm	43%–63 %, depending on drug loading amount.

\*Md=mean diameter, PF= perfluoro, PFC= perfluorocarbons, DP=drug payload, EE= encapsulation efficiency, FU= focused ultrasounds, ZP= zeta potential, LGB=liposomes gas bubbles, + means improved by US focused, - means efficacy not significantly improved by US focused, LGB=liposome gas bubbles.



**Table 2: Designs of liposomes gas bubbles (LGB) used in therapeutic field and their characteristics (continued)**

Encapsulated Molecule	Gaseous core/ generation approach	Shell Composition	Assessments	FU frequency used	Md* and ZP*	DP* or EE*
Paclitaxel	PFpropane/ film hydration -mechanic vibration technique	Phospholipids	biodistribution, cellular uptake, in vitro antiproliferative effect, in vivo (breast cancer)		(2.37-2.57) $\mu\text{m}$ depends on amount and variety of phospholipids	60-140 %
Doxorubicin	PFpropane/ film hydration -space head gas incorporation + drug active encapsulation	Phospholipids	In vitro and in vivo studies (pancreas cancer)	In vitro: 1 MHz, 1W/cm <sup>2</sup> , duty cycle of 50 % for 20 s; In vivo: 1,3 MHz, MI:1,6	(1.0165±0.021 8) $\mu\text{m}$ .	(3.91±0.37×10 <sup>-8</sup> ) $\mu\text{g}/\text{MB}$ .
Methotrexate	PFpropane/ Agitation -lyophilization -hydration -lyophylization	Phospholipids	In vitro, in vivo study (brain delivery)	In vitro: 1 MHz, 10 % duty cycle, intensity of 1 W/cm <sup>2</sup> 10seconds. In vivo: 1 MHz, 20 % duty cycle, intensity of 2 W/cm <sup>2</sup>	(2.64±0.93) $\mu\text{m}$	EE= 8.91 %±0.86 %

\*Md=mean diameter, PF= perfluoro, DP=drug payload, EE= encapsulation efficiency, FU= focused ultrasounds, ZP= zeta potential, LGB=liposomes gas bubbles, + means improved by US focused, - means efficacy not significantly improved by US focused, LGB=liposome gas bubbles.

**Table 3: GBM, DSGB and theranostics designs of gas bubbles used in therapeutic field and their characteristics**

Encapsulated Molecule	Gaseous core/ generation approach	Shell Composition	Assessments	FU frequency used	Md* and ZP*	DP* or EE*
Rapamycin (GBM)	PFbutane/ Sonication	Phospholipids +polyethylene glycol stearate	In vitro Studies (drug release and proliferative assay)	1 MHz, 0.5 % duty cycle	(2.5±1.3) μm	EE= (20.6±5.8) %; DP= 29 ng per million
Doxorubicin/ Super Paramagnetic Iron Oxide (SPIO) nanoparticles (MP-theranostic)	PFC gas/ stirring-double emulsification evaporation-lyophilization	Poly (lactic-co-glycolic acid)	In vitro Doxorubicin release, In vivo evaluation	1 MHz transducer at 2 W/cm <sup>2</sup>	(868 ± 68.7 ) nm	Depending on MRI contrast agent amount initial introduced
Nitric oxide (NO) (MP-theranostics form)	NO/ cross-linking high shear stirring	poly (vinyl alcohol) (PVA)	In vitro NO release, ultrasound imaging, in vitro anticlotting effect		(4.6±0,4) μm	
Dioxygen (O <sub>2</sub> ) (nanosponge-theranostics form)	Dioxygen	Cyclodextrin	In vitro evaluation			
Paclitaxel (DSGB)	PF-15-crown-5-ether/ Sonication	Phospholipids	In vitro release and in vivo release(breast and pancreas cancer)		(300-500) nm	(96.5 ± 1.4) %

\*Md=mean diameter, PF= perfluoro, PFC= perfluorocarbons, DP=drug payload, EE= encapsulation efficiency, FU= focused ultrasounds, ZP= zeta potential, LGB=liposomes gas bubbles, + means improved by US focused, - means efficacy not significantly improved by US focused, GBM=gas bubbles from micelle suspensions, DSGB=dispersed system as gas bubbles, MP= matricial particles containing gases.

**Table 4: Comparison of different type of gas bubbles**

	Advantages	Inconvenient	Limit for HD* encapsulation	Interest for HD drug	Limit for HpD* encapsulation	Interest for HpD encapsulation	Oscillation Frequency of gas bubbles	Shell elasticity
LGB	Gas escape possible controllable by co-stabilizers addition, strong remanence upon US*	Gas escape tracking ,lyophilized form to have good stability	Possible competition between gas and drug(EE** reduced)	Possible Passive encapsulation	Passive encapsulation not Possible	Possible increase of EE by the gas	Low, gas bubbles more echogenic	Elastic
GBM							Low	Elastic
MP	Gas incorporation is easy	gas EE depending on the type of matrix used	Risk for drug to precipitate				High for polymeric matrix and low for lipid matrix	Less elastic for polymer and elastic for lipid component
CGB	Good preservation of drug	Possible gas escape, gas introduction difficult to control	Drug seldom incorporated since it is limited by the generation method				Depends on the shell composition	Depends on the shell composition
DSGB	Gas incorporation easy	Possibility to have a gas escape	Depends on the different ingredients used				Depends on the shell composition	Depends on the shell composition

\*HD= hydrophilic drug, HpD= hydrophobic drug, US= Ultrasounds, \*\*EE=encapsulation efficiency, LGB= liposome gas bubbles, GBM=gas bubbles from micelle suspensions, DSGB=dispersed system as gas bubbles, MP= matricial particles containing gases, CGB= capsular gas bubbles,

## 5. Shell modification of pre-existent bubbles

### 5.1. Gas bubbles (GB) coated with phospholipids

Some authors used single phospholipids to generate gas bubbles even if their stability was not evoked. Zhao et al. [107] have prepared microbubbles with a phospholipids shell and entrapping hirudin as a model drug. In this work, gas bubbles were formulated by sonication-lyophilization process. The drug was introduced by incubating its solution with a lyophilized sample. The NaCl effects on the physical characteristics were studied as well as the echogenicity and the drug loading efficiency (DLE). The DLE decreased whereas the salt concentration increased. The presence of the drug did not significantly reduce the microbubbles capacity to boost the echo signal (hirudin loaded-microbubbles versus hirudin unloaded-microbubbles).

Pancholi et al. [74] developed small microbubbles coated by phospholipids and containing air. Their characteristics were compared to other systems prepared by sonication.

Other authors used the combination of stabilizers to reinforce the gas bubble shell. The stabilizers could impede the gas dissolution and thus the gas bubbles coalescence. For example, Wrenn et al. [75] formulated microbubbles coated with a mixture of phospholipids and polyethylene glycol stearate and filled with sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) using a sonication method. They underlined that the inertial cavitation threshold depends on the shell chemistry, especially the molecule weight or the molar fraction of the polyethylene glycol stearate as we mentioned it above [79].

Hettiarachchi et al. formulated microbubbles with a polymer-lipid shell (phospholipids and polydimethylsiloxan). According to their evaluation, this polymer increased the lifetime and the functionality of particles [114].

## **5.2. Gas bubbles coated with proteins or polysaccharides**

Mulvana and coworkers [83] synthesized microbubbles coated with albumin after the dispersion of the gas into a water-albumin mixture. They prepared different particles with various albumin concentrations in the shell. Dextrose was added to the albumin before the sonication step. The best physical and acoustic properties were obtained with microbubbles formulated using 2 % of albumin-suspension comparing to those of 5 % or 10 %. Cavalli et al. [116] developed dextran-shell nanobubbles with a mean size of 500 nm. The stability was reinforced adding polyvinylpyrrolidone (PVP) and soy phosphatidylcholine (Epikuron 200®) as co-stabilizing components. Indeed, they underlined that particles with a shell containing PVP had smaller mean size and lower zeta potential comparatively with those without PVP. Moreover, the stability at 37°C over time was maintained. Particles were loaded with pentafluoro pentane, (liquid at room temperature) a gas with a great potential to dissolve oxygen used in this case as a therapeutic agent. Microbubbles activity was evaluated on cell cultures and highlighted a great capacity to deliver sustained oxygen to cells.

### **5.3. Gas bubbles coated by surfactants**

Kukizaki and colleagues [70] developed unloaded-microbubbles filled with air using various surfactants suspensions: an anionic surfactant: sodiumdodecylbenzenesulfonate, a nonionic surfactant: Tween 20 and a cationic surfactant: cetyltrimetyldodecylammonium bromide. The fabrication method was impacted by the type of surfactant influencing the particle size and polydispersity. According to this research, cationic surfactant microbubbles had better polydispersity induced by the electrostatic attraction between the formulation membrane (Shirasu-porous-glass membrane) and the surfactant.

Xing and coworkers [77] have developed a model of unloaded drug-microbubbles constituted by perfluorocarbon dispersed in water and stabilized by two surfactants: span 60 and polyethylene glycol 40 stearate. Bubbles were obtained by sonication with a constant purge of the gas. They separated the polydispersed bubbles on a separator funnel to recuperate bubbles with an average mean of  $(2.08 \pm 1.7) \mu\text{m}$ . Their shells offer a long lifetime stability when the sample was preserved keeping its head space filled with gas. Moreover, it is sometimes required to add perfluorocarbon gas before using freeze-dried microbubbles.

In the studies of Oeffinger et al. [117,118], ST68 microbubbles were generated by sonication followed by a gas purge. They investigated the effect of sonication time on the total volume of generated-microbubbles but also on their mean size and distribution. The effect of the centrifugation time on the acoustic property and bubbles size was also studied. The sonication time did not constitute an impacting factor for the formulation characteristics (mean size, the total volume of microbubbles) whereas *in vitro* acoustic measurement showed an improvement of the echoes transmission compared to the control (buffer). Furthermore, authors noticed that narrow size distributions with mean size ranged between 450-700 nm and depending on the centrifugation time and speed, was obtained considering lower bubbles collected by centrifugation. Moreover, the particle size decreased with the centrifugation time and

speed. The centrifugation time and speed diminished the number of microbubbles per milliliter with the necessity to increase the microbubble volume to obtain the same signal for *in vitro* acoustic evaluation.

#### **5.4. Layer-per layer approach**

Xing et al. [119] tried to improve ST68 particles reinforcing their surfactant shell with alternative multilayers constituted by opposite charges of polyelectrolytes. After the ST68 formulation, they performed the coating by the layer-by-layer self-assembly method. The layer by layer structure was confirmed by fluorescent spectra analysis and by zeta potential measurement after each layer deposition. A normal rabbit liver parenchyma was used in order to evaluate the ST68 ultrasonic imaging improvement. Results confirmed that the imaging was enhanced. The half-life of microbubbles in the bloodstream increased with the number of coating layers.

#### **5.5. Gas bubble modifications for targeting**

The treatment assisted by focused ultrasounds can be considered as a type of passive targeting because once the drug in the body, its releasing can be triggered by focused-ultrasounds at a precise location. Ultrasounds are usually used to deliver easily not only small molecules but also macromolecules like proteins. They have an important interest for small molecules presenting a resistance for their cellular receptor and which efficacy was limited by their weak ability to penetrate into the cell membrane. Therefore creating the pore in the cell membrane using the sonication could increase their entry inside the cell. Thus many authors prefer to associate ultrasounds and more usual drug delivery devices to enhance the drug availability [120].

Active targeting method can improve the specificity of passive targeting and make microbubbles selective targeting particles. Antibodies, polysaccharides and peptides are used as targeting fragments to assume the targeting specificity of microbubbles. Few cases were developed in literature. Maeda et al underlined a

sufficient availability of bleomycin with squamous cell carcinoma (Ca9-22) in the presence of microbubbles targeted with a fragment of Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody versus the control (without antibody) [121]. Brand microbubbles (Sonovue® from Bracco®) were incubated with a bleomycin solution to form a bleomycin-microbubble complex. The efficacy of the complex was assessed on ca9-22 cells. This complex was able to link the EGFR receptors at the cell membranes [122]. Chapuis et al. [120] demonstrated that the use of targeted microbubbles with sonoporation, could help to make a selective treatment. In their study, targeting was realized by the carbohydrate chemical function of bleomycin acting as a ligand. Bleomycin and the commercial microbubbles were previously conjugated with the biotin group and both were coupled via streptavidin link. The bleomycin-microbubbles complex, after sonication, was fixed only onto the sick cells and consequently increase the drug passage contrary to the Maeda study [120].

Yan et al. [32] showed similar results using microbubbles containing paclitaxel and perfluoropropane, grafted with a ligand (biotinylated LyP-1 peptides). The complex could recognize the expressed receptors at the surface of breast tumor cells. The presence of this ligand combined with US increased the drug efficacy.

## **6. Modalities of drug encapsulation in gas bubbles**

### **6.1. Small active molecules-loaded in gas bubbles**

#### **6.1.1. Active molecules incorporated into gas bubbles**

Many authors prefer this approach because of the drug protection from external factors which could cause its degradation or interaction with the surrounding medium. In this option, gas and drugs are either put together in the same compartment or in separated compartments depending on their physicochemical properties or compatibility. Perfluorocarbon gases are often used to increase the encapsulation efficiency of some pharmaceuticals inside the particles.

Li et al. [23] succeed to put the anticancer 10-hydroxycamptothecin (HCT) molecule inside LGB prepared by a film hydration solvent evaporation method. The HCT loaded-

LGB contains perfluoropropane which was introduced via the cap of stored vial and incorporated under mechanical vibration. For the *in vivo* assessment, animal models infected with Murine Hepatic H22 cells were used. Drug release and biodistribution into various organs (liver, kidney, lung, heart and spleen) were evaluated by measuring the drug concentration in the tissue. The *in vivo* efficacy of the liposome gas bubbles was studied by measuring the tumor volume after a LGB intravenously administration followed by ultrasonication. A huge accumulation of the drug into tumor tissues was observed as well as the inhibition of the tumor growth under US in comparison with the case without US [23]. Kopeček and coworkers [19] have introduced separately two molecules (rosiglitazone and calcein) in two different liposomes. The loaded-liposomes were prepared by a film rehydration method. Pharmaceutical actives were incorporated during the hydration step by adding mannitol solution containing the active substances. After the film hydration, the whole was lyophilized and reconstituted with deionized and air-saturated water. According to authors, the echogenic property was assured by the lipids composition of the mixture and the air contained in the water. The encapsulation rate of rosiglitazone was superior to 90%. The drug release was not influenced by the ultrasonication. However, the authors evidenced the existence of both inertial and stable cavitations, which generally underlie and explain the drug release upon US. They thus hypothesized that the generated pulses, the kind of LGB membrane and the density of the gas (air being slightest than perfluorocarbon gases) were incriminated in this non-release of molecules.

According to Ren et al. [28], Doxetacel-loaded microbubbles charged in hexafluoro sulfide (SF<sub>6</sub>) showed an efficient anti-tumor effect on the DLD-1 human adenocarcinoma cell line upon US application. The cytotoxicity was investigated by MTT assay (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide).

Fang and collaborators [123] formulated liposomes microbubbles loaded with an antioxidant (resveratrol). They produced particles by a modified film hydration method using phospholipid with or without coemulsifiers as coating excipients.



Resveratrol is a molecule poorly soluble. Its solubility was enhanced using coconut oil. The drug was introduced simultaneously with the others components. Gas rates were applied at 32 % and 16 % whereas oil level was used at 18 % and 1.8 %. Two gases were evaluated (perfluoropentane and perfluoro hexane). The authors concluded that the particle size increased when the gas and the oil levels increased. The encapsulation efficiency was better when low level of gas and high level of oil were incorporated simultaneously. Particles formulated using hexafluoro carbon possessed the highest sizes. Moreover, lowest particles sizes were observed with particles formulated with a lower quantity of oil and perfluorocarbon or after adding pluronic F68 (PF68) as coemulsifier. The encapsulation rate was more than 90 % for all formulations but decreased after adding coemulsifier. The drug release from PF68 - microbubbles shell was increased in the US field.

Liu and colleagues [29] have assessed lipids particles loaded with paclitaxel on ovarian cancer cells. The drug and the gas (perfluoropropane) were incorporated in the core of particles obtained by a modified emulsification method. Particles were characterized by a mean size ( $1.8 \pm 1.2$ )  $\mu\text{m}$ , a mean zeta potential of ( $-9.6 \pm 3.2$ ) mV and a drug entrapment efficiency equal to ( $73.1 \pm 1.6$ ) %. Cell viability and apoptosis were assessed. Concerning the *in vitro* evaluation, the group treated with paclitaxel-loaded microbubbles and US had the better proliferation inhibitory rate on cells culture.

#### **6.1.2. Active molecules-loaded liposomes cross-linked to gas bubbles (Lp-GB).**

Some authors argue that introducing the drug into one particle and the gas in another one could increase the drug-loading efficiency and likely could avoid the drug-gas interactions.

Yan and coworkers [124] demonstrated that a Lp-GB charged with paclitaxel could release a sufficient amount of the drug to the breast cancer cells *in vitro* or *in vivo*. In this work, two kinds of liposomes were prepared: the first ones are liposomes loaded with paclitaxel (PXL-L), the second are liposomes containing the gas (perfluoropropane.) (LGB). PXL-L formulated by film hydration solvent evaporation

method was linked to the LGB via a biotin-avidin linkage leading to a Lp-GB design. The mean size of Lp-GB was 2.5  $\mu\text{m}$  and the range of the encapsulation efficiency (EE) values was 60 % to 140 % in function of [(1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Biotinyl(PolyethyleneGlycol)2000)](DSPE-PEG2000-Biotin) concentration. 73.49 % of the initial paclitaxel was released under the ultrasounds.

Wang et al. [125] tried to formulate microbubbles loaded with methotrexate. They developed the complex MLL-LMB: methotrexate-loaded liposomes (MLL) combined to liposome microbubbles (LMB) via a biotin-avidin link. At first, methotrexate-loaded liposomes were prepared by mixing the methotrexate solution in NaOH 1M to the lipids suspension before proceeding the agitation phase. In a second time, LMB were obtained after saturating the headspace of the same suspension with perfluoropropane gas. The related carrier was evaluated *in vitro* on Walker 256 cancer cell lines by determining its ability to cause cell apoptosis. The cytotoxicity was respectively highlighted by flow cytometry after propidium diode marking and MTT assay methods. An *in vivo* evaluation of the vector was also performed using healthy Sprague-Dawley rats. Authors highlighted a sufficient drug delivery from the complex in the brain upon the US. The drug cumulative amount released in the brain was dosed by chromatography. The efficacy of the complex+US *in vitro* or *in vivo* was higher than the one without US and than Methotrexate-loaded LMB.

### **6.1.3. Electrostatic binding system (EBS)**

Some authors prefer an association of the drug to the shell based on electrostatic properties (ionic interactions). As we can notice with Tinkov et al. [30,85,126], the efficacy of the complex Doxorubicin-loaded-microbubbles combined to the US was demonstrated *in vitro* and *in vivo*. They developed liposomes with doxorubicin in their hydrophilic part. In their experiment, loaded liposomes were obtained using a film-rehydration method. The drug was solubilized in an Ethylene-diamine-tetra acetic acid (EDTA) +glucose mixture used to hydrate the film. After the hydration step, the preparation was saturated with octapropane gas during few

minutes before the stirring. During the formulation process, Doxorubicin with positive charges was blended to anionic lipids contained in the initial mixture of the shell. Doxorubicin-loaded microbubbles were tested *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro* investigations, three tests were carried out. The first concerned the *in vitro*-acoustic destructibility measurements in comparison to Sonovue® and to doxorubicin-unloaded-microbubbles. Secondly, the intracellular penetration of liposome microbubbles was evaluated by fluorescence confocal laser scanning microscopy (CLSM) on 293/KDR human kidney carcinoma cells. Finally, the anti-proliferative activity was assessed through the plate reader method on the similar cells. As the main result, it was shown a significant difference between the half-life of the commercial brand and the formulated microbubbles. Sonovue® had the smallest half-time due to the difference in the particle average size and lipid shell composition. Formulated microbubbles in the presence of the US impacted positively the cell proliferation.

The *in vivo* evaluation was performed on Lewis rat models implanted with pancreas carcinoma cells. After the tumors growing, animals were treated with Doxorubicin loaded-microbubbles and exposed to the US. Result showed that the formulation inhibited the tumor growing and increased significantly the Doxorubicin concentration in the tissues such as the lung, the kidney and the liver.

## **6.2. Gas bubbles loaded with hormones, proteins, peptides or growth factors**

Wang et al. [127] demonstrated the promotion effect of focused-ultrasounds combined with microbubbles on a neurotrophic factor release to the brain. Indeed, focused-ultrasounds combined with microbubbles could open the brain blood barrier without invasive side effect. Microbubbles (MB) were constituted by per fluoro propane surrounded by a biotinylated lipid shell to allow a chemical link with the neurotrophic factor (NF) previously grafted with similar biotin groups. The bridge between the microbubbles and the NF was established via a streptavidin group (a complex MB biotin-streptavidin-biotin NF). Male Sprague-Dawley rats were used for the experiment and were exposed to ultrasound waves after the complex injection.

The bioactivity of the NF was preserved despite the US focusing. The NF penetration in the brain was highlighted by its quantification after tissue removing. Zhao et al. focused their research on hirudin encapsulation. Indeed, hirudin an anti-clotting peptide used as a model drug was attached onto phospholipids-coated microbubbles by a sonication-lyophilization method. The chemical characteristics (mean size, echogenicity, encapsulation efficiency) of such system were evaluated in function of the amount of added electrolyte [107].

One can note that some teams evaluated the free drug releasing upon the insonation in the presence of unloaded commercial brand GB [19,81,128–130].

### **6.3. Theranostic systems ( table IV)**

Niu et al. [131] generated microbubbles coated with a poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) polymer following a modified double emulsification-evaporation method. Doxorubicin (Dox) was co-introduced with superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) nanoparticles inside perfluorocarbon microbubbles. The co- introduction influence was investigated on the encapsulation efficiency as well as the drug payload. No significant difference was noticed. The presence of SPIO did not impact the drug incorporation. Moreover, US imaging was reinforced by the presence of SPIO in the microbubbles. The same particle was evaluated for its role as contrast agent under ultrasonography, as contrast agent in MRI and as a triggered drug delivery system. Microbubbles upon ultrasounds released quickly their content with a leakage rate achieving 90 % within 2 days in comparison to 75 % in the case where no ultrasounds were applied.

Some gases such dioxygen (O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO) and even perfluorocarbons have demonstrated some therapeutic properties in several indications. Cavalieri et al. [132] formulated microbubbles loaded with NO. They were coated with a Poly Vinyl Alcohol polymer and formulated following a cross-linking/high shear stirring method. The gas was introduced into freezing-dried microbubbles following a 1 hour incubation.

The release rate (40 %) was measured in PBS during 2 hours upon ultrasonication. The inhibitory effect on clots formation (*in vitro*) was observed when microbubbles were used within 60 minutes following the opening of the microbubble container. Their efficacy for US imaging was also performed with success.

Perfluorocarbons can also be used as blood substitutes due to their high ability to solubilize oxygen. Riess et al. [133] (phase III clinical trial) have noticed that a perfluorocarbon emulsion reduced and avoided patient blood transfusion during surgery. According to Cavalli et al. [134], oxygen-loaded nanosponges without US were able to release quickly during the first minutes (and slowly after) their contain to a hypoxic medium with quantities and leakage rates which varied with the type of the used cyclodextrin ( $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\alpha$ , cyclodextrins). Release Rates increased about 58 % under Ultrasounds from the fourth minutes whereas no changes were observed for the oxygen solution used as a control. Particles were coated with the three cyclodextrins which had cross-linking property to fixe gases. The gas loading did not change up to 15 days in a 25°C storage condition.

## **7. Conclusion**

Microbubbles constitute today's a new tool for diagnostic and therapeutic treatment. They present some advantages in comparison with others particles which gave them some renewal. They exist in several designs. Each of the designs has its advantages and inconvenients. In summary between all of designs reviewed, liposomes microbubbles are commonly formulated and have an interest for researchers. Their core is made of perfluorocarbons gases. Their shell can be a lipid, polymeric or proteinic nature. Colloidal particles are seldom used for bubbles generation. Sonication method is easily used to generate stable bubbles.

### **Acknowledgments**

This study was funded by 'Service de Cooperation et d'Action Culturelle' of the French Embassy in Benin, by "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin" and by the "Faculté des Sciences de la Santé de Cotonou". The first Author of this article thanks the laboratory MINT, INSERM 1066, CNRS 6021 of University of Angers to accept her reception and to provide facilities for this research. Authors wish acknowledge also Ms Abdoul-razack OSSENI for English review.

*Evaluation des propriétés tensioactives des  
nanocapsules lipidiques- article 2*

## **Evaluation des propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau- article 2**

### **Contexte et résumé**

Ce travail initie les essais de formulation de microbulles. Il a pour objectif principal d'évaluer la potentialité qu'ont les nanocapsules lipidiques (NCL) à diminuer de façon intrinsèque la tension de surface à l'interface air/eau. De plus il s'agit ici de justifier l'utilisation des NCL en lieu et place du Solutol® (mélange d'hydroxy stéarate de PEG 660 et de PEG 660 libre) pour formuler et stabiliser des microbulles. Nous avons donc évalué cette capacité à baisser la tension superficielle en considérant comme solution contrôle, la solution de Solutol® à la même concentration que celle utilisée dans les NCL. En effet le Solutol® est le principal tensioactif hydrophile qui forme la paroi des nanocapsules lipidiques. Les phospholipides constituant le Lipoid® (surfactant de nature lipophile) renforcent la coque capsulaire des NCL. Le cœur lipidique est constitué d'une huile synthétique Labrafac® (mélange de triglycérides de chaînes moyennes). Différentes dilutions de la solution de solutol® et de la dispersion des NCL ont été préparées. Pour chacune d'elles, la tension de surface a été mesurée en utilisant les méthodes de Wilhelmy (lame à l'affleurement de la solution étudiée) et celle de la goutte pendante. Ces deux méthodes ont été considérées en tenant compte des limites que présente chacune d'elles obligeant ainsi à les combiner pour atteindre l'objectif fixé. En effet la méthode de la goutte pendante est très longue et ne permet pas la mesure des échantillons turbides. La méthode de Wilhelmy ne permet pas la mesure de la tension de surface à l'interface liquide –liquide.

La diminution de la tension superficielle par chaque constituant présent dans les nanocapsules lipidiques a été établie par la réalisation des mélanges binaires ou ternaires. De même, l'influence de la taille des NCL sur la valeur de tension de surface a été étudiée après leur adsorption à l'interface air/eau. Plusieurs paramètres



permettant d'apprécier le mécanisme de diminution de la tension superficielle par les NCL ont été déduits et interprétés à partir des valeurs des tensions d'équilibre obtenues. Parmi ces paramètres nous citons entre autres, la concentration de surface et le taux de recouvrement de l'interface air/eau qui sont deux paramètres importants à la compréhension de la stabilisation par les NCL. Cette étude a révélé la propriété tensioactive des NCL ou de leurs composants. Les NCL diminuent la tension superficielle de façon remarquable et mieux que le Solutol® seul en considérant les valeurs fournies par les deux méthodes et rappelons le, pour des échantillons de concentration égale en Solutol®. La valeur de tension superficielle obtenue à la concentration micellaire critique (CMC) était comparable à celle qu'on peut avoir à l'interface air/eau en présence d'un tensioactif classique.

La concentration de saturation interfaciale (CSI) déterminée pour les NCL est dix fois supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) du Solutol® seul quel que soit la méthode utilisée. A concentration égale de Solutol® (soit 0.049 mM correspondant à 0.111 mg/ml de LNC60), les taux de recouvrement étaient de 90 % et de 80% respectivement pour la solution de Solutol® et la suspension de NCL. L'analyse des mélanges binaires et ternaires permet de retenir que le Lipoid® n'intervient pas dans l'effet d'abaissement de la tension de surface pour les mélanges et donc pour les NCL même si les phospholipides sont connus pour diminuer la tension de surface. A l'opposé, il en ressort que le rapport Solutol®/Labrafac® joue un rôle capital dans la diminution de la tension de surface par les NCL. La taille des NCL ne constitue pas un facteur influençant pour la valeur de tension de surface. En effet, les valeurs de tension de surface obtenues à l'équilibre sont similaires malgré les tailles variables de NCL utilisées.

***Cet article est soumis au journal PLoS One***

## **Surface active properties of lipid nanocapsules**

Celia R.A. Mouzouvi <sup>1,2,3</sup>, Anita Umerska <sup>1,2\*</sup>, André K. Bigot <sup>4</sup>, Patrick Saulnier <sup>1,2</sup>

- 1) INSERM U 1066, 'Micro et Nanomédecines biomimétiques - MINT', Angers, France
- 2) Université Angers, UMR-S1066 Angers, France
- 3) Laboratoire de Pharmacie Galénique et de technologie Pharmaceutique, UFR Pharmacie, FSS, Université d'Abomey-calavi, Cotonou, Benin
- 4) Service de la Banque de Sang du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou, Benin

To whom correspondence should be addressed: [anitaumerska@yahoo.fr](mailto:anitaumerska@yahoo.fr)

Phone: 0033 244688566

Present address: INSERM U1066 (A. Umerska)

IBS-IRIS Niveau 3

Rue des Capucins

49933 Angers Cedex 9

France

**Abstract**

Lipid nanocapsules (LNCs) are biomimetic nanocarriers used for the encapsulation of a broad variety of active ingredients. Similarly to surface active compounds, LNCs contain both, hydrophilic and hydrophobic parts in their structure. Moreover, their components, macrogol 15 hydroxystearate (MHS) and lecithin are known for their surface active properties. Therefore, the aim of this paper was to investigate the capability of LNC to decrease the surface tension using two methods: the drop tensiometry and the Wilhelmy plate method.

LNCs with diameters of 30-100 nm were successfully obtained using a phase inversion technique. Their properties such as the hydrodynamic size and the zeta potential depended on the initial composition. LNCs exhibited lower limiting surface tension than did MHS (34.8-35.0 mN/m and 37.7-38.8 mN/m, respectively), as confirmed by both, drop tensiometry and Wilhelmy plate method. LNCs showed saturated interfacial concentration (SIC) 10 fold higher than the critical micellar concentration (CMC) of MHS or the SIC of binary and ternary mixtures of LNC ingredients. The SIC of the LNC formulations depended on the mass mixing ratio of MHS/triglycerides, but not on the presence of lecithin. The CMC/SIC values measured by Wilhelmy plate method were higher than those obtained using drop tensiometer because of longer duration of tensiometry measurement. In conclusion, the surfactant-like properties of the LNCs offer new possibilities for their medical and pharmaceutical applications.

## **1. Introduction**

Lipid nanocapsules (LNCs) are biomimetic nanocarriers, the structure of which is a hybrid between polymeric nanoparticles and liposomes. They contain an oily core composed of medium chain triglycerides surrounded by a surfactant shell made of a PEGylated surfactant and optionally lecithin or other co-surfactant [135,136]. All mentioned LNC components are approved by the FDA for oral, topical and parenteral administration[135]. A broad range of active ingredients, mainly drugs with lipophilic properties, has already been incorporated into LNCs, including fluticasone propionate [43], essential oil: eugenol, carvacrol and trans-cinnamaldehyde [53], paclitaxel [137], ibuprofen [45]. Recently, the interest to use LNCs as carriers for hydrophilic compounds (e.g. polymyxin B, calcitonin, antimicrobial peptides) using the adsorption processes has developed [136]. LNCs can be considered as carriers for various routes of administration, e.g. pulmonary [43,137], intravenous [138], oral and local delivery [42]. The advantages of the LNCs include small particle size (20-100 nm), good physical stability (18 months) and manufacture via a phase inversion temperature method, which is a low energy, organic solvent-free process [40,42]. Physical properties, such as particle size and zeta potential, and biological properties of the LNCs have extensively been studied since 2002[40,42,43,55,139–141]. Although there have been reports on other physical properties of the LNCs, such as elasticity [141], no study on the capability of decreasing surface tension by LNCs has been performed so far.

Surface tension is the elastic tendency of a fluid surface making it acquire the least surface area possible. At the molecular level this phenomenon results from the difference in energy between molecules at a fluid interface and in bulk [142]. Interfacial tension/surface tension is of fundamental importance in colloid science[142]. The advancement achieved in surface chemistry has led to countless applications in a multitude of industries. For instance, interfaces have crucial importance in pharmaceuticals, biotechnology and biomedicine [143]. In pharmaceutical sciences

interfacial phenomena play an important role in the processing of a wide variety of formulations. The interactions between particles and interfaces may occur during the processing (e.g. spray drying) or administration (e.g. nebulization). The subsequent *in vivo* behavior of these formulations is often governed by an (or several) interfacial process (es). In the biological environments, particles interact with various interfaces[144].

Many compounds, including pharmacologically active molecules, are amphiphilic- they bear a polar head group (either non-ionic or zwitterionic, anionic or cationic) and a hydrophobic portion [145]. Colloidal particles act in many ways like surfactant molecules [146]. Although nanoparticles with suitable size and surface chemistry strongly adsorb at interfaces, there is a long ongoing debate whether they can reduce the interfacial tension [146,147]. For instance Okubo [148] showed that polystyrene particles, which yielded crystalline structures at the interface, were able to reduce the interfacial tension, whereas silica particles, independently of the structure formed, or polystyrene particles not yielding crystalline structures did not affect the surface tension. Particles have been shown to act as stabilizers in many foam and emulsion systems (Pickering emulsions) and could prove economically attractive as replacements for conventional surfactants [149].

Similarly to surface active compounds, LNCs contain both, hydrophilic and hydrophobic parts in their structure. Moreover, the components of the LNCs, macrogol 15 hydroxystearate (MHS) and lecithin, are known for their surface active properties. The Langmuir balance studies [55,56,144,150,151] suggest that the LNCs are able to decrease the surface tension. When deposited at the air/water interface, LNCs form a monolayer, but there are no detailed studies on their surface active properties, particularly on their adsorption from the bulk of the liquid.

There are several methods available for the measurement of surface and interfacial tensions. The pendant or sessile drop technique determines the interfacial tension

based on the fact that small drops/bubbles tend to be spherical due to the predominance of surface forces over gravitational forces acting on them. If the drop is of a size such that gravitational effects and surface tension are comparable, the interfacial tension can be determined from measurements of the drop/bubble shape[152] . In a Wilhelmy plate method, a thin plate (usually made of platinum or iridium) is dipped into the liquid perpendicular to the interface and the force exerted on it is measured. Both methods measure the equilibrium surface tension.

The aim of this study was to investigate the capability of decreasing surface tension by LNCs using two techniques: drop tensiometry and Wilhelmy plate method and to compare the surface active properties of the LNCs with those of macrogol 15 hydroxystearate - the surfactant used for their fabrication. Another important goal of this work was to examine the contribution of other LNC components: oil (triglycerides) and lecithin to the surface tension of the LNC dispersion. The last objective was to examine the influence of the LNC composition on their surface active properties.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Materials**

Lipoid®S75-3 (soybean lecithin) was kindly provided by Lipoid GmbH (Germany). Kolliphor® HS 15 (Solutol® HS 15, macrogol 15 hydroxystearate, polyoxyl 15 hydroxystearate; CAS Number: 70142-34-6; molecular weight: 963.24 g/mol) was kindly provided by BASF (Germany). Labrafac® CC (caprylic/capric acid triglycerides) was kindly provided by Gattefossé S.A. (France). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

### **2.2 Preparation of LNCs**

LNCs were prepared following the procedure described by [40] at a concentration of 120 mg/mL, and the composition of each formulation is shown in Table 1. The components of LNCs (macrogol 15 hydroxystearate, lecithin and triglycerides) and NaCl (0.089 g) were weighed, mixed with 3 mL of water and heated up to 95-100°C. The

sample was cooled down to 60°C. Three heating-cooling cycles were employed and during the last cooling cycle, at 80-90°C (the temperature at which phase inversion occurred) the system was diluted with cold (~4°C) water up to the final volume of 17.5 mL. The dispersions for surface tension measurements were prepared with aqueous solution of sodium chloride to ensure constant ionic strength.

The number of nanocapsules was calculated as described by [141] using the following equation:

$$x = \frac{3m}{\rho\pi 4r^3}$$

Where m is the mass of triglycerides, ρ is the density of triglycerides (945 g/L), r is the radius of the nanocapsule, and x is the number of the nanocapsules.

**Table 1: Composition and properties of LNCs.** PS: particle size (mean ± S.D., n=3), PDI: polydispersity index (mean ± S.D., n=3), ZP: zeta potential (mean ± S.D., n=3). Solutol® HS 15= Macrogol 15 hydroxystearate/triglycerides; Labrafac® CC = Caprylic/capric acid triglycerides

	Solutol®HS15 MMR	Macrogol 15 hydroxy Stearate	Lecithin	Labrafac®CC	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
LNC30	2.29	67.75%	2.63%	29.62%	26.7±0.1	0.036±0.004	-7.14±0.33
LNC60	0.82	43.38%	3.85%	52.77%	56.0±1.0	0.028±0.016	-6.33±1.32
LNC100	0.40	27.33%	4.24%	68.42%	100.0±2.2	0.047±0.013	-10.62±1.90
LNC81	0.82	45.12%	0.00%	54.88%	81.0±3.4	0.086±0.015	-1.8±0.40
LNC44	0.82	41.71%	7.43%	50.86%	44.0±0.1	0.041±0.010	-12.3±3.0
LNC40	0.82	40.29%	10.71%	49.00%	40.0±0.3	0.033±0.010	-23.4±2.4

### 2.3 Characterisation of LNCs

The intensity-averaged particle diameter and the polydispersity index of LNCs were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) with the employment of 173° backscatter detection. The electrophoretic mobility values measured by Laser Doppler Velocimetry (LDV) were converted to zeta potential by the Smoluchowski equation. Both, DLS and LDV measurements were done on a Zetasizer nano series Nano-ZS fitted

with a 633 nm laser (Malvern Instruments, UK). The measurements were performed at LNC concentration of 3 mg/ml obtained after dilution with MilliQ water. Each analysis was carried out at 25 °C in triplicate.

#### **2.4 Preparation of macrogol 15 hydroxystearate solution and its mixtures with other LNC ingredients**

The following solution and mixtures were prepared: (1) macrogol 15 hydroxystearate solution, (2) a mixture of macrogol 15 hydroxystearate solution and hydrogenated lecithin, (3) a mixture of macrogol 15 hydroxystearate and triglycerides and (4) a mixture of macrogol 15 hydroxystearate, hydrogenated lecithin and triglycerides. The quantities of ingredients in mixtures/solution were the same than those involved in the LNC60 formulation. Lecithin was solubilized in chloroform. The remaining ingredients (macrogol 15 hydroxystearate and triglycerides) as well as NaCl were weighed. All ingredients were dispersed in water and left under magnetic stirring overnight for chloroform to evaporate.

#### **2.5 Surface tension measurement by Wilhelmy plate method**

A platinum plate was attached to a laboratory microbalance so that it was oriented perpendicular to the interface. The liquid level was raised until it just touched the hanging plate. The mass recorded on the balance was noted and the surface tension ( $\gamma$ ) was calculated using the Wilhelmy equation:

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{l \cdot \cos\theta}$$

Where  $m$  is the mass measured by the balance,  $g$  is the standard acceleration due to gravity ( $g=9.81 \text{ m/s}^2$ ),  $l$  is the wetted perimeter of the Wilhelmy plate and  $\theta$  is the contact angle between the liquid phase and the plate.

The wetted perimeter  $l$  was calculated using the following equation:

$$l = 2w + 2d$$



Where  $w$  is the plate width ( $w=2$  cm) and  $d$  was the plate thickness (it was assumed that  $d=0$  cm because of the negligible thickness of the plate). Platinum was chosen as the plate material because it is chemically inert and easy to clean, and because it can be optimally wetted on account of its very high surface free energy and therefore it generally forms a contact angle  $\Theta$  of  $0^\circ$  ( $\cos\Theta=1$ ) with liquids.

## **2.6 Surface tension measurement by drop tensiometry**

Surface tension was also measured using a drop tensiometer (Tracker, ITConcept, Longessaigne, France). A stainless steel U-shaped needle with a gauge G18 and a flat-cut tip connected to a 0.25 mL Exmire microsyringe containing air was dipped into the sample placed in a 1x2x4.3 cm cuvette made of optical glass (Hellma, France) so that the tip was covered by the aqueous phase. The contents of the cuvette were enlightened by a 10W halogen lamp. A rising air bubble with a controlled volume of 5  $\mu\text{L}$  (approximately  $12.5 \text{ mm}^2$ ) was delivered by pushing the piston of the syringe by a DC motor with 100 count per revolution optical encoder (Maxon motor, Switzerland). After the formation of the axisymmetric bubble, its profile was digitized and analyzed by the CDD camera coupled to a video image profile digitizer board (Imaging Technology<sup>TM</sup>, model PCVision Plus) connected to a computer. The bubble profile was processed by a WINDROP<sup>®</sup> software using the Laplace equation:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \sin\theta) = \frac{2}{b} - Cz$$

Where  $x$  and  $z$  are the Cartesian co-ordinates at any point of the bubble profile,  $b$  is the curvature radius at the bubble apex,  $\theta$  is the angle of the tangent to the bubble profile and  $C$  is the capillarity constant.

The capillarity constant can be calculated using the following equation:

$$C = \frac{g \cdot \Delta\rho}{\gamma}$$

Where  $\Delta\rho$  is the difference between the densities of the aqueous phase and the air,  $\gamma$  is the surface tension and  $g$  is the standard acceleration due to gravity ( $g=9.81 \text{ m/s}^2$ ) [153].

Simultaneously calculated surface tension and surface area were recorded in real time.

### **2.7 Calculation of surface excess concentration, % of surface coverage, surface pressure, area per molecule and critical micelle concentration/saturated interfacial concentration**

The surface excess concentration ( $\Gamma_2$ ) was calculated using the Gibbs adsorption equation applicable to dilute solutions:

$$\Gamma_2 = -\frac{c}{RT} \frac{d\gamma}{dc}$$

Where  $\gamma$  is the surface tension,  $c$  is the concentration of macrogol 15 hydroxystearate,  $T$  is the absolute temperature (in kelvins) and  $R$  is the gas constant ( $R=8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

The percent of surface coverage was calculated by dividing the surface excess concentration at a given concentration of macrogol 15 hydroxystearate in bulk by a maximal surface excess concentration multiplied by 100%.

Surface pressure ( $\pi$ ) is the difference between the surface tension of the clean surface ( $\gamma_0$ ) and that of the surfactant-covered surface ( $\gamma_m$ ):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_m$$

The area ( $A$ ) occupied by each macrogol 15 hydroxystearate molecule was calculated using the following equation:

$$A = \frac{1}{N_A \Gamma_2}$$

Where  $\Gamma_2$  is the value of surface excess concentration calculated from the Gibbs equation (Eqn. 6) and  $N_A$  is the Avogadro constant ( $N_A=6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ).

The critical micelle concentration/saturated interfacial concentrations were determined from the plots of surface tension against logarithm of surfactant

concentration. The CMC/SIC was taken as the concentration at the point of intersection of the two linear portions of the  $\gamma$  versus  $\log c$  plots. The slope of the linear portions of each curve in the plot was determined by the method of least mean squares. In some cases it was not possible to determine the CMC/SIC based on those calculations because the plots of surface tension against concentration showed shape irregularities. In those cases the point of the curve at which a sharp change of slope occurred was taken as the CMC/SIC.

## **2.8 Statistical analysis**

The statistical significance of the differences between samples was determined using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1 Influence of composition on the properties of lipid nanocapsules**

Varying the quantities of the LNCs ingredients, particularly MHS and triglycerides yielded particles with sizes between 27 and 100 nm. The higher the surfactant/oil mass mixing ratio, the smaller the diameter of the LNCs was. Those formulations were characterized by a homogenous size distribution (PDI below 0.1) and slightly negative zeta potential.

Nanocapsules composed solely of oil and MHS have been successfully obtained, similar to those reported previously [136]. Incorporation of lecithin, a lipophilic surfactant, considerably decreased the size of the LNCs from 81 nm to 56 nm. Further increase in lecithin concentration from 3.85 to 7.43% or 10.71% resulted in a further decrease in particle size from 56 to 44 nm and 40 nm, respectively. Incorporation of lecithin also decreased the zeta potential considerably. A linear correlation was found between the

concentration of the lecithin in the LNCs and properties such as particle size and zeta potential ( $R^2= 0.912$  and  $R^2=0.9408$  for particle size and zeta potential, respectively).

### **3.2 Surface activity of the LNCs and macrogol 15 hydroxystearate measured by drop tensiometry**

Figure 1a shows the surface tension isotherms for MHS and LNC60 measured using a drop tensiometer. The isotherm may be divided into two regions. In the first region there is a decrease in surface tension with an increasing surfactant or LNC concentration. At very low MHS or LNC60 concentration only slight changes in surface tension were detected, whereas at higher concentrations further addition of surfactant/LNCs decreased the surface tension drastically. In the second region of surface tension isotherms the line became horizontal because further additions of surfactant or LNC60 are not being accompanied by a decrease in surface tension. Because the particles do not assemble in the same way that surfactant molecules do to give aggregates forming micelles [146], in the case of LNC formulations we used saturated interfacial concentration (SIC) instead of critical micellar concentration (CMC). The sharp change of slope in surface tension isotherms corresponds to CMC/SIC. The obtained CMC value of  $0.073\pm 0.0056$  mg/ml ( $0.076\pm 0.006$  mM) for MHS agrees well with the manufacturers data (CMC between 0.005 and 0.02%, equivalent to 0.05-0.2 mg/ml) (Table 2). A 5-10 -fold increase in SIC of MHS has been observed when this surfactant was incorporated into LNCs compared with CMC of free MHS.

## *Chapitre I : Evaluation des propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques- article 2*

**Table 2:** Critical micellar concentration (CMC) or saturated interfacial concentration (SIC) and limiting surface tension of MHS solution and LNC dispersion determined by drop tensiometry. The CMC/SIC is the concentration at which a sharp change in the slope occurred. The concentrations given in brackets correspond to CMC/SIC calculated based on the slope of surface tension isotherms. Minimum surface tension is the lowest surface tension observed for a given system regardless of the bulk concentration.

Sample	CMC/SIC in mM of macrogol 15 hydroxystearate	CMC/SIC in mg of LNCs/ml	Limiting surface tension (mN/m)
Macrogol 15 hydroxystearate	0.050 (0.076±0.006)	N/A	37.72±0.10
LNC60	0.500 (0.388±0.073)	0.8605±0.1618	34.81±0.19

Interestingly, LNCs were capable of decreasing surface tension to a lower value than did MHS (37.72±0.10 mN/m and 34.81±0.19 mN/m for MHS and LNC60, respectively). This result suggests that it is not only MHS that contributes to the decrease in surface tension of LNC dispersion, and other components of the LNCs must contribute to that effect as well. Figure 1b shows the surface coverage as a function of MHS concentration in bulk. It can be observed that the surface coverage curves had very similar shape for MHS solution and LNC60 dispersion, but in the case of the surfactant solution surface coverage was achieved for lower MHS concentrations in bulk. At 0.049 mM of MHS 90% of surface coverage was achieved, whereas at the same MHS concentration in LNC60 dispersion (equivalent to 0.111 mg/mL LNC60) only 80% of surface coverage was achieved. Figure 1c shows the surface pressure- area per MHS molecule isotherm for the MHS solution and LNC60 dispersion. The shape of isotherms and the area per molecule at the concentration of surface saturation were similar for both systems (0.10-0.11 nm<sup>2</sup> per molecule) despite the fact that in the case of the LNC dispersion the molecules of other ingredients (triglycerides, lecithin) are also present in the system.

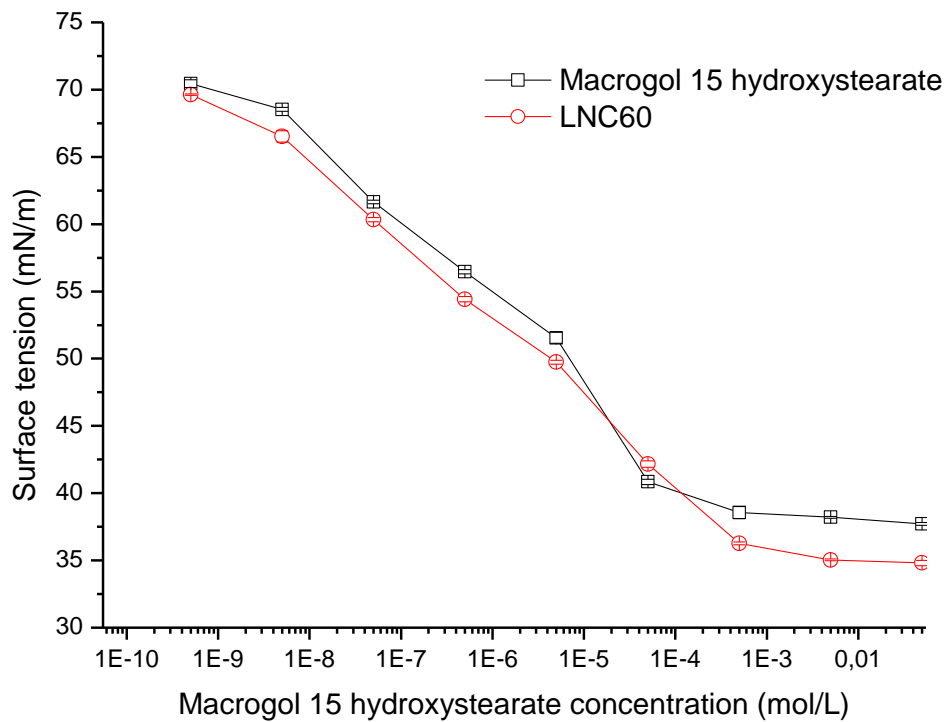


Figure 1a

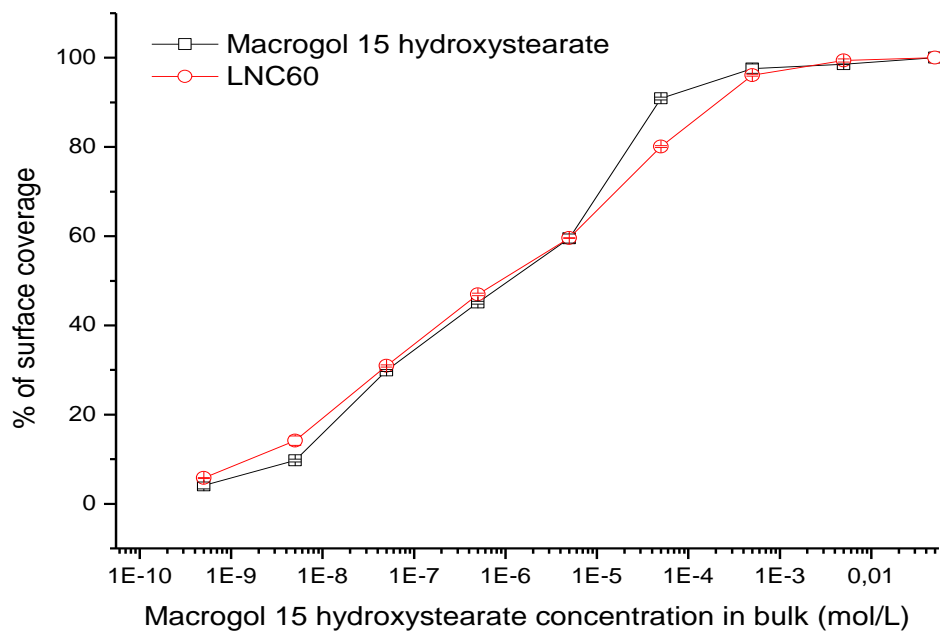


Figure 1b

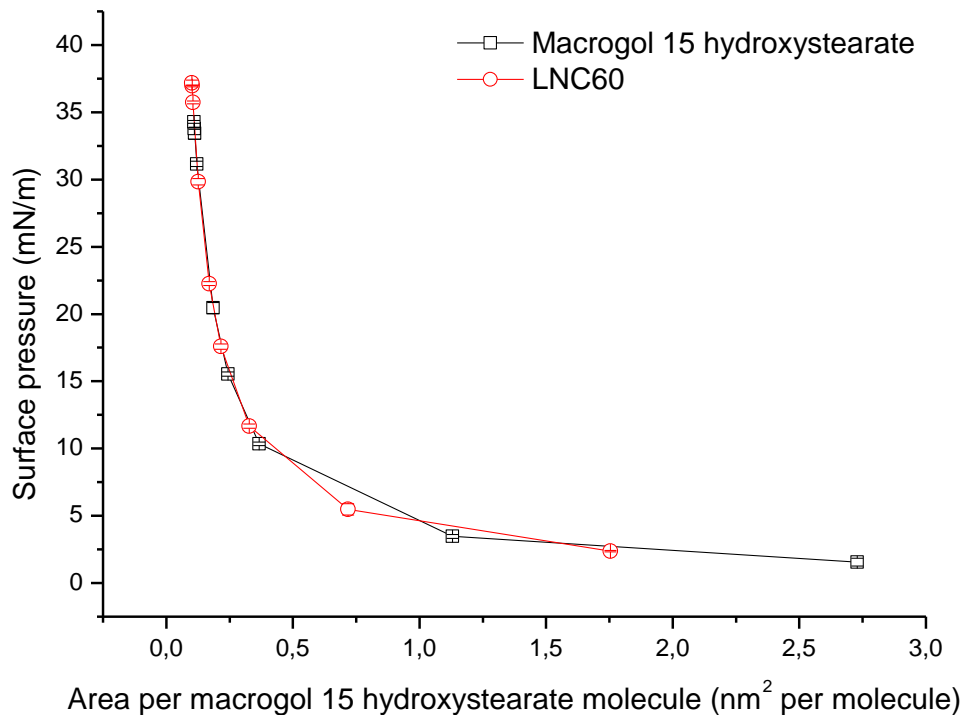


Figure 1c

**Figure 1:** Surface tension as a function of MHS concentration (a), percentage of surface coverage as a function of MHS concentration (b) and surface pressure versus area per MHS molecule (c) of MHS solution and LNC dispersion determined by drop tensiometry.

Figure 2 shows changes in surface tension as a function of time for both, MHS and LNC60 dispersion. A sharp reduction in the surface tension was observed in the first minutes of the experiment after the formation of air bubble in both, the MHS solution and the LNC dispersion, followed by a gradual decrease; after reaching the equilibrium surface tension no change in surface tension was observed. Time necessary to achieve equilibrium surface tension was much longer in the case of the LNCs (approximately 7 hours) than in the case of the MHS solution (approximately 4 hours). This time was further increased with a decreasing MHS or LNCs concentration (5-6 hours and 9 hours for MHS and LNC60, respectively- not shown).

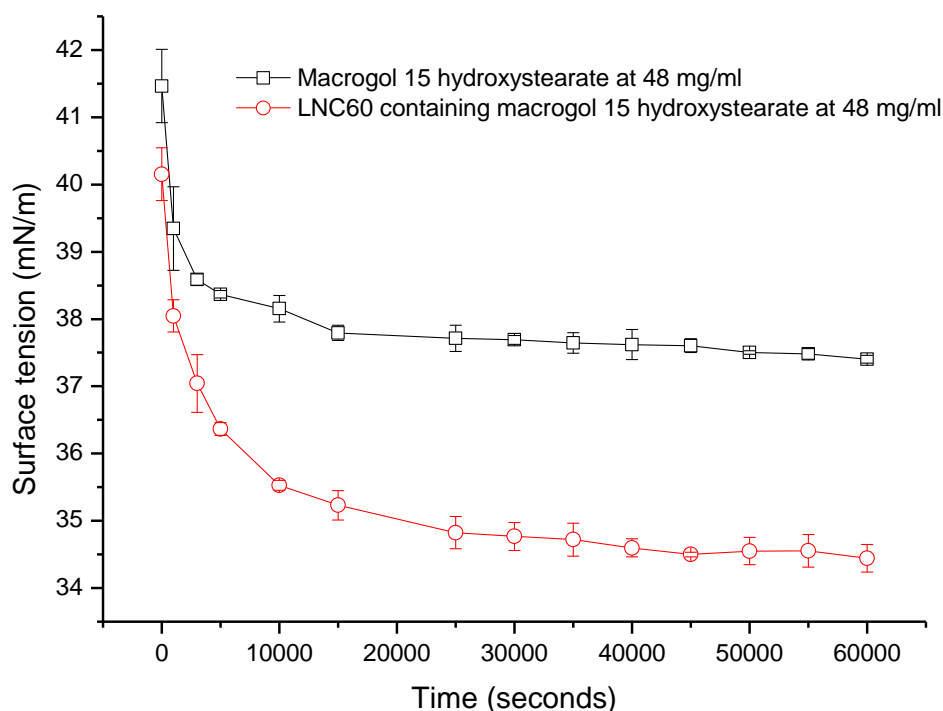


Figure 2

**Figure 2:** Surface tension versus time of MHS solution (50 mM) and LNC dispersion containing 50 mM of MHS determined by drop tensiometry.

### 3.3 Surface activity of the LNCs and macroglol 15 hydroxystearate measured by Wilhelmy plate method

Figure 3a shows surface tension versus concentration plots for MHS, LNC60 and binary and ternary physical mixtures of LNC components, and table 3 shows CMC/SIC values. The isotherm of MHS obtained by Wilhelmy plate method has similar shape to that obtained by drop tensiometry in the sense that it exhibits a sharp change of slope at CMC, but the CMC value was 5-10 -fold higher than that measured by drop tensiometry. The measurement by Wilhelmy plate method lasted about 15 minutes- it was impossible to perform long time measurements due to the effect of the evaporation of the liquid. Lecithin/MHS mixture was capable of decreasing the surface



tension to similar values as did MHS on its own ( $39.10 \pm 0.13$  mN/m and  $38.83 \pm 0.17$  mN/m, respectively), but the isotherm of the binary mixture exhibited a minimum surface tension of  $38.41 \pm 0.31$  mN/m around the SIC value. In contrast to lecithin/MHS, the binary mixture composed of MHS and triglycerides exhibited the lowest surface tension ( $34.5 \pm 0.14$  mN/m) from all tested systems. In addition to the SIC (0.500 mM of MHS), another change in the slope was observed at a lower concentration (0.050 mM of MHS), with the isotherm forming second horizontal line at concentrations in the range of approximately 0.050-0.149 mM of MHS. Similarly MHS/triglycerides binary mixture, a ternary mixture also produced an important decrease in surface tension compared with that of MHS ( $35.86 \pm 0.11$  mN/m and  $38.83 \pm 0.17$  mN/m, respectively) and a second horizontal line in surface tension isotherm at the concentrations of 0.005-0.100 mM of MHS. LNC60 were capable of reducing surface tension to significantly lower value ( $35.01 \pm 0.08$  mN/m) than did MHS or its binary mixture with lecithin. This is in good agreement with results obtained by drop tensiometry method.

**Table 3:** Critical micellar concentration (CMC) or saturated interfacial concentration (SIC) and limiting surface tension of MHS solution, LNC dispersion and binary and ternary mixtures of LNC components determined by Wilhelmy plate method. The CMC/SIC is the concentration at which a sharp change in the slope occurred. The concentrations given in brackets correspond to CMC/SIC calculated based on the slope of surface tension isotherms. Minimum surface tension is the lowest surface tension observed for a given system regardless of the bulk concentration.

Sample	CMC/SIC in mM of macrogol 15 hydroxystearate	Limiting surface tension (mN/m)
Macrogol 15 hydroxystearate	0.500 (0.339±0.016)	38.83±0.17
Macrogol 15 hydroxystearate + lecithin	0.500 (0.329±0.042)	39.10±0.13
Macrogol 15 hydroxystearate + triglycerides	0.500	34.50±0.14
Macrogol 15 hydroxystearate + lecithin + triglycerides	0.500	35.86±0.11
LNC60	5.000	35.01±0.08

Figure 3 b shows that the surface saturation occurs at much lower MHS concentrations in bulk for MHS and its binary and ternary mixtures compared with that observed for LNC60. The surface was covered in 98% at 0.149 mM MHS and at 0.500 mM for its binary mixture with lecithin. The percentage of surface coverage was 92-93% at 0.500

mM for the binary mixture MHS/triglycerides and the ternary mixture, whereas 92% of surface coverage was achieved at 69.0 mM of MHS for LNC60.

The surface pressure-area isotherms had similar shape for the LNCs, macrogol 15 hydroxystearate and binary and ternary mixtures (Figure 3c). The area per molecule is similar for all systems and it is also similar to the results obtained by drop tensiometry. However the shape of isotherms obtained by Wilhelmy plate method is different than those obtained by drop tensiometry. The former produced expanded liquid monolayers, whereas the latter- compressed liquid monolayers.

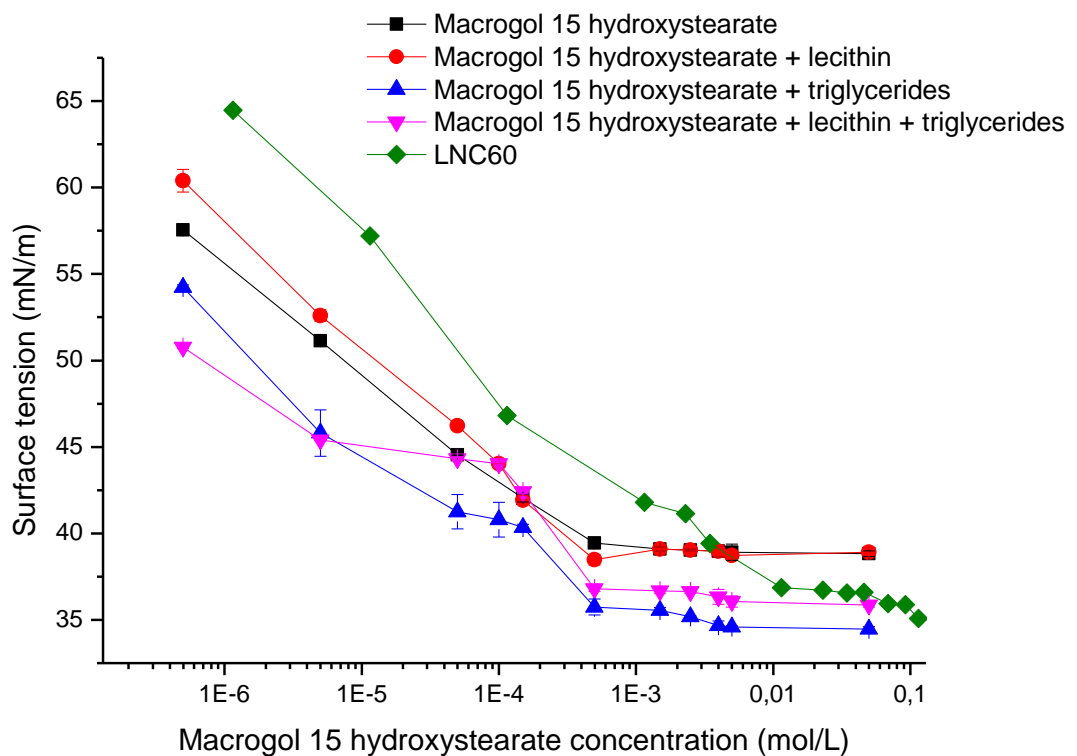


Figure 3a

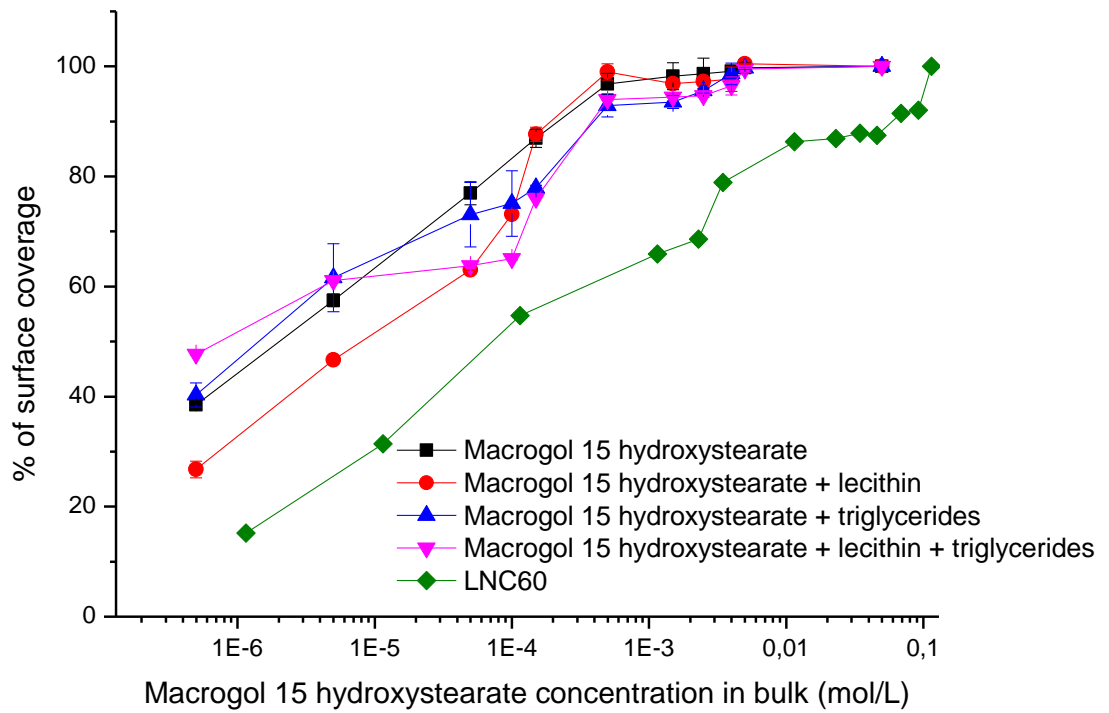


Figure 3b

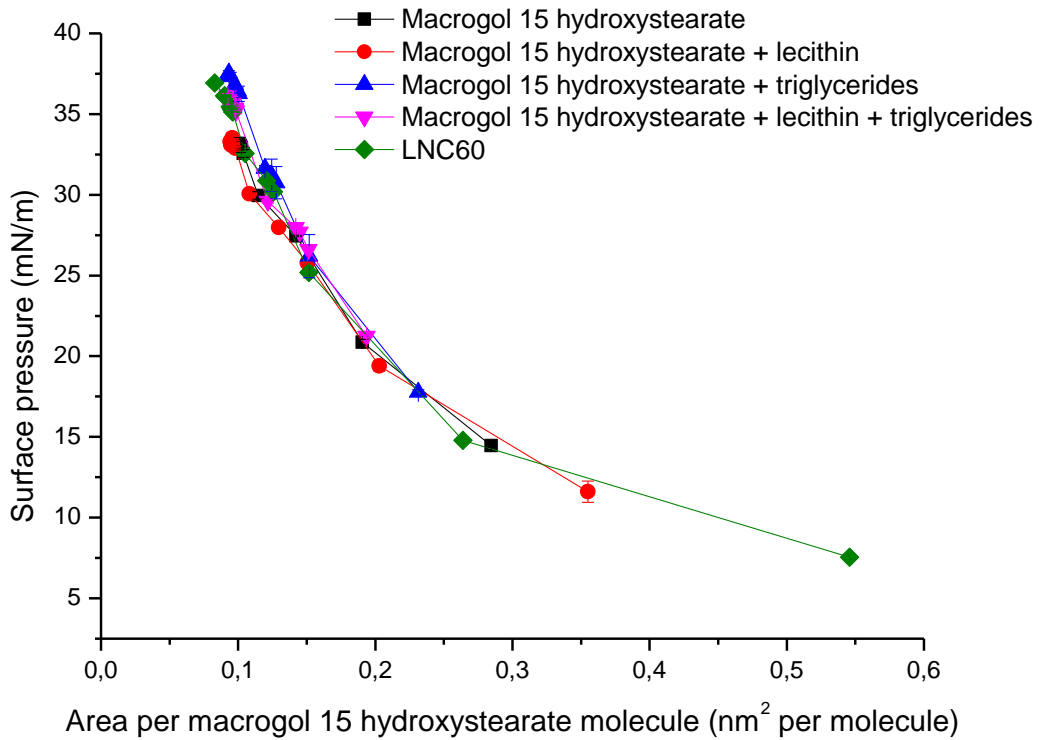


Figure 3c

**Figure 3** :Surface tension as a function of MHS concentration (a), percentage of surface coverage as a function of MHS concentration (b) and surface pressure versus area per MHS molecule (c) of MHS solution, LNC dispersion and binary and ternary mixtures of LNC components determined by Wilhelmy plate method.

### 3.4 Influence of composition on surface activity of the LNCs

Figure 4 shows surface tension isotherms as a function of MHS concentration (Figure 4a), LNC concentration (Figure 4b) or nanocapsule number (Figure 4c) of LNCs with MHS/triglycerides mixing ratio and, consequently, different particle size. All formulations were capable of decreasing surface tension to similar values ( $35.19 \pm 0.18$  mN/m,  $35.01 \pm 0.08$  mN/m and  $35.18 \pm 0.05$  mN/m for LNC30, LNC60 and LNC100, respectively) (Table 4). Considering the MHS concentration, the SIC can be ranked in the following order (LNC100 < LNC60 < LNC30). They can be ranked in the same way if the particle number is considered (Figure 4c). Moreover, when the LNC concentration

is considered, LNC30 had higher SIC compared with LNC60 or LNC100. The surface saturation was reached at lower concentration of MHS for LNC100, then for LNC30, and the highest for LNC60. More than 90% of surface coverage can be achieved at 2.85 mM of MHS for LNC100, 14.15 mM of MHS for LNC30 and 69.0 mM of MHS for LNC60. The surface pressure-area per molecule isotherm had similar shape and similar area per MHS molecule for all three LNC formulations (Figure 4e).

**Table 4: Saturated interfacial concentration (SIC) and limiting surface tension of LNC formulations determined by Wilhelmy plate method.** The SIC is the concentration at which a sharp change in the slope occurred. Minimum surface tension is the lowest surface tension observed for a given system regardless of the bulk concentration.

Sample	CMC/SIC in mg of macrogol 15 hydroxystearate/ml	CMC/SIC in mg of LNCs/ml	Limiting surface tension (mN/m)
LNC30	21.185	30.13	35.19±0.18
LNC60	5.000	11.08	35.01±0.08
LNC100	2.849	10.04	35.18±0.05
LNC81	5.000	10.67	36.78±0.03
LNC44	5.000	11.55	36.46±0.04
LNC40	5.000	11.95	36.26±0.08

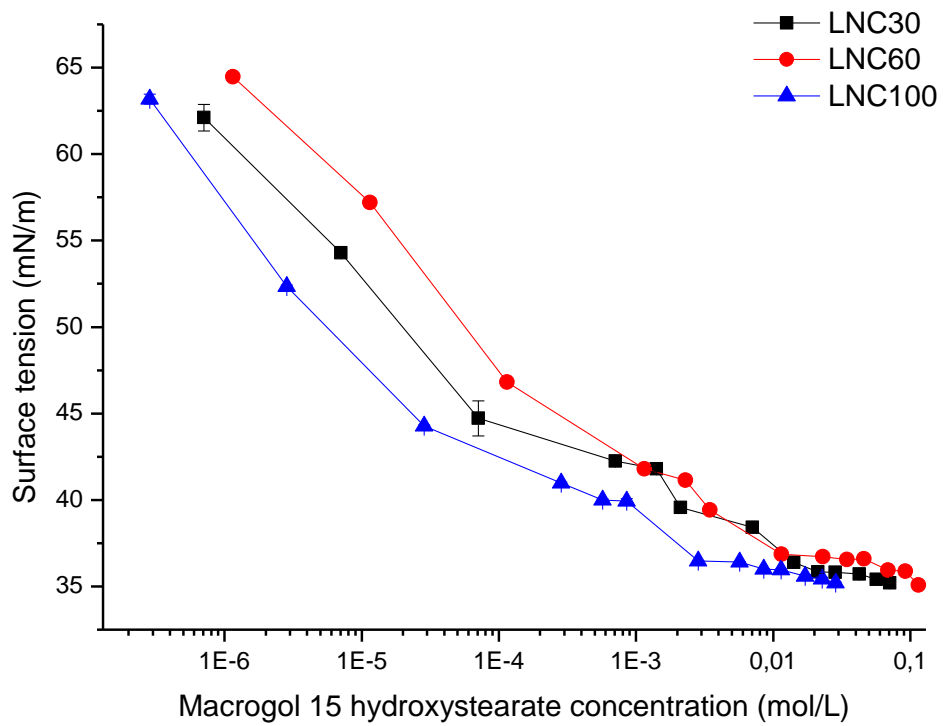


Figure 4a

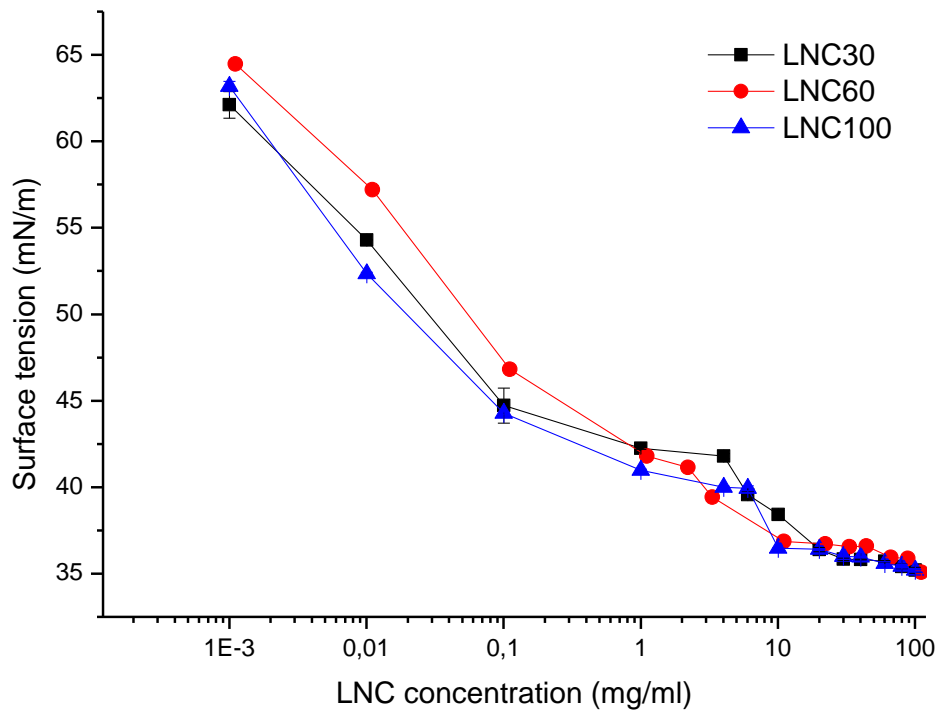


Figure 4b

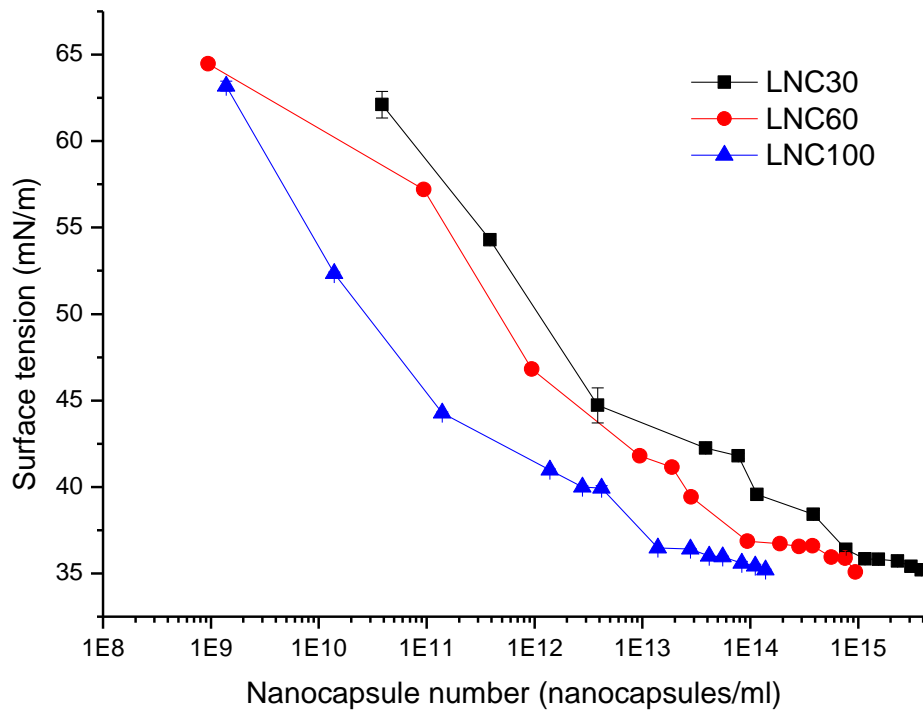


Figure 4c

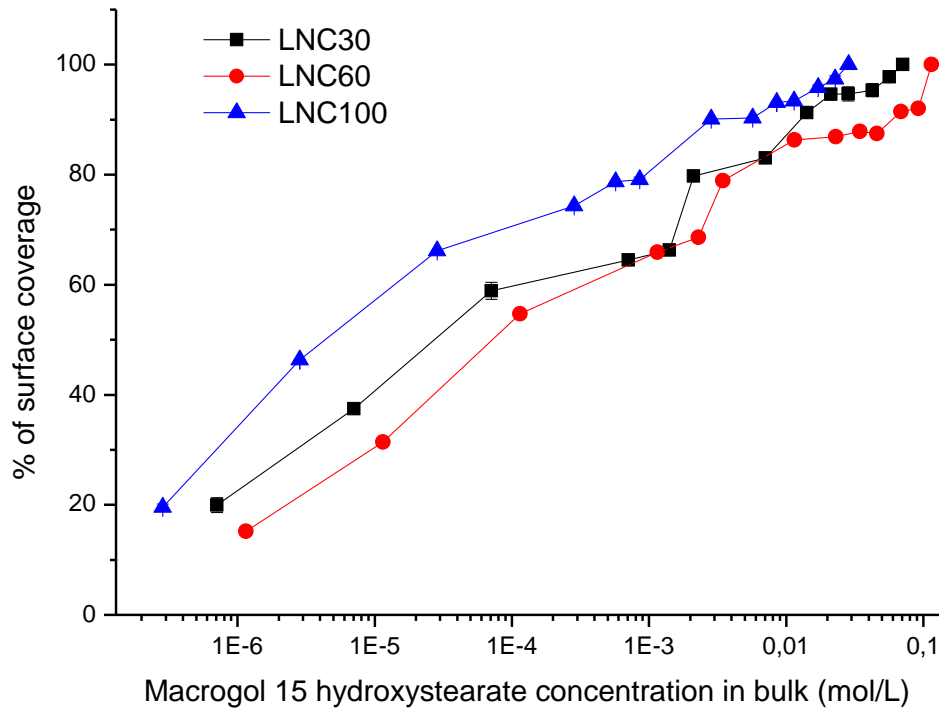


Figure 4d

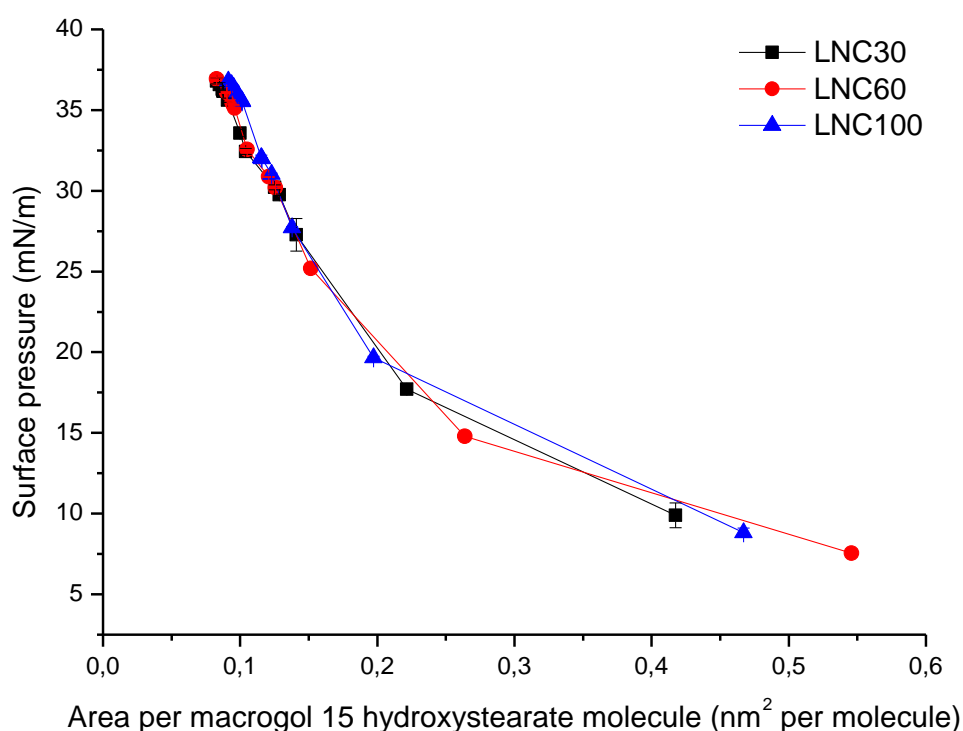


Figure 4e

**Figure 4:** Surface tension as a function of MHS concentration (a), LNC concentration (b), nanocapsule number (c), percentage of surface coverage as a function of MHS concentration (d) and surface pressure versus area per MHS molecule (e) of LNC formulations containing different mixing ratios of MHS/triglycerides determined by Wilhelmy plate method.

Figure 5 shows surface tension isotherms as a function of MHS concentration (Figure 5a), LNC concentration (Figure 5b) or nanocapsule number (Figure 5c) of LNCs containing different quantities of lecithin. Removal of lecithin or increase in lecithin concentration to 7.4 or 10.7% yielded LNCs capable of decreasing surface tension to 36.3-36.8 mN/m. These values are significantly larger than those observed for LNC60 containing 3.85% of lecithin. The SIC was not affected either by the presence/absence or by the quantity of lecithin at MHS/TG MMR=0.82 (Table 4). Interestingly, in the isotherms of LNCs containing high percentage of lecithin (7.4 or 10.7%) a minimum is observed at 1.19 mM MHS. This minimum can also be observed in surface coverage isotherms (Figure 5d). A minimum in surface tension isotherm was also observed for binary mixture of lecithin and MHS, but it occurred at SIC. When the number of LNCs



is considered, the shape of lecithin-LNCs isotherms was similar, whereas LNCs without lecithin show larger surface activity particularly at lower particle numbers. LNC40, LNC44 and LNC90 provided surface saturation at lower concentrations than did LNC60 (Figure 5d). The shape of the surface pressure-area per molecule isotherm and the surface area were similar in all LNC formulations (Figure 5e).

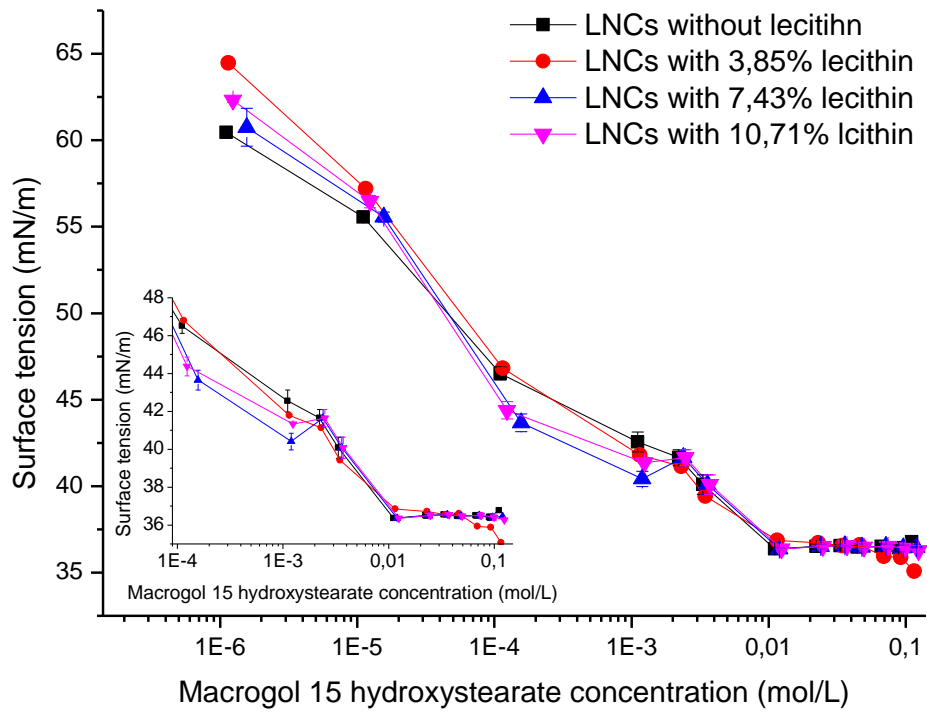


Figure 5a

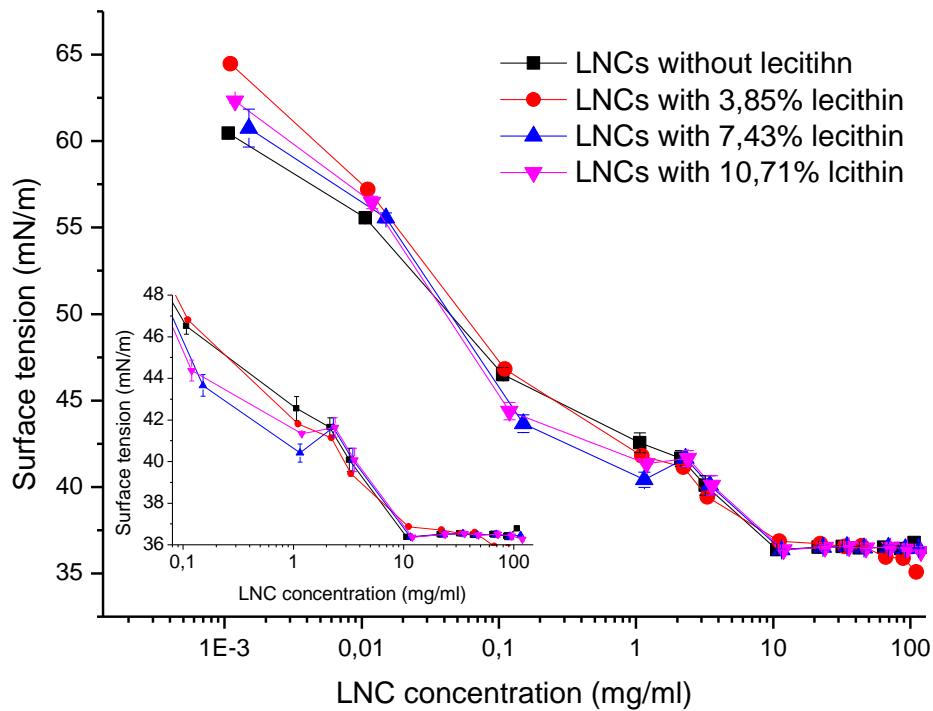


Figure 5b

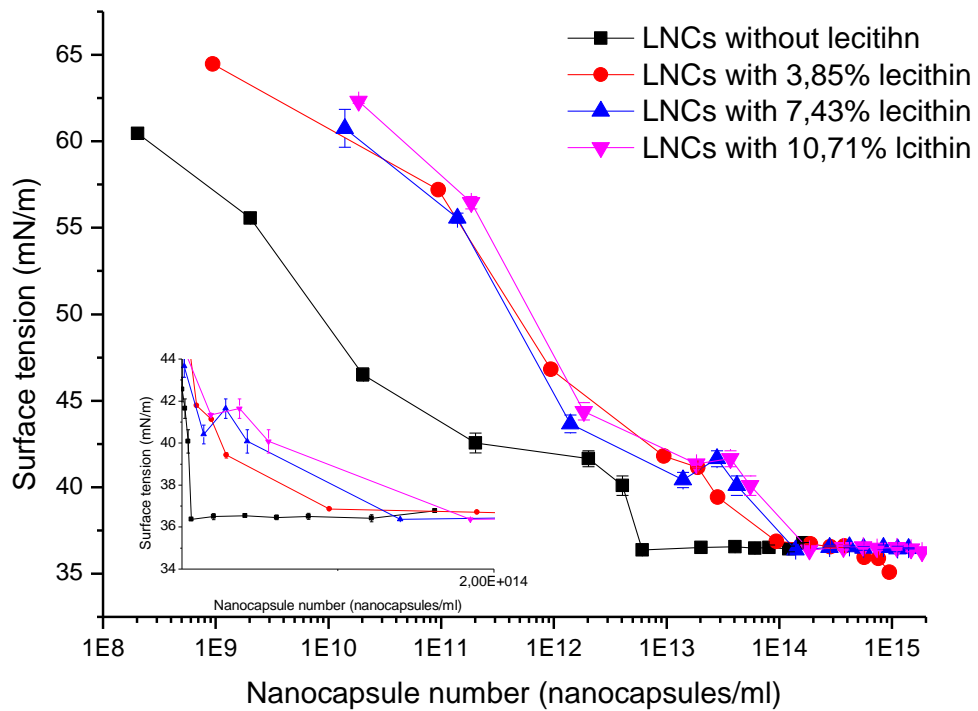


Figure 5c

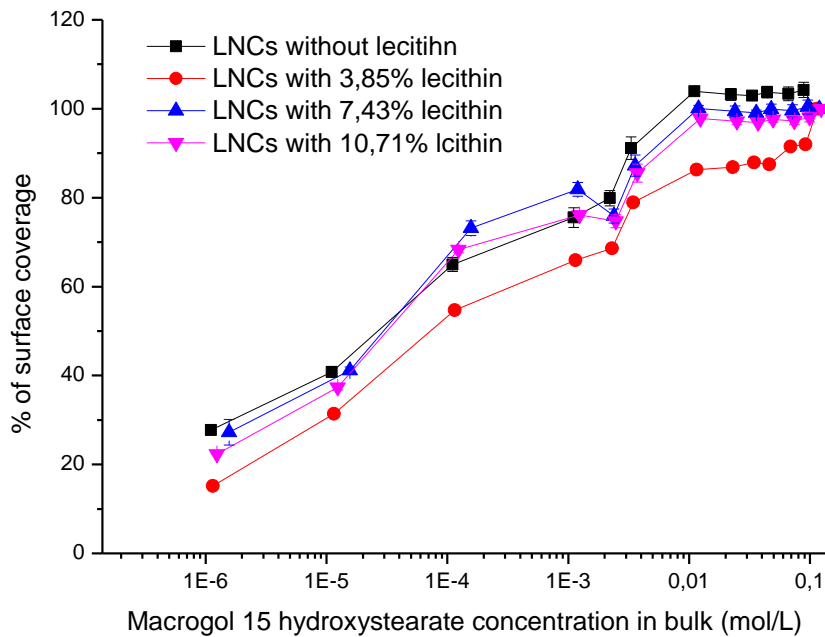


Figure 5d

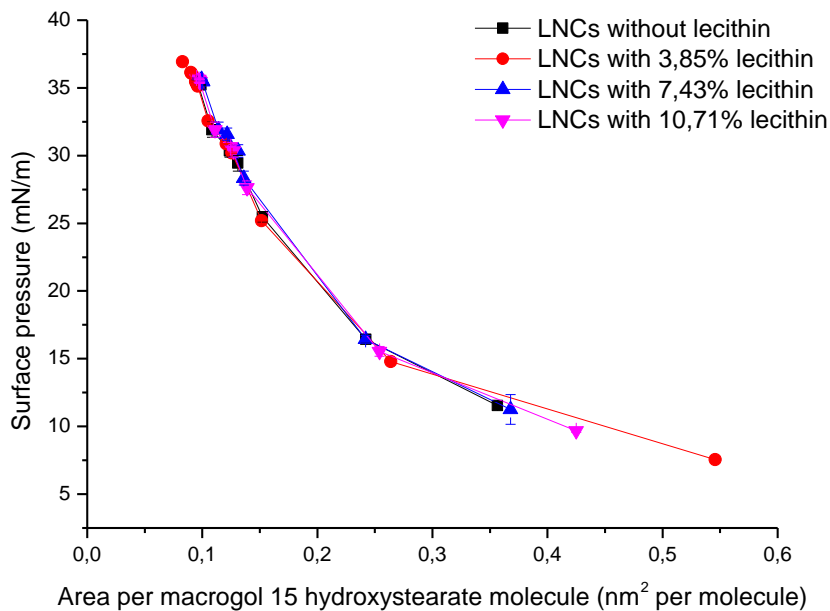


Figure 5e

**Figure 5:** Surface tension as a function of MHS concentration (a), LNC concentration (b), nanocapsule number (c), percentage of surface coverage as a function of MHS concentration (d) and surface pressure versus area per MHS molecule (e) of LNC formulations containing different quantities of lecithin determined by Wilhelmy plate method.

## **4. Discussion**

### **4.1 Influence of composition on the properties of lipid nanocapsules**

MHS, the main surfactant used for the fabrication of the LNCs, consists of polyglycol mono- and di-esters of 12-hydroxystearic acid and approximately 30% free polyethylene glycol. It is used as a non-ionic solubilizer and an o/w emulsifying agent (HLB value between 14 and 16). MHS is a surfactant soluble in water to form clear solution (manufacturer's data). The solubility of MHS in water decreases with increasing temperature, what is very important for the fabrication of the LNCs, because it enables the phase inversion from O/W to W/O emulsion upon heating. The cloud point (i.e. the temperature at which MHS is no longer soluble in water) is 63 °C [43]. MHS and other polyoxyethylene-type non-ionic surfactants become more lipophilic at higher temperatures due to dehydration of polyoxyethylene chains resulting from the break-down of hydrogen bonds with water molecules [42]. Below the cloud point non-ionic emulsifiers in water form micelles, which are composed of about 100 molecules. The dispersion remains transparent because these micelles are much smaller than the wave length of light. Although the micellar solution is transparent, the formation of micelles is a phenomenon similar to a phase separation [154,155].

LNCs with the sizes 25-100 nm have been described thus far. It has been shown that the properties of the LNCs strongly depend on the proportions of the ingredients [40,42,43,141]. As the LNCs contain small quantity of lecithin (usually less than 10%), an important factor determining if the LNCs can be obtained and the size of the obtained LNCs is the quantity of oil (triglycerides) and MHS. The presence of the PEGylated surfactant (e.g. MHS) is necessary for phase inversion. Although the nanocapsules composed solely of MHS and triglycerides can be obtained, it has been shown that they are not stable at air/water interface [55]. Co-surfactants, such as lecithin have been shown to stabilize the LNCs [43,55]. Incorporation of lecithin

decreased the size and zeta potential of the LNCs [136,156]. Lecithin is an ampholytic surfactant containing phosphate and amino groups and has an isoelectric point of 4.15 [157]. The negative values of zeta potential indicate that the charge of the phosphate groups predominated under the examined conditions (pH=6), similarly to previous reports [136].

#### **4.2 Surface activity of LNCs and their ingredients**

Surface activity of the LNCs and their ingredients was examined using two methods: drop tensiometry and Wilhelmy plate method. The turbidity of nanoparticulate dispersion depends on the particle size and the number/concentration of the particles [158,159]. Larger LNCs (80-100 nm) formed turbid dispersions at higher concentrations, similarly did the mixtures of the LNC ingredients. For this reason and also due to long duration of drop tensiometry measurements most of the samples were tested only by Wilhelmy plate method, and drop tensiometry was used only to compare the properties of the LNC60 and MHS.

The CMC/SIC of LNC60 was 5-10 times higher than that of MHS, as determined by both, drop tensiometry and Wilhelmy plate method. The CMCs/SICs of the mixtures of LNC ingredients were the same as those of MHS. It seems that it is mainly the free MHS molecules that are responsible for the decrease in surface tension. The LNC dispersion may contain free MHS molecules not attached to the LNC surface. These molecules may be responsible for the decrease in surface tension of LNC dispersions. The remaining MHS molecules are attached to the surface of the LNCs and that prevents their adsorption at the interface, and consequently larger number of MHS molecules in the system is required for interface saturation. It is known that the adsorption onto the NP surface decreases the surfactant efficiency in lowering the interfacial tension, whereas concurrently preventing nanoparticle aggregation [147]. Because the surface of the LNCs is much larger than that of the emulsions formed by ingredient mixtures, it is expected that the number of MHS molecules entrapped on the LNC surface will be

much higher. Interestingly, the CMCs/SICs obtained by drop tensiometry were 10 times smaller than those obtained by the Wilhelmy plate method. As discussed later in more detail, the differences may be explained by different duration of the measurements.

The film formed by molecules at air/water interface act as a two-dimensional analogue to normal matter in that it may exist in different physical states, which in some ways resemble solids, liquids and gases [160]. Both, drop tensiometry and Wilhelmy plate measurements revealed that the shape of isotherms of surface pressure versus area per MHS molecule of MHS and LNC60 was the same for a given method. Moreover, Wilhelmy plate measurements showed that binary and ternary mixtures as well as all tested LNC formulations produced isotherms with the same shape as those of MHS and LNC60. When adsorbed from bulk there are mainly MHS molecules present on the surface forming a continuous phase. This is in contrast with the results obtained by Heurtault et al. [144], which showed different profiles for isotherms obtained for the LNCs, MHS and the mixture of the LNC ingredients. They used the Langmuir balance and the samples were deposited on the surface, and not adsorbed from bulk as in our case. The shape of LNC isotherm observed by Heurtault et al. [144] was similar to that of MHS, but the isotherm of MHS was more expanded. The triglycerides (not tested in our study) at a large area per molecule showed behavior typical to that of liquid, but after compression they exhibited a phase transition to a more condensed monolayer. Lecithin produced a typical condensed film- the film pressure remained very low at high film areas and raised abruptly when the molecules become tightly packed on compression. In the film of a ternary mixture of the LNC ingredients the presence of both, triglycerides and lecithin was evident. Therefore it can be concluded that the composition of the monolayer depends on the deposition. Adsorption or desorption of surface active material onto or out of the interface can follow in three steps: (i) diffusion and/or convection between a deeper layer of solution/dispersion and the sub-surface layer immediately adjacent to the interface, (ii) adsorption and/or desorption between the sublayer and the interface and (iii) rearrangement of adsorbed

molecules at the interface. The diffusion is driven by a concentration gradient, adsorption/desorption is driven by the chemical potential and rearrangement may be caused by reorientation, complex formation, phase transition or formation of a two-dimensional micelle structure [161]. In the case of deposition on the surface the first stage does not occur and that may explain the differences observed between the deposition in the bulk or on the surface.

The mixtures containing triglycerides were capable of reducing surface tension to a larger extent than did MHS. Similarly, the LNCs showed lower limiting surface tension than did MHS as shown by both, drop tensiometry and Wilhelmy plate method. This finding may suggest that the triglyceride molecules, although they do not form a continuous phase on the surface, are present in the monolayer formed by MHS and significantly contribute to the reduction of surface tension. Another explanation is that caprylic/capric acid triglycerides contain some impurities, e.g. mono- and diglyceride molecules or free fatty acids, which are known for their surface activity and may be present in the monolayer.

The binary mixture of MHS and lecithin had similar limiting surface tension as the MHS, and their isotherms had very similar shapes, with the exception that the isotherm of the binary mixture exhibited a minimum surface tension around the SIC. Isotherms with a similar shape exhibiting such a minimum were observed for sodium dodecylsulfate solution and this is thought to be because of the impurities present in the surfactant solution [162]. It can be concluded that at high concentrations (above the SIC) the lecithin molecules are excluded from the interface despite the surface active properties of phospholipids.

Another question is what is happening to the nanocapsules when they reach the surface. The density and the structure of the nanoparticle film at the gas/liquid interface depends on the equilibrium between the attractive and repulsive forces between the nanoparticles, and the exchange of nanoparticles between the interface



and the bulk of the liquid. While electrostatic forces serve as repulsive forces for the charged nanoparticles, van der Waals forces may serve as the attractive forces, particularly for closely spaced nanoparticles [163]. In general, the forces responsible for the interactions between particles in bulk are also operative in particulate monolayers on the surface [146]. While the distances between the nanoparticles estimated based on the bulk concentration are relatively large (>10-100 diameters depending on the concentration), shorter distances may occur if the nanoparticles accumulate and assemble at the liquid-gas interface [163]. Therefore nonelectrostatic forces such as hydrophobic, polar and hydrogen bonding interactions become much more important in two-dimensional ordering at the interface compared with the bulk [148]. Such interaction may lead to the reduction in the repulsion and consequently, aggregation and destruction of particles. For instance it has been demonstrated that phospholipid vesicles can disrupt upon contact with the air/water interface, allowing the flow of phospholipids monomers and their deposition at the interface forming a monolayer and consequently decreasing the surface tension [164–166]. Similarly, emulsions or high density lipoproteins (HDL) have been shown to destabilize at the interface releasing their components, such as triglycerides [164,167]. It has been suggested that during spreading of the LNCs on air/water surface, a small amount of MHS located at the nanocapsule surface was released from the initial structure, but this did not lead to the destruction of the nanocapsules [144]. It has been suggested that in lipid nanocapsules a sufficiently rigid shell prevents their opening [144]. Indeed, it has been shown that deformation of LNCs is possible to some extent without destruction of the particle structure [141]. Luo and Dai [168] conducting simulations found that surfactants and nanoparticles compete for adsorption at liquid-liquid interfaces and that as the surfactant concentration increased the nanoparticles desorbed from the interface. MSH molecules reach the interface quicker than do the LNCs, and when adsorbed at the surface the MHS molecules may repel the approaching

LNCs. This effect may contribute to the similarities between LNC and MHS film on aqueous substrate.

As mentioned, the shapes of isotherms produced by Wilhelmy method were different than those obtained by drop tensiometry. The differences between these two methods may be explained by different duration of the measurements. Drop tensiometer enables measuring of equilibrium surface tension, which corresponds to the equilibrium or maximum biosurfactant concentration at the drop-air interface. It is the minimum surface tension observed at very long times in surface tension versus time measurements [169]. On the other hand, measurement by Wilhelmy plate method is much shorter (approximately 15 minutes). As shown in Figure 2, more than 15 minutes is required for the MHS molecules or the LNCs to reach the interface, particularly at lower concentrations. Moreover, this study confirms well known fact that the adsorption of particles to interfaces is slow compared with surfactant molecules [146].

Furthermore, the extrapolated limiting surface area per MHS molecule (approximately  $0.1 \text{ nm}^2$ ) was the same for all samples tested by both methods. Such a low value may suggest that at high concentration MHS molecules stand upright and are closely packed together. However, as indicated by the fact that they form a liquid film, at lower concentration the MHS molecules may be lying along the surface. The area per molecule for SDS was  $0.47 \text{ nm}^2$  [170] and for fatty acids a limiting surface area of about  $0.20 \text{ nm}^2$  was found [160]. However the limiting area per MHS molecule may be higher than that obtained from the calculations. First, MHS contains about 30% of free polyethylene glycol molecules, which are hydrophilic and may not be located in the surface. Secondly, it is possible that even below the CMC not all MHS molecules are present on the surface, some of them may remain in the bulk.

#### **4.3 Influence of composition on surface activity of lipid nanocapsules**

Some of the physical or biological properties of the nanocarrier can be markedly changed by adding a new ingredient or by changing the properties of the ingredients.

For instance, incorporation of fatty acids or monoglycerides yielded LNCs with antibacterial properties [156]. Changes in quantities of the LNC ingredients (particularly MHS/triglycerides mixing ratio) affects the properties of the LNCs such as particle size, but also their capability to encapsulate drug molecules [43]. The composition of the LNCs affects their redispersibility after freeze-drying [171], their nebulization [43], or their interactions with cells and uptake [140]. Therefore it is very important to examine if the composition of the LNCs affects their capability of decreasing surface tension. Indeed, the studies by Minkov et al.[55] have shown that the content of MHS, triglycerides and lecithin influence the kinetics of film formation after deposition on the surface.

Increasing the size of the nanoparticles can significantly increase the desorption energy, leading to larger surface coverage and therefore larger interfacial tension reductions [172,173]. This may explain lower why below the SIC the same number of larger nanocapsules provides higher reduction in surface tension compared with smaller LNCs.

The SIC depended on the mass mixing ratio of MHS/triglycerides, but not on the presence of lecithin. It has been confirmed that after the deposition of lipid nanocapsules on the surface lecithin was neither released and nor located at the interface [144]. Lecithin molecules were found to stabilize LNC structure at the interface [55]. Two populations of the LNCs with and without phospholipid molecules were detected. Lecithin prevented the release of molecules from the LNCs. It has been suggested that after spreading on the interface a rapid dissociation of the unstable LNCs containing smaller quantity of lecithin occurs, leading to rapid release of triglyceride molecules and small quantity of MHS molecules forming instantaneously a liquid expanded monolayer. After the deposition, the stable population of LNCs with larger quantity of lecithin remains intact and slowly releases only single MHS molecules weakly attached to the shell [55]. Adsorption of the LNCs on the surface is particularly

important when the interface area is largely increased compared with that on the bulk. For instance it has been observed that the size of the LNCs increased significantly after nebulization; the increase in particle size was attributed to adsorption of the LNCs on the surface of aerosol droplets [43].

## **5. Summary and conclusions**

The properties of the LNCs strongly depended on their composition. The size was influenced mainly by the quantity of the MHS in the LNCs. However, the addition of lecithin affects significantly both, the particle size and the zeta potential.

LNCs were capable of decreasing surface tension to lower values than did MHS or MHS/lecithin mixture, as confirmed by both, drop tensiometry and Wilhelmy plate method. The CMC/SIC values measured by Wilhelmy plate method were higher than those obtained using drop tensiometer because of longer duration of tensiometry measurement. The SICs of the LNCs were approximately 10-fold higher than the SICs of binary and ternary mixtures of LNC ingredients or the CMC of MHS. The SIC depended on the mass mixing ratio of MHS/triglycerides, but not on the presence of lecithin.

The surface active properties of the LNCs offer new possibilities to use them as surfactants in various medical and pharmaceutical applications.

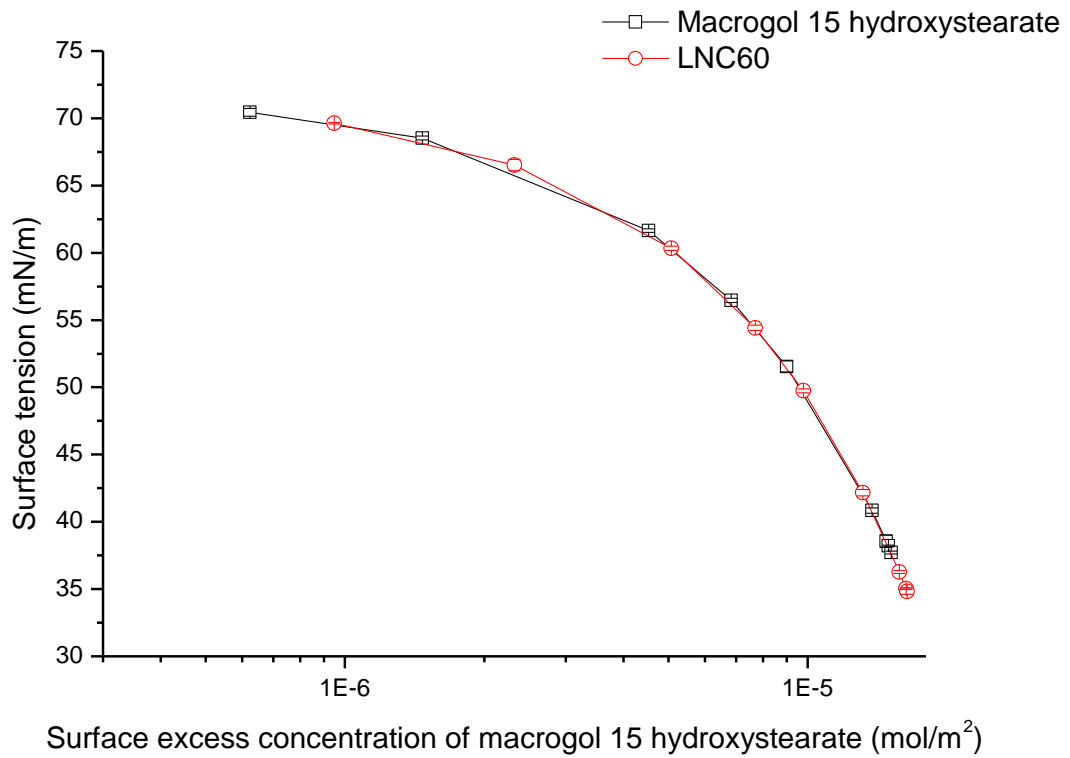
## **Acknowledgments**

This study was funded by 'Service de Cooperation et d'Action Culturelle' of the French Embassy in Benin, by Zcube (Italy), by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin and by the "Faculté des Sciences de la Santé de cotonou". The first Author of this article thanks the laboratory MINT U1066 and the "laboratoire de pharmacie galénique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et de

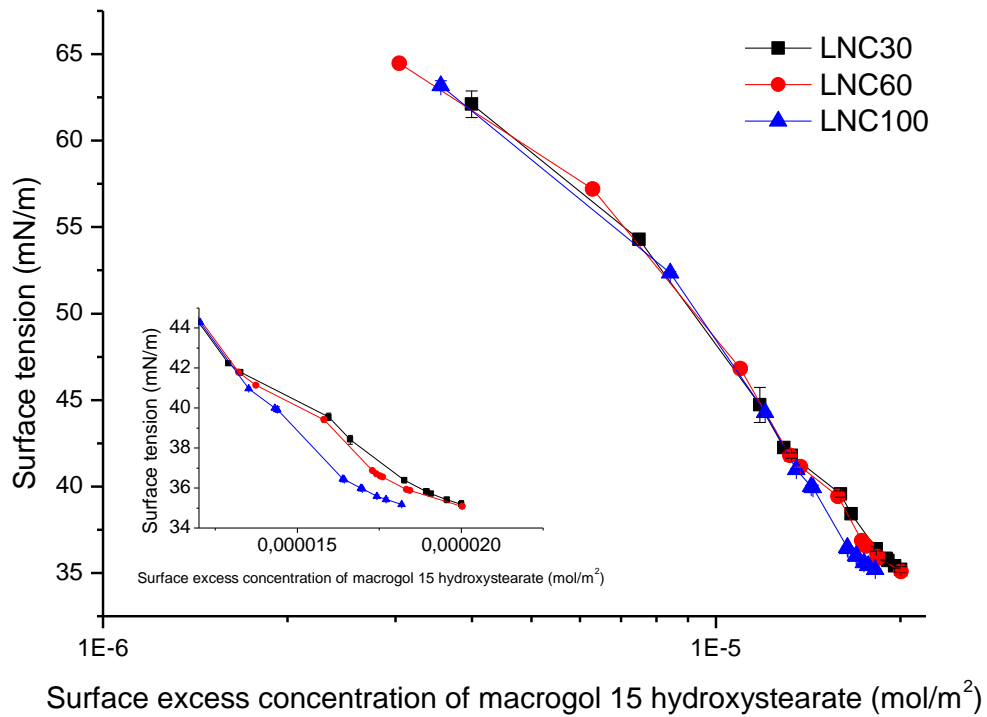
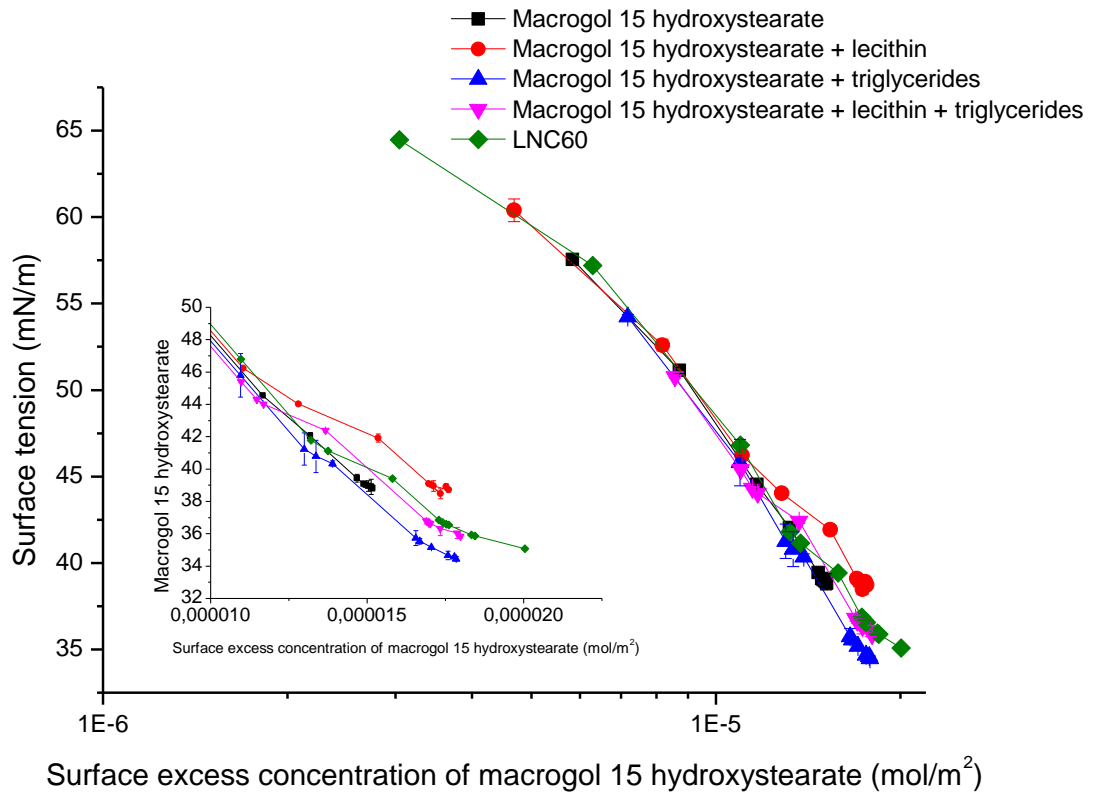
## Chapitre I : Evaluation des propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques- article 2

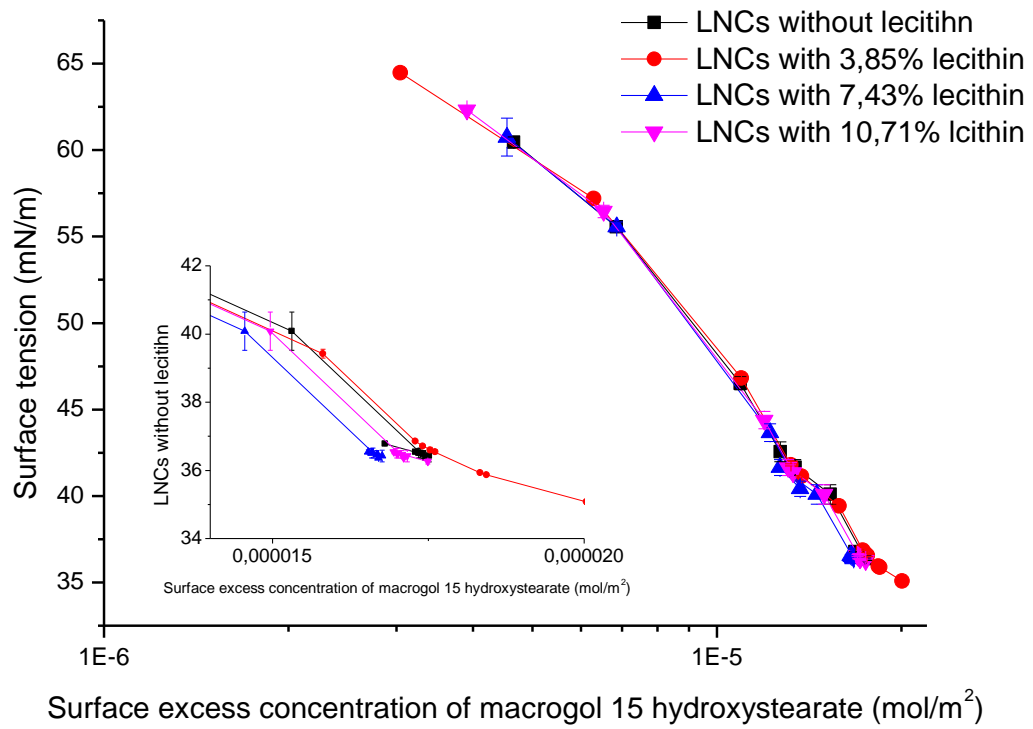
l'ingénierie de la santé" of University of Angers to accept her reception and to provide facilities for this research.

### Supplementary data



# Chapitre I : Evaluation des propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques- article 2





*Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques  
des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*



## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

---

Dans ce chapitre sont récapitulées toutes les études concernant les propriétés d'interface à l'interface air/ eau réalisées sur les nanocapsules lipidiques (NCL) durant cette thèse. Il est subdivisé en trois sous chapitres. Le sous chapitre 1 détaille les comportements des NCL pendant leur diffusion vers l'interface. Le sous chapitre 2 présente les études relatives à l'évaluation de la qualité de la couche que formeront les NCL à l'interface des microbulles d'air qui seront formulées. Le sous chapitre 3 décrit les comportements des NCL lorsqu'elles se trouvent dispersées dans le milieu de formulation.

## **Diffusion des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau**

### **Résumé**

Dans ce travail, les coefficients de diffusion des nanocapsules lipidiques (NCL) ont été déterminés à différentes concentrations et comparés à ceux obtenus pour différentes concentrations de solution de Solutol®. Pour cela, le modèle de Ward et Tordai a été utilisé pour le calcul des valeurs de coefficient de diffusion. Il ressort des résultats obtenus que les coefficients de diffusion des NCL obtenus au cours de la première séquence de diffusion (0-100 secondes) ne soit pas très différents de ceux du Solutol® tandis que les valeurs obtenues lors de la deuxième séquence (100-900 secondes) sont significativement élevées pour la dispersion de LNC. En conclusion, dans le cas des NCL, en dehors du Solutol®, d'autres constituants sont libérés dans la subphase et diffusent vers l'interface ce qui explique cette quantité importante d'ingrédients qui atteind l'interface par seconde et par unité de surface durant la deuxième séquence de diffusion.

## **LIPID NANOCAPSULES DIFFUSION TOWARDS THE AIR/WATER INTERFACE**

**C. Rosemonde A. MOUZOUVI<sup>1,2</sup>, Anita UMERSKA<sup>1,\*</sup>, André Koffi BIGOT<sup>3</sup>, Patrick SAULNIER<sup>1</sup>.**

- 1) MINT, INSERM 1066, CNRS 6021, Univ Angers, Université Bretagne Loire, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers cedex France
- 2) Laboratoire de Pharmacie Galénique et de technologie Pharmaceutique, UFR Pharmacie, FSS, Université d'Abomey-calavi, Cotonou, Benin
- 3) Service de la Banque de Sang du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou, Benin

To whom correspondence should be addressed: [rosedescience@yahoo.fr](mailto:rosedescience@yahoo.fr)

Phone: 0022995566814

Present address: Université d'Abomey-calavi (R. MOUZOUVI)

05 BP 657 Cotonou

Bénin

### **Abstract**

In the pharmaceutical field, the use of colloidal particles can be an efficient strategy in order to stabilize dispersed systems where important density differences prevail between the dispersed and the continuous phase. They can supplement usual surfactants used as stabilizer agents due to their ability to stabilize the related interfaces. In this strategy, lipid nanocapsules (LNC) were used to generate stabilized microbubbles. At first, their surfactant properties were investigated and more particularly their ability to diffuse at the air/water interface in comparison with their main surfactant excipient (Solutol®) alone in the solution. A drop tensiometer was used to determine the diffusion parameters.

## **1. Introduction**

Usual dispersed systems are constituted by two immiscible phases, the external continuous phase and the internal dispersed one. This latter can be constituted by water, oil, or by gas. The two immiscible phases are shared by the so-called interface. Dispersed systems need to be stabilized by a suitable emulsifying agent to overcome their inherent instability which is more pronounced when the dispersed phase objects are small [1,2]. The stabilization mechanisms are related to parameters such as the chemical structures, the hydrophilic lipophilic balance (HLB), the Water Oil Ratio, the temperature, the concentrations and the medium pH. To palliate the toxicity of surfactants, bio surfactants (proteins, polysaccharides) were tested. Unfortunately these latter are not able to decrease sufficiently the interfacial tension with sometime a characteristic adsorption time that can be too long.

Such a way, it is common to associate several amphiphilic molecules (surfactants or (and) proteins) [174,176,177] when no adsorption competition prevails between them [178]. In this context, bubbles constitute very challenging systems due to their inherent Laplace pressure but also to the importance of the density difference existing between the dispersed gas and the aqueous continuous medium.

Recently, some scientists have tried to stabilize dispersed systems by using organic or inorganic particles and even the spores or bacteria [34,179–185] offering interesting alternatives. Pickering systems have thus renewed interests in recent years even if they have been widely studied since a long time [186,187]. The adsorption and the stabilization mechanisms of some particles had been highlighted. For instance, the wettability and hydrophobicity of silica nanoparticles are important parameters to be considered when used as Pickering agents. Some particles can decrease the surface tension such as Janus ones which exhibit different wettability thanks to their two different parts [188–190]. Other particles can keep constant the interfacial surface

## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

---

tension values such as polystyrene nanoparticles [148,173,191,192]. Pickering stabilizers stand irreversibly at the interface forming a block which serves as a steric barrier [190]. In this study we propose to evaluate the suitability of LNC as Pickering agents at the air /water interface. We intend to evaluate if LNC can be used to overcome the bubbles instability.

Bubbles in aqueous media are pseudo spherical particles with a mean size preferably lower than 10 $\mu$ m to present a therapeutic interest. They are constituted by a gaseous core surrounded by a shell that can be of various nature[13,103]. The main difficulty is to maintain the bubble stability over time in spite of the Laplace pressure that can be very important in the case of small bubbles. Another drawback is the difficulty to bring the proof of micro bubbles formulation.

Lipid nanocapsules (LNC) were developed in the MINT laboratory since several decades. Their lipidic core is composed by medium chain fatty acids surrounded by a shell composed with polyethylene glycol 660 hydroxystearate ( Solutol<sup>®</sup> ) and lecithin ( Lipoïd<sup>®</sup>). Various hydrodynamic nanoparticle diameters (mainly 25nm, 50nm and 100nm) can be obtained depending on the amount of each ingredient incorporated in the initial mixture [3,40,44,193–196]. This structure confers to the LNC a very cohesive structure making them very stable over time and in various thermodynamic conditions [40,44,55,141,144]. Otherwise, LNC constitute good drug carriers for various drugs that have been correctly encapsulated and released in several biological media (ibuprofen[2,3,46,47,197–203]). In this way, it could be possible to accumulate loaded LNC around micro bubbles to enhance the bubble stability (Pickering effect). Active molecules inside le LNC structure could be release in an appropriated ultrasound field.

In this study, we propose to compare the diffusion of LNC in their aqueous medium to reach the air/water interface to the diffusion of their main surfactant alone:( Solutol<sup>®</sup>)

## **2. Methods and materials**

### **2.1. Materials**

Solutol® HS 15 a mixture of free polyethylene glycol 660 (PEG) and polyethylene glycol 660 hydroxystearate was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany)(Mw: 911g/mol). Lipoid® S75-3 (GmbH, Ludwigshafen, Germany) is a kind of soybean lecithin. It contains 70 % of phosphatidylcholine, 10% of phosphatidylethanolamine and other phospholipids (Mw: 800 g/mol).Labrafac®WL1349 is constituted from caprylic and capric acid triglycerides (Gatefossé S.A. Saint-Priest, France) (Mw: 512 g/mol). Water is distributed from a Milli-Q-plus® system (Paris, France).

### **2.2. Lipid nanocapsules formulation**

Firstly, lipid nanocapsules were prepared according to the method described by Heurtault et al. [40,44]. Briefly, the mixture of components (Solutol®, Lipoid®, Labrafac®, and water) was subject to a heating and a magnetic stirring at 500rpm. Three cycles of temperature (60-100°C) was applied. The temperature was increased up to 100°C (4°C per minute) and decreased to 60°C (cooling phase) and so on. During the cooling phase of the third cycle, at 75°C, cold water (4°C) was added to induce the lipid nanocapsules formation.

### **2.3. Lipid nanocapsules characterization**

After the formulation, the LNC hydrodynamic diameter, their polydispersity index (PDI) and their Zeta potential were measured at 25°C using a Nano sizer apparatus (Nano Series ZS, Malvern, Worcestershire, UK). These different parameters were given via a Dynamic light Scattering (DLS) analysis whereas, the zeta potential measurement was based on the Electrophoretic Mobility principle. The apparatus was fitted with a 632.8 nm laser beam fixed at the angle of 173°. For these measurements,

the samples were diluted with deionized water in the ratio 1:59. All measurements were performed in triplicate.

#### **2.4. Surface tension measurement by a drop tensiometer method**

A drop tensiometer (Tracker<sup>®</sup>, ITConcept Teclis, Longessaigne, France) (Laplace theoretical background) was used to determine the surface tension from one axial symmetric drop. The measurements were performed on the Solutol<sup>®</sup> solutions or on the LNC dispersions. LNC previously prepared were stored at 4°C. Samples were filtrated through a 0.22µm filter before each experiment. Both Solutol<sup>®</sup> solution and LNC dispersion contained the equal amount of Solutol<sup>®</sup> (48mg/mL or 52.76.10<sup>-3</sup> mol/L for the primary samples). The related concentrations were in 5.3x10<sup>-7</sup> mol/L – 1.6x10<sup>-1</sup>mol/L range. The drop volume was 5 µL with an estimative area of 12,5mm<sup>2</sup>. The surface tension was recorded during 15 hours at (20±2) °C to achieve the equilibrium. Fives concentrations were tested for each sample and all experiments were performed in triplicate.

#### **2.5. Surface excess determination**

Using surface tension data (curve 1:  $\gamma$ -lnC), surfaces excess and diffusion coefficients were evaluated. Surface excess represents the amount of amphiphilic molecule per area unit at the interface. Concerning an immiscible monolayer, especially, in the case of diluted solution ( $C \leq 10^{-2}$  mol/L) [204] and for a nonionic surfactant, the surface excess is given by the Gibbs equation

$$\Gamma = -\frac{\partial \gamma}{RT \partial \ln C} \quad (1)$$

Where  $\Gamma$  is the surface excess, R is the gas constant, T is the absolute temperature,  $\gamma$  is the surface tension and C is the molar concentration of the amphiphilic molecule.

In this way the curve  $\Gamma$ -ln C (curve 2) is plotted applying equation 1 for each point of the curve 1.

The diffusion coefficient (D) can be obtained from the following simplified Ward and Tordai model giving the surface excess in function of time. In order to better use this simplify equation, the short interval of time (0-900 seconds) was considered for the calculation of the all of the diffusion coefficient values.

$$\Gamma(t) = 2C \sqrt{\frac{D}{\pi}} \sqrt{t} \quad (2)$$

D is the diffusion coefficient,  $\pi = 3, 14$ .  $2 \sqrt{\frac{D}{\pi}}$  is the slope of the curve representing the surface excess in function of square root of time. For each studied concentration the kinetic curves was experimentally deduced ( $\gamma=f(t)$ ). For each concentration of the sample,  $\Gamma$  was determined using equation 1. Then the surface excess was calculated from the equation of the curve 2. The curve 3 and 4 were plotted for the concentrations that is the 10% of the critical micelle concentration (CMC) ( $5.3 \times 10^{-4}$  mol/L). At that concentration, the molecules diffusion is supposed to be done freely because there are less material in the medium. Diffusion coefficient was calculated in two ranges of time interval.

## **2.6. Statistical analysis**

The significant difference between samples was appreciated using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Formulation and characterization of lipid nanocapsules (LNC)**

According to Heurtault et al. [44], different mean sizes (25nm, 50nm and 100nm) can be obtained depending on the amount of excipients composing the formulation (Solutol<sup>®</sup>, labrafac<sup>®</sup> and water). The Lipoid<sup>®</sup> amount does not influence the LNC size.



## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

The LNC zeta potential is known to be negative due to the dipoles interactions between the Polyethylene-glycol radicals [42] but also to the presence of phospholipids in the inner part of the LNC shell. LNC particles usually present zeta potential values between -5mV and -9mV. Indeed, the zeta potential is one parameter, which determines the physical stability of the dispersion. Higher the zeta potential absolute value (close to 25mv), and better stable could be the dispersion. In the case of LNC dispersion, the longtime stability is more consequent to the PEG chains providing an important steric stabilization even if the electrostatic requirements are not satisfied. Concerning the LNC polydispersity Index (PDI), its values must be advantageous lower or equal to 0.3 conferring to the preparation a homogeneous distribution.

The LNC met all of these requirements considering the characterization data (table 1). Furthermore, even if LNC are stable during 1month and half at 37°C and for 18 month at 4°C, we took some cautions to avoid the LNC instability during our experiments. Therefore, LNC samples used for all experiments were immediately put back in the cool room after removing required quantities. Thus no physical changes did occur during the experiment period.

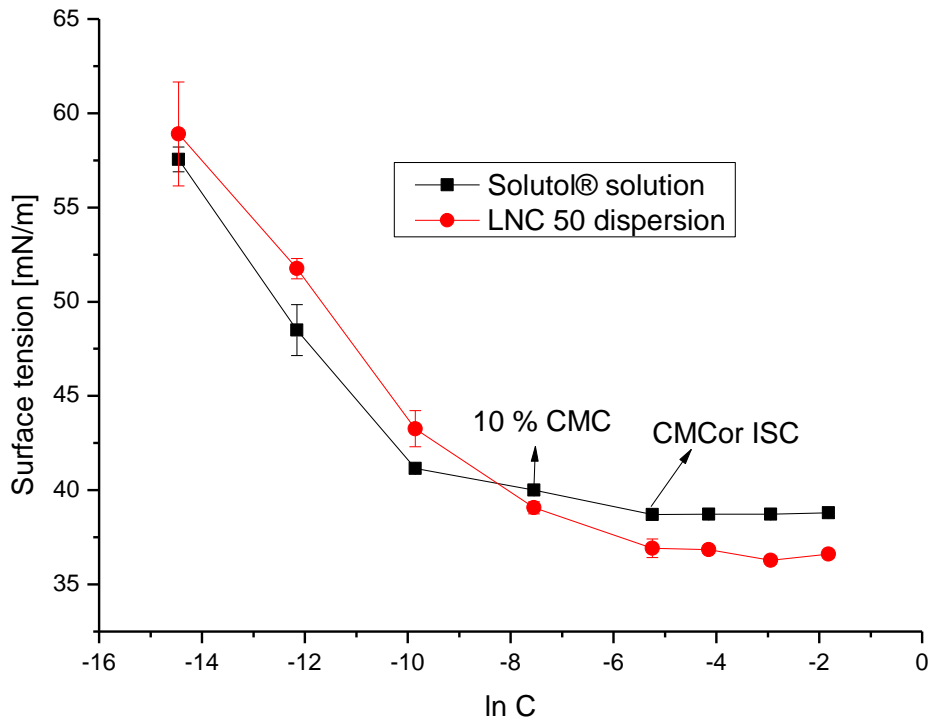
**Table1: physicochemical characteristics of LNC dispersion and Solutol® solution**

	Composition			Concentration (mg/mL)	particles/ml	Z-average (nm)	ZP (mV)	PDI
	Solutol® (%)	Lipoïd® (%)	Labrafac® (%)					
<b>LNC50 dispersion</b>	43,4	3,8	52,8	111	16,6.10 <sup>15</sup>	52,2±0,05	6,3±1,3	0,03±0,02
<b>Solutol® solution</b>	91,9	0	0	48,1				

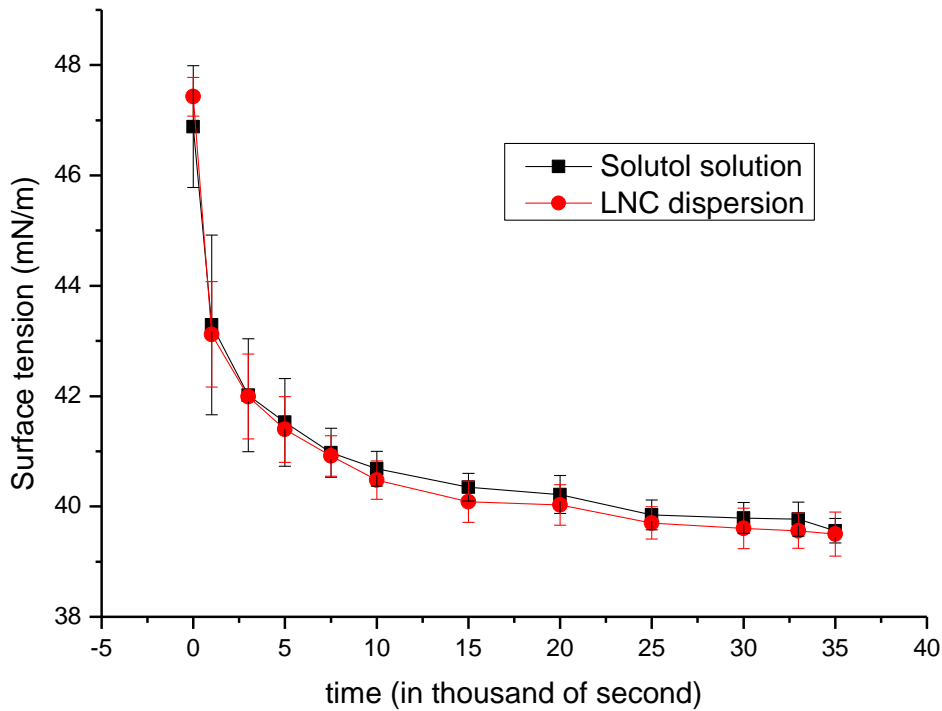
### 3.2. Surface tension measurements

The critical micelle concentration (CMC) for Solutol® solution was 5.3x10<sup>-3</sup>mol/L with an equilibrium surface tension value of 38mN/m. Considering LNC and assuming the

presence of the whole particle at the interface after adsorption (not a single surfactant molecule), the Interfacial saturated concentration (ISC) was preferred. The surface tension value obtained at the ISC was 36 mN/m. Both CMC and ISC have the same values. For concentrations higher than 10% of the CMC or ISC value, the surface tension decrease for LNC dispersion is significantly higher than the one obtained for Solutol<sup>®</sup> solutions. This is interesting because all microbubbles formulations were performed at a concentration in Solutol<sup>®</sup> of  $5.3 \times 10^{-2}$  mol/L. On the contrary, when concentrations are lower than 10 % of the CMC or the ISC, there was not a significant difference between values obtained for Solutol<sup>®</sup> solutions and for LNC dispersions (figure 2). The equilibrium surface tension value obtained at the air/water interface for LNC dispersion or the Solutol<sup>®</sup> solution is not so far from the conceptual figure required (about 32-42mN/m) in the presence of surfactant at the air/water interface to assume a good stabilization. Indeed, the surfactant presence at the air/water interface decreases the surface tension up to 30-40mN/m. The LNC although they are colloïdal particles seem to better stabilize the interface compared to the classical surfactant (Solutol<sup>®</sup>).



**Figure 1:** Air water surface tension versus Solutol<sup>®</sup> solutions concentrations



**Figure 2:** Air water surface tension versus time for a 10 % of CMC (ISC) concentration.

### 3.3. Amount of material at the interface

Regarding the figure 3, for the concentration above 10 % of the CMC, the surface excess values are not significantly changed. Below this concentration, the surface concentrations increase up to reach a constant value at the CMC. However, for the lower concentrations, the amount of Solutol<sup>®</sup> brought by Solutol<sup>®</sup> solution is higher than the one brought by the LNC dispersion. The difference observed between these amounts could result from the fact that, in the sample of the LNC dispersion, Solutol<sup>®</sup> would not be the single component brought by the LNC dispersion at the interface. Indeed, when LNC particles are deposited in the bulk, in the first times, they remove from there to the subphase. In the subphase, they release their components, especially

## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

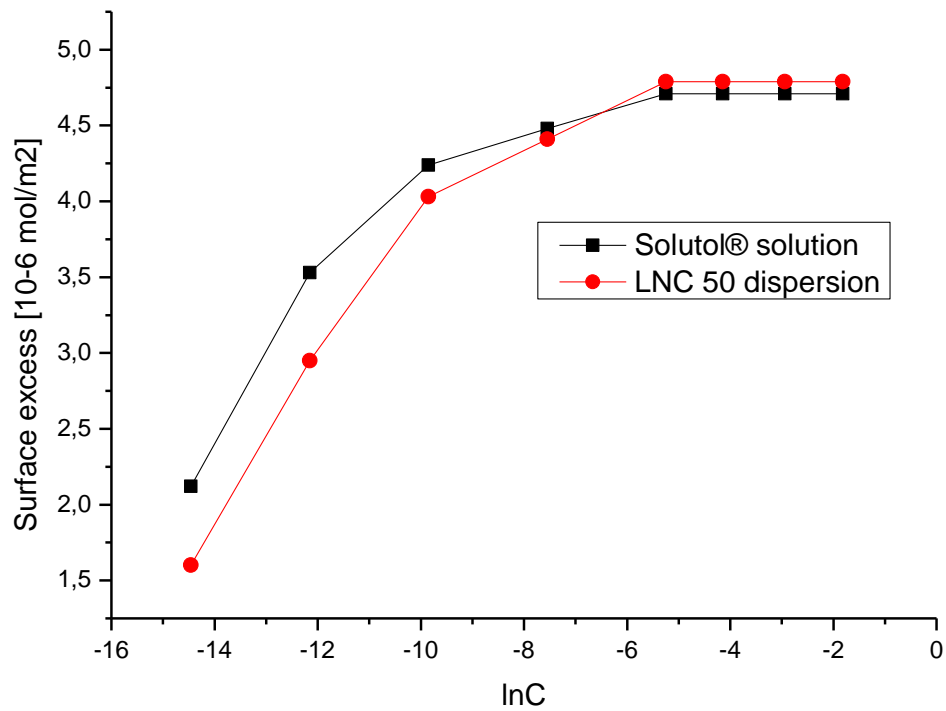
---

Solutol<sup>®</sup> and Labrafac<sup>®</sup>. Both of Solutol<sup>®</sup> molecules and Labrafac<sup>®</sup> molecules release reach the interface with the different speed.

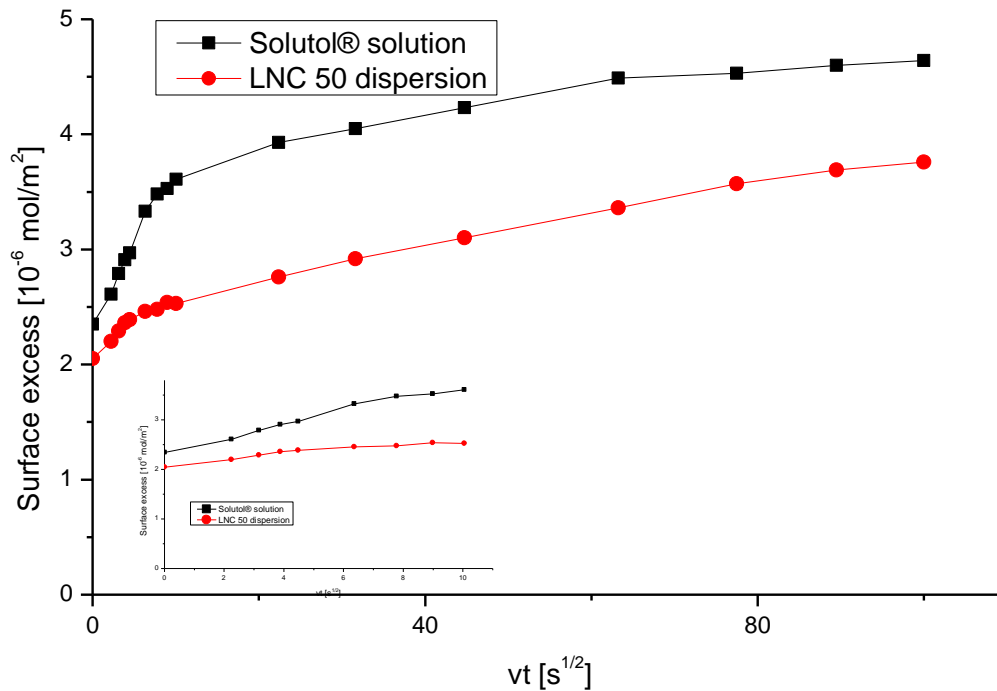
Otherwise, according to figure 4, two parts are distinguished in the curves. The molecules adsorption could be done in a two-phased process. Nevertheless, the plots show over the short time scales as well as for the long time scales, a linear shape. So the adsorption of molecules may be diffusion controlled, that means that molecules remove the concentrated medium toward the less concentrated one (from subphase to the interface).

Comparing to the LNC dispersion, within the first hundred second, the amount of Solutol<sup>®</sup> accumulated at the interface increase quickly and abruptly before slacking in the following seconds (figure 4). This explains the rapid removal of Solutol<sup>®</sup> molecules from the bulk to the subphase. Once, there are enough molecules at the interface, the moving is slower. In the case of LNC 50 dispersion, the accumulation of molecules at the interface was done more slowly. Maybe before their diffusion, molecules must be release from the shell of LNC which could take more time to be achieved.

When the concentration is high, the amounts are almost similar for the Solutol<sup>®</sup> solution and the LNC dispersion samples. We hypothesized that in the concentrated LNC dispersion, there are sufficient Solutol<sup>®</sup> molecules which can move toward the interface. So the moving of the others molecules are not compulsory to have the expected value of the surface excess.



**Figure 3:** Surface excess in function of Solutol<sup>®</sup> concentration for both the LNC dispersion and Solutol<sup>®</sup> solution.



**Figure 4:** Solutol® amount accumulated with time for the concentration of 10 % of CMC ( $5.3 \times 10^{-4}$  mol/L in solutol).

Diffusion coefficients were calculated considering two first parts of curves and the short-time approximation of Ward and Tordai equation. It is difficult to note the beginning of the molecules adsorption using the hanging drop method. Therefore, the beginning of the surface tension values recording was considered as the beginning of that of the molecules adsorption. Considering each time scale, diffusion coefficients values remain below  $10^{-7}$  m<sup>2</sup>/s for the three first points (table 2) or for the fourth first points (table3). From the fourth point (table 2 ) or fiveth point ( table3 ) , its values increase when the concentrations decrease to attain its highest values for very diluted solutions. Indeed, when the medium is well diluted, the molecules interactions are reduced limiting the molecules aggregates formation and facilitating their important accumulation at the interface. The diluted medium provides more space for molecules

## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

moving so the diffusion is pure [205,206]. In the case of concentrated medium, the opposite report is observed. Like us, certain authors also observed that the diffusion coefficient decreased as the bulk concentration increased [207–209].

Moreover, in the time range of 0-100 seconds, the diffusion coefficients values were not significantly different for Solutol® solutions or for the LNC dispersion. This could be related to the migration of Solutol® molecules weakly attached present in LNC dispersion. Indeed, in the first time the free Solutol® molecules present in the LNC dispersion or weakly attached to the LNC were detached and remove toward the interface air/eau explaining the absence of difference obtained for the two samples.

However, considering the values obtained in the second time range (100-900 seconds), LNC dispersion bring more material per second than Solutol® solution. Indeed, once free Solutol® molecules attain the interface, the relay is assumed by the ingredients release from the LNC surface. So the difference obtained in the second time scale is justified.

**Table 2:** coefficient diffusion values in the time range of 0-100 seconds

Concentration of Solutol® ( mol/L)	Solutol® dispersion	Standard deviation	LNC 50 Dispersion	Standard deviation	P value
$5.30 \times 10^{-7}$	0.009	0.005	0.0013	0.001	0.042
$5.30 \times 10^{-6}$	0.00018	0.0001	$1.02 \times 10^{-5}$	$1.29 \times 10^{-5}$	0.071
$5.30 \times 10^{-5}$	$1.30 \times 10^{-5}$	$1.13 \times 10^{-5}$	$2.32 \times 10^{-6}$	$8.23 \times 10^{-7}$	0.76
<b><math>5.30 \times 10^{-4}</math></b>	$2.09 \times 10^{-8}$	$1.21 \times 10^{-8}$	$1.76 \times 10^{-8}$	$1.05 \times 10^{-8}$	0.73
$5.30 \times 10^{-3}$	$4.47 \times 10^{-11}$	$1.11 \times 10^{-11}$	$4.66 \times 10^{-11}$	$2.24 \times 10^{-11}$	0.053
$5.30 \times 10^{-2}$	$3.82 \times 10^{-13}$	$1.13 \times 10^{-13}$	$2.70 \times 10^{-13}$	$1.68 \times 10^{-13}$	0.89



## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

**Table3:** values of diffusion coefficient (m<sup>2</sup>/s) obtained for the Solutol® solution and for the LNC dispersion in the time range of 100- 900 seconds

Concentration of Solutol® ( mol/L)	Solutol® dispersion	Standard deviation	LNC 50 Dispersion	Standard deviation	P value
5.30x10 <sup>-7</sup>	0.008	0.007	2.62x10 <sup>-4</sup>	3.06x10 <sup>-5</sup>	0.13
5.30x10 <sup>-6</sup>	1.65x10 <sup>-4</sup>	2.42x10 <sup>-5</sup>	1.16x10 <sup>-4</sup>	1.86x10 <sup>-5</sup>	0,051
5.30x10 <sup>-5</sup>	3.3x10 <sup>-9</sup>	3.21x10 <sup>-9</sup>	2.70x10 <sup>-7</sup>	1.68x10 <sup>-7</sup>	0,041
5.30x10 <sup>-4</sup>	1.68x10 <sup>-10</sup>	9.68x10 <sup>-11</sup>	1.15x10 <sup>-9</sup>	5.77x10 <sup>-11</sup>	1.12x10 <sup>-4</sup>
<b>5.30x10<sup>-3</sup></b>	1.58x10 <sup>-12</sup>	8.02x10 <sup>-13</sup>	2.62x10 <sup>-12</sup>	3.06x10 <sup>-13</sup>	0.047
5.30x10 <sup>-2</sup>	2.70x10 <sup>-15</sup>	1.68x10 <sup>-15</sup>	1.53x10 <sup>-14</sup>	4.52x10 <sup>-15</sup>	0.048

#### **4. Conclusion**

In conclusion, the use of LNC dispersion to formulate dispersed system could allow to bring more material able to better stabilize the interface. Considering the diffusion coefficients values obtained for both LNC 50 dispersion and Solutol® solution in the second range of time, it appears that LNC dispersion values are significantly very far from that of pure Solutol® solution. This explains once more the release of shell components by the LNC 50 in the subphase after their deposition in the bulk of the medium.

#### **Acknowledgments**

This study was funded by 'Service de Cooperation et d'Action Culturelle' of the French Embassy in Benin, by "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin" and by the "Faculté des Sciences de la Santé de cotonou". The first Author of this article thanks the laboratory MINT U1066 of University of Angers to accept her reception and to provide facilities for this research.

## **Rhéologie interfaciale de nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau**

### **1. Contexte**

Par un système de stabilisation de type Pickering like, les nanocapsules lipidiques pourraient constituer une alternative intéressante pour renforcer et stabiliser l'interface de bulles de gaz dispersées en solution aqueuse. Pour cela, de nombreuses études préliminaires sur ces particules ont été faites afin d'investiguer sur une éventuelle possibilité de les utiliser comme agents de stabilisation interfaciale.

Précédemment, les propriétés tensioactives des nanocapsules lipidiques ont été étudiées à travers une étude de mesure de tension de surface utilisant les méthodes de Wilhelmy et de la goutte pendante. A l'issue de ces études, nous pouvons retenir que les NCL se comportent comme de vrais acteurs dans la stabilisation des bulles. De plus le type de diffusion vers l'interface déterminée à l'interface air/eau, révèle une capacité de diffusion intrinsèque des NCL. En outre, la concentration à l'interface, déduite à partir des valeurs de tension de surface, montre que pour une concentration égale en Solutol<sup>®</sup>, la solution de Solutol<sup>®</sup> apporte plus de matière à l'interface comparativement à la dispersion de NCL au niveau de laquelle la différence est compensée par d'autres substances autre que le Solutol<sup>®</sup>. Au décours de cette étude il a été montré qu'en plus du Solutol<sup>®</sup>, d'autres molécules telles que celles du Labrafac<sup>®</sup> se placent aussi à l'interface. Malgré ces constatations, la qualité du film de stabilisation formé à l'interface n'est toujours pas connu précisément. L'objectif ici est de compléter ces études au travers d'une étude de rhéologie à l'interface eau-air après stabilisation par les NCL.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériels**

Solutol®15 HS fourni par BASF (Ludwigshafen, Allemagne) est un mélange de polyéthylène glycol 660 libre et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660). Lipoid® 75-3, une lécithine de soja composée de phosphatidylcholine à 70 % et de phosphatidyléthanolamine à 10 %, a été acheté auprès de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Labrafac® WL 1349 est un triglycéride d'acides caprylique et caprique et provient de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). L'eau Milli Q est délivrée par un système Milli-Q-plus® system (Paris, France).

### **2.2. Méthodes**

#### **2.2.1. Formulation des NCL**

La méthode mise au point en 2000 par Heurtault et al. [40] a été utilisée. Elle repose sur trois cycles de température allant de 60°C à 100°C. Brièvement, le mélange de tous les constituants (huile, phase aqueuse, surfactifs) a été chauffé trois fois entre 60-100°C. A la fin du troisième cycle, la préparation a été diluée conduisant ainsi à la formation des NCL. Les NCL ont été conservées pendant 7 jours à température ambiante et leur stabilité a été évaluée au bout de cette durée de conservation avant leur utilisation.

#### **2.2.2. Caractérisation des NCL**

Le Nano Series ZetaSizer (Malvern, Worcestershire, UK) a été utilisé pour mesurer la taille des particules, leur indice de polydispersité ainsi que leur potentiel zêta. Le mouvement brownien des particules, mesuré par la diffusion dynamique de la

lumière, a été analysé par l'appareil pour donner la taille hydrodynamique des particules. Le système fonctionne avec un faisceau laser de longueur d'onde de 632,8 nm incliné d'un angle de 173°. Quant à la mesure du potentiel zêta, elle est basée sur la mobilité électrophorétique des particules. Toutes les mesures ont été faites à 25° et ont été répétées trois fois. Tous les échantillons ont été dilués dans le ratio 1 :59 avant chaque mesure.

### **2.2.3. Mesure de la tension de surface**

Les mesures de tension de surface sont basées sur le principe de la goutte pendante utilisant le tensiomètre à goutte (Tracker®, ITConcept Teclis, Longessaigne, France). L'appareil est équipé d'un porte-cuve thermostaté dans lequel est placée la cuve en verre de 7 mL contenant l'échantillon. L'ensemble seringue-aiguille + piston est contrôlé par un moteur qui assure le mouvement de la goutte formée au bout de l'aiguille. Une source de lumière éclaire la cuvette et permet à la caméra d'enregistrer des images liées aux différentes modifications de l'aire de la goutte qui seront par la suite analysées par un ordinateur équipé d'un logiciel spécifique. L'équation de Laplace est appliquée aux images afin de donner la valeur de la tension de surface. Dans notre cas c'est une bulle d'air avec une symétrie axiale qui a été formée. Il s'agit d'une goutte montante d'un volume fixe et constant de 5 mL. La fréquence de la caméra a été réglée à une mesure toutes les 5 secondes. Une microseringue de 0,25 mL (Prolabo, Paris, France) a été adaptée à une aiguille recourbée G20 (ITConcept Teclis, Longessaigne). Les mesures ont été réalisées sur des échantillons de solutions de Solutol® et de dispersions de NCL. La gamme de concentration considérée était  $5,3 \cdot 10^{-6}$ - $1,6 \cdot 10^{-1}$  (mol/L). Cet intervalle a été retenu sur la base des résultats d'évaluation des propriétés tensioactives des NCL. Les échantillons ont été passés au travers d'un filtre seringue de 0,22 µm avant d'être introduits dans une cuvette en verre (Fischer Scientific). Pour espérer atteindre l'équilibre, la durée de chaque mesure a été fixée à 16 heures.

#### 2.2.4. Propriétés rhéologiques à l'interface

Pour pouvoir déduire les modules de viscoélasticité, une fois l'équilibre atteint, la bulle est soumise à des mouvements de compression et de dilation d'une amplitude de 8 % (par rapport à l'aire totale de 13,5 mm<sup>2</sup>) permettant d'avoir un régime linéaire. La variation a été appliquée au volume de la bulle considérant l'intervalle de période (T) de 1-120 secondes correspondant à une gamme de fréquence (W) de 0,05-6,28 (rad/s). Le profil de sollicitation du volume était de type sinusoïdal avec 5 cycles normaux alternés par 5 cycles blancs. L'analyse des sinusoïdes a été faite en utilisant un logiciel d'analyse par transformées de Fourier où 5 cycles normaux sont considérés. Les parties réelle (G') et imaginaire (G'') du module d'élasticité complexe (G) sont calculées par le logiciel de traitement. En s'inspirant des travaux de Saulnier et al. [210] et à partir des valeurs du module d'élasticité complexe, nous avons déduit par extrapolation les valeurs des élasticités dissipative (E<sub>ne</sub>), conservative (E<sub>e</sub>) d'interface et du temps de relaxation (τ). Ces derniers permettent de s'affranchir des biais liés à chaque expérience et facilitent donc la comparaison des résultats. Ces coefficients sont considérés ici comme des paramètres ajustables dans les équations de G' et G'' en supposant que le modèle de Maxwell s'applique à notre type d'interface. Les équations suivantes ont été utilisées pour déduire les E<sub>ne</sub>, E<sub>e</sub> et τ.

$$G'(\omega) = Ee + Ene \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (a)$$

$$\frac{G''(\omega)}{\omega} = Ene * \tau \frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (b)$$

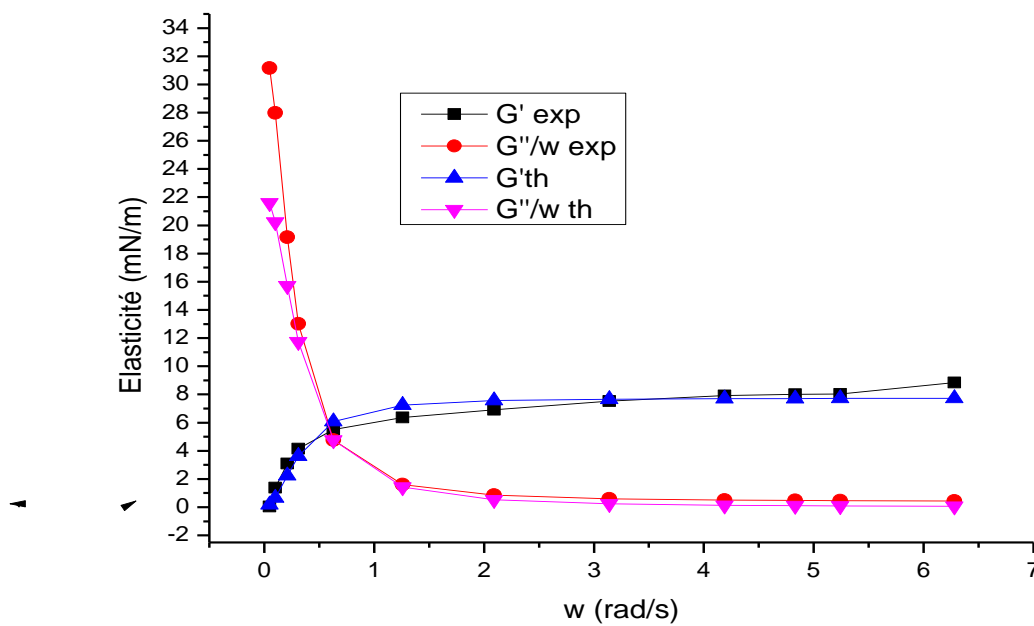
$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G' = Ee \quad (c)$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G' = Ee + Ene \quad (d)$$

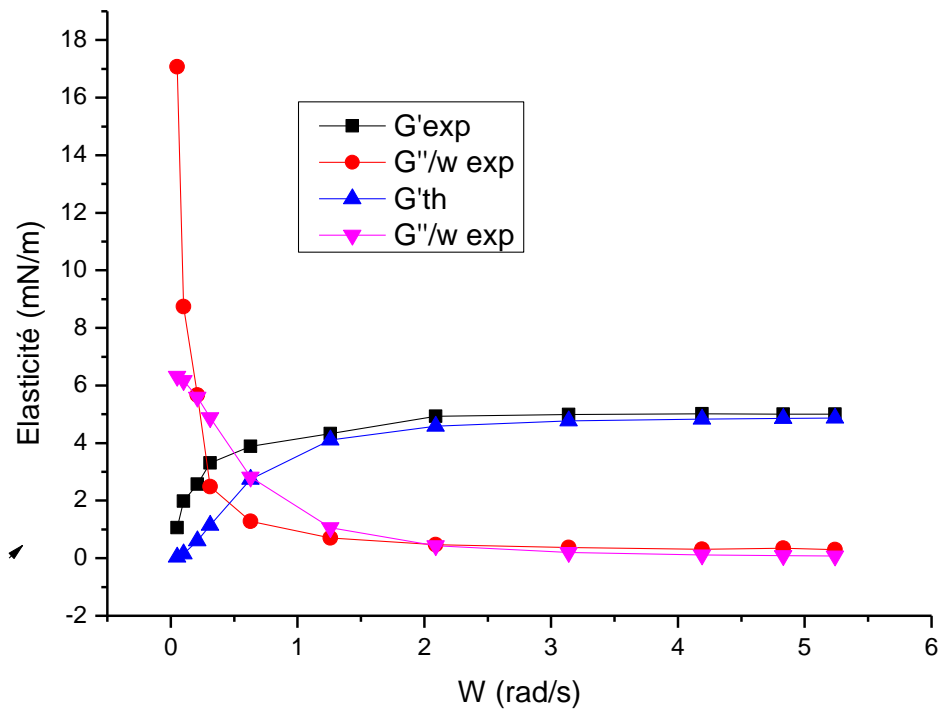
$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G' = E_{ne} \tau (e)$$

### 3. Résultats et discussion

En observant les figures 5 et 6, nous notons une bonne superposition entre la courbe théorique et expérimentale dans le cas des deux types d'échantillons ( solutions de Solutol® solution et dispersion de NCL ), ce qui signifie que les équations de Maxwell corrélaient bien les données expérimentales.



**Figure 5 : Evolution de l'élasticité en fonction de la concentration en Solutol® pour la solution de Solutol®.** Cette courbe a été tracée pour la concentration de  $5,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L. les courbes théoriques (th) sont obtenues avec les paramètres optimaux  $E_e$ ,  $E_{ne}$  et  $\tau$  introduits dans les équations de Maxwell



**Figure 6:** Evolution de l'élasticité en fonction de la concentration en Solutol®. Cette courbe a été tracée en considérant la concentration primaire des NCL soit  $C = 5,2 \cdot 10^{-2}$  mol/L. Les courbes théoriques (th) sont obtenues avec les paramètres optimaux  $E_e$ ,  $E_{ne}$  et  $\tau$  introduits dans les équations de Maxwell

Au niveau des figures 7, 8 et 9 sont présentés respectivement les valeurs optimales de l'élasticité conservative ( $E_e$ ), de l'élasticité dissipative ( $E_{ne}$ ) et du temps de relaxation ( $\tau$ ) [210].  $E_e$  exprime les interactions latérales existant entre les molécules du surfactant qui s'adsorbent à l'interface [211]. Lorsque la valeur de  $E_e$  est importante, les interactions latérales entre les molécules de tensioactifs sont importantes ce qui préserve la couche de tensioactif d'une éventuelle déstabilisation (lors de la manutention ou de la conservation). En effet, les molécules sont intimement liées ce qui rend leur départ de l'interface difficile. A l'opposé lorsqu' $E_e$  est basse, on pourrait observer le phénomène inverse.  $E_{ne}$  reflète les interactions que les molécules de tensioactif disposées à l'interface peuvent établir avec les molécules environnantes

## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

---

(phase hydrophile ou (et) hydrophobe) [212]. Sa valeur donne des indications sur la qualité des interactions établies par les molécules à l'interface avec celles des phases adjacentes. Pris isolément, lorsqu' $E_{ne}$  est élevée, les interactions entre les molécules de tensioactifs et celles des phases environnantes sont fortes et lorsque sa valeur est moins élevée, les interactions sont faibles. Le temps de relaxation est le temps au bout duquel une couche de tensioactif une fois délocalisée sous l'effet d'une contrainte retrouve un nouvel état d'équilibre après suppression de la contrainte. Ces trois paramètres servent d'indices d'appréciation de la qualité (élasticité ou rigidité) de la couche formée par les tensioactifs à une interface donnée. Ils sont utilisés pour comparer deux systèmes dispersés du point de vue résistance mécanique ou physique. On peut également les utiliser pour comparer la stabilité des différentes formulations au sein d'un même système dispersé en se basant sur les valeurs de concentration en tensioactif. Pour qu'un système soit efficacement et puisse résister aux phénomènes mécaniques, l'idéal est d'avoir un  $E_e$  fort (10-50 mN/m), un  $E_{ne}$  faible ( $\leq 10$  mN/m) et un  $\tau$  faible (0-2 secondes).

En observant les figures 7,8 et 9, on remarque que les deux courbes sont très similaires. Ce qui laisse à penser que les NCL ne sont pas présentes à l'interface sous forme native mais de façon déstructurée où le Solutol<sup>®</sup> venant des NCL natives s'est étalé. Les NCL sont capables de se réorganiser à l'interface air/eau et libérer les molécules de surfactant (Solutol<sup>®</sup>) et du triglycéride (Labrafac<sup>®</sup>) [55,144]. Les molécules de Solutol<sup>®</sup> ainsi libérées forment une monocouche dans laquelle s'insère quelques molécules de Labrafac<sup>®</sup>. Nous rappelons que  $E_e$  et  $E_{ne}$  sont déterminés en tenant compte des interactions établies par les molécules de surfactant à l'interface. Ainsi donc le Labrafac<sup>®</sup> n'étant pas un surfactant donc incapable d'établir des interactions avec les compartiments environnementaux, il n'est pas pris en compte dans le calcul du  $E_{ne}$ . De plus, cette présence en faible quantité et cette incrustation des molécules de Labrafac<sup>®</sup> dans la monocouche de Solutol<sup>®</sup> pourrait expliquer cette absence de contribution des molécules de Labrafac<sup>®</sup> au calcul de la valeur de  $E_e$ . Par conséquent,

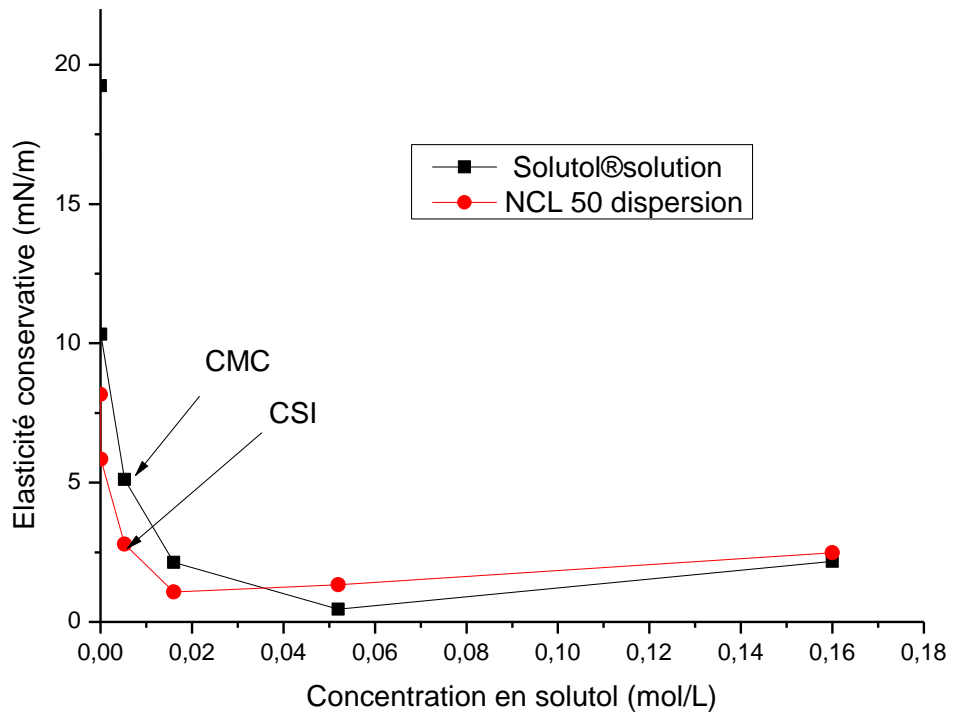


## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

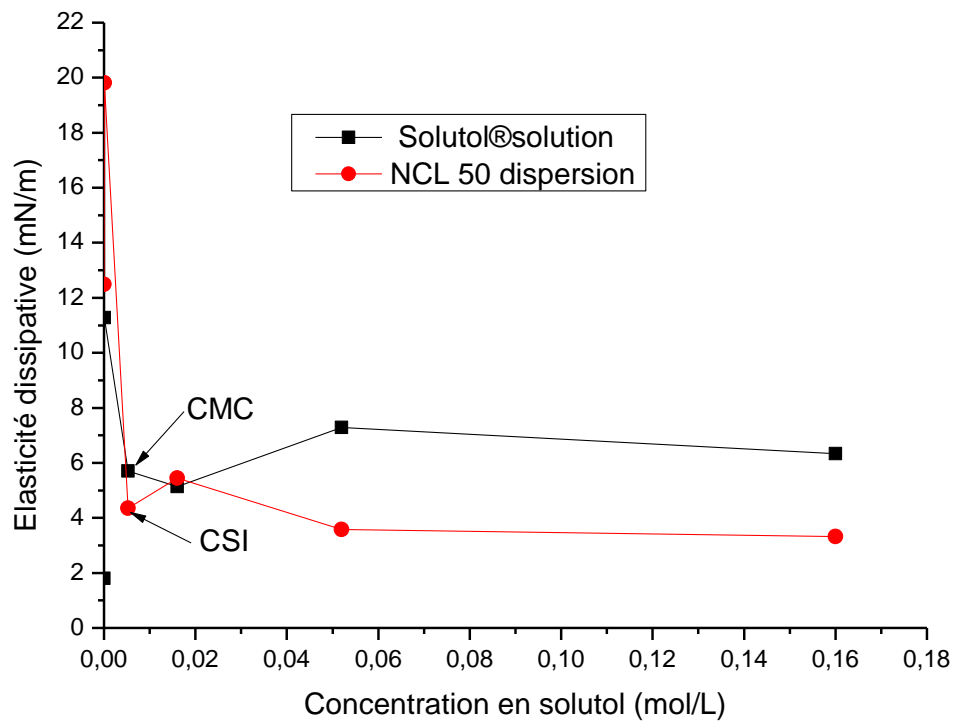
---

une similitude est observée au niveau des valeurs de  $E_e$ ,  $E_{ne}$  et  $\tau$  pour la solution de Solutol® et la dispersion de NCL.

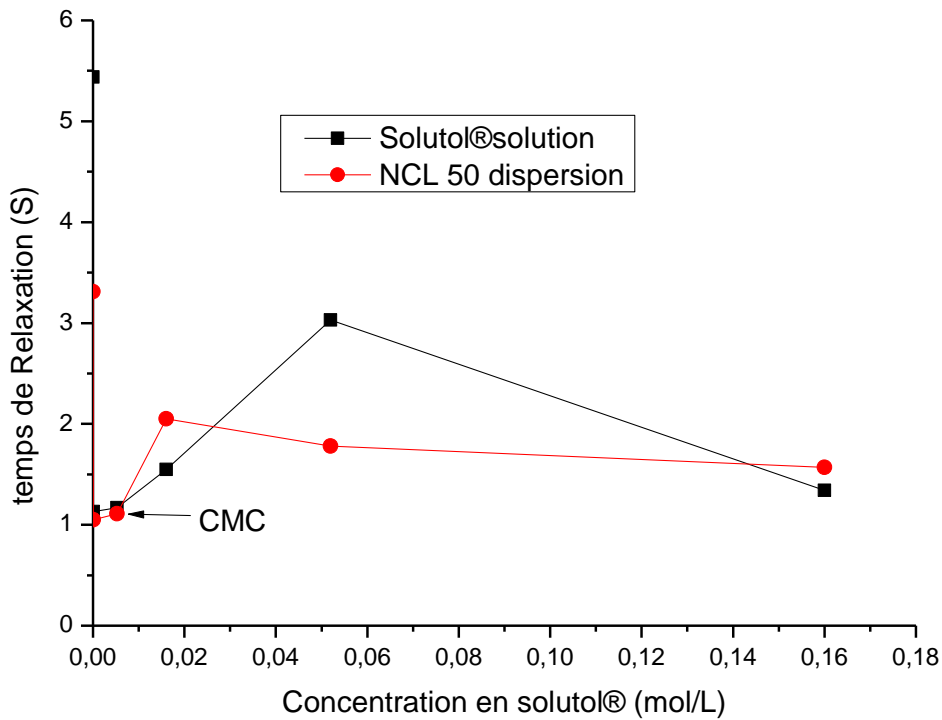
Par ailleurs, en considérant la concentration à laquelle les NCL 50 sont utilisées pour formuler les microbulles d'air ( $5,3 \cdot 10^{-2}$  mol/L), les valeurs obtenues pour les trois paramètres d'élasticité sont simultanément intermédiaires entre les valeurs les plus faibles (1,18 mN/m pour  $E_e$  et  $E_{ne}$  et 1,05 s pour  $\tau$ ) et celles plus élevées (20 mN/m pour  $E_e$  et  $E_{ne}$  et 5s pour  $\tau$ ). De plus les valeurs de  $E_e$  et de  $E_{ne}$  sont toutes en dessous de 10mN/m et celle de  $\tau$  en dessous de 2 secondes et sont donc considérées comme des valeurs faibles. Cette simultanité obtenue pour les trois paramètres, pourrait présager une stabilité acceptable de la couche d'ingrédients formée par les NCL autour des microbulles d'air.



**Figure7 :** Evolution de l'élasticité conservative en fonction des différentes concentrations.



**Figure8** : Evolution de l'élasticité dissipative en fonction des différentes concentrations.



**Figure9 :** Evolution du temps de relaxation en fonction des différentes concentrations.

En conclusion, les valeurs des paramètres d'élasticités obtenus pour la concentration en NCL 50 considérée dans la formulation des microbulles d'air sont toutes inférieures à 10mN/m ou à 2 secondes et par conséquent sont considérées comme pas trop élevées. Comme on pouvait s'y attendre, ce résultat permet de donner des indications sur la stabilité de la couche que formeront les LNC à l'interface des microbulles d'air qui seront mises au point. Ainsi, nous concluons à une stabilité plus ou moins rigide et souple de la couche pouvant résister à toute éventuelle destabilisation mécanique.

## **Comportement des nanocapsules lipidiques et qualité du film formé à l'interface air/eau évaluée par la balance de Langmuir.**

### **1. Contexte**

A travers cette étude, nous avons voulu apprécier le comportement des nanocapsules lipidiques introduites de deux manières différentes. Il s'agit de vérifier si les NCL réagissent de la même manière lorsqu'elles sont déposées à l'interface air/eau et lorsqu'elles sont introduites dans la sous-phase. Cette expérience permettrait de mieux comprendre les phénomènes qui se produisent au cours du processus de formulation des bulles d'air. Nous saurons donc si au cours de la formulation, les NCL sont capables de quitter le milieu de dispersion et d'aller s'insérer à l'interface les bulles néoformées.

### **2. Matériels et méthodes**

#### **2.1. Matériels**

Lipoïd® 75-3, une lécithine de soja composée de phosphatidylcholine à 70 % et de phosphatidyléthanolamine à 10 %, a été fourni par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Labrafac® WL 1349, un triglycéride d'acides caprylique et caprique provient de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). Solutol® HS 15 a été fourni par BASF (Ludwigshafen, Allemagne) et contient du polyéthylène glycol 660 libre et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660). L'eau Milli Q est délivrée par un dispositif Milli-Q-plus® system (Paris, France).

#### **2.2. Méthodes**

##### **2.2.1. Formulation des NCL**

Les NCL ont été formulées grâce à la méthode d'inversion de phase mise au point en 2000 par Heurtault et al. [40]. Cette méthode comporte trois cycles de températures. Les différents excipients ont été mélangés puis trois cycles de

chauffage- refroidissement ont été exécutés. Au cours de la phase de refroidissement du troisième cycle, la préparation a été diluée avec de l'eau MilliQ à 4°C. Cette dilution amorce la formation des NCL. Après la préparation, les formulations ont été conservées à température ambiante pendant trois jours avant d'être utilisées pour la conduite des expériences de Langmuir.

### **2.2.2. Caractérisation des NCL**

Le Nano Series ZetaSizer (Malvern, Worcestershire, UK) a été utilisé pour mesurer la taille des particules, leur indice de polydispersité ainsi que leur potentiel zêta. Le mouvement brownien des particules mesuré par la diffusion dynamique de la lumière a été analysé par l'appareil pour donner la taille hydrodynamique des particules. Au cours de la mesure, l'échantillon est traversé par un faisceau laser de longueur d'onde de 632,8 nm incliné d'un angle de 173°. Quant à la mesure du potentiel zêta, elle repose sur le principe de la mobilité électrophorétique des particules. Toutes les mesures ont été faites à 25° et répétées trois fois. Avant chaque mesure, l'échantillon est dilué au 1/60ème avec de l'eau Milli Q.

### **2.2.3. Cinétique d'adsorption des NCL à l'interface air/eau**

Pour cette expérience, une balance de Langmuir de type KSV NIMA Langmuir and Langmuir Blodgett Instruments (BiolinScientific, KSV NIMA, Tietäjantie 2, Finland) a été utilisée. Elle est équipée d'une chambre de protection qui empêche l'évaporation de la phase aqueuse. Une sonde de température permet de contrôler la température du solvant introduit dans la cuve. Cette cuve a une superficie de 130 cm<sup>2</sup>, munie d'une barrière à chaque extrémité et thermostatée à (20±1) °C. Pour la mesure d'échantillons de nature différente, la cuve et ces accessoires sont nettoyés au micro90, et rincées successivement avec de l'eau de robinet, de l'éthanol 70° puis de l'eau MilliQ. Ces dispositifs sont manipulés avec précaution et avec des gants. Pour chaque expérience, la cuve est remplie à ras bord avec environ 50 mL d'eau milliQ. Cette quantité a été

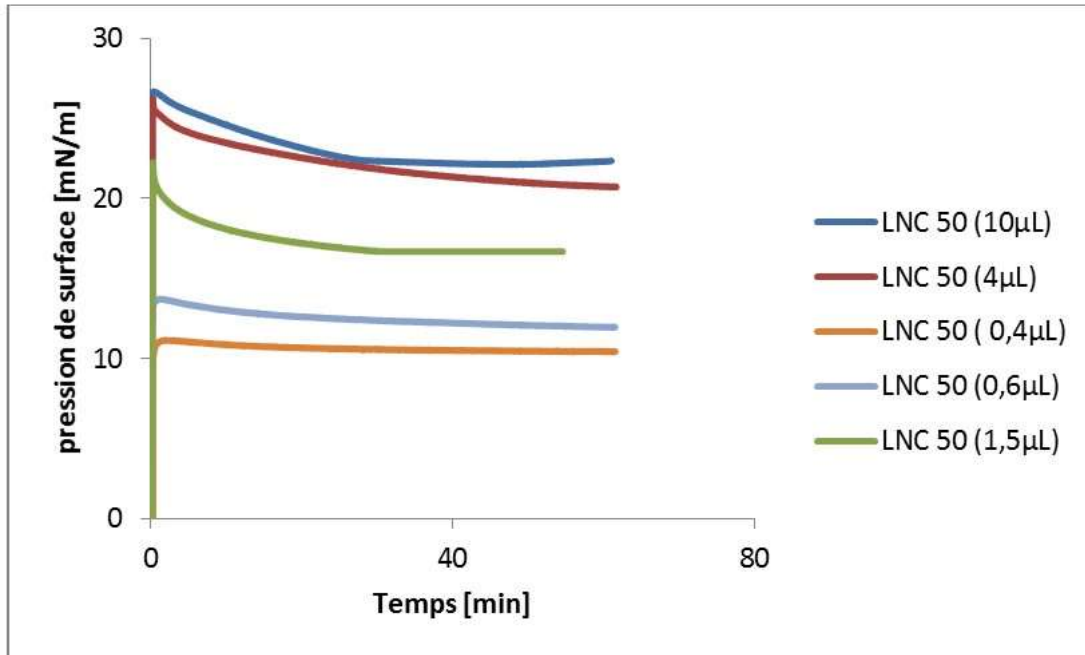
fixée après plusieurs expériences. Le calibrage de l'appareil est fait trois fois avant chaque utilisation. La propriété du milieu a été vérifiée en fermant et en ouvrant les barrières et en veillant à ce que la valeur de pression soit comprise entre 0,2-0,3 mN/m à chaque point de la cuve. Avant les mesures, nous nous sommes assuré que la pression de surface ne dépasse pas 0,5 mN/m en faisant le zéro pour la pression de surface et pour la position des barrières. Durant la mesure les barrières sont maintenues à des positions fixes. L'enregistrement des données a été lancé et les échantillons sont déposés en surface de l'eau avec une micro seringue (exmure) ou introduits dans la sous- phase avec précaution lorsqu'il s'agit de l'expérience d'adsorption. En fonction du volume à introduire, la micro seringue est choisie en conséquence.

Cinq différents volumes ont été testés: 0,4  $\mu\text{L}$  ; 0,6  $\mu\text{L}$  ; 1,5  $\mu\text{L}$  ; 4  $\mu\text{L}$  et 10  $\mu\text{L}$ . Pour les échantillons de petits volumes, une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la dispersion primaire des NCL ou de la solution de Solutol<sup>®</sup> a été utilisée afin de faciliter le prélèvement. L'échantillon a été déposé sur une surface d'une aire totale de 130  $\text{cm}^2$ .

### **3. Résultats et discussion**

#### **❖ Dépôt des échantillons de dispersion de NCL**

La valeur maximale de pression de surface et le plateau (figure 10) sont obtenus juste après l'introduction des échantillons. Toutefois, après le plateau la pression baisse légèrement pour se maintenir à une valeur inférieure à celle de départ et pourrait être dû à la fuite de certaines particules vers la sous-phase[144].

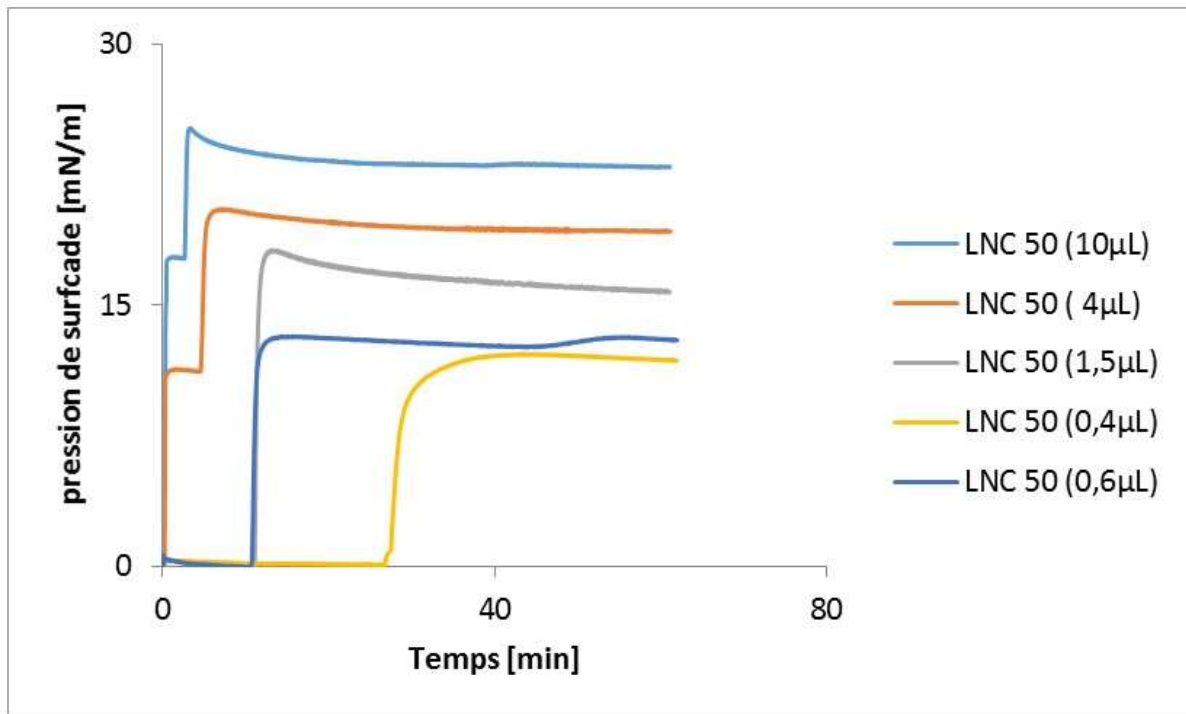


**Figure 10** : Dépôt des particules de NCL sur la balance de Langmuir

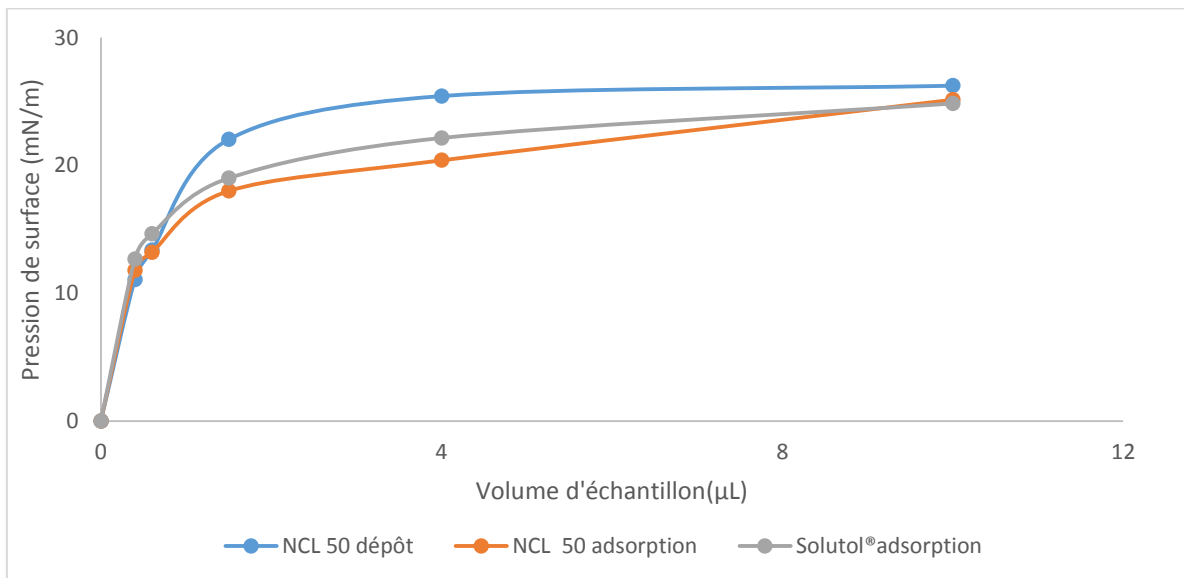
#### ❖ Adsorption

Considérant les volumes importants (4 et 10 µL), nous pouvons remarquer sur la figure 11, des courbes caractérisées chacune par deux verticalités séparées par deux plateaux. En effet, aussitôt après l'introduction de l'échantillon dans la sous-phase, la pression de surface atteint rapidement 18 mN/m et 11 mN/m avant de se stabiliser à sa valeur maximale de 25,15 mN/m pour 10 µL après 4 minutes et de 20,45 mN/m pour le volume de 4 µL après 3 minutes. Pour les petits volumes, les courbes présentent deux parties horizontales séparées par une verticalité. Ainsi donc, après l'introduction de ces volumes, les valeurs maximales de pression de surface de 18 mN/m; 13,20 mN/m et de 11,86 mN/m sont respectivement obtenues pour les volumes suivants : {1,5; 0,6; 0,4 µL} et ceci après un temps de latence respectifs de 26 min, 12 min et de 10 min. Le temps de latence augmente à mesure que le volume apporté augmente.





**Figure 11** : Adsorption des particules de NCL sur la balance de Langmuir



**Figure12** : Evolution de la pression de surface en fonction du volume d'échantillon

Sur la base de ces résultats, la pression de surface est proportionnelle au volume d'échantillon introduit lorsque nous considérons le dépôt ou l'adsorption. Dans le cas de l'adsorption, le temps nécessaire pour que les particules aient un effet sur l'interface dépend de la quantité initiale de particules dans la suspension. Plus elles

## *Chapitre II : Etude des propriétés rhéologiques des nanocapsules lipidiques à l'interface air/eau*

---

sont nombreuses et plus rapidement elles diffusent vers l'interface. En comparant les résultats du dépôt des NCL aux résultats donnés par l'adsorption, on constate que la pression de surface obtenue au plateau est légèrement supérieure à celle donnée par l'adsorption, ce qui veut dire qu'une partie des particules n'a pas pu s'adsorber (ou se réétaler). En comparant l'adsorption du Solutol® à celle des NCL (figure 12), contrairement à ce qu'on devrait s'attendre en considérant la méthode de dépôt, on constate que les valeurs maximales de pression obtenues ne sont pas très différentes. La différence résiderait dans les phénomènes qui gouvernent chaque processus. En effet le processus d'adsorption se fait en trois étapes (diffusion et /ou convection, adsorption et ou désorption et réarrangement) tandis que le processus de dépôt comporte deux étapes (adsorption et /ou désorption et réarrangement. Cette différence expliquerait les résultats obtenus.

En conclusion, les NCL sont capables de quitter la sous-phase et de s'adsorber à l'interface en se déstabilisant pour former des couches mixtes de Solutol®, et Labrafac®. Par conséquent, lors de la formulation elles constitueront bien des éléments de stabilisation intéressants des bulles néoformées.

*Chapitre III : Formulation des  
microbulles d'air-article 4*

### **Microbubbles d'air stabilisées par des nanocapsules lipidiques (LNC)-article 4**

#### **Résumé**

Ce chapitre expose les différentes étapes nécessaires lors de la mise au point des microbulles qui, rappelons-le, sont formulées par agitation d'une suspension de nanocapsules lipidiques de taille 50 nm. Après avoir testé toutes les tailles de nanocapsules lipidiques disponibles ainsi que certaines concentrations de NCL, la dispersion primaire de NCL de taille de 50 nm a été retenue à cause des meilleures caractéristiques (volume final de microbulles, taille des microbulles) que possédait la formulation générée par cette dimension de particules (détails dans l'étude complémentaire).

Après la formulation des microbulles d'air, plusieurs approches ont été utilisées pour apporter la preuve que les bulles ont été effectivement générées et présentent des caractéristiques de stabilité satisfaisantes. Les différents facteurs pouvant influencer sur les différentes étapes du processus de développement ont été évalués. Les meilleures conditions de conservation de ces nouvelles particules ont été définies à travers des études de stabilité. Sur la base de la valeur du Span ( $1,07 \pm 0,37$ ) nous pouvons en déduire que les particules formulées ont une distribution assez homogène avec une distribution de taille comprise entre  $0,25 \mu\text{m}$  et  $1,20 \mu\text{m}$ . la taille moyenne déterminée par la méthode de diffraction de la lumière laser est de  $(1,9 \pm 0,6) \mu\text{m}$ . le facteur d'incorporation du gaz (quantité maximale de gaz pouvant être incorporée dans la formulation) est de  $0,177 \pm 0,01$ . L'analyse de la structure de la paroi des bulles via la microscopie confocale permet de confirmer la présence du Solutol® et du Lipoid® ainsi qu'une quantité infime de Labrafac® parmi les constituants de la paroi des bulles.

Les particules peuvent être conservées à  $4^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  ou à  $37^\circ\text{C}$  pendant une durée de deux semaines. La vitesse d'agitation s'est révélée comme un facteur influençant la taille et la concentration finale des bulles. Une corrélation a été établie entre la durée d'agitation et la concentration en microbulles.

## **Microbubbles formulated using lipid nanocapsules**

**C. Rosemonde A. MOUZOUVI<sup>1,2</sup>, Anita UMERSKA<sup>1,\*</sup>, Laurent LEMAIRE<sup>1</sup>, Guillaume BASTIAT<sup>1</sup>, Florence FRANCONI<sup>1</sup>, André Koffi BIGOT<sup>3</sup>, Patrick SAULNIER<sup>1</sup>.**

- 5) MINT, INSERM 1066, CNRS 6021, Univ Angers, Université Bretagne Loire, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers cedex France
- 6) Laboratoire de Pharmacie Galénique et de technologie Pharmaceutique, UFR Pharmacie, FSS, Université d'Abomey-calavi, Cotonou, Benin
- 7) Service de la Banque de Sang du Centre National Hospitalier et Universitaire de Cotonou, Benin

To whom correspondence should be addressed: [rosedescience@yahoo.fr](mailto:rosedescience@yahoo.fr)

Phone: 0022995566814

Present address: Université d'Abomey-calavi (R. MOUZOUVI)

05 BP 657 Cotonou

Bénin

### **Abstract**

Aqueous suspensions of gas bubbles are used for several medical applications and more particularly in the field of ultrasound imaging, as effective contrast agents. Recently, bubbles were studied as interesting drug delivery systems able to transport and release therapeutic agents localized at their surface which can be controlled by playing with the characteristics of the ultrasound field in which they are introduced. Despite these advances, small bubbles stabilization remains an important challenge because of the inherent important Laplace pressure that merits to be faced.

In this work, we decided to use well-defined Lipid Nanocapsules (LNC) in order to check if they can stabilize small air bubbles as usual nanoparticles can stabilize Pickering emulsion systems. LNC were formulated by inversion phase. Once prepared microbubbles were formulated by the stirring method in a LNC aqueous suspension. Effects of some parameters stepping in the formulation process were assessed and the stability of the microbubbles was studied over time.

The size distribution of formulated microbubbles was in the range of (0.25-1.25)  $\mu\text{m}$  with one average a mean size (Sauter diameter) of  $(1.9 \pm 0.3)$   $\mu\text{m}$ . They were stable at 4°C, 25°C and 37°C for two weeks.

### **1. Introduction**

In the simplest case, usual dispersed systems are constituted by two immiscible phases mainly classified as the external continuous phase and the internal dispersed one. This latter can be constituted by water, oil and in our purpose by gas. They need to be stabilized by amphiphilic molecules (surfactants, polymers, proteins) to overcome their inherent unstability more pronounced when their size is small [1,2]. However, the stabilization mechanisms depend on many parameters as their chemical structures, their hydrophilic lipophilic balance (HLB), the water-oil Ratio, the temperature, concentrations, pH, etc. Thus, when single surfactants are used, one can assist generally to an unsatisfying stabilization that needs to be reinforced by using a combination of several amphiphilic molecules. Surfactants are able to adsorb at the interface due to their amphiphilic properties diminishing the interfacial tension. Steric or electrostatic effects can strongly impact the mechanism of adsorption. However, it should be noticed that the use of these molecules is not without any adverse toxic effects: some of them can cause allergic reaction or irritation limiting their use in many preparations. This toxicity is strongly correlated with their concentration. In recent years, biosurfactants regain a certain interest to bypass these limitations. Various proteins (albumin) and biopolymers (saponins) adsorb at the interface due to their amphiphilic capacity whereas an additional polymer (gum) can be used to increase the viscosity of the external phase [213,214]. Experiments combining protein and polysaccharides or polymer and surfactant were also tested [174,176,177]. Unfortunately, biosurfactants and proteins could not decrease significantly the interfacial tension in combination with a too long adsorption characteristic time.

An alternative to the usual amphiphilic stabilizers described before, organic or inorganic particles and even the spores or bacteria have been proposed to stabilize

dispersed system [34,179–185] to offer an alternative to the usual amphiphilic stabilizers described before. In the field of emulsions, Pickering systems have renewed interest in recent years even if they have been widely studied for many years but have never been used at an industrial scale [186,187].

The wettability or hydrophobicity of such particles is important to allow them to be localized at the interface. In some emulsions, the stabilization is not correlated with an interfacial tension decrease. Some of the stabilizing particles can decrease the surface tension like Janus particles which exhibit different wettability thanks to their two related parts [188–190]. Other ones can increase or even keep constant the interfacial tension such as polystyrene nanoparticles [148,173,191,192]. Pickering stabilizers stand irreversibly at the interface forming a block serving as a steric barrier [190].

Moreover, there are few studies concerning the use of colloidal particles to stabilize dispersed microbubbles systems [33]. Bubbles can be considered as spherical particles with preferentially a size not exceeding 10  $\mu\text{m}$  when used in therapeutic applications. They are constituted by a gaseous core surrounded by a shell of various nature [13,103]. The main difficulty is to maintain the bubbles stability over time regardless the Laplace pressure that can be very important in the case of small bubbles. Another drawback is the difficulty to bring the proof of the microbubble formulation.

In comparison with Pickering emulsions, we intend to evaluate the potential of colloidal particles to overcome the bubble instability. Therefore, we evaluated microbubbles formulated in a suspension of lipid nanocapsules (LNC) [144]. Their lipidic core is composed by medium chains fatty acid surrounded by a shell composed of polyethyleneglycol 660 hydroxystearate and lecithin. Various size including 25 nm, 50 nm and 100 nm can be obtained depending on the amount of each ingredient present in the initial mixture [3,40,44,193–196]. This structure confers to the LNC a very cohesive structure making them very stable over time and in various thermodynamic conditions [40,44,55,141,144].

Moreover, LNC constitute good drug carriers for various drugs that have been correctly encapsulated and released in several biological media. Among drugs incorporated we can note: ibuprofen [197], paclitaxel [198] 10-hydroxycamptothecin [199], doxorubicin [215], erlotinib hydrochloride [200] etoposide [201], docetaxel amiodarone [2], tamoxifen [46], tripartite [203], ferrociphenol [202].

In this way, it could be possible to accumulate loaded LNC around microbubbles where active molecules could be released in an appropriated ultrasound field.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

Solutol<sup>®</sup> HS15 a mixture of free polyethyleneglycol 660 (PEG) and polyethyleneglycol 660 hydroxystearate was provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). Lipoid<sup>®</sup> S75-3 (GmbH, Ludwigshafen, Germany) is a kind of soybean lecithin. It is constituted with 70 % of phosphatidylcholine, 10 % phosphatidylethanolamine and other phospholipids. Labrafac<sup>®</sup> WL 1349 is constituted from caprylic and capric acid triglycerides (Gatefossé S.A. Saint-Priest, France). Water is distributed from a Milli-Q-plus<sup>®</sup> system (Paris, France). Sodium chloride (NaCl) was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). All suspending agents were provided by Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, USA). Dyes 1,1'-dioctadecyl 3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine 4chlorobenzenesulfonate (DiD 7775) and 3, 3'-dioctadécylloxacarbo-cyanine perchlorate (DIO 275) was provided by lifes technologies (Eugene, OR, USA). Nile Red (NR) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). 1-palmitoyl-2-(dipyrroetheneborondifluoride)undecanoyl-sn-glycerophosphocholine (TopFluor PC 810181 and CholEsteryl 4, 4-Difluoro-5, 7-Dimethyl-4-Bora- 3a, 4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoate (CholEsteryl BODIPY<sup>®</sup> FL C12) were purchased from Avanti polar Lipids, INC (Alabaster, Alabama).



### 2.2. Formulation of LNC 50 aqueous suspension

Blanc native lipid nanocapsules with mean size of 50 nm (LNC 50) or dye-loaded lipid nanocapsules with mean size of 50 nm (LNC 50-dye) were suitably prepared following the method described by Heurtault et al. (34) and Bastiat et al [40,216]. DIO 275, DID 7775, Top Fluor PC 810181, NR and CholEsteryl BODIPY® FL C12 are dyes incorporated separately into LNC 50. They were added at the concentration of 0.5 mg/g (weight ratio dye/Labrafac®). In the case of NR, DIO and DID, primary solutions were previously prepared by solubilizing the dye in the mixture of Labrafac®/ acetone. Then the solvent was evaporated before the ingredients weighing. The composition of LNC 50 formulated is presented in table 1.

Briefly, the flask containing the mixture of all ingredients (with or without dye depending on the kind of LNC 50) was put on a hot plate under gentle magnetic stirring (500 rpm). The temperature was increased up to 100°C then the mixture was subject to three cycles of temperature between 100°C and 60°C. During the cooling phase of the third cycle, when the temperature reached 75°C, cold water (4°C) was added to induce the lipid nanocapsules generation.

**Table 1: Composition of LNC formulated**

NCL modifiées	Solutol®	Lipoïd®	Mixture Labrafac®/dye	Labrafac®	NaCl	Eau Milli Q
Blanc LNC 50	847,7	75,2	0	1029,8	89,5	2961,5
LNC 50-dye	846,6	75,3	1029,7	0	89,6	2961,8

### 2.3. Characterization of LNC

Once formulated, particle sizes, their polydispersity index (PDI) and the Zeta potential were performed à 25°C in triplicate on a Nano Series ZetaSizer (Malvern, Worcestershire, UK). Before the measurements, samples were diluted with deionized water in a 1:59 ratio.

The size distributions and the average hydrodynamic particle diameter were determined by Dynamic Light Diffusion. Concerning the zeta potential, the measurements followed the electrophoretic mobility principle. The apparatus was fitted with a 632.8 nm laser beam at a fixed angle of 173°.

#### **2.4. LNC suspension storage**

When LNC are used few days after preparation, the storage is done at room temperature. But, if samples needed to be used after several days, they were conserved at 4°C.

#### **2.5. Formulation of microbubbles aqueous suspension**

LNC aqueous suspension firstly formulated was conserved at room temperature for a few days before using it to prepare microbubble aqueous suspensions. This latter was produced using the ultraturrax® 125 basic instrument (IKA®, Werke Staufen, Germany) with a horn dimension of 8 mm x 100 mm and offering a wide speed of 11000-24000 rpm. The device power was set at 125 W with a sample volume in a 0.5-100 mL range. 10 milliliters of LNC 50 or LNC 50-dye aqueous suspension (Solutol® concentration of 48 mg/mL considering  $9.45 \times 10^{14}$  particles/mL of suspension) were introduced into a graduated plastic flask. The blade of the agitator was immersed in the suspension up to the graduation line of 7.5 mL. The stirring speed and stirring duration were respectively 22000 rpm and 5 min. After this, the volume of microbubble suspension formed at the top was immediately estimated before decanting the mixture into a separating funnel during 20 min. The sediment was then withdrawn in the beaker and the supernatant remaining in the funnel was diluted with 15 ml of milliQ water. The recovered supernatant was put again into the funnel and left for 10 min for a second decantation. After this step, biggest microbubbles located at the top of the funnel were stricken. The remaining microbubble suspensions (MBS) were used for further investigations. The influence of the stirring speed, of the stirring duration

and the initial volume of LNC on the microbubbles size, microbubbles dispersion volume and visual appearance also were investigated.

In order to determine the migration or creaming speed, dispersions of suspending agents previously prepared in water were added to the MBS. The creaming speed was appreciated by visual in gently hand stirred conditions. The viscosity of all systems was measured using rotational rheometer Kinexus Pro+ (Malvern Instrument Ltd, UK) using a plate-cone geometry with an angle of 2°C and an angular velocity between 10 nrad<sup>-1</sup>-and 500 rads<sup>-1</sup>.

#### **2.6. Microbubbles size, zeta potential and concentration measurements**

A granulometer with a sample dispersion unit hydro 2000 S and operating with a static light scattering principle (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) was used to determine the size distribution of the microbubbles that were introduced in water in the dispersion unit with a 600 µl: 50 mL ratio. Sample material refraction index (RI) and its absorbance were fixed respectively at 1 and 0.01. We used water as dispersant medium with a RI of 1.33 and an obscuration range in the 2 %-8 % range with an average value of 5 %. The stirring rate in the dispersion unit was 850 rpm.

Particle sizes were reported as “volume equivalent sphere” for which mean, mode, median, D<sub>n10</sub>, D<sub>n50</sub>, D<sub>n90</sub> which are percentiles, the D [4, 3] (De brouckere Mean Diameter), the D [3, 2] (Sauter mean Diameter) and finally the Span were measured.

Span factor expressed with the equation (1) allows determining the width of the particle distribution and thus its polydispersity. Span must be less or equal to 1 to expect a good and narrow distribution.

$$\frac{D_{n90} - D_{n10}}{D_{n50}} \quad (1)$$

Microbubbles zeta potentials were measured by electrophoretic light scattering using a Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Before measurements, microbubbles suspension was diluted in a 1: 299 (10  $\mu$ L: 2.99 mL) ratio.

Microbubbles number accounts were performed using a multisizer 3, based on Electrozone sensing principle (Beckman coulter®, California, USA). A tube of 30  $\mu$ m of diameter with calculation ranges between 0.6  $\mu$ m and 18  $\mu$ m was used. 2  $\mu$ L of the preparation were introduced into the beaker contained 250 mL of the conduction solution (Isoton® II diluent).

The gas hold-up which can be defined as the gas fraction incorporated into the total volume of microbubbles suspension is given by the following equation (2).

$$\delta = \frac{v_f - v_i}{v_f} (2)$$

$\delta$  corresponds to the gas hold-up,  $v_f$  is the final volume obtained just after microbubbles generation,  $v_i$  is the initial volume of the LNC suspension.

### 2.7. Microscopy characterization

For optical microscopy, the trademark of microscope "Axioskop 2 Mot from Carl Zeiss AG" (Göttingen, West Germany) was used. Some droplets of microbubbles suspension were deposited on the glass and covered with a blade. The observation was performed using a 40 x 40 lens with a wavelength within the visible spectrum.

Concerning the shell structure characterization, 9  $\mu$ L sample was deposited on a slide and covered. Each side of the blade was set with a nail polish and observed at Confocal laser scanning microscopy using a 63 fold/1.4 NA objective of LEICASP5 (LEICA, Mannheim Germany). LEICA LAS AF software allows images every 1 $\mu$ m of depth. The DIO 275 and the Nile Red emitted respectively in wavelength ranges of 491 nm to 574 nm and of 611 to 669 nm. The DID 7775 fluorescence were observed at 665 nm. Both the Topfluor PC 810281 and CholEsteryl BODIPY® FL C12 fluorescences were detected at 503 nm.

### **2.8. Multiple Light scattering analysis**

Turbiscan MA 2000 (Formulaction®, L'Union, France) was used to track any creaming phenomena. The device works with an electroluminescent diode source emitting in the near infrared ( $\lambda_{\text{air}} = 850 \text{ nm}$ ). Two synchronous optical sensors receive respectively the light transmitted through the sample ( $180^\circ$  from the incident light, transmission sensor), and the light backscattered by the sample ( $45^\circ$  from the incident radiation, backscattering detector). The apparatus allows the scanning of the whole container each  $40 \mu\text{m}$  from the bottom up to the top acquiring transmission and backscattering intensity. The corresponding curves provide the transmitted and backscattered light flux in % relative to standards (suspension of monodisperse spheres and silicone oil) as a function of the sample height (in mm). The complete analysis mode enables the detection of the migration phenomena. An open bottom glass with a total capacity of 8 mL (70 mm of length) was used. A volume of 4.5 mL of each sample was introduced into this cylindrical glass cell that was introduced in the apparatus for measurements.

### **2.9. Stability study of microbubbles suspension**

Microbubbles were formulated in the same conditions mentioned above. After preparation, physicochemical properties were determined before some amount of sample was withdrawn for kinetic study over 8 hours. Physicochemical parameters were checked each 2 hours. The remainder of the microbubble suspension was shared in three parts and stored at different temperature ( $25^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$  and  $37^\circ\text{C}$ ) for two weeks. One day and three days after being stored, microbubble sizes were measured and checked every week during 2 weeks.

### **2.10. Microbubbles suspension behaviour under ultrasounds**

The ultrasounds source was a biological device used for cell transfection, Sonidel SP 100 Biological (Sonidel Limited, Dublin, Ireland). It was equipped with a probe for

which the head surface area and the diameter were respectively 1.5 cm<sup>2</sup> and 1.38 cm. A 36-well plate with a capacity of 3 mL and diameter slightly below 1.38 cm was used. Each well received 2.8 mL of the sample. The head of the probe was introduced in the sample leaving a headspace of 0.2 mL. Experiments were carried out for an ultrasound intensity of 5 W/cm<sup>2</sup> during 10 min with a duty cycle of 50 %.

### **2.11. Statistical analysis**

The significant difference between samples was appreciated using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Microbubbles suspension formulation**

Different LNC sizes were tested to stabilize microbubble suspensions but only LNC 50 allowed the better formulations with the best size distributions. It was possible to generate microbubbles with LNC 50 suspension diluted up to a 0.5 ratio.

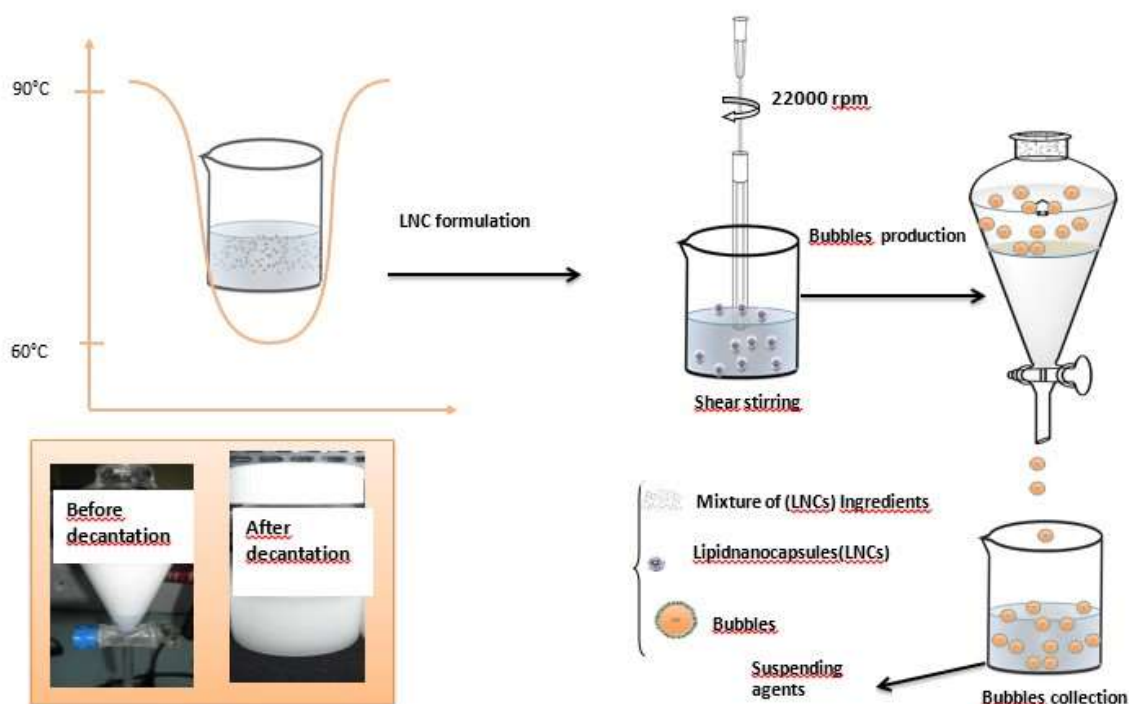
On figure 1, we can remark that microbubbles newly formed stay at the top of the separator funnel (supernatant above the sediment). On the left picture, after decantation, microbubbles suspension has a cloudy and milky aspect.

Several methods can be used to generate microbubbles as sonication or agitation methods. In this study we decided to use well-defined colloidal particles lipid nanocapsules (LNC 50) to induce the microbubble stabilization. LNC 50 are constituted by biocompatible, biodegradable ingredients (GRAS excipients) such as Solutol<sup>®</sup>, Lipoïd<sup>®</sup> and Labrafac<sup>®</sup> which are suitable for parental administrations. A lot of studies were already carried out on their capacity to encapsulate lipophilic or hydrophilic drugs with high drug payloads [40,43].

The LNC 50 suspension used in this process contains  $5.3 \times 10^{-2}$  mol/L of Solutol<sup>®</sup>,  $5.3 \times 10^{-3}$  mol/L of Lipoïd<sup>®</sup> and  $1.14 \times 10^{-1}$  mol/L of Labrafac<sup>®</sup>. This LNC suspension is able to decrease the surface tension at the air/ water interface up to 35 mN/m the LNC ability

to stabilize microbubbles without any other ingredient addition. Indeed, an aqueous solution containing the same amount of Solutol® molecules that was introduced in the LNC 50 suspension was not able to stabilize bubbles (results not shown).

Moreover, if microbubbles are able to oscillate in presence of ultrasounds the sustained release of the drug could be controlled.



**Figure1:** Schematic illustration of the microbubble preparation process via LNC 50 and visual appearance of microbubble suspension.

### 3.2. Physicochemical Characterization of microbubbles suspension

Microbubbles are characterized by a size distribution range between 0.25 and 1.2  $\mu\text{m}$  with a mean diameter "D [3, 2]" of  $1.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$  (fig 2 a). The Span value is  $1.05 \pm 0.37$ , which is acceptable for a homogeneous size distribution of particles (table2). The bubble size seems suitable for intravenous administration for which particles with mean size lower than  $10\mu\text{m}$  are known to facilitate the passage through blood vessels [66,108].

Particles were observed by optical microscopy and they can be described as spherical object that seem surrounded by a shell (Fig 2 b). According to the optical

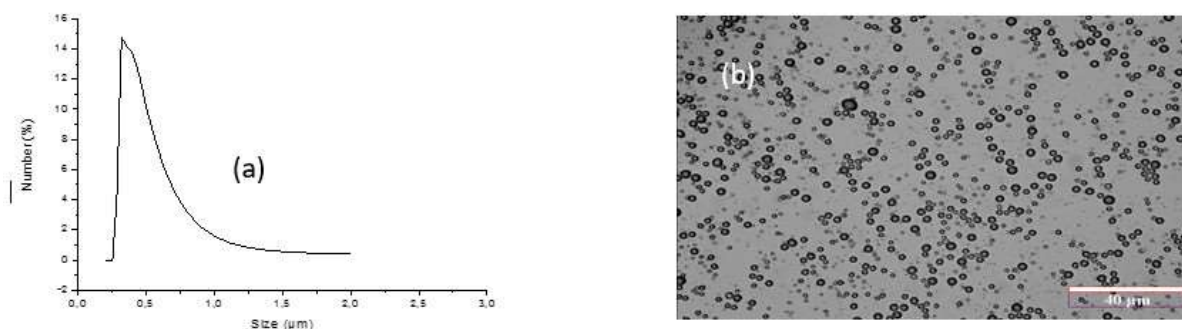
microscopy scale, their mean diameter was about 2  $\mu\text{m}$ . considering the particles profile obtained by AFM picture extrapolation (supplementary data), bubbles can be assimilated to particles with diameter and height of 5 $\mu\text{m}$  and 0.6  $\mu\text{m}$  respectively.

Considering values given by mastersizer apparatus, we can deduce that particles with a size below 400 nm constitute 50 % of the particles population. 90 % of this population having a mean size below 950 nm and 10 % of the population had a mean diameter below 290 nm.

Shear stirring is involved during the generation of microbubbles but in the most case, particles formulated with surfactants have a wide size distribution and large mean diameter[67,90] considering that stirring is known to give more stable microbubbles with higher gas encapsulation [74,217]. Wang et al. who reported a large size distribution for microbubbles coupled to methotrexate-loaded liposomes and formulated by stirring [125].

The gas hold-up ( $0.177\pm 0.01$ ) was in the same order of magnitude compared to the one reported by Xu et al ( $0.11$  or  $0.15$  depending on the composition of the formulation). Indeed the gas hold-up in microbubble suspensions depends on the generation method, on the physicochemical properties of the dispersed and dispersant phases. It seems not significantly influenced by the nature or the amount of surfactant [218]. The particles concentration ( $2.18 \times 10^{12} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) obtained during our study is higher than the one revealed by Xu et al[67]. ( $4.37 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ – $6.25 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  depending on the type of surfactant used). This difference could correspond to the difference existing between the sizes of both particles. Indeed, our particles are smaller than those of Xu and coworkers. Or considering that the gas hold-up is similar in both cases, the difference between the particles concentration could be an explanation. The mean size depends on the used formulation method, the nature and the concentration of the surfactant.





**Figure 2:** Microbubbles characterization microbubble sizes distribution obtained by static light scattering (a); microbubbles optical microscopy observation (b);

**Table 2:** microbubbles size characteristics.

D[4,3]( $\mu\text{m}$ )	D[3,2] ( $\mu\text{m}$ )	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )
3.6 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3	0.29 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	0.95 $\pm$ 0.35
Span	Zp (mV)	Particles/mL	Density (g/mL)	Gas hold-up
1.05 $\pm$ 0.37	-21.7 $\pm$ 2.36	2.18 $\times 10^{12}$ $\pm$ 27528	1.003 $\pm$ 0.61	0.177 $\pm$ 0.01

### 3.3. Influence of the stirring parameters on the microbubble characteristics

#### 3.3.1. Stirring speed

At low speeds (11000 rpm-13000 rpm), the mean diameter of the bubbles (2.9 $\pm$ 0.15)  $\mu\text{m}$  was larger than the one measured with higher speeds (16000 rpm-24000 rpm): (1.9 $\pm$ 0.28)  $\mu\text{m}$ . The final volume obtained for the microbubbles suspension did not significantly vary in function of the shear speeds. Nevertheless, the difference between formulations lays in the microbubble concentrations and in the visual appearance. Indeed, microbubbles formulated at lower speeds were more translucent than others. This could be in relation with the fact that less particles are obtained at lower speeds compared to formulations obtained with higher speeds in

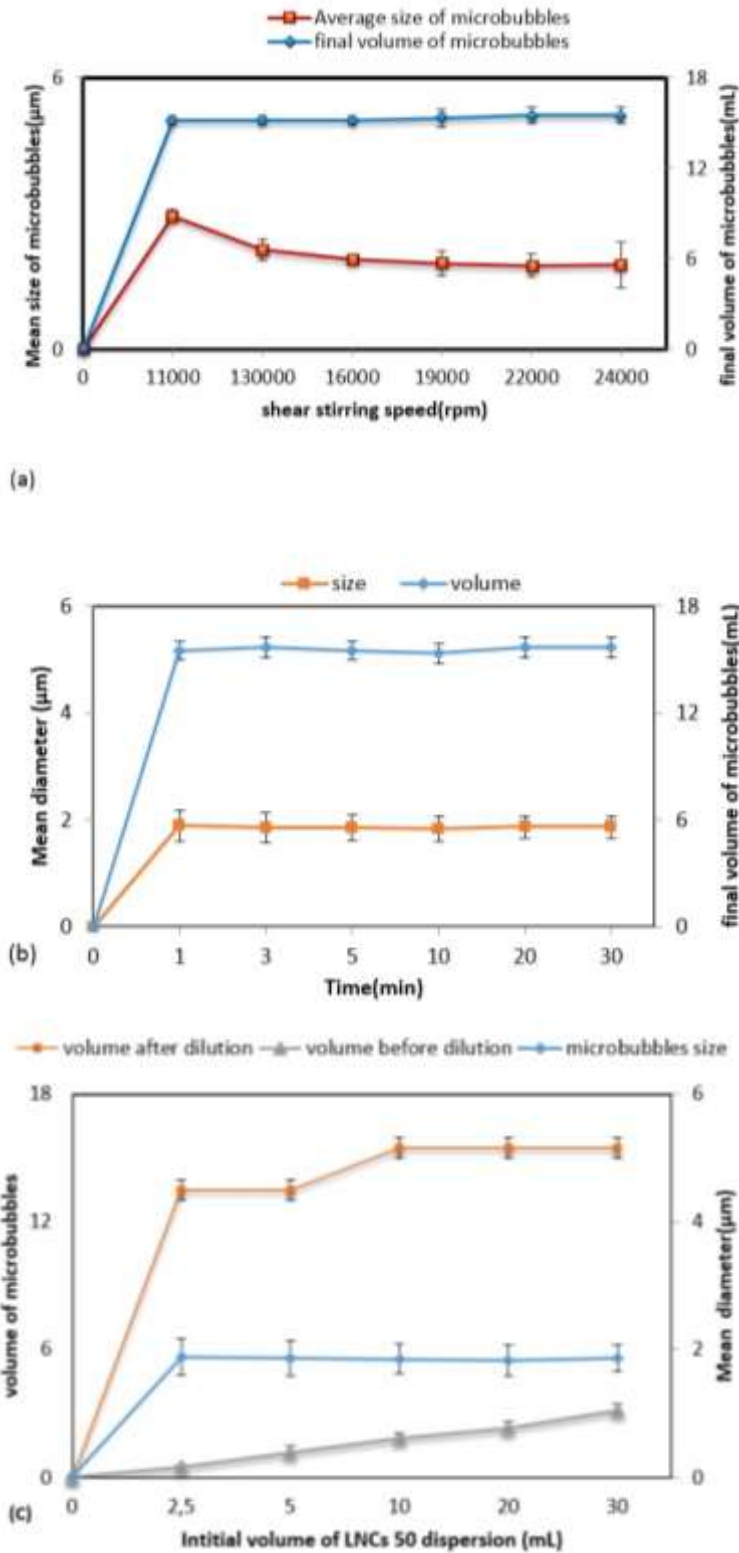
spite of the use of the same amount of dilution water. Or the small size of particles in the case of low speed could be evoked (figure 3a).

### **3.3.2. Stirring time**

Contrary to the stirring speed, the stirring time did modify neither the mean diameter nor the final volume of the microbubbles suspension. However, the change of the visual appearance is also obtained. Indeed, between 1-3 min and 25-30 min, the preparation was less turbid than the one obtained when the time is between 5-20 min (figure 3 b).

### **3.3.3. Volume of the initial LNC dispersion**

The average microbubble diameters have similar values whatever the LNC suspension volume ( $V_i$ ) initially used. Nevertheless, the final volume of microbubble suspensions was lower for  $V_i$  ranged in 0-5 mL whereas it was constant for  $V_i$  between 7.5-30 mL. In a same way, the volume of microbubbles before dilution (BVMs) increased with  $V_i$  (figure 3c).



**Figure3:** Influence of stirrer parameters on the microbubbles characteristics. Influence of stirring speed (a), influence of time of stirring (b), influence of initial volume of LNC (c).

#### **3.4. Microbubbles of gas nature underlined**

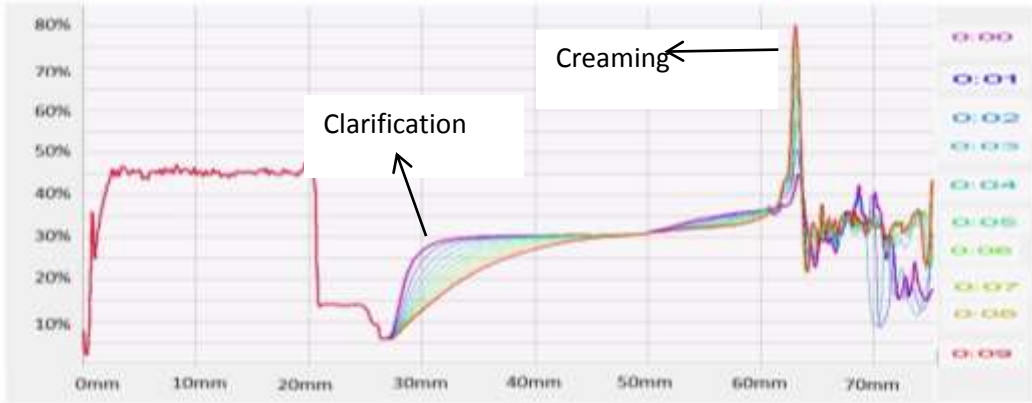
The different indirect methods described above, underline the presence of microbubbles. However, these methods do not allow a full and direct confirmation of the presence of air in the core of particles despite giving indications and information for bubbles generation forecast. In the upper part of fig 4, we have indicated the backscattering curve. The lower part is related to the transmission one. For both of them, profiles were plotted for the total length of the cell (fig 4 c). On fig 4c, we distinguish three parts. Between 0-20 mm (part A) corresponds the void space before the bottom plug. The part B corresponds to the bottom plug area between 27 mm and 30 mm. The sample compartment is located in the (30 mm-65 mm) area (part C). A second void space is located in the part D.

As shown in fig 4, microbubbles suspension behaves like classical emulsions. Indeed, as it is shown in fig 4 a, a clarification (first peak), a creaming, corresponding in this case to the microbubbles emergence (second peak) and in fig 4 b, transmission curve a drainage (first peak) phenomena[219–221]. Microbubbles being less dense than water, they leave easily the bottom of the glass cell towards its top, and this explains the clarification associated to the creaming observed during the sample analysis by multiple light scattering theory. The clarification expresses the decrease of the particle volume fraction at the bottom of the cell and its increase at the top of the cell. Therefore, the percentage of the backscattering decreases over time (1min to 10 min) for the clarification peak and increases for creaming one (fig 4 a). This is in accordance with the predictions of classical physical models, where backscattering decreases with the particle volume fraction [2,51–53]. Backscattering signal analysis of the preparation formulated 8 hours did not shown any superposition within the first 10 minutes of measurements and therefore sustain the absence of shrinking phenomena. Generally, microbubbles suspension is subject to two unstabilities: the shrinkage and the repining. The presence of these phenomena depends on the value of the critical value (CV) of Laplace-Young pressure ( $\Delta P$ ) defined as the difference in pressure between the microbubble core and the continuous phase. The CV depends

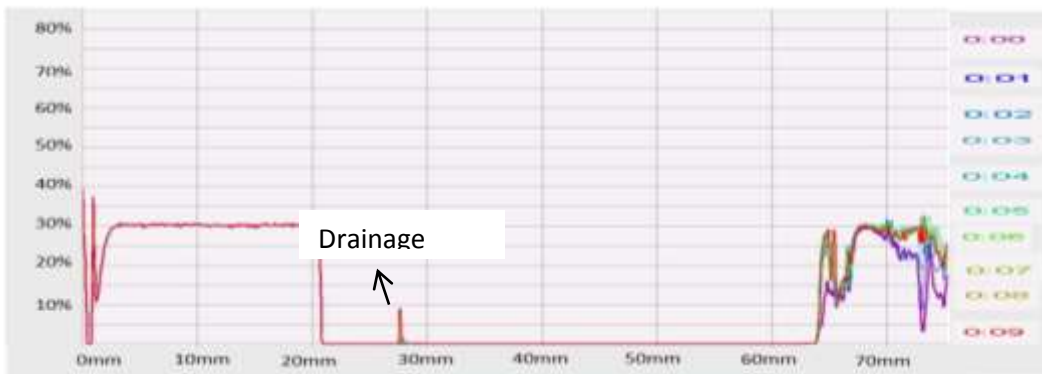
on the formulation method and the formulation ingredients. The equation (3) below gives the formula of the  $\Delta P$ . When this difference exceeds the CV, microbubble can experience shrinkage phenomena whereas repining occurs when this difference is below the CV. The CV value is closely linked to the formulation method, the shell composition, the gas solubility and diffusivity [67,222]. In the present case, microbubbles did not undergo shrinkage nor repining during 8 hours after formulation certainly due to the presence of Lipoid® (phospholipic molecules) which ensures the stickiness of the shell hindering the gas escape.

$$\Delta P = \frac{4\sigma}{r} \quad \text{Equation 3}$$

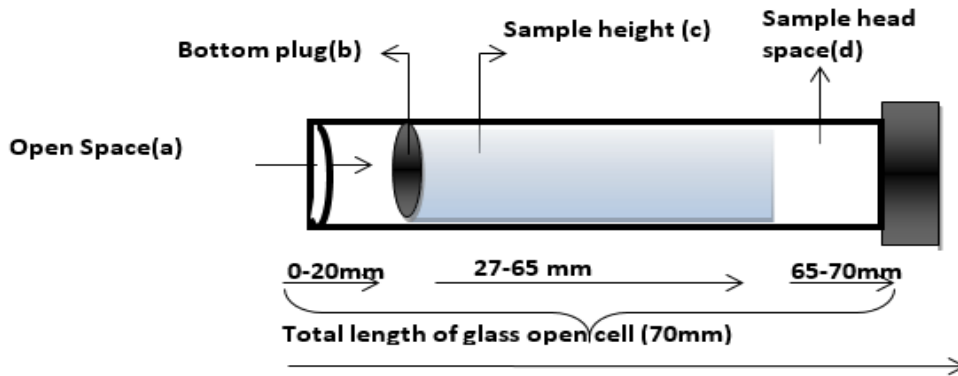
$\Delta P = P_2 - P_1$ ,  $P_2$  represents the pressure inside the particle,  $P_1$  corresponds to the pressure outside the particle,  $\sigma$  is the surface tension at the interfaces of the particle,  $r$  is the radius of the particle.



Curve of backscattering (a)



Curve of transmission (b)

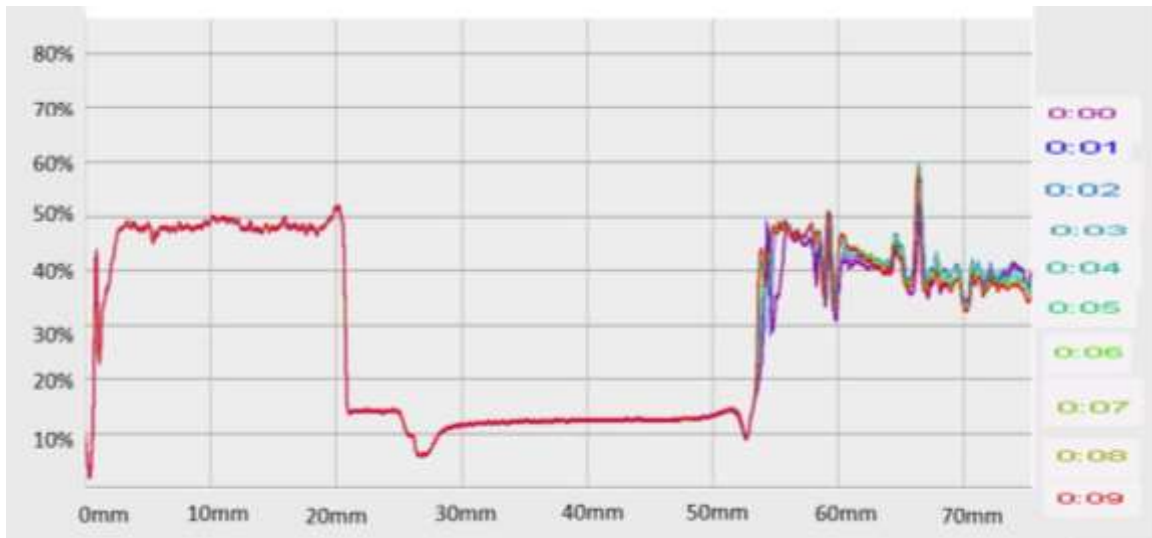


**Figure4:** Approaches underlining the presence of microbubbles by multiple light scattering. Backscattering curve (a), transmission curve (b), Turbiscan classic open cell and different parts(c)

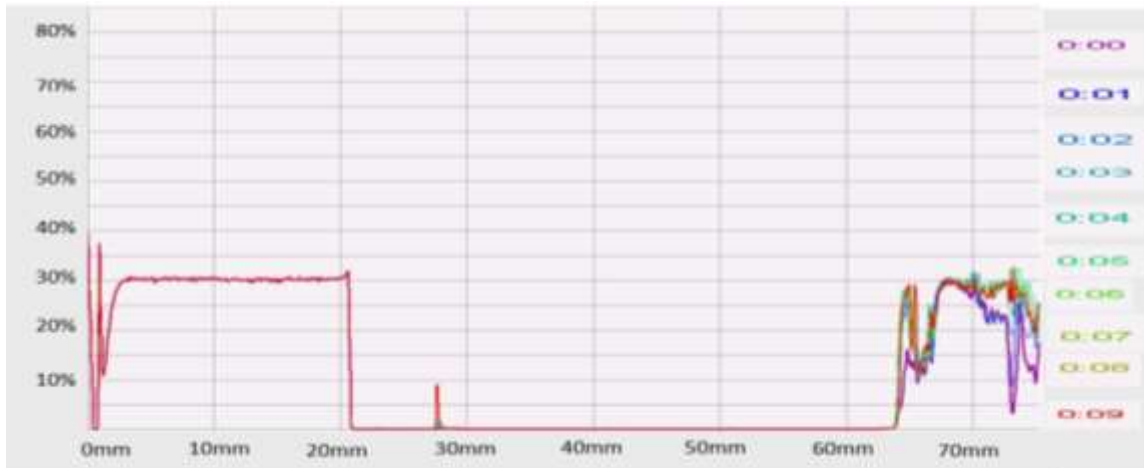
### **3.5.Improvement experiences of microbulles migration and migration rate determination**

Although the creaming can be considered as a proof of the bubble presence, it is possible to delay this phenomenon to make the suspensions more stable over time. Before adding suspending agents, the size of the mixture “suspending agents+LNC 50” was measured to detect the eventual interactions between suspending agents and LNC 50. Only a slight increase of lipid nanocapsules mean diameter was observed as it can be expected. Thus, the formulations were optimized by the use of suspending agents and the related viscosity values are summarized in the table 2.

All suspending agents in aqueous solution possess a Newtonian behaviour expect hyaluronic acid dispersion that behaves like a rheofluidifier liquid. According to fig 5 a and b, the drainage, clarification and creaming phenomena disappear with the suspending agent addition. Using HA at 0.25 % (w/w) decreases the migration rate and increase migration delay from 4min to up of 1 hour (table 3). This efficacy could be an advantage for intramuscular or cutaneous administration for sustained release of drug. Moreover, given that hyaluronic acid has a capital rule in the cartilage reconstitution, its association with microbubbles could maximize the effect of the treatment.



Backscattering curve for bubble suspension + HA (a)



Transmission curve for bubble suspension +HA (b)

**Figure 5:** Migration rate slowing by adding of suspending agents and viscosity increasing agents. The profile obtained after adding of HA 1 % (w/w) to the dispersion of native microbubbles is presented here: backscattering curve (a), transmission curve (b).



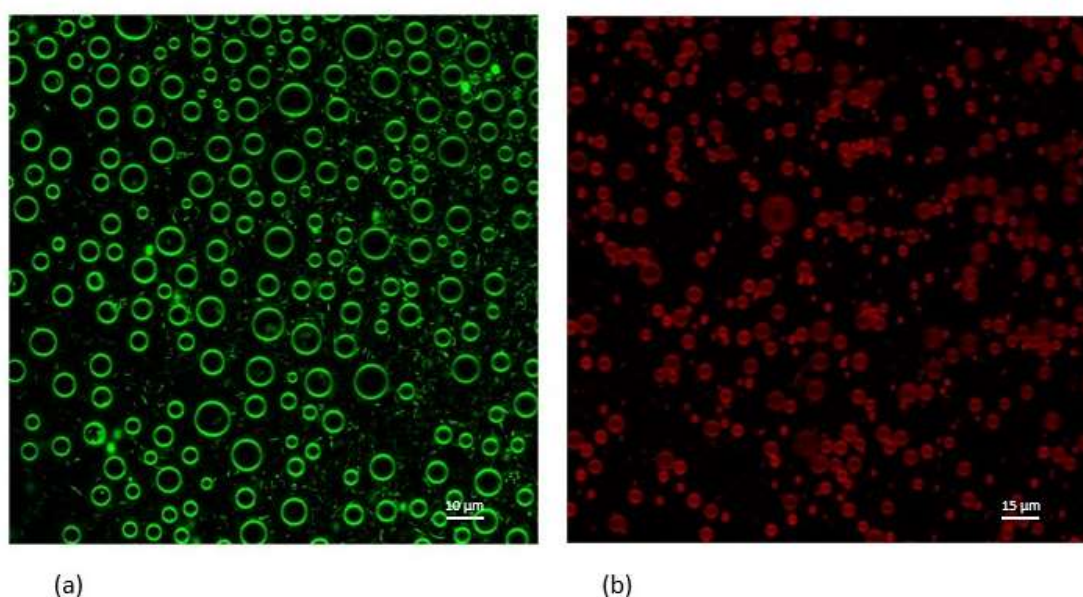
**Table 3: viscosities values measured before or after suspending agents addition.** HA= hyaluronic acid, Al=sodium alginate, CMC Na = sodium carboxymethylcellulose with low average weight.

	Theoretical final concentration (%)	Viscosity values measured (Pa.s)	Start of migration (min)
Bubble without suspending agent	0	$1.14 \times 10^{-3}$	4min 17 s
Bubble +Al 0.5%	0.5 (w/w)	$7.65. \times 10^{-3} \pm 2. \cdot 10^{-5}$	25min
Bubble + Al 1%	1 (w/w)	$1.66 \times 10^{-2} \pm 1.6 \cdot 10^{-4}$	35min
Bubble + PEG 400	30(v/v)	-	21min 36 s
Bubble + Glycerol 75%	75 (w/w)	-	22min 10 s
Bubble + HA 0.25%	0.25 (w/w)	$3.52 \times 10^{-2} - 3.88 \times 10^{-1}$	>1h
Bubble + HA 0.5%	0.5 (w/w)	$7.75 \times 10^{-2} - 2.58$	>1h36mins
Bubble + CMC Na 1%	1 % ( w/w)	$2.73 \times 10^{-2} \pm 1.2 \times 10^{-3}$	20min 15s

### 3.6. Identification of the microbubbles structure

When amphiphilic dyes such as DIO 275 and DID 7775 were used, an intense fluorescent signal is observed at the bubble wall level (fig 6) suggesting that LNC are effectively involved in the stabilisation mechanisms since the dyes were shown to be inserted into the shell of LNC particles [216]. Then, a phospholipidic dye such as Topfluor PC was used, to only highlighted the Lipoïd® that mimics Solutol® when DIO or DID are used. The fluorescence detected at the microbubbles contour after using the topfluor (Results not shown) confirms that Lipoïd® was also included between the shell ingredients of formulated microbubbles. To investigate the presence of an oily phase (Labrafac®), dyes able to colour only this oily phase were used to stain particles (Nile Red or CholesterylBodipy® FL C12). According to confocal microscopy image, no fluorescence can be observed when particles were observed at the emission maximal wave-length of 639 nm for Nile Red and 503 nm for Cholesteryl BODIPY® FL C<sub>12</sub>, whereas, an observation in black and white, showed bubbles in a large number (supplementary data). According to these results, one can assume that Labrafac® is not present at the microbubble interfaces or is not detectable. This conclusion raises two other questions: did LNC remain intact at the microbubbles interface? Or did them

break and release the majority of their Solutol® and Lipoid® contents? As currently, both options can be assumed. In the first case, LNC are present in native form at the interface and as Labrafac® is an important part of them, it may be difficult to visualize them. In the second case the mechanical effect of the agitation could lead to the release of the LNC ingredients.



**Figure 6:** Aspect of the microbubble wall structure underlined by confocal microscopy. At the right: picture of bubble and DIO 275 (a). At the left: picture of bubble and DID 7775 (b).

### 3.7. Microbubble stability study

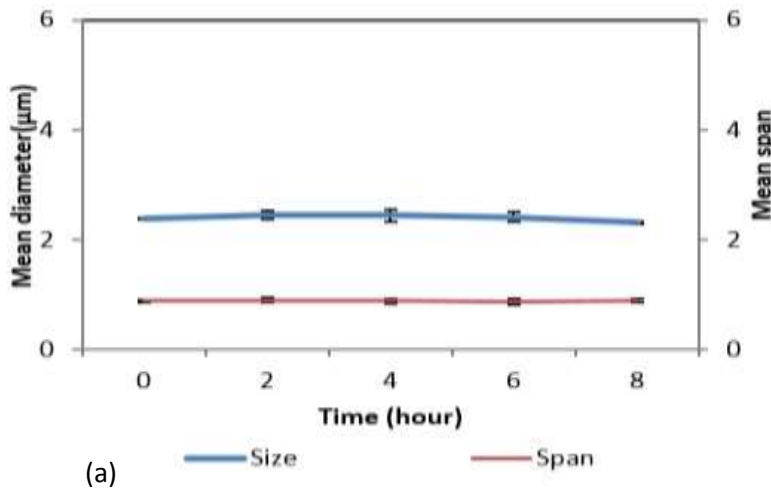
#### 3.7.1. Short time stability study

The mean size and the Span measured every 2 hours during 8 hours did not show any changes. We conclude that microbubbles formulated in our conditions remained unchanged during 8 hours (figure 7a).

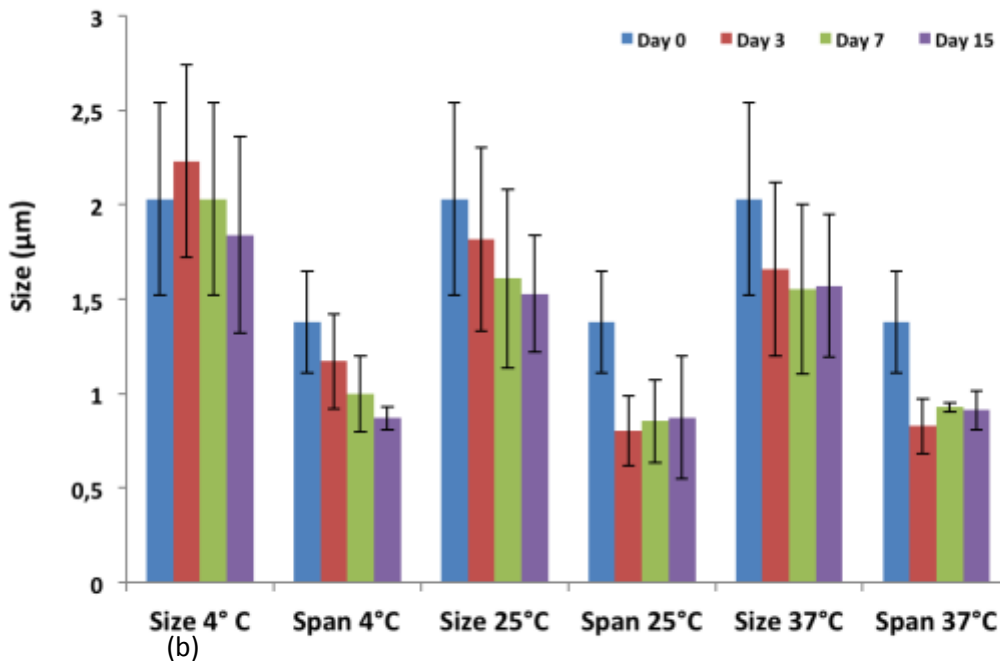
#### 3.7.2. Long time stability study

In the reporting conditions, a slight increase in mean diameter and span occurred at 4°C, 25°C or 37°C from the third day up to a fifteenth day (Fig7 b). However, this modification was not significant. Concerning the appearance, sample stored at 4°C

appear cloudier than the initial samples (Day 0). Contrary to that, samples kept at 25°C and 37°C became slightly clearer than the initial ones. In conclusion, microbubbles supported important modifications ongoing the reporting period (3 weeks). This could be related to the stabilization mechanism of Pickering system which is irreversible and not well known [223,224] and also due to the important value of zeta potential (/20 mv/).



(a)



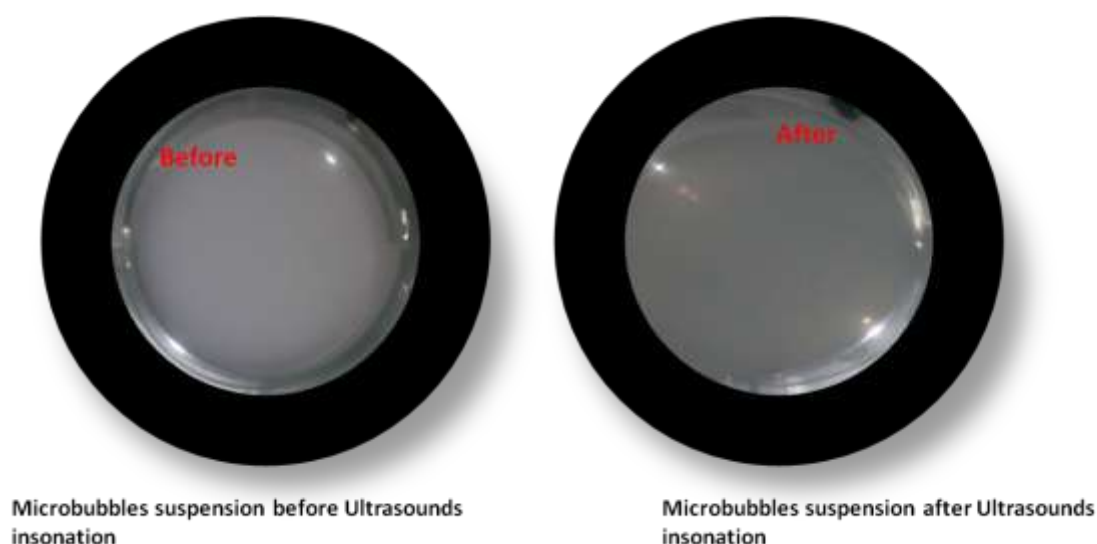
(b)

**Figure 7: Stability study of microbubbles dispersion.** Short time stability ( a) Long time stability (b): The Average diameter evolution over time of particles was checked as well as their span, average diameter evolution in function of temperature. The influence of temperature was also investigated;

### 3.8. Ultrasounds application

Ultrasounds pulses with adequate intensity and power (5 w/cm<sup>2</sup> for 10 min with a duty cycle of 50 %) are able to create pressure waves in situ at the site where they were applied and consequently caused bubbles breaking.

On Figure 8 is presented a significant aspect difference of microbubbles suspension before and after processing by ultrasound waves. The sample became clear after the untrasonation indicating a certain bubble disappearance due to their breaking under ultrasounds [85]. This observation allows us to reveal that microbubbles were effectively produced in the medium by the stirring technique.



**Figure 8: Microbubbles subject to ultrasounds:** at the left, sample aspect before ultrasound at the right, sample aspect after ultrasounds.

LNC 50 behave as ingredient tanks allowing a sufficient surfactant transfer towards the air-water interfaces during the microbubble production.

## 4. Conclusion

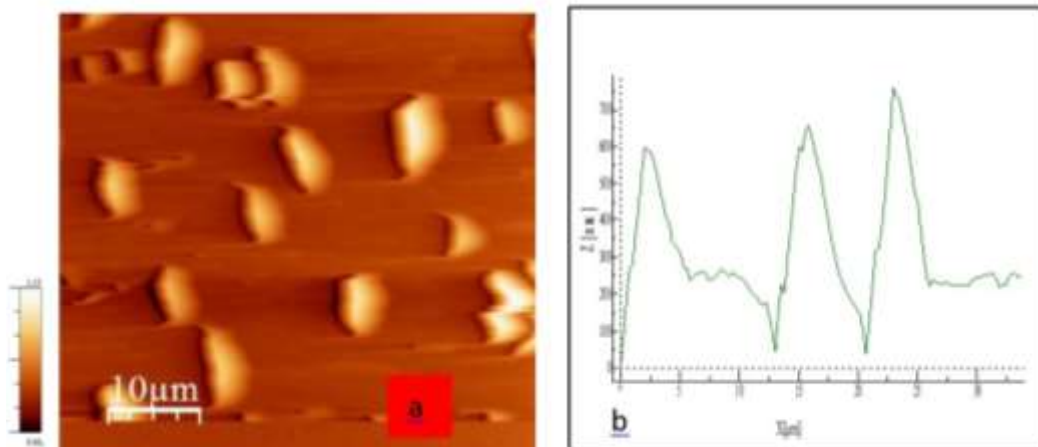
Microbubbles are generated from lipid nanocapsules suspension and have a micrometric size. These microbubbles appear robust with an appropriate mean diameter, size distribution and stability. Lipid nanocapsules can be used as great

potential stabilizers for the particles formulation. This work emphasizes the valorization of LNC particles for a better stabilization of fragile bubbles.

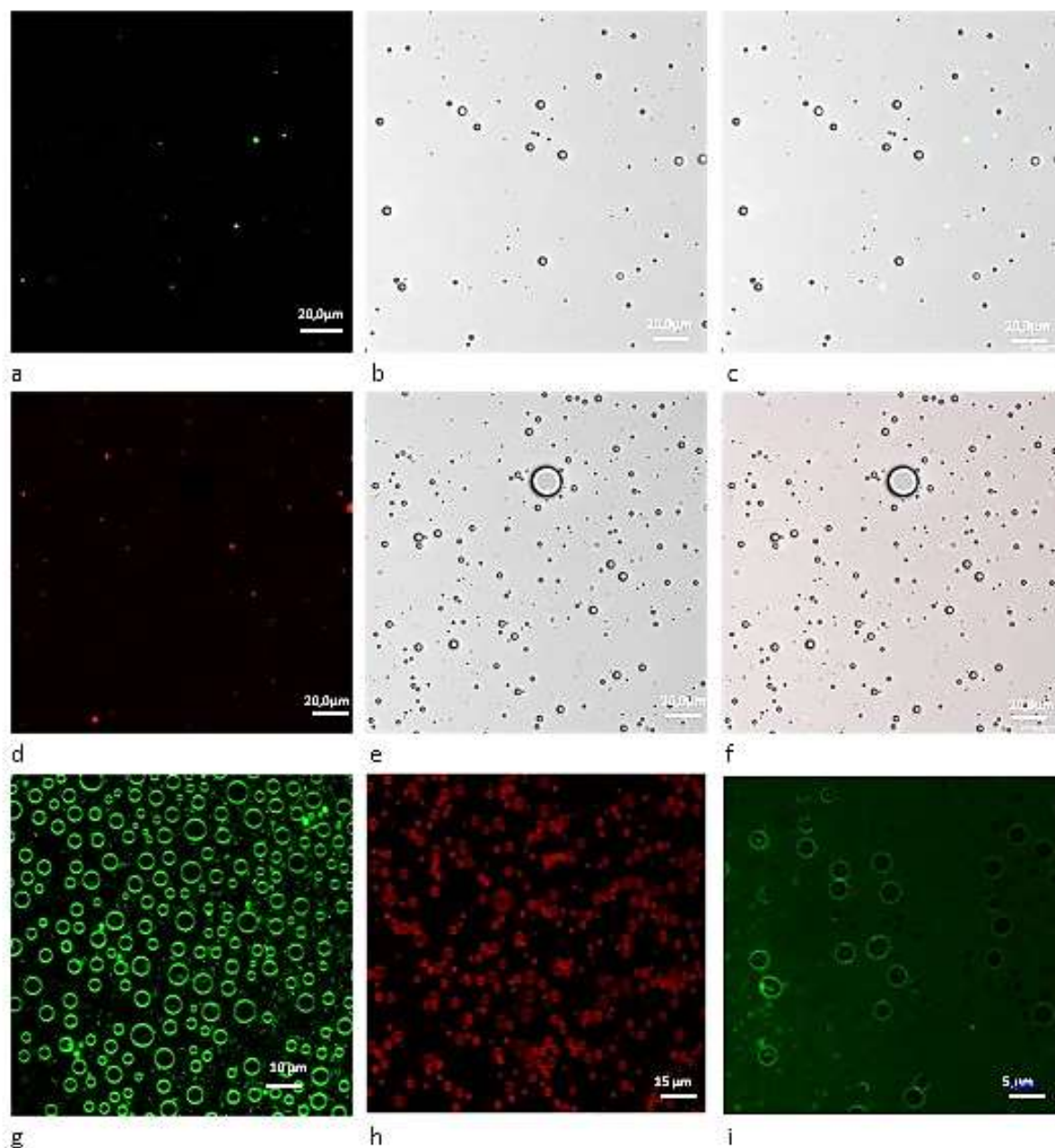
### Acknowledgments

This study was funded by 'Service de Cooperation et d'Action Culturelle' of the French Embassy in Benin, by "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin" and by the "Faculté des Sciences de la Santé de cotonou". The first Author of this article thanks the laboratory MINT U1066 and the "laboratoire de pharmacie galénique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et de l'ingénierie de la santé" of University of Angers to accept her reception and to provide facilities for this research. Author acknowledge also the SCIAM (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques) for microscope analysis.

### Supplementary data



Atomic force microscopy: a; Size profile by AFM: b



**Photographies of microbubbles visualized with confocale microscopy.** Bubbles+ BODIPY® FL C<sub>12</sub> : fluorescence capture (a) ; bubbles+ BODIPY® FL C<sub>12</sub>:black-and- white capture (b); Bubbles + BODIPY® FL C<sub>12</sub> : simultaneous capture (black-and- white and fluorescence captures) ( c) ; Bubbles + Nile Red : fluorescence capture ( d) ; Bubbles + Nile red : black-and- white capture (e) ; Bulles + Nile Red: : simultaneous capture (black-and- white and fluorescence captures) (f) ; Bulles +DIO 275 : fluorescence capture (g) ; Bulles +DID 7775 : fluorescence capture (h) ; Bulles+Top Fluor PC : fluorescence capture(i).

### **Etudes complémentaires**

Toutes les approches de caractérisation ainsi que des essais réalisés afin de choisir la taille et la concentration idéales des NCL pouvant générer des bulles avec des meilleures caractéristiques physicochimiques n'ont pas pu être détaillés dans l'article publié. Nous avons donc jugé bon de présenter ces expériences en annexe à l'article.

#### **1. Influence de la taille des NCL et de la concentration en NCL sur les caractéristiques des bulles formulées**

##### **1.1. Méthodes**

Les NCL de différentes tailles (25 nm, 50 nm ou 100 nm) ont été utilisées en début de formulation pour formuler les bulles. La dispersion primaire de NCL 50 nm a été diluée dans une gamme de facteur de dilution allant de 1/10 à 0 afin de déterminer la concentration seuil de particules pouvant générer les microbulles. Les bulles ont été formulées en utilisant la méthode d'agitation et en travaillant dans les mêmes conditions.

##### **1.2. Résultats et discussions**

En considérant le tableau 1, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Les NCL 50 nm n'ont plus été capables de générer les bulles lorsque la dispersion primaire a été diluée au-delà de ½.
- Les NCL 25 nm n'ont pas donné des bulles quel que soit la concentration en NCL utilisée. Cela s'expliquerait-il par la quantité de Lipoid® par particule qui est moins importante que dans les autres types de NCL ? En effet, dans une dispersion de NCL, nous avons deux types de populations de particules. La population I constituée de particules faites des trois constituants principaux et la population II au sein de laquelle les NCL dépourvues de Lipoid® sont les plus représentées. Les NCL 25 nm sont en majorité constituées par la population de

## *Chapitre III : Formulation des microbulles d'air*

type II, ce qui explique bien la pauvreté de l'échantillon en Lipoid® [55,56]. Or ce dernier est un stabilisateur tensioactif lipophile important de la structure capsulaire.

- Les NCL 100 nm ont donné des bulles lorsqu'elles ont été utilisées sans dilution
- Les NCL sans Lipoid® n'ont pas donné de bulles.

Bulle (NCL utilisées)	V <sub>i</sub>	V <sub>0</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>mr</sub>	V <sub>B</sub>	V <sub>PB</sub>	V <sub>GB</sub>	Ve	Vr	V <sub>b</sub>	Taille des bulles	Span®
T78 (NCL 100)	10	15	12,5	10	2,5	2	0,5	15	17,5	15	1,6±0,01	1,3±0,003
T79 (NCL 50 dil1/2)	10	15	12,5	10	2,5	0,5	2				2±0,003	1,1±0,004
T80 (NCL 25)	10	12,5	10,25	10	Couche de 0,25ml présente et ne ressemblant pas aux bulles							
T81 (NCL 50 dil1/10)	10	15	10	10	0	0	0	0	0	0		
T82 (NCL 50 dil1/8)	10	15	10	10	0	0	0	0	0	0		
T83 (NCL 50 dil 1/6)	10	15	10	0,5	0,5	0	0,5	0	0			
T84 (NCL50 dil1/4)	10	14	10,25	10	0,25	0,25	0	0	0			

**Tableau 1** : Caractéristiques des bulles générées en utilisant différentes tailles ou différentes dilutions de NCL. dil= dilution.

Vi= volume de NCL initialement prélevé, V<sub>0</sub>= volume total de préparation juste après l'agitation, V<sub>20</sub>= volume total de la préparation après 20 min de repos, V<sub>mr</sub>= volume du sédiment après la première décantation, V<sub>B</sub>= volume total de bulles obtenu après la première décantation, V<sub>PB</sub>= fraction volumique représentée par les petites bulles, V<sub>GB</sub>= volume occupées par les grosses bulles au sein du volume total, Ve= volume d'eau ajouté pour récupérer le volume total de bulles, Vr= volume total de bulles récupéré après dilution, V<sub>b</sub>= volume de bulles récupéré après la deuxième décantation.

## 2. Preuve de la présence de l'air dans les particules

### 2.1. Méthode



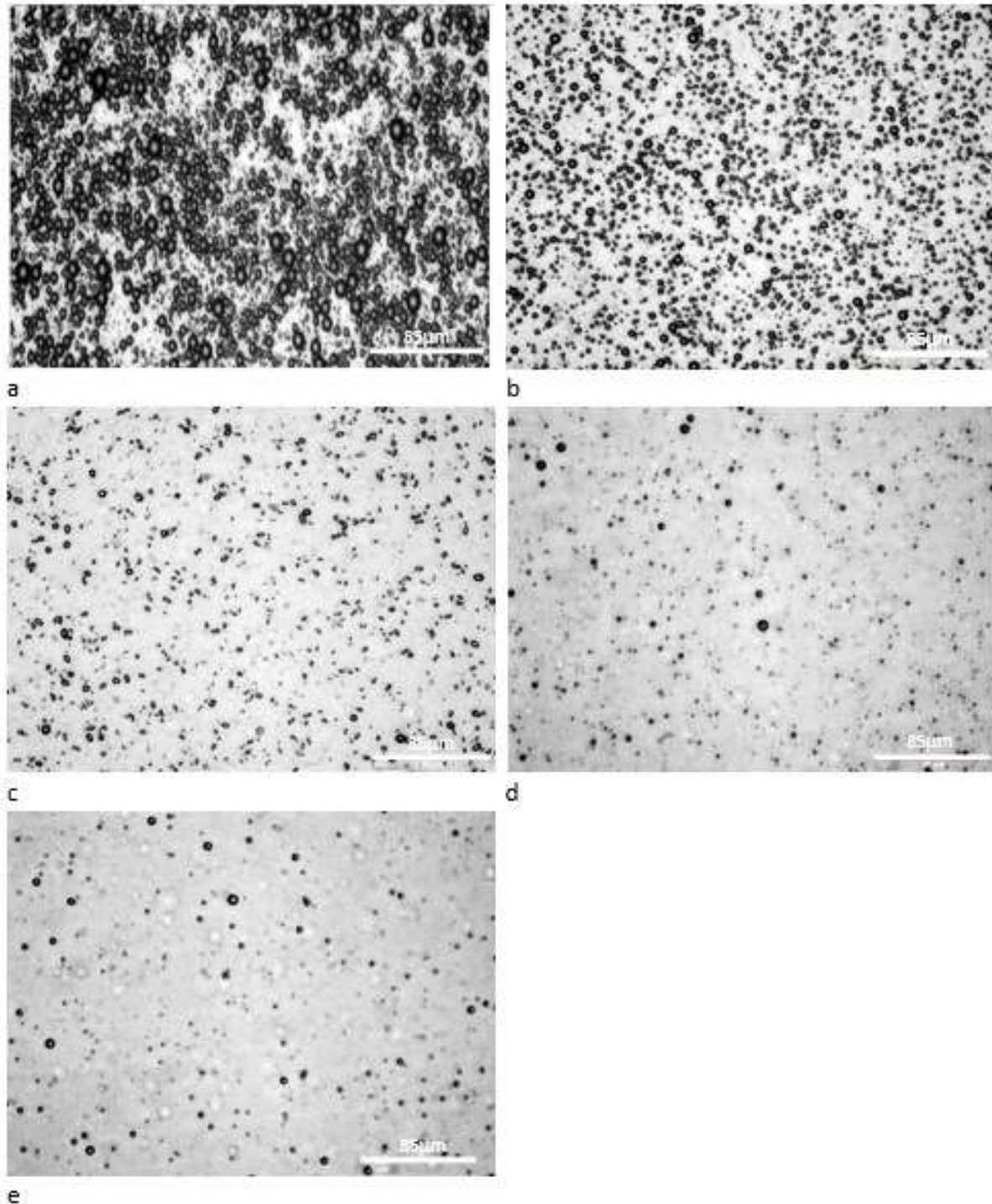
L'objectif était ici de mettre en évidence par une méthode indirecte la présence de l'air dans les particules formulées.

Pour cette expérience une seringue d'une capacité de 5 mL a été utilisée. Son piston est au départ maintenu sur la graduation 2 mL afin de faciliter les variations de volume. Nous avons introduit dans cette seringue à l'aide d'une aiguille, 1 mL de dispersion de bulles. Ce volume a été introduit de sorte à laisser 1 mL d'espace vide à pression atmosphérique au-dessus de l'échantillon (l'échantillon est donc confiné entre les graduations 1 mL et 2 mL de la seringue) (figure 13). Nous avons ensuite obturé l'embout de la seringue et avons créé différentes dépressions en tirant lentement sur le piston par palier de 1 mL de graduation. Pendant chaque expérience, le piston est maintenu sur la graduation prédéfinie et l'embout est obturé pendant une minute avant d'être relâché au même moment que le piston. Les dispersions de bulles soumises à l'effet de dépression ont été observées au microscope optique après les avoir montées sur la cellule de Thomas. Cette cellule a la particularité de conserver la forme originelle des objets. Nous avons utilisé comme témoins, des dispersions de bulles natives non soumises à une variation de pression.

Ainsi lorsque nous avons soumis les dispersions aqueuses de bulles à une diminution de pression extérieure, nous avons assisté à une augmentation de taille suivie d'une déformation jusqu'à la disparition de ces bulles en fonction de l'importance de la dépression appliquée (figure 14). Ceci peut s'expliquer en raison de la dépression dans le volume libre entraînant un dégazage de la phase aqueuse dans laquelle sont dispersées les bulles natives. Aussi on observe une augmentation de volume des bulles préexistantes. En parallèle, la baisse de pression à la surface libre de la dispersion aqueuse favorise son dégazage expliquant la disparition des bulles.



**Figure 13:** Aspect de l'échantillon avant (à gauche) et après application de la pression (à droite)



**Figure14** : observations des bulles au microscope optique avant et après modification de la **pression extérieure**. Bulles natives avant diminution de la pression atmosphérique(a) ; Bulles natives après passage à travers la seringue sans modification de la pression atmosphérique (b) ; Aspect des bulles soumises à une pression atmosphérique de 0,5 bar (c) ; Aspect des bulles soumises à une pression atmosphérique de 0,33 bar (d) ; Aspect des bulles soumises à une pression atmosphérique de 0,25 bar (e).

### **3. Caractérisation de la couche stabilisant les bulles**

Nous avons voulu identifier les constituants des nanocapsules lipidiques (NCL) qui se retrouvent au niveau de la paroi des bulles, en utilisant des colorants susceptibles de marquer chacun des ingrédients. Le DIO 275 et le DID 7775 ont été utilisés pour marquer le Solutol<sup>®</sup>, l'un des composants de l'interface des NCL, le top fluor PC 810181, pour marquer le Lipoïd<sup>®</sup>, le Nile red et le CholEsteryl BODIPY<sup>®</sup> FL C<sub>12</sub> pour le marquage du cœur constitué de Labrafac<sup>®</sup>.

#### **3.1. Méthode**

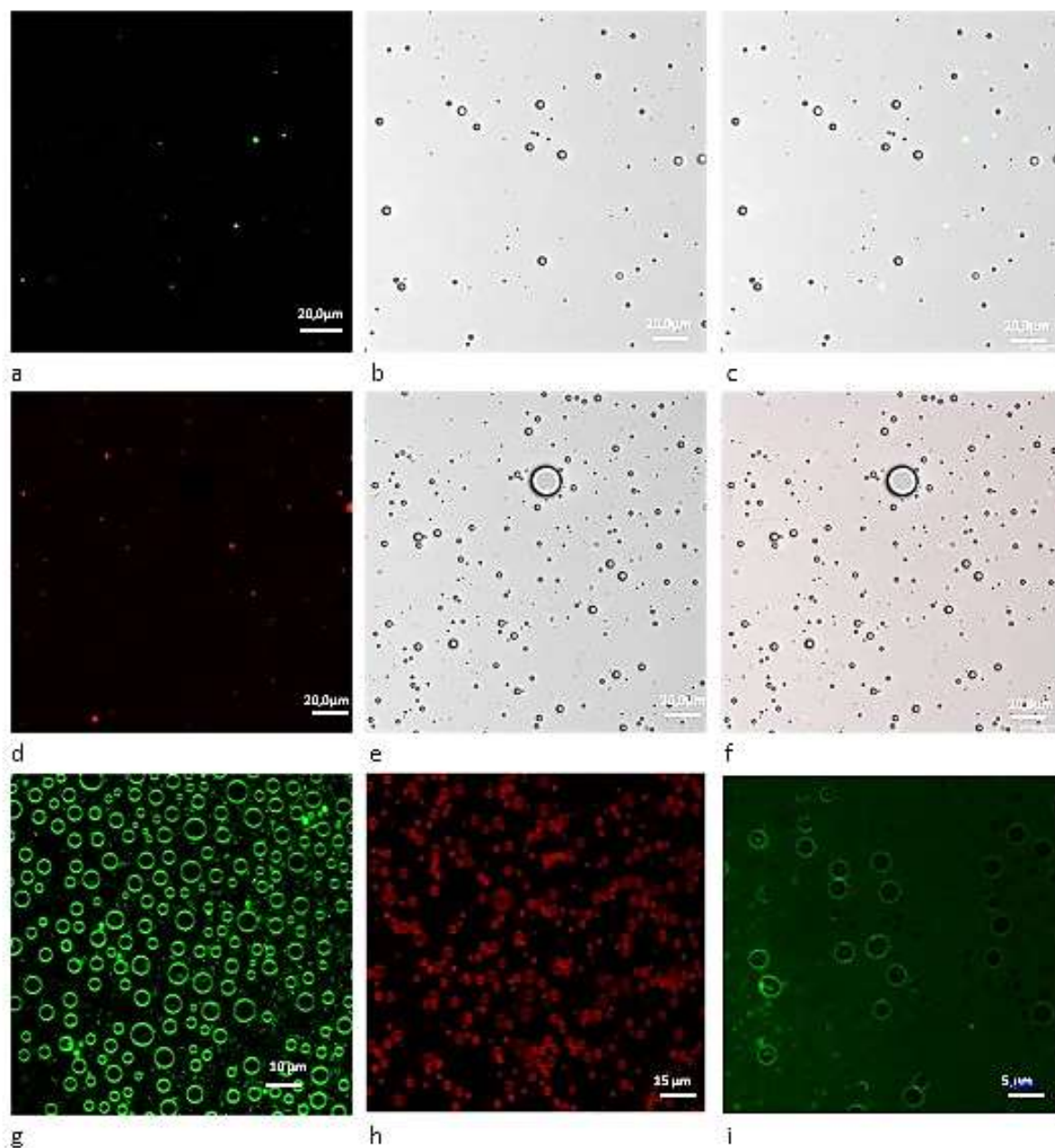
Pour l'incorporation des colorants dans les bulles, nous avons réalisé deux méthodes. La première méthode consiste à formuler préalablement des NCL chargées en colorants qui seront utilisées par la suite pour préparer les bulles. L'autre méthode est la méthode de transfert du colorant développée par Bastiat et al[216]. Parmi les deux méthodes, seule la première a donné de bons résultats.

#### **3.2. Résultats et discussions**

Les observations faites en utilisant la microscopie confocale, nous ont permis de conclure à la présence du Solutol<sup>®</sup>, du Lipoïd<sup>®</sup> et éventuellement d'une quantité infime de Labrafac<sup>®</sup> ( Figure 15) à la surface des bulles. Ces constituants sont-ils observables de façon isolée ou le sont dans les NCL restées intactes à l'interface des bulles ? Nous n'avons pas pu répondre à cette question car les NCL étant de taille de 50 nm, la seule méthode qui permet de les observer individuellement à l'interface des bulles est une microscopie confocale à haute résolution, technique à laquelle nous n'avons pas eu accès. Nous pouvons donc avancer deux arguments pour expliquer la présence de ces ingrédients à l'interface des bulles. Le premier argument est que les NCL soient restées intactes à l'interface des bulles. Cela expliquerait pourquoi le Labrafac<sup>®</sup> se trouvant dans le cœur capsulaire n'est pas très bien visible au microscope confocal contrairement aux autres excipients qui sont localisés à l'interface des NCL. Le second argument probant c'est que sous l'effet mécanique de l'agitation, les constituants des NCL se seraient libérés ce qui explique la présence des molécules telles que le Solutol<sup>®</sup>

et le Lipoid® à l'interface des bulles. L'absence du labrafac® ou sa présence en faible quantité serait dû à la différence de comportement entre un composé tensioactif et un non tensioactif. En effet le labrafac n'étant pas doté de propriété amphiphile il lui serait difficile de s'adsorber à l'interface. Par conséquent il se serait répandu dans le milieu environnant

Nos résultats ne corroborent cependant pas ceux rapportés par Minkov et al.[55] qui ont mis en évidence un relargage du Solutol® et de Labrafac® uniquement, lorsque les NCL sont déposées sur la balance de Langmuir. Dans leur expérience aucune force mécanique n'a été appliquée pouvant entraîner l'arrachement ou le détachement des molécules. C'est pour cela que dans leur expérience, seules les NCL fragiles (de type I) ont pu libérer librement leur constituants.



**Figure 15** : photographies des bulles observées en microscopie confocale. Bulles+ BODIPY® FL C<sub>12</sub> :capture de la fluorescence (a) ; bulles+ BODIPY® FL C<sub>12</sub> :Capture noir et blanc (b); Bulles+ BODIPY® FL C<sub>12</sub> : acquisition simultanée (noir et blanc/ fluorescence) (c) ; Bulles + Nile Red : capture de la fluorescence (d) ; Bulles+ Nile red : capture noir et blanc (e) ; Bulles + Nile Red: capture simultanée (noir et blanc/ fluorescence) (f) ; Bulles +DIO 275 : capture de la fluorescence (g) ; Bulles +DID 7775 : capture de la fluorescence (h) ; Bulles+Top Fluor PC : capture de la fluorescence(i).

*Tentatives d'amélioration de la  
formulation des microbulles d'air*

## **Amélioration de la formulation des microbulles d'air**

### **1. Introduction**

Les nanocapsules lipidiques (NCL) ont été développées au sein du laboratoire MINT en 2000 et sont protégées par un ensemble de 5 brevets dont le brevet princeps s'intitule n°AU2001240753 (B2), Saulnier, P. ;Heurtault,B. ; Richard, J. ;Pech, B. ; Proust, J-E., Benoit, J-P [1]. A l'origine de leur découverte, elles sont constituées de trois principaux excipients (le Solutol®, le Lipoid® et le Labrafac®). Rappelons que le Solutol® et le Lipoid® constituent les surfactifs qui stabilisent la coque sachant que le Labrafac® forme le cœur huileux de la nanocapsule. En variant les proportions relatives des différents constituants présents dans le mélange initial on obtient des NCL de 25 nm, de 50 nm ou de 100 nm de diamètre hydrodynamique [2]. Les NCL ont ainsi une composition qualitative et quantitative standard qu'il est possible de modifier afin de les adapter à l'encapsulation de certaines molécules tout en conservant la taille dans le même ordre de grandeur que les particules de départ. Ainsi Roger et al. [199,201] ont remplacé le cœur lipidique par le mélange « Labrafac®+ Transcutol® HP + Labrafil® M 1944 CS » pour assurer la solubilisation du principe actif à encapsuler. Dans une autre étude, le Labrafac® a été substitué par du Captex® 8000 afin d'améliorer la solubilité du Paclitaxel [138,198,225,226]. Le Solutol® et le Labrafac® ont été respectivement remplacé par le mélange « Cremophor A25 + Cremophor A6 » et Miglyol® 812 pour une encapsulation optimale de l'ibuprofène [197]. Vonarbourg et al. [227] ont utilisé du Plurol® oléique en lieu et place du Lipoid® pour formuler des NCL chargées en lipoplexes. Par ailleurs, la combinaison « Span® 60 + Tween® 80 » ou encore « Tween® 80 + stéarate de polyoxyéthylène glycol 40 » ont prouvé leur efficacité dans la stabilisation des microbulles de gaz [117,118].

En se référant à ces différents travaux, nous avons pensé améliorer la méthode de synthèse des bulles ainsi que leurs principales caractéristiques physicochimiques. Il



## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

---

s'agit plus précisément de réduire le volume du sédiment obtenu par la méthode d'agitation et d'augmenter la concentration des microbulles formulées. Cette étape est nécessaire pour procéder ultérieurement à une optimisation de la formulation des microbulles d'air.

L'hypothèse qui sous-tendait cette idée est la suivante : les NCL modifiées ne seraient-elles pas plus susceptibles de générer des microbulles de façon plus efficace ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé les approches suivantes :

- L'utilisation des NCL de compositions variées (NCL modifiées) dans lesquelles le Lipoïd® est remplacé par un tensioactif lipophile de même nature
- L'addition de tensioactifs hydrophiles aux NCL avant la formulation des bulles
- L'utilisation d'agents viscosifiants et des modificateurs de densité pour améliorer la stabilité et la densité particulaire du liquide de dispersion des bulles.

La plupart des excipients qui ont été considérés ont été choisis soit à cause de leur compatibilité avec l'administration intraveineuse, soit en fonction de l'obtention d'une viscosité adéquate pour une administration intraveineuse ou soit à cause de leur utilisation dans la formulation des nanoparticules classiques (chitosan, alginate de sodium, macrogol 4000 dans sonovue®).

Par ailleurs, au cours de cette phase d'amélioration, le rôle de chacun des constituants des NCL dans la genèse des bulles a été investigué.

### **2. Matériels et méthodes**

#### **2.1. Matériels**

Le Solutol® HS 15 (Solutol®) a été acheté auprès de la société BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Il s'agit d'un mélange de polyéthylène glycol 660 libre et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660. Le Lipoïd® 75-3 (Lipoïd®) a été fourni par

## ***Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air***

---

Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Le Labrafac® WL 1349 (Labrafac®) mélange d'acides caprylique et caprique provient de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). L'eau Milli Q est prélevée au niveau d'un dispositif Milli-Q-plus® system (Paris, France). Tous les viscosifiants et polymères utilisés comme stabilisants ainsi que le chlorure de sodium proviennent de Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA). Les surfactants utilisés pour la modification des NCL, sont d'origines variées. Le Plurol® oléique (6-dioléate), le Lauroglycol™ 90, le Capryol PGMC, les sucroesters (Sucro Es) 7, 11 et 15 proviennent de Gattefossé SAS (St- Priest, France). Sigma aldrich a fourni les Span® 20, 40 et 60 ; le docusate de sodium; le stéarate de PEG 600 ; les Tween® 40 et 60 ; le Lutrol®F68 (poloxamer 188) (F68) et le Lutrol® F127 (poloxamer 407) (F127). Les surfactants suivants proviennent de Abitec Corporation (Jackson street Janesville, USA) : le Capmul MCMEP, le Capmul 907 P, le Capmul MGO-50, le Capmul MCM C8 EP. Le Tween® 20 a été fourni par Prolabo (Paris, France). Les stéarates de PEG (SPEG) 300,400, le glycérol, les PEG 200,300, 400 et 4000 ont été gracieusement offerts par Stearinerie Dubois (Boulogne-Billancourt, France).

### **2.2. Formulation des NCL classiques et modifiées**

La méthode utilisée repose sur l'inversion de phase par augmentation de température. Cette méthode impose trois cycles de température. Elle a été mise au point en 2000 par Heurtault et al. [40]. Pour la formulation des NCL classiques, le mélange de tous les constituants a été chauffé et refroidi trois fois successivement entre 60 et 100°C. Au cours du troisième cycle, la préparation a été diluée avec de l'eau froide à 4°C conduisant à la formation des NCL. Pour les NCL modifiées, la procédure a été la même exceptées les températures de chauffage qui ont varié en fonction du type de surfactant utilisé en lieu et place du Lipoid®. Ces plages de température ont été déterminées suivant la localisation des inversions de phase repérées visuellement ou par conductimétrie. Les NCL ont été stockées durant 7 jours et leur stabilité a été

## **Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air**

évaluée avant leur utilisation. Le tableau 2 présente les proportions des tensioactifs lipophiles utilisés pour la formulation des NCL modifiées.

<b>Tensioactif/Nom de marque</b>	<b>Autre dénomination</b>	<b>HLB</b>	<b>Proportion : Recommandée/Considérée</b>
Docusate de sodium	Diocetyl Sulfosuccinate de sodium	10	0,01-1 %**/0,5%[228]
Span® (20, 40,60 et 80)	Esthers de sorbitane	8,6 ; 6,7 ; 4,7 ; 4,3	1-10 %**/4 % [228]
Stéarate de PEG (300,400, 600)	Stéarates de PEG	9,7 ; 11,1 ; 13	0,5-5 %**/ 4% [228]
Laurogyglycol™ 90	Monolaurate de Propylène glycol	4-5	0,2-5 %*/4 %
Plurol® oleique	Polyglycéril 6- dioleate	3	Sans objet/4 %* [227]
Capryol PGMC	monocaprylate de propylène glycol type I	5-6	0,2-5 %*/4 % [229]
Capmul MCM EP	Caprylocaprate de glycerol	4,7	0,2-5 %*/4% [229]
Capmul 907 P	monoheptanoate de Propylène glycol	7,5	0,2-5 %*/4% [229]
Capmul MGO-50	Oléate de glycerol	3-4	0,2-5 %*/4 % [229]
Capmul MCM C8 EP	Caprylate de glycérol	5-6	0,2-5 %*/4 % [229]

\* référentiel : article ; \*\* référentiel : Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ème édition. Il s'agit des pourcentages m/m (masse de tensioactif/quantité totale des ingrédients, quantité d'eau de dilution non incluse).

**Tableau 2 : Liste des tensioactifs lipophiles et les proportions évaluées.**

### **2.3. Préparation des mélanges « NCL + tensioactifs hydrophiles »**

Certains tensioactifs (Tween® 20, 40, 60,80 ; Lutrol® F68 ; Sucroester 7, 11 et 15) ayant des propriétés physicochimiques proches de celles du Solutol® ont été mélangés sous agitation magnétique aux dispersions de NCL 50 nm classiques avant la formulation des bulles. Dans le cas du Solutol® et des Sucroesters, une dispersion à 10

## ***Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air***

% (m/m) a été préparée à l'avance puis diluée avec la dispersion de NCL. Finalement, on obtient des mélanges ayant une concentration finale de 5 % en Solutol®, de 1% (m/m) en Sucroester 7 et de 2,5 % (m/m) en Sucroester 11 et 15. Dans le tableau 3 sont récapitulés les tensioactifs hydrophiles utilisés avec leurs concentrations respectives.

La taille et le potentiel zeta des NCL ont été mesurés avant et après ajout des tensioactifs hydrophiles pour s'assurer qu'on a des particules ayant conservé leurs caractéristiques physicochimiques de départ ou qui sont pas trop loin des NCL de départ.

<b>Tensioactif</b>	<b>HLB*</b>	<b>Concentration finale dans la préparation : recommandée /considérée</b>	<b>Référentiel</b>
Lutrol® F68	29	1-5 %/2,5 %	HBE*[228]
Lutrol® F127	22	1-5 %/2,5 %	HBE[228]
Sucro Es 11 10 %		0,5-10%/1 %	Internet[230]
Sucro Es 15 10 %	10,6	0,5-10 %/2,5%	Internet[230]
Sucro ES 7 10 %	11	0,5-10 %/1 %	Internet[230]
Tween® 40	15,6	1-10 %/5 %	HBE[228]
Tween® 60	14,9	1-10 %/5 %	HBE[228]
Tween® 20	16,7	1-10 %/5 %	HBE[228]
Tween® 80	15	1-10 %/5 %	HBE[228]
Solutol® 10 %	≈15	10 %	HBE[228]

HBE= Handbook of Pharmaceutical Excipients, HLB= Balance Hydrophile Lipophile

**Tableau 3:** Tensioactifs hydrophiles et concentrations (m/m) utilisées.

### **2.4. Préparation des mélanges « NCL + agents viscosifiants ou + glycérol ou + PEG»**

Le but de cette approche est d'augmenter la viscosité et/ou la densité du milieu de dispersion afin de ralentir la vitesse de migration des bulles vers la surface et de prolonger leur durée de conservation. Nous avons préparé les dispersions aqueuses « primaires » suivantes :

-10 % (m/m) d'alginate de sodium (Al)

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

---

- 5 % (m/m) d'acide hyaluronique (HA)
- 7,5 % (m/m) de carboxyméthylcellulose sodique (CMCNa) de bas poids moléculaire (BPM) ou de poids moléculaire élevé
- 7,16 % de CMCNa de poids moléculaire moyen (PMM)

Pour le macrogol 4000, une solution aqueuse primaire à 5 % a été préparée de sorte à avoir un mélange final concentré à 2,5 % (m/m). Les chitosans de bas poids moléculaire (BPM) ou de poids moléculaire moyen (PMM) ont été solubilisés avec une solution d'acide acétique à 0,1 M ou 1 % (m/v) pour obtenir des dispersions à 5 % (m/m). Toutes les dispersions de polymère ont été stockées à 4°C pendant 48 heures (h) afin d'améliorer la solvatation du polymère. Une fois ce délai passé, la quantité requise de dispersion a été ajoutée aux microbulles préalablement formulées à partir des NCL 50 nm classiques.

Les ingrédients destinés à augmenter la densité du milieu de dispersion des bulles tels que le glycérol et les Polyéthylène glycol (PEG) de bas poids moléculaire ont été directement ajoutés aux microbulles néoformées. La taille des NCL a été également mesurée après ajout des dispersions dans l'objectif d'identifier d'éventuelles incompatibilités pouvant survenir lors du processus de mélange des NCL et des dispersions. Dans le tableau 4 sont reportées les concentrations (m/m ou m/v) finales des additifs utilisés.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Excipient	Type de mélange	Concentration finale recommandée	Concentration considérée dans le mélange final (%)
PEG		30 % (v/v) ** [228]	
	Bulle+PEG 200		30 % (v/v)
	Bulle+PEG 300		30 % (v/v)
	Bulle+ PEG 400		30% (v/v)
Macrogol 4000		5 % (m/m)** [228]	5 % (m/m)
Glycérol		<50 %** (m/m) [228]	
	Bulle+Glycérol 20 %		20 % (m/m)
	Bulle+Glycérol 30 %		30 % (m/m)
	Bulle+Glycérol 50 %		50 % (m/m)
	Bulle+Glycérol 70 %		70 % (m/m)
Chitosan		0,25-1*(m/m) [231]	
	Bulle+chitosan BPM		0,5 % (m/m)
	Bulle+Chitosan PMM 0,25 %		0,25 % (m/m)
Alginate de sodium	Bulle+Al 0,5 %	1-5**(m/m) [228]	0,5 % (m/m)
Acide hyaluronique	Bulle+HA 0,25 %	0,25-1 %**(m/m) [231]	0,25 % (m/m)
Carboxyméthyl-cellulose sodique		0,10-0,75**(m/m) [228]	
	Bulle+ CMCNa BPM		0,3 % (m/m)
	Bulle+CMCNa BPM		0,6 % (m/m)
	Bulle + CMCNa BPM		0,75 % (m/m)
	Bulle+CMCNa PMM		0,1 % (m/m)
	Bulle+ CMCNa PMM		0,2 % (m/m)
	Bulle+ CMCNa PMM		0,4 % (m/m)

\*\* : selon Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6<sup>ème</sup> édition, \* : selon un article,

**Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des viscosifiants utilisés.**

## **2.5. Caractérisation des NCL**

Le Nano Series ZetaSizer (Malvern, Worcestershire, UK) a été utilisé pour mesurer la taille des particules, leur indice de polydispersité ainsi que leur potentiel zêta. Le mouvement brownien des particules est mesuré (principe de diffusion dynamique de la lumière) et est analysé pour déterminer la taille hydrodynamique des particules. Le système fonctionne avec un faisceau laser de longueur d'onde de 632,8 nm incliné d'un angle de 173°. Quant à la mesure du potentiel zêta, elle repose sur la mobilité électrophorétique des particules laquelle est fonction de la charge des particules. Toutes les mesures ont été faites à 25°C et répétées trois fois. Tous les échantillons ont été dilués dans le ratio 1 :59 avant la mesure (même ceux renfermant un agent viscosifiant ou un tensioactif hydrophile additionnel). L'appareil donne la taille moyenne en intensité qui se calcule en considérant l'intensité de lumière diffusée par les particules. Elle est proportionnelle au diamètre des particules à la puissance 6. A partir de cette taille et en utilisant des calculs mathématiques, le Z-average, la taille moyenne en nombre et en volume sont déduites. Le Z-average est une taille moyenne en intensité déterminée en tenant compte de l'ensemble des particules mesurées. La taille moyenne en nombre est calculée en prenant en compte le nombre absolu de particules présent dans l'échantillon. La taille en volume est basée sur le volume des particules et est proportionnelle au rayon de la particule à la puissance 3.

## **2.6. Formulation des microbulles**

L'Ultra turrax T 125 (IKA®, Werke Staufen, Germany) a été utilisé comme système d'agitation pour préparer les bulles. L'appareil a été réglé sur la vitesse de 22000 rpm et sur une durée d'agitation de 5 min. Les dispersions de NCL classiques, de NCL modifiées, les mélanges « NCL + surfactants hydrophiles » et les mélanges « NCL + viscosifiants ou modificateur de densité » ont servi de phases intermédiaires pour la formulation des bulles. Dans chaque cas, un volume initial de 10 mL ( $V_i$ ) a été utilisé. Après la formulation, une première décantation de 20 min a permis de retirer le

## ***Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air***

---

sédiment (volume résiduel :  $V_{mr}$ ) et de récupérer la quantité totale des microbulles générées ( $V_B$ ) par ajout de 15 mL d'eau Milli Q ( $V_e$ ). Une seconde décantation d'une durée de 10 min a été effectuée sur le  $V_B$  afin de séparer les petites bulles ( $V_{PB}$ ) des grosses ( $V_{GB}$ ). La préparation définitive de microbulles est constituée par la fraction de petites bulles ( $V_b = V_{PB} + V_e$ ).

### **2.7. Evaluation de chacun des ingrédients standards des NCL sur les propriétés physicochimiques des bulles.**

Pour évaluer l'influence de chaque constituant, différents types de NCL ont été formulées en modifiant la quantité des ingrédients présents dans les NCL classiques. Ainsi donc les proportions de deux ingrédients ont été à chaque fois fixées tandis que celle du troisième est modifiée.

### **2.8. Caractérisation des microbulles**

La taille a été mesurée au master sizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) qui fonctionne selon le principe de la diffraction de la lumière laser. Dans le cas d'espèce, la vitesse d'agitation de la palette de l'unité de dispersion était réglée à 850 rpm, le pourcentage d'ultrasons pouvant faire vibrer l'unité de dispersion était fixé à 0%.

### **2.9. Paramètres d'évaluation des formulations (NCL modifiées, bulles)**

La taille des particules, l'indice de polydispersité, le potentiel zêta, la stabilité dans le temps, les températures d'inversion de phase ainsi que la capacité à générer des bulles, sont les paramètres mesurés pour l'appréciation de la qualité des NCL modifiées. Concernant la production des bulles, et selon le cas, le volume total des bulles générées 20 min après formulation ( $V_{20}$ ), le volume final de bulles obtenu ( $V_B$ ), le



## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

volume total de petites bulles ( $P_{pb}$ ), le volume final de bulles récupéré ( $V_b$ ), le diamètre des bulles, le Span, la vitesse de migration et la stabilité dans le temps sont considérés comme paramètres d'évaluation de la méthode d'amélioration.

### 3. Résultats et discussions

#### 3.1. Mesure de la taille des NCL après addition de tensioactifs hydrophiles, de viscosifiants ou de modificateur de densité

Les dispersions de NCL conservent l'effet Tyndall (aspect bleuté ou orangé lié à la diffusion de la lumière blanche par les objets nanométriques) malgré l'ajout des additifs à l'exception des sucroesters pour lesquels le mélange devient turbide. Les tensioactifs tels que Tween® 60, Lutrol® F127 et Sucroester 15 ont légèrement augmenté la taille des NCL à l'inverse du Sucroester 11. Toutefois les valeurs obtenues ne sont pas trop éloignées de la valeur initiale (valeur avant ajout) (voir tableau 5). Les valeurs de potentiel zeta se trouvent dans la fourchette des valeurs obtenues pour les NCL classiques.

Mélange	Z-average (nm)	Taille en Intensité (nm)	Taille en volume (nm)	Taille en nombre (nm)	PDI	ZP (mV)	% de variation
NCL 50 (avant ajout)	53,1±0,6	56,2±0,8	48,1±0,3	41,9±0,1	0,04±0,01	-7,6±1,2	
NCL 50 + F68	54,9±0,4	57,7±0,5	50±0,4	43,9±0,5	0,03±0,01	-8±1,5	
NCL 50 + F127	<b>62,3±0,9*</b>	65,5±0,4	56,8±1,2	49,7±1,7	0,03±0,02	-5,2±0,7	17,32 %
NCL 50+Sucro Es 11 1%	<b>39,2±0,7*</b>	42,3±0,7	34,5±1	29,3±1,4	0,07±0,02	-9,5±0,3	26,18 %
NCL 50+Sucro Es 15 2,5%	<b>61,5±2,2*</b>	91,5±3,4	33,4±1,6	22±0,8	0,27±0,002	-8,9±0,2	15,82 %
NCL 50+Sucro Es 7 1%	54,1±0,9	57,4±1,2	48,5±0,6	41,9±0,4	0,04±0,01	-12,4±1,6	
NCL 50+Tween® 40	55,3±0,7	59±1,1	49,4±0,6	42,4±0,8	0,05±0,01	-5,7±0,4	
NCL 50+Tween® 60	<b>58,1±0,9*</b>	63,3±2	48,7±0,8	39,7±1,7	0,13±0,01	-8,3±2,6	9,42 %
NCL 50+Tween® 20	53,5±0,3	56,7±0,9	48,1±0,2	41,7±0,6	0,04±0,02	-8,6±3	
NCL 50+Tween® 80	52,9±0,4	56,5±0,4	47,2±0,6	40,5±1	0,05±0,004	-8,9±2,2	
NCL 50+Solutol 10%	53±0,8	58,2±0,4	45,2±1,2	37±1,3	0,08±0,01	-21±2,6	

**Tableau 5 : Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL après ajout de tensioactifs hydrophiles.**

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

La plupart des viscosifiants ajoutés ont légèrement augmenté le diamètre des NCL. Cela pourrait résulter de l'existence d'interactions de type Van Der Waals entre les constituants de la paroi des NCL et le viscosifiant (tableau 6).

Mélange	Z-average (nm)	Taille en Intensité (nm)	Taille en volume (nm)	Taille en nombre (nm)	PDI	ZP (mV)	% de variation
NCL 50 (avant ajout)	53,1±0,6	56,2±0,8	48,1±0,3	41,9±0,1	0,04±0,01	-7,6±1,2	
NCL 50 +Al 1%	57,8±0,7	62,8±0,4	49,9±1,3	41,2±1,7	0,074±0,005	-10,4±0,4	8,85 %
NCL 50 +CMCNa PMM 1%	57,3±1,2	64,4±2,4	47,4±1,4	37,2±2,5	0,100±0,013	-11,6±1	7,53 %
NCL 50 +HA 0,5%	64,8±0,7	161,8±40,5	73,4±8,1	33,5±0,4	0,22±0,008	-8,3±0,8	22,03 %
NCL 50 +Glycérol 50%	55,6±0,7	59,9±1,4	49,2±1,8	41,7±2,9	0,07±0,02	-5,4±0,8	4,7 %
NCL 50+PEG 300 30%	64,4±0,6	68,7±1,6	54,2±0,1	44,6±0,9	0,15±0,01	-3,1±0,3	21,28 %
NCL 50+Macrogol 4000 5%	57,4±0,7	62,3±0,4	48,4±0,6	39,8±0,8	0,14±0,001	-6,8±0,8	7,51 %

**Tableau 6 : Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL après ajout de viscosifiant.** Al= alginate de sodium, HA= acide hyaluronique, CMC Na= carboxyméthylcellulose sodique, PMM= poids moléculaire moyen.

### 3.2. Propriétés physicochimiques des NCL modifiées

Toutes les modifications n'ont pas abouti à une formulation stable. Nous donnons ici seulement les résultats des préparations qui sont satisfaisantes en termes de dispersion de taille et de stabilité. A composition égale, la valeur de la taille des NCL dépend du type de tensioactif. Les Stéarates de PEG, et le Capmul PMPG EP utilisés à des proportions indiquées plus haut ont donné des NCL dont la taille est de l'ordre de 100 nm tandis que pour les Span<sup>®</sup>, le Capmul GMC-50 et le Plurol<sup>®</sup>, la taille obtenue

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

est proche de celle des NCL 50 nm classiques. Le lauroglycol 90 a donné des NCL de taille de 150 nm (tableau 7). Le contrôle de la taille fait à J7 a montré que les préparations sont stables dans le temps (tableau 8).

NCL modifiées	Z-average (nm)	Taille en Intensité (nm)	Taille en volume (nm)	Taille en nombre (nm)	PDI	ZP (mV)
NCL pluro <sup>®</sup> oleïque	49,5±0,5	51,9±0,3	44,9±0,9	39,4±0,3	0,025±0,004	-7,2±0,7
NCL Span <sup>®</sup> 20	57,1±0,4	60,7±1	51,1±0,7	43,9±0,6	0,04±0,01	-3,3±0,7
NCL Span <sup>®</sup> 40	63,4±0,6	70,5±1,1	54±1,4	43,6±2	0,1±0,002	-8,3±0,8
NCL Span <sup>®</sup> 60	62±0,5	65,3±0,5	56,8±1	49,8±1,3	0,03±0,01	-5,3±0,2
NCL Span <sup>®</sup> 80	74,1±0,5	80,7±1,3	65,8±0,4	54,6±1,3	0,1±0,01	-6,6±1,2
NCL SPEG 300	111,6±0,6	129,3±1,6	99,4±3,2	64,8±9,3	0,13±0,01	-5,6±0,5
NCL SPEG 400	99,3±1	117,8±1	81,9±2	54,1±1,5	0,14±0,003	-4,8±0,5
NCL laurylglycol 90	143,9±0,2	163±6,1	99,7±11,7	47,3±5,8	0,11±0,03	-4,5±0,4
NCL capmul GMO-50	58,2±0,6	63,9±2,1	48,6±2	39,7±3,2	0,13±0,02	-3,9±0,4
NCL capmul PMCG EP	112,3±1,1	123,2±3	104,2±1,5	79,9±5,4	-	-

**Tableau 7 : Tailles hydrodynamiques et potentiel zêta des NCL formulées avec les tensioactifs lipophiles. Tailles mesurées à J0.**

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

NCL modifiées	Z-average (nm)	Taille en Intensité (nm)	Taille en volume (nm)	Taille en nombre (nm)	PDI
NCL pluro <sup>®</sup> oleïque	50±0,8	52,7±0,9	45,6±0,7	40,1±0,8	0,04±0,01
NCL Span <sup>®</sup> 20	57,8±0,8	62,5±1,4	50,8±0,5	42,7±0,6	0,07±0,02
NCL Span <sup>®</sup> 40	61,1±0,8	63,8±1,2	55,9±0,5	49,3±0,4	0,02±0,01
NCL Span <sup>®</sup> 60	63,1±0,7	66±0,6	58,2±0,9	51,7±1,5	0,02±0,022
NCL Span <sup>®</sup> 80	73,8±1,1	75,5±1,2	67±1,2	57,5±1	0,05±0,014
NCL SPEG 300	113,3±0,6	131±2,1	102,7±1,2	70,3±2,2	0,14±0,014
NCL SPEG 400	97±0,7	115,7±2	80,1±1,8	54,8±3,5	0,16±0,01
NCL laurylglycol 90	149,2±1,5	170,7±2,4	154,6±2	102,7±3,6	0,12±0,014
NCL capmul GMO-50	50,6±0,3	55,8±0,5	43,1±0,4	35,6±0,7	0,1±0,01
NCL capmul PMCG EP	112,1±1,1	124,2±3,1	104,3±1,6	79,4±5,5	

**Tableau 8** : Tailles hydrodynamiques des NCL formulées avec les surfactants lipophiles. Tailles mesurées à J7.

### 3.3. Températures d'inversion de phase en fonction de la nature du tensioactif

Les températures (T) d'inversion de phase sont reportées au sein du tableau 9.

Malgré de nombreuses modifications effectuées au niveau des compositions des ingrédients, certains tensioactifs n'ont pas pu donner des NCL caractérisables en donnant des macroémulsions dont la caractérisation au nanosizer a révélé une distribution multimodale, ce qui s'est traduit par un résultat de mauvaise qualité signalé par l'appareil). C'est le cas du Capmul 907 P, du Capryol PGMC, du Capmul MCM C8 EP et du Docusate de sodium. Pour ces tensioactifs, nous n'avons pas pu observer l'inversion de phase. A l'opposé, l'utilisation des Span<sup>®</sup>, du Capmul PMCG EP, du Capmul MGO 50 et du Lauroylglycol 90 à la place du Lipoïd<sup>®</sup> comporte un intérêt particulier pour l'encapsulation des molécules thermosensibles du fait qu'ils génèrent des NCL stables et avec une inversion de phase survenant à une température plus basse.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

NCL modifiées	Tmin	Tmax	T de début d'inversion de phase			T de fin d'inversion de phase			T d'apparition de la translucidité			TT
			Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	
NCL plurool® oleique	40	80	53,5	53,6	53,9	46	46,5	46,2	52,9	52	52,1	40
NCL Span® 20	30	80	53	53,8	51	41,1	41,1	41,9	45	46,8	45	35
NCL Span® 80	30	80	53,9	53,2	53,8	46,7	46,2	46,8	Pas remarqué			35
NCL Span® 60	26	80	51	50,4	50,2	30	30	30	30	28,9	30	30
NCL Span® 40	30	80	51	51,2	50,5	40	40		40	40	40	30
NCL SPEG 400	60	90	74,5	75	74,8	71	71,2	71,4	Pas remarqué			75
NCL SPEG 300	60	80	68,5	66	68,5	60,5	62	60	65,5	64	64	60
NCL capmul GMO-50	25	60	Inversion remarquée seulement pendant le refroidissement du dernier cycle où la préparation devint plus translucide aux alentours de 28°C, par conséquent la trempe a été faite à 25°C									
NCL capmul MCMEP	30	80	36	37,6	36	32	33	32,5	34	35,7	35	32

**Tableau 9:** Températures d'inversion de phase détectées lors du refroidissement. T= température (°C), min=minimale, max= maximale, TT= température de trempe.

### **3.4. Evaluation de l'influence de l'ajout de viscosifiant sur la vitesse de migration des bulles.**

Cette évaluation a été faite en observant à l'œil nu les échantillons. Le temps du début de migration a été significativement ralenti par ajout des viscosifiants sauf dans les cas suivants : glycérol utilisé à une concentration comprise entre 20 % et 30 % ; CMCNa BPM ; CMCNa PMM à 0,1 % et 0,2 %. Les bulles issues de ces mélanges ont un temps de migration augmenté de 2 unités, 4 voire 6 unités par rapport à la valeur des bulles classiques (i.e. des bulles sans ajout de viscosifiant) tableau 10.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Mélange de bulle+Excipient	Temps de début de migration	Mélange de bulle+Excipient	Temps de début de migration
Bulle+ Al 0,25 %	35 min	Bulle+CMCNa PMM 0, 4 %	20 min 15s
Bulle+Al 0,5 %	>35min	Bulles classiques*	4min 17 s*
Bulle+ HA 0,25 %	1h20 min	Bulle+PEG 200	30min
Bulle+HA 0,5 %	>1h36min	Bulle+PEG 300	27min 40s
Bulle+ ChBPM 0,5 %	52min 25s	Bulle+ PEG 400	21min 36s
Bulle+ChPMM 0,25 %	40min 43s	Bulle+Glycérol 20 %	10min 26s*
Bulle+CMCNa BPM 0, 3 %	4min36s*	Bulle+Glycérol 30 %	13min 45s*
Bulle+CMCNa BPM 0, 6 %	9min 17s*	Bulle+Glycérol 50 %	22min 10s
Bulle+CMCNa BPM 0, 75 %	11min 59s*	Bulle+Al 1%	Pas fait
Bulle+CMCNa PMM 0, 1 %	6min 27s*	Bulle+HA 1 %	Pas fait
Bulle+CMCNa PMM 0, 2 %	8min 13s*		

**Tableau 10 : Effet des viscosifiants sur le temps de migration.** Min=minute, s= seconde. Al= alginate de sodium, HA= acide hyaluronique, CMC Na= carboxyméthylcellulose sodique, Ch= chitosan, BPM= bas poids moléculaire, PMM= poids moléculaire moyen. Certains mélanges n'ont pas été évalués car ils nous semblaient être trop visqueux. Il s'agit de : bulle + Al 1%, bulle + HA 1%, bulle + Chitosan (le Chitosan n'étant pas complètement dispersé malgré la quantité d'acide acétique utilisée).

### **3.5. Capacité des dispersions de NCL modifiées à engendrer des bulles**

Toutes les NCL modifiées à l'exception de quelques-unes ont pu générer des bulles par la méthode d'agitation. Le volume des bulles qui apparaissent juste après agitation ( $V_0$ ), le volume total de bulles après la première décantation ( $V_B$ ) et la taille des bulles ont été considérés comme critères principaux de jugement. En analysant le tableau 11, nous pouvons conclure que seules les NCL formulées avec du Capmul MGO-50 ou du Plurol® oléique n'ont pas la capacité de donner des bulles. Toutefois, les autres tensioactifs en sont capables même si les bulles obtenues sont de taille importante (tableau 12) lorsqu'on les compare à celles générées dans des dispersions de NCL classiques (non modifiées). Parmi les tensioactifs ayant généré des bulles, seuls

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

les spans 40 et 60 ont été considérés dans la suite de l'évaluation à cause du volume considérable de bulles produit. Une modification de composition des NCL formulées avec les span 40 et 60 a été entreprise dans le but d'espérer une diminution de la taille des bulles (voire les tableaux 13 à 16). En effet, partant du constat selon lequel une augmentation de la quantité du Solutol® dans les NCL formulées avec du Span® 40 ou 60 entraîne une diminution de la taille des bulles précédemment obtenues de 5 µm, la question suivante a été posée : est-ce que en augmentant davantage la quantité du Solutol® ou en augmentant celle du Span®, on parviendra à réduire la taille jusqu'à une taille de 2 µm ? N'ayant pas pu répondre à cette question à travers nos manipulations, nous pensons que c'est plutôt la méthode de formulation des bulles qui serait incriminée et non la composition des NCL.

Bulle formulée	NCL modifiées utilisées	V <sub>i</sub>	V <sub>0</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>mr</sub>	V <sub>B*</sub>	V <sub>PB</sub>	V <sub>GB</sub>	V <sub>e</sub>	V <sub>r</sub>	V <sub>b</sub>
Bulle classique	NCL 50 classiques	10	15	12,5	10	2,5	1,5	1	15	16,5	15
T58	NCL Span® 20	10	17,5	15	10	5	0	5	0	0	0
T59	NCL Span® 40	10	27,5	20	7,5	12,5	0	12,5	15	20	15
T60	NCL Span® 60	10	25	20	7,5	12,5	0	12,5	15	22,5	15
T61	NCL Span® 80	10	15	12,5	10	2,5	0	2,5	0	0	0
T62	NCL SPEG 300	10	17,5	12,5	8,5	4	0	4	0	0	0
T63	NCL SPEG 400	10	14	12,5	10	2,5	0	2,5			
T64	NCL capmul 90	10	15	11,25	10	1,25	0	1,25			
T65	NCL capmul MGO-50*	10	14	10*	10	0*	0*	0			
Bulle Plurol®	NCL Plurol® oléique*	10	10	10*	10	0*	0*	0			
T66	NCL capmul MCMC EP	10	45	15	8,5	6,5	0	6,5			

**Tableau 11 : Caractéristiques des bulles formulées à partir des NCL modifiées.**

V<sub>i</sub>= volume de NCL initialement prélevé, V<sub>0</sub>= volume total de préparation juste après l'agitation, V<sub>20</sub>= volume total de la préparation après 20 min de repos, V<sub>mr</sub>= volume du sédiment après la première décantation, V<sub>B</sub>= volume total de bulles obtenu après la première décantation, V<sub>PB</sub>= fraction volumique représentée par les petites bulles ,

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

$V_{GB}$ = volume occupées par les grosses bulles au sein du volume total ,  $V_e$ = volume d'eau ajouté pour récupérer le volume total de bulles,  $V_r$ = volume total de bulles récupéré après dilution,  $V_b$ = volume de bulles récupéré après la deuxième décantation.

Type de bulle (NCL utilisées)	Taille ( $\mu\text{m}$ ) D [3,2]	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Span
Bulle (NCL classiques)	2,9±0,01	0,46±0,001	0,6±0,001	1,3±0,01	1,32±0,01
T59 (NCL Span® 40)	22,5±0,2	11,3±0,12	16,3±0,2	25,9±0,2	0,9±0,003
T60 (NCL Span® 60)	23,1±0,5	10,5±0,5	15,2±0,7	25,4±0,8	0,98±0,02
T85 (NCL+Tween® 20)	2,6±0,01	0,7±0,01	1,3±0,01	2,6±0,002	1,43±0,013
T86 (NCL+Tween® 40)	1,9±0,003	0,9±0,001	1,3±0,002	2,1±0,01	0,96±0,003
T87 (NCL+Tween® 60)	1,5±0,002	0,8±0,001	1,1±0,001	1,7±0,002	0,87±0
T88 (NCL+Tween® 80)	2,3±0,01	0,90±0,001	1,3±0,001	2,3±0,01	1,1±0,005
T89 (NCL+macrogol 4000)	1,8±0,001	0,9±0,001	1,2±0,001	1,9±0,001	0,91±0,001
T90 (NCL+F68)	2,2±0,01	0,8±0,001	1,1±0,001	2 ±0,004	1,1±0,004
T91 (NCL+F127)	1±0,02	0,06±0,0006	0,1±0,002	0,2±0,01	1,6±0,03
T92 (NCL+sucro Es 7)	1,9±0,01	0,6±0	0,8±0,001	1,6±0,001	1,3±0,002
T93 (NCL+sucro Es 11)	0,4±0,001	0,10±0,001	0,2±0,002	0,3±0,002	1,3±0,1
T94 (NCL+sucro Es 15)	1,6±0,01	0,3±0,001	0,5±0,002	1,1±0,002	1,7±0,005

**Tableau 12 :** Tailles des bulles formulées en utilisant les NCL modifiées ou les mélanges de NCL + tensioactifs hydrophiles.

NCL modifiées	Solutol®	Labrafac®	Span®	NaCl	Eau Milli Q
	QR	QR	QR	QR	QR
NCL Span® 40 (L14)	847,7	508,4	200,0	69,8	3472,1
NCLpan® 60 (L15)	847,7	506,9	200,5	83,8	3398,7
NCL Span® 40 (L16)	846,3	1037,4	75,6	89,6	3021,3
NCL Span® 40 (L26)	846,4	517,7	405,5	75,2	3241,7
NCL Span® 40 (L27)	483,7	494,2	404,4	114,1	3945,6
NCL SPEG 300 (L17)	845,3	501,2	201,7	82,3	3491,5
NCL SPEG 400 (L19)	845,8	1029,0	70,6	88,7	3099,8

**Tableau 13 :** Composition des NCL contenant du Span® ou du SPEG. QR= quantité réelle pesée.



## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

NCL modifiées	z-average (nm)	Taille en intensité (nm)	Taille en volume (nm)	Taille en nombre (nm)	PDI	ZP (mV)
NCL Span® 40 (L14)	32,5±0,4	35,2±0,4	28±0,4	23,7±0,5	0,12±0,03	-6,6±3,3
NCL Span® 60 (L15)	32,8±0,4	35,2±0,3	28,9±0,5	24,7±0,5	0,06±0,01	-4±0,9
NCL Span® 40 (L16)	97,4±1,6	112,6±3,2	86,7±3,2	62,9±2,2	0,12±0,01	-0,7±0,1
NCL Span® 40 (L26)	57,6±0,5	92,1±6,7	39±2,5	27,4±1,1	0,25±0,01	-13,4±1,6
NCL Span® 40 (L27)	57±0,3	61,7±0,6	46,2±0,7	37,4±1	0,13±0,001	-13,8±0,5
NCL SPEG 300 (L17)	32,6±0,5	34,8±0,3	28,9±0,2	24,7±0,1	0,05±0,01	-3,5±0,2
NCL PEG 400 (L19)	122,6±1,1	143,4±1	116,7±2,4	76,8±2,6	0,14±0,001	-6,3±0,5

**Tableau 14 :** Tailles des NCL contenant des proportions variables de Span® ou de SPEG. QR= quantité réelle utilisée.

NCL modifiées	Tmin	Tmax	T début d'inversion de phase			T de fin d'inversion de phase			T d'apparition de la translucidité			TT
			Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	
NCL Span® 40 (L14)	40	80	54	56,6	55	43,6	45,1	44	43,6	45,1	44	44
NCL Span® 60 (L15)	40	80	68	69,2	67,7	54,5	54,4	53,3	54,5	54,4	53,3	52
NCL Span® 40 (L16)	50	80	65	64,4	67	59,5	62,7	62	63,7	66,2	66	60
NCL SPEG 300 (L17)	40	80	77,3	76,2	78	68,3	68,8	68,5	74,9	75	74	69
NCL Span® 40 (L27)	30	70	46,7	46,7	47	38	39	38,7	38	39	38,7	30
NCL Span® 40 (L26)	40	90	55	54	53,3	45	47	46,4	49	49,2	49,1	43
NCL SPEG 400 (L19)	60	90	82,1	82		71,5	72		78,1	76,8	77,6	70

**Tableau 15 :** Cycles d'inversion de phase des NCL contenant du Span® ou du SPEG. Cy= cycle, T= température (°C), min= minimale, max= maximale, TT= température de trempe.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

NCL utilisées	V <sub>i</sub>	V <sub>0</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>mr</sub>	V <sub>B</sub>	V <sub>PB</sub>	V <sub>GB</sub>	V <sub>e</sub>	V <sub>r</sub>	V <sub>b</sub>
NCL 17	10	15	12	10	2	0	2			
NCL 14	10	15	15	8,75	6,25*	0	6,75	15	20	15
NCL 16	10	15	11	10	1	0	1	0	0	0
NCL 15	10	19	17,5	7,5	10		10	15	19 15	
NCL 19	10	17,5	12,5	10	2,5	0	2,5	0	0	
NCL 26	10	20	17,5	7,5	10	0	10	15	22,5	17
NCL 27	10	32,5	32,5	2	30,5	0	30,5	15	40	35

**Tableau 16 : Volume total de bulles obtenu en utilisant les NCL Span® ou NCL SPEG.**

V<sub>i</sub>= volume de NCL initialement prélevé, V<sub>0</sub>= volume total de préparation juste après l'agitation, V<sub>20</sub>= volume total de la préparation après 20 min de repos, V<sub>mr</sub>= volume du sédiment après la première décantation, V<sub>B</sub>= volume total de bulles obtenu après la première décantation, V<sub>PB</sub>= fraction volumique représentée par les petites bulles, V<sub>GB</sub>= volume occupées par les grosses bulles au sein du volume total, V<sub>e</sub>= volume d'eau ajouté pour récupérer le volume total de bulles, V<sub>r</sub>= volume total de bulles récupéré après dilution, V<sub>b</sub>= volume de bulles récupéré après la deuxième décantation.

### **3.6. Capacité des mélanges « NCL + surfactants hydrophiles » à donner des bulles**

En observant le tableau 17, nous constatons que dans la majorité des cas, le volume de bulles obtenu n'est pas très différent de celui obtenu en utilisant les NCL 50 nm classiques. Seuls les mélanges de NCL + Poloxamer (F68 et F127) et les mélanges de NCL + sucroester ont pu générer un volume important de bulles (V<sub>B</sub> et V<sub>PB</sub> importants, et V<sub>b</sub> faible pour les NCL+ sucroester). L'observation au microscope optique des microbulles formulées avec les mélanges « NCL+ poloxamers ou NCL+ sucroesters » a révélé un milieu visqueux et pauvre en microbulles (figure 16). Cela serait dû au fait que les poloxamers se seraient comportés comme des viscosifiants au lieu d'agir comme des tensioactifs. Et pourtant, la concentration incorporée était en adéquation avec celle recommandée lorsque c'est la propriété tensioactive qui doit être mise à profit. Concernant les sucroesters, cette faible présence des particules

## ***Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air***

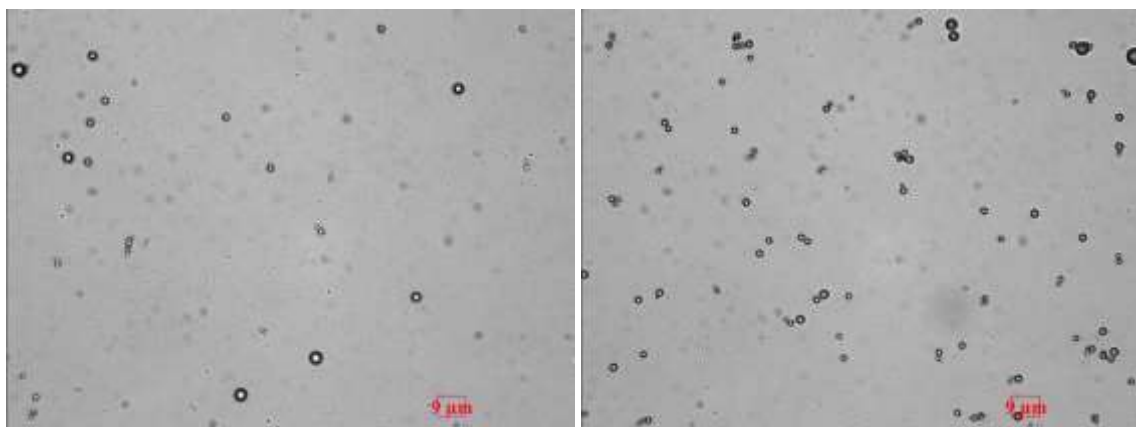
---

serait due à leur éventuelle disparition du milieu de dispersion, ce qui expliquerait une faible stabilité dans le temps. Toutefois, la taille des particules contenues dans ces formulations est inférieure à 10  $\mu\text{m}$  et se trouve même en deçà de 2,5  $\mu\text{m}$  ce qui reste dans les limites recommandées pour une application médicale (tableau 12).

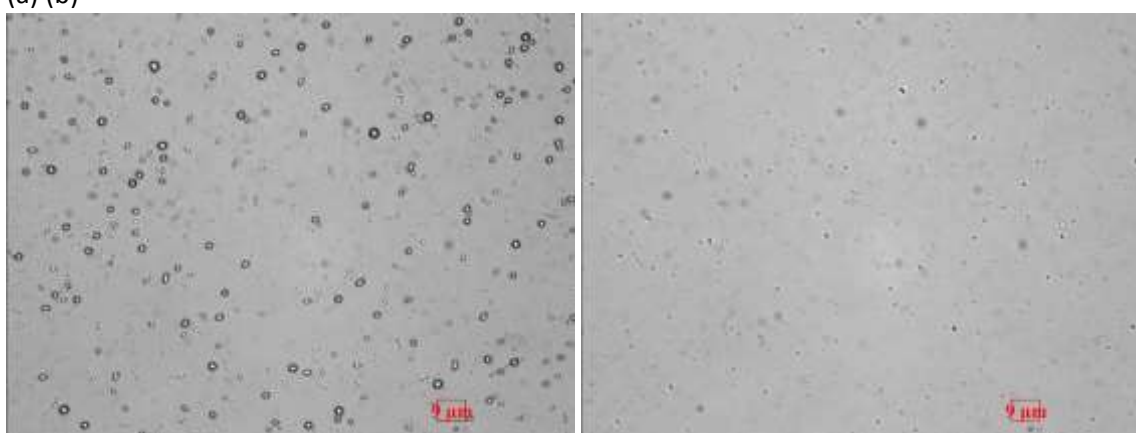
L'ajout de Tween® ou du F68 a augmenté le  $D_{90}$  de 0,5 au moins tout en maintenant la taille des bulles dans l'ordre de grandeur habituel.

Avec les Tweens®, les bulles sont rares. Cela laisse penser que ces tensioactifs n'aideraient pas à la formulation des bulles. De plus les échantillons étaient plus limpides qu'habituellement.

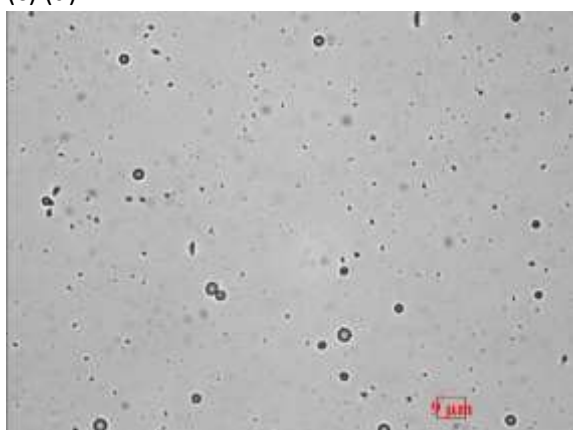
## Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air



(a) (b)



(c) (d)



(e)

**Figure 16** : photographies des bulles formulées avec des mélanges « NCL+ surfactants hydrophiles ». Les images sont prises avec un objectif « 63 fold/1,4 NA » et avec une résolution de 1024 x 1024. Bulles obtenues avec le mélange NCL+F68 (a) ; bulles obtenues avec le mélange « NCL+F127 » (b) ; bulles obtenues avec le mélange « NCL+sucro Es 7 » (c) ; bulles obtenues avec le mélange « NCL+sucro Es 11 » (d) ; bulles obtenues avec le mélange « NCL+sucro Es 15 » (e).

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Mélange utilisé	V <sub>i</sub>	V <sub>0</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>mr</sub>	V <sub>B</sub>	V <sub>PB*</sub>	V <sub>GB</sub>	V <sub>e</sub>	V <sub>r</sub>	V <sub>b</sub>
(NCL+Tween® 20)	10	12,5	10	8	2	1	1	15	17,5	15
(NCL+Tween® 40)	10	13,5	12,5	8,5	3	1,5	1,5	15	16	15
(NCL+Tween® 60)	10	15	11,5	8,5	3	1,5	1,5	15	15	15
(NCL+Tween® 80)	10	13	10	8	2	1	1	15	16,5	15
((NCL+Macrogol 4000)	10	12	10,5	9	1,5	0,75	0,75	15	15	15
(NCL+F68)*	10	13	10	2,5	7,5	6,5*	1	15	20	20
(NCL+F127)*	10	15	12,5	0	12,5	10*	2,5	15	25,5	22,5
(NCL+sucro Es 7)	10	17,5	15	10	5	2,5	2,5	15		14
(NCL+sucro Es 11)	10	15	15	7,5	7,5	2,5	5	15	17,5	14
(NCL+sucro Es 15)	10	25	15	7,5	7,5	2,5	5	15	20	14

**Tableau 17 : Caractéristiques des bulles formulées à partir des mélanges de NCL+surfactants hydrophiles.**

V<sub>i</sub>= volume de NCL initialement prélevé, V<sub>0</sub>= volume total de préparation juste après l'agitation, V<sub>20</sub>= volume total de la préparation après 20 min de repos, V<sub>mr</sub>= volume du sédiment après la première décantation, V<sub>B</sub>= volume total de bulles obtenu après la première décantation, V<sub>PB</sub>= fraction volumique représentée par les petites bulles, V<sub>GB</sub>= volume occupées par les grosses bulles au sein du volume total, V<sub>e</sub>= volume d'eau ajouté pour récupérer le volume total de bulles, V<sub>r</sub>= volume total de bulles récupéré après dilution, V<sub>b</sub>= volume de bulles récupéré après la deuxième décantation.

### **3.7. Caractérisation des bulles formulées**

Les valeurs de taille des différentes catégories de bulles formulées sont regroupées au niveau des tableaux 12, 18 et 19. Les tailles des bulles mesurées avant l'ajout des viscosifiants ont été comparées aux valeurs obtenues après leur ajout. Le PEG a entraîné une légère augmentation des D<sub>10</sub>, D<sub>50</sub> et D<sub>90</sub> tandis que le glycérol, l'acide hyaluronique et l'alginate de sodium semblent avoir réduit ces paramètres. La taille ne paraît pas être modifiée avec l'ajout du carboxyméthylcellulose sodique. L'augmentation de taille observée après addition du PEG pourrait s'expliquer par l'adsorption des molécules de PEG sur la paroi des bulles. En effet le Solutol® qui est le principal constituant de la paroi des bulles est composé des molécules de PEG libre.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Ainsi donc l'affinité de la paroi pour les fragments de PEG, serait à la base de l'incrustation des molécules de PEG apporté par le viscosifiant dans la paroi entraînant ainsi une présence accrue de matière au niveau de la coque.

Bulle+ viscosifiant ou modificateur de densité	Taille ( $\mu\text{m}$ ) D [3,2]	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Span®
T45	2,7±0,005	0,5±0,004	0,8±0,01	2±0,02	1,9±0,01
T45+PEG 200	2,8±0,01	0,7±0,0026	1,2±0,001	2,6±0,01	1,7±0,01
T45+PEG 300	2,8±0,003	0,6±0,002	0,9±0,002	2,4±0,002	1,9±0,01
T45+PEG 400	2,8±0,01	0,5±0,001	0,8±0,004	2,2±0,003	2±0,01
T46	2,8±0,004	0,5±0,002	0,7±0,003	2±0,01	2±0,002
T46+Glycérol 20 %	2,3±0,01	0,4±0,001	0,5±0,001	1±0,001	1,1±0,002
T46+Glycérol 30 %	2,3±0,01	0,4±0,001	0,5±0	0,9±0,001	1±0,001
T46+Glycérol 50 %	2,2±0,004	0,4±0	0,5±0	0,8±0,001	1±0,001
T47	2,6±0,01	0,9±0,001	1,4±0,001	2,6±0,004	1,2±0,004
T47+HA 0,25 %	2,8±0,002	0,5±0,001	0,6±0,001	1,5±0,002	1,5±0,001
T47+ Al 0,5 %	2,2±0,01	0,8±0,001	1,1±0,001	2±0,004	1,1±0,004
T47+ Al 1 %	2,8±0,005	0,5±0,001	0,7±0,001	1,7±0,004	1,8±0,002
T48	2,8±0,01	0,6±0,004	0,8±0,003	2±0,01	1,9±0,01
bulle+CMC Na PMM 1 %	2,7±0,001	0,8±0,01	1,3±0,01	2,6±0,02	1,4±0,01
T48+ Glycérol 75 %	2,5±0,1	0,7±0,003	1,1±0,04	2,3±0,1	1,4±0,03
T48 +Ch BPM 0,5 %	2,9±0,01	0,7±0,001	1±0,01	2,5±0,01	1,6±0,004
T48 +Ch PMM 0,25 %	2,9±0,1	0,7±0,002	1±0,02	2,5±0,02	1,7±0,001

**Tableau 18 : Tailles des bulles formulées en utilisant les mélanges de NCL + viscosifiants.** Al= alginate de sodium, HA= acide hyaluronique, CMC Na= carboxyméthylcellulose sodique, Ch= chitosan, PMM= poids moléculaire moyen, BPM= bas poids moléculaire.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Bulle+viscosifiant ou modificateur de densité	Taille ( $\mu\text{m}$ ) D [3,2]	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Span
T40	2,7±0,004	0,5±0,002	0,7±0,002	2±0,002	1,99±0,005
T40+CMC Na BPM 0,4 %	2,8±0,01	0,7±0,003	1,2 ±0,001	2,6±0,01	1,66±0,01
T40+CMC Na BPM 0,6 %	2,7±0,03	0,5±0,01	0,7±0,02	1,8±0,12	1,85±0,12
T40+CMC Na BPM 0,75 %	2,7±0,04	0,5±0,01	0,7±0,01	1,7±0,11	1,78±0,11
T41	3,1±0,01	0,5±0,001	0,6±0,001	1,3±0,01	1,4±0,01
T41+ CMC Na PMM 0,1 %	3±0,12	0,5±0,02	0,7±0,1	1,7±0,5	1,85±0,5
T41+ CMC Na PMM 0,2 %	3,1±0,01	0,5±0,001	0,6±0,002	1,3±0,02	1,28±0,02
T41+ CMC Na PMM 0,4 %	3,1±0,004	0,46±0	0,6±0	1,3±0,001	1,32±0,02

**Tableau 19 : Tailles des bulles formulées en utilisant les mélanges de NCL+viscosifiants**

### **3.8. Influence de la présence des constituants des NCL sur les caractéristiques des bulles (tableaux 20 à 24).**

Les critères d'appréciation étaient la possibilité de donner des NCL stables et le volume final de bulles produit.

#### **3.8.1. Influence du Solutol®**

Le Solutol® est nécessaire à la production des bulles. Lorsque la quantité de Solutol® est augmentée jusqu'à 1246 mg, les NCL obtenues se comportent comme les NCL classiques en terme de génération de bulles. Lorsque la quantité est supérieure ou égale à 1446 mg, les NCL ne sont pas obtenues et nous n'avons donc pas de possibilité de former de bulles (voire les préparations TL8, TL10, TL11 et TL12 du tableau 19). TL24 montre que, même en divisant la quantité du Solutol® par 2 nous obtenons toujours des bulles, cependant le volume final de bulles obtenu n'est pas plus important que celui obtenu en utilisant directement les NCL classiques. La diminution de la quantité du Solutol® en dessous de 483 mg n'a pas une influence positive car TL25 n'a pas donné de volume plus important.

### **3.8.2. Influence du Lipoïd®**

TL24 et TL21 comparés à TL22 et TL23 indiquent que le Lipoïd® est indispensable à l'obtention d'un volume important de bulles. En augmentant la quantité de Lipoïd® jusqu'à 225 mg tout en gardant celles du Solutol® et de Labrafac® constantes, nous obtenons des NCL qui donnent des bulles de volume total trois fois supérieur à celui obtenu en utilisant les NCL classiques.

### **3.8.3. Influence du Labrafac®**

L'augmentation de la quantité de Labrafac® n'est pas bénéfique pour la formulation des bulles. Cependant, lorsque la quantité de Labrafac® est inférieure ou égale à 495 mg, celle du Lipoïd® ne peut excéder 75 mg pour éviter la précipitation du Lipoïd® et par conséquent rendre impossible la formulation des NCL. En maintenant la quantité de Labrafac® au-dessus de 495 mg et quel que soit la quantité du Solutol® contenue dans les NCL, si celle du Lipoïd® excède 200 mg dans les NCL, ces dernières sont capables de donner les bulles pourvu que les NCL soient obtenues au préalable.



**Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation  
des microbulles d'air**

NCL obtenues	Solutol®	Labrafac®	Lipoïd®	Nacl	Eau
	QR	QR	QR	QR	QR
<b>Influence du Solutol®</b>					
<b>NCL 8</b>	846,6	513,5	76,1	70,4	3531
<b>NCL 10</b>	1046,3	503,4	75,6	69,5	3335,8
<b>NCL 11</b>	1245,5	508,4	74,9	70,1	3130,5
<b>NCL 12</b>	1446,6	506,4	75,4	81	2934,1
<b>NCL 23</b>	195	499,5	74,7	71	4093,6
<b>NCL 24</b>	483,5	1024	75,7	96,1	3372,9
<b>NCL 25</b>	282,9	1084,2	76,1	90,9	3530,1
<b>Influence du Lipoïd®</b>					
<b>NCL 20</b>	196,6	495,6	200,4	70,7	3949,2
<b>NCL 18</b>	484,6	1038,1	201,4	70,6	3167,8
<b>NCL 21</b>	482	524,3	200,7	116,9	3771,4
<b>NCL 22</b>	482,6	513,2	77,6	72,1	3868,6
<b>NCL 4,5% lipo</b>	846,2	1028,2	225,3	89,5	
<b>Influence du Labrafac®</b>					
<b>NCL 1</b>	846,9	1039	225,2	92,5	2859,4
<b>NCL 6</b>	845,9	501,8	201,2	70,2	3391,9
<b>NCL 9</b>	847,5	758,3	76,2	72,6	3254,2

**Tableau 20 : Composition des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence du Solutol®, du Lipoïd® et du Labrafac®**

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

NCL	Tmin	Tmax	début d'inversion de phase			Fin d'inversion de phase			Apparition de la translucidité			TT
			Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	Cy1	Cy2	Cy3	
NCL 8	60	80	72,5	73	73,4	66,1	66	65	71,1	71	72	63
NCL 9	60	80	84			72			76			70
NCL 10	60	80	74,5	74,9	73,3							68
NCL 11	60	80	81			66						68
NCL 12	60	80	75,5	74		70	70,5		72	71		68
NCL 19	60	90	82,1	82		71,5	72		78,1	76,8		70
NCL 20	60	90	84,3	84	85	77	78	78				76
NCL 21	60	90	87	87,4	88	66	66,6	66,2	66	66,6	66,2	63
NCL 18	60	90	88	88	87,7	74	74,5	74	74	74,5	74	73
NCL 6	55	90	84	87	86	64	63	64,2	64	63	64,2	60

**Tableau 21** : Températures d'inversion de phase des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence des différents constituants. Cy=cycle, T= température (°C), min= minimale, max= maximale, TT= température de trempe.

NCL	z-average	Intensité	Volume	Nombre	PDI	ZP (mV)
NCL L 18	53±0,4	56,3±0,3	47,8±0,5	41,5±0,6	0,05±0,02	-24,8±1,4
NCL 4,5 % lipo	40,7±0,4	42,7±0,7	36,8±0,4	32,8±0,6	0,03±0,014	-15,1±2,3
NCL 20	69,9±1,5	76,5±1,9	61±2,3	50±2,8	0,09±0,02	-21,9±0,06
NCL 21	39,2±0,8	43±0,8	33,6±0,8	27,9±0,7	0,1±0,01	-10,3±1,4
NCL 22	43,7±1	47,2±1,7	38,3±0,7	32,4±0,6	0,2±0,01	-6±0,7
NCL 8	31,6±0,1	34,7±0,1	26,7±0,2	22,1±0,3	0,1±0,014	-43±3,3
NCL 10	27,8±0,4	29,7±0,6	24,6±0,7	21,3±1	0,06±0,021	-36,6±1
NCL 11	25,5±0,1	28±0,5	21,5±0,2	17,8±0,3	0,12±0,01	-22,6±2,1
NCL 12	Mesure impossible					
NCL 24	109,7±1,1	120,7±1,3	102,7±1,8	81,4±4,1	0,09±0,02	-47,6±2,5
NCL 23	87,3±0,6	94,6±0,6	78,6±1,8	64,8±3,2	0,07±0,015	-13,4±1,6
NCL 25	127,4±1,6	134,9±1,7	125,1±1,6	104,9±1,1	0,05±0,01	-23,4±2,7
NCL 1	41,4±0,5	44,5±0,4	36,6±0,9	31,3±1,1	0,1±0,01	-24±1,2
NCL 6	26,8±0,5	28,2±0,4	24,2±0,8	21,4±1,2	0,03±0,02	-7±0,6
NCL 9	41,9±0,2	44,8±0,4	37,2±0,3	32±0,5	0,06±0,005	-23,3±2,8

**Tableau 22**: Caractéristiques physicochimiques des NCL formulées pour l'évaluation de l'influence de chaque constituant.

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Bulle	V <sub>i</sub>	V <sub>0</sub>	V <sub>20</sub>	V <sub>mr</sub>	V <sub>B</sub>	V <sub>PB</sub>	V <sub>GB</sub>	V <sub>e</sub>	V <sub>r</sub>	V <sub>b</sub>
<b>Influence du Labrafac®</b>										
TL 1	10	15	12,5	10	2,5	2	0,5	15	16	15
TL 6	10	20	17,5	7,5	10	5	5	15	20	15
TL 9	10	15,5	12,5	9	3,5	2	1,5	15	16,5	16
<b>Influence du Solutol®</b>										
TL 8	10	16,5	12,5	9	3,5	2	1,5	15	16	15
TL 10	10	16,5	12,5	10	2,5	1,25	1,25	15	15	15
TL 11	10	15	12,5	10	2,5	1,25	1,25	15	15	15
TL 23	10	15	12,5	8,5	4	1,5	2,5	15	16	15
TL 24	10	13	12,5	8,5	4	1,5	2,5	15	16	15
TL 25	10	15	12,5	10	2,5	2	0,5	15	16	15
<b>Influence du Lipoid®</b>										
TL 20	10	25	20	6,5	13,5	8,5	5	15	25	17
TL 18	10	17,5	17,5	7,5	10	5	5	15	17,5	17
TL 21	10	25	22,5	7,5	15	7,5	7,5	15	22,5	17,5
TL 22	10	15	12,5	8	4,5	2	2,5	15	16,5	15
TL 4,5% lipo	10	17,5	15	7,5	7,5	5	2,5	15	20	15

**Tableau 23 : Caractéristiques des bulles formulées pour l'évaluation de l'influence des constituants contenus dans les NCL.**

Vi= volume de NCL initialement prélevé, V<sub>0</sub>= volume total de préparation juste après l'agitation, V<sub>20</sub>= volume total de la préparation après 20 min de repos, V<sub>mr</sub>= volume du sédiment après la première décantation, V<sub>B</sub>= volume total de bulles obtenu après la première décantation, V<sub>PB</sub>= fraction volumique représentée par les petites bulles, V<sub>GB</sub>= volume occupées par les grosses bulles au sein du volume total, V<sub>e</sub>= volume d'eau ajouté pour récupérer le volume total de bulles, V<sub>r</sub>= volume total de bulles récupéré après dilution, V<sub>b</sub>= volume de bulles récupéré après la deuxième décantation

## *Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air*

Bulle	Taille ( $\mu\text{m}$ ) D [3,2]	D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	Span®
TL8	3,1±0,02	0,4±0,002	0,6±0,002	1±0,01	1,03±0,01
TL10	2,5±0,002	0,6±0,0012	0,8±0,002	1,4±0,002	1,1±0,003
TL11	2,6±0,003	0,6±0,001	1±0,004	2,3±0,005	1,8±0,005
TL12	2,6±0,01	0,7±0,01	1,3±0,005	2,6±0,002	1,4±0,01
TL23	2,5±0,003	0,7±0,001	0,9±0,002	1,4±0,01	1±0,003
TL24	2,3±0,003	0,7±0,001	1,2±0,001	2,2±0,003	1,3±0,001
TL 25	3,2±0,015	0,6±0,003	0,9±0,01	2±0,06	1,6±0,05
TL1	2,6±0,001	0,7±0,001	0,9±0,001	1,2±0,001	0,9±0,001
TL6	3,1±0,01	0,5±0,004	0,6±0,004	1±0,01	0,9±0,01
TL9	1±0,02	0,06±0,001	0,10±0,002	0,2±0,01	1,6±0,03
TL 18	2,6±0,02	0,5±0,005	0,7±0,02	1,9±0,01	1,9±0,1
TL20	3,7±0,01	0,5±0,01	0,6±0,001	1,1±0,02	1,1±0,03
TL21	2,6±0,01	0,6±0,001	1±0,002	1,3±0,002	1,2±0,005

**Tableau 24 : Distribution des bulles obtenues en modifiant la quantité de chaque constituant présent dans les NCL.**

En conclusion à cette étape d'amélioration de la méthode de formulation des microbulles d'air, nous dirons qu'aucune approche n'a donné de résultats plus satisfaisants. Le remplacement du solutol® par les spans 40 et 60 a permis d'augmenter le rendement de formulation mais la taille des particules obtenues limite une application médicale. Toutes tentatives de réduction de la taille se sont avérées impossibles. En ajoutant les poloxamers ou les sucroesters, le problème de taille est réglé mais la densité en microbulles est faible et demeure un autre problème qui n'est pas avantageux pour obtenir un meilleur rendement de formulation. L'utilisation des NCL contenant trois plus de Lipoïd® permet de tripler le volume de bulles ( $V_B$ ) et de réduire le volume du sédiment de 2,5 mL (on passe donc de 10mL à 7,5 mL).

## ***Chapitre IV : Tentatives d'amélioration de la formulation des microbulles d'air***

---

Le recours à d'autres méthodes de formulation telles que la microfluidique ou l'introduction du gaz sous pression pourraient donner de bons résultats.

*Chapitre V : Essais d'encapsulation et de  
libération du fusidate sodique*

## **Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique**

### **1. Introduction**

Les nanocapsules lipidiques (NCL) ont été développées au sein du laboratoire MINT dans les années 2000 et sont protégées par le brevet princeps n°AU2001240753 (B2), Saulnier, P. ; Heurtault, B. ; Richard, J. ; Pech, B. ; Proust, J-E. ; Benoit, J-P [1]. Dans leur forme native, elles contiennent trois principaux excipients que sont le Solutol<sup>®</sup>, le Lipoïd<sup>®</sup> et le Labrafac<sup>®</sup>. Solutol<sup>®</sup> et Lipoïd<sup>®</sup> constituent les principaux ingrédients de la paroi des NCL. Le Labrafac<sup>®</sup> représente l'unique constituant du cœur. Différentes tailles peuvent être formulées en fonction de la composition initiale considérée [2]. Après leur découverte, des études d'évaluation de leurs propriétés rhéologiques à l'interface eau-air ont été réalisées. Ces études ont montré qu'elles sont capables de se réorganiser à l'interface air/eau pour former un film composé principalement de Solutol<sup>®</sup> et de Labrafac<sup>®</sup> [55]. Cette hypothèse constitue une argumentation consistante à l'utilisation des NCL pour stabiliser d'autres particules.

Par ailleurs, les microbulles de gaz constituent un axe de recherche de bons nombres de laboratoires. Toutefois, toute la difficulté réside dans la possibilité de les stabiliser vu l'effet de la pression de Laplace qu'il faut arriver à surmonter. En considérant la capacité de formation de film par les NCL, nous avons essayé de les utiliser pour stabiliser des microbulles d'air. Les microbulles de gaz appartiennent à la catégorie des particules de taille ne dépassant pas 10 µm [17,232]. Elles sont généralement composées d'une coque et d'un cœur tous deux de structure et de nature variables. Plusieurs présentations galéniques ont été développées à savoir les liposomes microbulles [233], les microbulles creuses [110,111] ainsi que les gaz dispersés [66,67]. De nombreux principes actifs ont été incorporés aux liposomes microbulles dont la plupart sont des anticancéreux [23,28,30]. Malheureusement, peu de recherches se sont intéressées à l'évaluation des paramètres d'encapsulation tels que le taux d'encapsulation et la quantité de principe actif libérée par le vecteur

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

---

formulé. Ce chapitre a donc été consacré à l'encapsulation d'une molécule antibactérienne au sein des bulles formulées. L'acide fusidique et son sel le fusidate de sodium ont été donc retenus comme des traceurs pour évaluer la capacité d'encapsulation des bulles ainsi que leur pouvoir de relargage sous ondes ultrasonores. Les molécules ont été choisies à cause de leur accessibilité et disponibilité au niveau du laboratoire. Il s'agit des substances pas trop coûteuses et la méthode de détection est simple et basée sur la spectrophotométrie UV-visible.

Ces molécules présentent des caractéristiques qui pourraient être mises à profit au cours du processus d'encapsulation et d'évaluation. D'abord dans la structure des molécules se trouvent un noyau stérane hydrophobe, des radicaux alkyles ainsi que des groupements polaires OH, COOH. Cet ensemble confère à la molécule une propriété amphiphile. Cette propriété sera donc mise à profit dans l'incorporation au niveau des microbulles d'air. La solubilité élevée du fusidate sodique dans l'eau facilitera son encapsulation. Les molécules sont des antibiotiques bactériostatiques avec une concentration minimale inhibitrice faible (2mg/L pour les germes sensibles), il serait donc facile d'envisager une évaluation *in vitro* sur des cultures bactériennes.

### **2. Matériels et méthodes**

#### **2.1. Matériels**

Solutol® HS 15 (mélange de polyéthylène glycol 660 libre et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660) a été fourni par BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Lipoïd® 75-3 (mélange de phosphatidylcholine à 70% et de phosphatidyléthanolamine à 10%), a été fourni par Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Labrafac® WL 1349 un mélange d'acides caprylique et caprique provient de Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). L'eau Milli Q est délivrée par un dispositif Milli-Q-plus® system (Paris, France).



## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

---

L'acide fusidique (AF) et le fusidate de sodium (Ac) proviennent de Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA).

### **2.2. Formulation des NCL**

Les NCL ont été formulées selon la méthode d'inversion de phase par température comportant trois cycles de température. Cette méthode a été développée par Heurtault et al. [40]. Une fois les ingrédients mélangés, trois séries de chauffage- refroidissement ont été effectués entre 60-100°C. Au cours du troisième cycle, la préparation a été diluée avec de l'eau milliQ à 4°C afin de provoquer la formation des NCL.

### **2.3. Caractérisation des NCL**

Les propriétés physicochimiques des particules ont été déterminées en utilisant le Nano Series ZetaSizer (Malvern, Worcestershire, UK). Ce dispositif muni d'un faisceau de lumière de longueur d'onde de 632,8 nm incliné d'un angle de 173° mesure le mouvement brownien des particules pour donner la taille hydrodynamique des particules. Toutes les mesures ont été faites à 25° et répétées trois fois. Tous les échantillons ont été dilués dans le ratio 1:59 avant mesure.

### **2.4. Encapsulation des principes actifs dans les NCL formulées**

En début d'expérience, l'acide fusidique et le fusidate de sodium (fusidate sodique) ont été incorporés dans les NCL. Plusieurs méthodes d'incorporation ont été testées. Pour l'encapsulation de l'acide fusidique, des méthodes d'ajout au mélange au cours du procédé de fabrication et d'incubation (post-insertion) ont été utilisées tandis que pour le fusidate de sodium, seule la méthode par incubation a été testée.

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

---

Dans le cas de la méthode d'ajout, la molécule a été incorporée au Labrafac® avant le chauffage. Pour la méthode d'incubation, en se basant sur des études antérieurement réalisées au sein du laboratoire, nous avons travaillé dans les conditions suivantes: à 37°C pendant 4 heures, à 20°C pendant 1 heure 30 min ou encore à 60°C pendant 1 heure 30 min sous agitation magnétique à 500 rpm afin de détecter d'éventuelles influences sur le taux d'encapsulation. Ces différentes conditions ont donné le même résultat, nous avons donc opéré pour la suite de l'expérience à 20°C pendant 1h30 min. Dans les deux possibilités d'incorporation, les doses de charge initiales étaient respectivement de 1 et 2,5 mg/mL de NCL.

### **2.5. Préparation des bulles et Incorporation des principes actifs**

La méthode d'agitation par Ultra turrax T 125 (IKA®, Werke Staufen, Germany) a été utilisée pour préparer les bulles. L'appareil a été réglé sur une vitesse d'agitation de 22000 rpm pendant 5min. Selon le cas, les NCL natives blanches ou chargées en actifs pharmaceutiques ont été utilisées. Brièvement, un volume initial de 10 mL ( $V_i$ ) a été introduit dans un flacon de 50 mL. La tige de l'agitateur a été plongée sur une hauteur de 2,5 cm avant la mise en marche de l'appareil. Après la formulation, une première décantation de 20 min permet de retirer le sédiment (volume résiduel :  $V_{mr}$ ) et de récupérer la quantité totale des microbulles générées ( $V_B$ ) en ajoutant 15 mL d'eau Milli Q ( $V_e$ ). Une seconde décantation d'une durée de 10 min effectuée sur le  $V_B$  permet de séparer les petites bulles ( $V_{PB}$ ) des grosses ( $V_{GB}$ ). La préparation définitive de microbulles est constituée par la fraction correspondante aux petites bulles ( $V_b$ ). Pour l'incorporation du principe actif dans les bulles, deux méthodes ont été essayées. Des NCL préalablement chargées en actifs ont été utilisées pour formuler des microbulles de gaz chargées en fusidate sodique.

La deuxième méthode consiste à post-insérer les bulles avec du fusidate sodique. Cette expérience a été conduite à température ambiante sans agitation et toute une nuit.

## **2.6. Caractérisation des microbulles**

La taille a été mesurée au master sizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) qui fonctionne selon le principe de diffusion statique de la lumière. Cet appareil est équipé d'une unité de dispersion qui reçoit l'échantillon. Cette unité peut être soumise à des vibrations imprimées par une source d'ultrasons intégrée à l'appareil. Les vibrations assurées par les ultrasons émises vont être à l'origine de la désagrégation d'éventuels agglomérats de particules présent dans l'échantillon à mesurer. Nous avons opéré en absence d'ultrasons avec une vitesse d'homogénéisation qui était réglée à 850 rpm.

## **2.7. Détermination du taux d'encapsulation des principes actifs dans les NCL et les bulles**

Lorsque nous avons utilisé les NCL fortement chargées en acide fusidique ou en fusidate sodique pour formuler les bulles, nous les obtenons faiblement chargées. Pour cela, seule l'encapsulation du fusidate sodique dans les bulles par post-insertion sera considérée par la suite. Après l'incubation de la molécule avec la suspension de NCL (pendant 1h30 min à 20°C) ou de bulles (pendant 24 h à 20°C), un volume de 2 mL de chaque échantillon est introduit dans des amicons (4 mL, 10 kD) puis centrifugé pendant 30 mn à 4000 rpm. Après l'étape de centrifugation, le filtrat est séparé du sédiment qui est complété à 2 mL avec le même volume que le filtrat. Les méthodes directes et indirectes ont été utilisées pour le dosage du principe actif. Le dosage a été donc fait dans les filtrats et dans les résidus. L'HPLC a été utilisée pour la mesure des aires de pics en fonction de la concentration. La phase stationnaire remplissant une colonne Symmetry 300® (Waters, USA), avec les caractéristiques suivantes : C18, 5 µm 3,9x150mm ; taille particules : 5 µm. La phase mobile est constituée par les solvants

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

« HPLC grade » tels que l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % (v/v), le méthanol (MeOH) l'acétonitrile (ACN) placés sur trois voies différentes et utilisés en mode isocratique respectivement dans les proportions de 30 %, 10 % et 60 %. La phase mobile est envoyée avec un débit de 1mL/min. L'échantillon a été injecté à un volume de 10 µL à température ambiante. Le temps de rétention de l'acide fusidique est de 3,5 min et sa longueur d'onde d'absorption de 235 nm. Les courbes de calibrations ont été construites en considérant deux gammes de solution : la gamme eau+ Ac et la gamme NCL+MeOH+Ac (tableau 25). Nous n'avons pas eu besoin de valider la méthode car il s'agit d'une méthode déjà décrite dans la littérature. Cependant les gammes sont refaites à chaque expérience.

Taux d'encapsulation	Standard1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
Gamme Ac+eau	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Gamme NCL+MeOH+Ac	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml

**Tableau 25 : gamme de concentration pour la détermination du taux d'encapsulation**

### **2.8. Essai de libération du fusidate sodique**

Une dilution au 3/10 dans du PBS (pH 7,4) a été préparée pour tous les échantillons. Deux types d'échantillons ont été considérés. Les échantillons soumis aux ondes ultrasonores (US) (échantillons tests) et les échantillons non soumis aux US (échantillons contrôles). Pour la mise en œuvre du protocole, les contrôles ont été incubés au bain marie à 37°C pendant 1h. Ensuite, un volume de 2 mL de chaque échantillon est introduit dans un système amicon (4 ml, 10 KD) pour centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min. Pour les échantillons tests, une boîte de culture à 32 puits a été utilisée. Le volume à introduire dans les puits a été préalablement déterminé et maintenu à 1,8 ml. Ce volume a été choisi pour favoriser l'immersion de la sonde du générateur d'ultrasons dans l'échantillon contenu dans le puit sans le faire déborder.

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

Une fois la sonde immergée, l'échantillon est insonifié pendant 60 secondes en mode de 50 % de « duty cycle » et avec une intensité de 5 W/cm<sup>2</sup>. Tout le volume initialement introduit a été transféré dans l'unité de filtration de type « amicon » pour être centrifugé. Après cette étape, un volume de 10 µl de chaque filtrat recueilli après centrifugation a été dilué avec 990 µL d'eau Milli Q. Chacune des solutions (standard et échantillon) diluées est passée sur un filtre 0,22 µm avant qu'un volume de 800 µL ne soit utilisé pour remplir le flacon ambré de mesure qui est ensuite fermé avec un bouchon avant de procéder à l'analyse proprement dite. Une solution non filtrée a été mesurée pour vérifier l'influence de la filtration sur la hauteur du pic. Les résultats sont similaires, qu'il s'agisse de la solution filtrée ou de celle non filtrée. Les concentrations des solutions standards ayant servi à la détermination des droites de calibration sont récapitulées dans le tableau 26.

Essai de libération	Stan1	Stan2	Stand 3	Stand4	Stand5	Stand6	Stand7	Stand8
Gamme Ac+eau	1µg/ml	2,5µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	25µg/ml	30µg/ml	50µg/ml	100µg/ml
Gamme NCL+MeOH+Ac	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	25µg/ml	50µg/ml	100µg/ml		

**Tableau 26** : gamme de concentrations pour la détermination de la droite de calibration.

Stan= standard.

### **2.9. Vérification du passage du fusidate sodique à travers le filtre amicon**

Il s'agit de vérifier si le fusidate sodique est capable de traverser le système de filtre de type « amicon » et se retrouver dans le filtrat. Sinon il n'y a pas de raison de le doser ou de le rechercher dans ce dernier. Pour cela, une certaine quantité de fusidate sodique (Ac) a été ajoutée à la dispersion de NCL 50 et à l'eau MilliQ. Après homogénéisation au vortex pendant 30 secondes, les échantillons ont été centrifugés à

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

4000 rpm pendant 30 min sur du « amicon » (4 ml, 10 KD) puis le filtrat a été récupéré et mesuré et analysé (tableau 27).

Mélange type	NCL50	Eau	Ac	Volume filtrat	Concentration théorique dans filtrat	Taux de passage de l'Ac
Mélange NCL50+AC	1ml		2,45 mg	750 µl	3,27 mg/ml	9,18 %
Mélange eau+Ac		1,270 ml	2,27 mg	1,270 ml	1,8 mg/ml	78,32 %

**Tableau 27:** vérification de passage de l'actif Pharmaceutique

### **2.10. Vérification de l'influence des solvants utilisés pour l'HPLC et des ingrédients des NCL ou des bulles.**

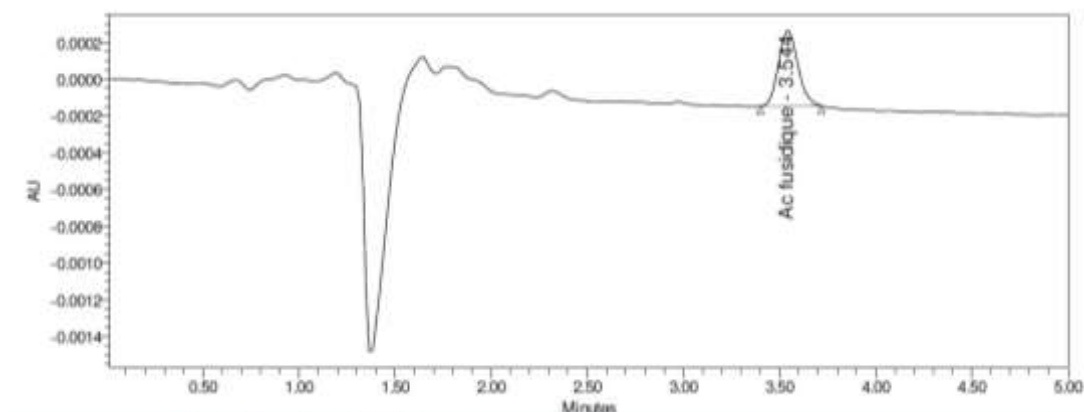
Dans le cas d'espèce, les solvants utilisés sont l'eau (pour reprendre les filtrats) et le méthanol (pour reprendre les bulles ou les NCL chargées). Les filtrats ont donc été dilués dans de l'eau et les NCL ou bulles ont été détruites avec du méthanol. Ainsi, l'échantillon final est un mélange d'eau et de méthanol. Pour relever d'une part d'éventuelles différences entre les valeurs des pics d'adsorption et d'autres part des modifications au niveau du temps de rétention, le fusidate sodique (Ac) a été introduit dans de l'eau, dans du méthanol ou dans un mélange méthanol/eau. Les différentes solutions ont été éluées séparément

Nous avons aussi vérifié si la présence des composants des NCL dans les échantillons à doser ne modifiait pas le pic de l'Ac. Pour cela, les NCL blanches ont été ajoutées à la solution de l'Ac dans méthanol+eau (tableau 28). Les pics obtenus sont présentés ci-dessous.

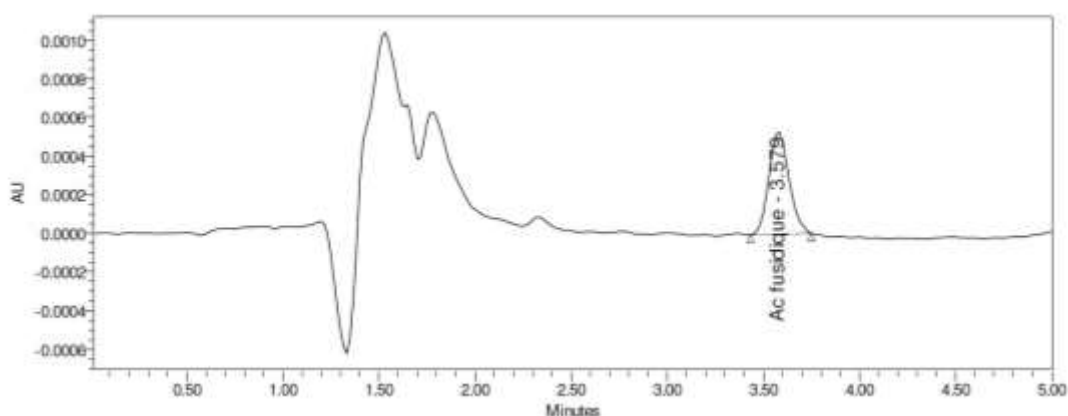
## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

Mélange type	Solution mère de Ac dans eau	Solution mère de Ac dans MeOH	Eau	MeOH	NCL50	eau+MeOH+Ac	Concentration théorique en Ac
Eau +Ac	100 µL		900µL				100 µg/mL
Méthanol+Ac		100 µL		900 µL			100 µg/mL
NCL+ (MeOH+eau+Ac)					100 µL	900µL	100µg/mL
(Eau+MeOH)+ Ac	100 µL			900µl			100 µg/mL

**Tableau 28** : Proportions utilisées pour l'évaluation de l'influence des interférences



**Figure 17** : Chromatogramme de l'Ac dans l'eau



**Figure 18** : chromatogramme de L'Ac dans le mélange eau+méthanol+NCL

### **3. Résultats et discussions**

Concernant l'évaluation des interférences, nous avons constaté que la présence des NCL modifiait la hauteur du pic de l'Ac. Il n'y a pas de différence entre les pics obtenus avec l'Ac dans l'eau et dans le méthanol. Or l'Ac traverse avec certitude les filtres « amicon » (tableau 27). La présence des ingrédients des NCL modifie la hauteur du pic (figure 18). La solution d'Ac +eau analysée révèle la présence d'un seul pic ce qui indique la présence d'un seul type de produit. En se fiant à la qualité de l'actif utilisé et à sa date de préemption nous éliminons l'hypothèse de la sortie d'un produit de dégradation à la place du produit recherché. Par conséquent, le seul pic obtenu correspond bien à celui du fusidate sodique.

L'Ac se lie rapidement aux NCL. Presque toute la quantité initiale ajoutée est encapsulée dans les NCL (tableau 29) avec un taux d'encapsulation allant de 91 à 99 % et quelque soit la méthode utilisée. La quantité encapsulée dans les bulles par post insertion représente le tiers de la quantité initiale introduite ( $30,97 \pm 0,041$  %), avec une concentration d'environ 630  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (concentration théorique ou initiale étant de 2  $\text{mg}/\text{mL}$ ). Le pouvoir d'encapsulation des bulles apparait nettement inférieur à celui des NCL (tableau 30).

Dans le cas des bulles, la méthode d'incubation ou de post-insertion semble meilleure que celle d'ajout puisque, lorsque nous formulons des bulles à partir des NCL contenant au préalable le médicament, nous obtenons seulement un taux d'encapsulation de  $7 \pm 1$  (%). Ceci explique pourquoi nous avons préféré par la suite la méthode de post-insertion.

En ce qui concerne l'étude de la libération de l'Ac, environ un pourcentage de  $13,89 \pm 1,36$  (%) (Tableau 31) du contenu initial des NCL est libéré en présence d'ultrasons contre  $12,94 \pm 0,71$  (%) en absence d'ultrasons ( $p=0,344 > 0,05$ ). Les pourcentages libérés sont comparables lorsqu'on applique ou non les ondes ultrasonores. Cependant, en considérant les résultats obtenus avec les bulles, le pourcentage libéré en absence des ondes ultrasonores focalisées est de  $42,32 \pm 2,51$



## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

---

(%). En focalisant les ondes ultrasonores, la quantité libérée augmente et atteint  $53,40 \pm 2,70$  (%). Il existe une différence significative entre ces deux valeurs ( $p=0,006 < 0,05$ ). Ce résultat laisse penser que les bulles répondent bien à l'effet des ultrasons. En effet, la présence du gaz à l'intérieur de ces particules occasionne des mouvements d'oscillation en présence d'ondes ultrasonores. Cette oscillation est responsable de la libération de la molécule encapsulée [57,234]. Dans le cas des particules autres que les bulles de gaz, le mécanisme expliquant l'augmentation du relargage en présence d'ultrasons est différent de la cavitation et soutenue entre autre par la destruction des particules ou l'apparition de pores dans les particules. Encore qu'il faudra remarquer que la survenue de l'un ou de l'autre de ces mécanismes dépend de la composition de la coque. En effet les liposomes composés en majorité par du phosphatidyléthanolamine sont sujets au mécanisme de collapsus sachant que ceux composés majoritairement de phosphatidylcholine libèrent leur contenu par un mécanisme de création de pores. Le mécanisme de collapsus favorise plus le relargage du médicament [235]. On peut noter que certains auteurs ont mis en évidence des libérations améliorées d'actifs dans le cas des liposomes chargés en médicaments et en présence d'ultrasons focalisés [22,236]. Les NCL étant composé par 70 % de phosphatidylcholine, cette absence d'amélioration du profil de libération en présence d'ultrasons focalisés s'expliquerait aisément.

## *Chapitre V : Essais d'encapsulation et de libération du fusidate sodique*

**Tableau 29 : résultats de l'encapsulation de l'actif pharmaceutique dans les NCL et les bulles**

Méthode directe	Quantité initiale (mg)	Quantité encapsulée (mg)	Taux d'encapsulation
NCL1	4,21	4,13	98,01 %
NCL2	4,15	3,9	93,97 %
NCL3	4,12	3,8	92,23 %
<b>Moyenne (94,74±0,029) %</b>			
Bulle1	4,35	1,54	35,40 %
Bulle2	4,10	1,24	30,24 %
Bulle3	4,18	1,14	27,27 %
<b>Moyenne (30,97±0,041) %</b>			

(méthode directe)

Méthode indirecte	Quantité initiale (mg)	Quantité non encapsulée (mg)	Taux d'encapsulation
NCL1	4,21	0,11	2,61 %
NCL2	4,15	0,41	9,96 %
NCL3	4,12	0,36	8,7 %
<b>Moyenne (7,09±0,04)%</b>			
Bulle1	4,35	3,18	73,10 %
Bulle2	4,10	2,66	64,88 %
Bulle3	4,18	3,28	78,47 %
<b>Moyenne (72,15±0,07)%</b>			

**Tableau 30 : résultats de l'encapsulation de l'actif pharmaceutiques dans les NCL et les bulles**

(méthode indirecte).

Echantillon (méthode directe)	Charge initiale (mg)	Quantité libérée (mg)	Pourcentage libérée (%)
NCL1	5,52	0,68	12,32
NCL2	5,52	0,81	14,67
NCL3	5,52	0,81	14,67
NCL1+US	5,1	0,67	13,14
NCL2+US	5,1	0,62	12,15
NCL3+US	5,1	0,69	13,53
Bulle1	1,15	0,47	40,87
Bulle2	1,15	0,52	45,22
Bulle 3	1,15	0,47	40,87
Bulle1+US	0,93	0,5	53,76
Bulle2+US	0,93	0,52	55,91
Bulle3+US	0,93	0,47	50,54

**Tableau 31 : Résultats de l'étude de libération.**

#### **4. Conclusion**

L'utilisation de bulles présente des avantages par rapport aux NCL. Le taux d'encapsulation obtenu est acceptable en vue des applications ultérieures. De plus les bulles sont capables d'osciller en présence de grande fréquence d'ultrasons et d'entraîner la libération du principe actif incorporé. Les ultrasons déclenchent donc la libération de l'actif de la formulation de la bulle. Ceci pourrait être dû au fait que les ultrasons agissent en modifiant le coefficient de partage du médicament entre les nanocapsules / bulles d'air et l'environnement aqueux. Il s'ensuit donc une possibilité de contrôler et d'assister le relargage du médicament. Toutefois cette augmentation d'environ 10% de libération en présence d'ondes ultrasonores pourrait être améliorée en essayant différentes conditions d'application des ondes.

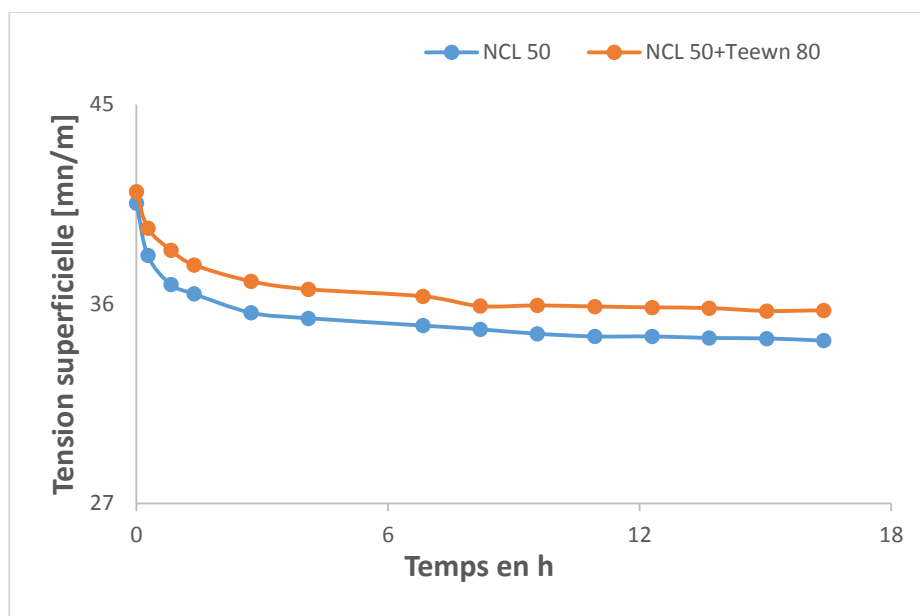
*Discussion générale*

Ce travail de thèse s'est organisé autour de deux axes complémentaires : l'axe physicochimique et l'axe galénique. Nous procéderons à la discussion des deux axes en insistant sur les difficultés auxquelles nous avons été confrontés.

Rappelons que l'objectif principal de cette recherche est de mettre au point un vecteur de médicament efficace, plus stable que ceux déjà existant, capable de libérer son contenu en présence d'ondes ultrasonores.

### ***Axe physicochimique***

Afin de contrôler au mieux la qualité des microbulles finales, il s'est avéré nécessaire d'analyser les propriétés des NCL choisies comme assemblages moléculaires de stabilisation. Puisque dans la formulation elles joueront le rôle de stabilisants, nous avons commencé par évaluer leurs propriétés tensioactives (chapitre 1). Elles se sont montrées capables de diminuer la tension de surface air/eau. La valeur de tension de surface obtenue à l'équilibre, se trouve dans un ordre de grandeur compatible pour une stabilisation satisfaisante de l'interface air-eau. Etant donné ce résultat encourageant, nous avons donc choisi de les utiliser dans leur forme native pour la préparation des bulles de gaz. Les expériences prévues visant à associer les NCL à d'autres surfactants ont été donc abandonnées car un essai de mesure de tension de surface du mélange des NCL et du Tween 80 n'a pas donné de résultats plus satisfaisants. La mesure de la tension superficielle d'un mélange contenant  $6.10^{-3}$  mol/L de tween 80 et  $5,3.10^{-3}$  mol/L de Solutol® a donné une valeur similaire à celle obtenue lorsqu'il s'agit de la mesure de la dispersion de NCL seul (35,36 mN/m vs 34,98 mN/m). En effet, sur la figure 19, nous remarquons que les deux courbes sont presque superposables. Ce qui signifie que l'association du tween au Solutol® n'a pas outre mesure amélioré la valeur de la tension superficielle à l'équilibre obtenue avec les NCL.



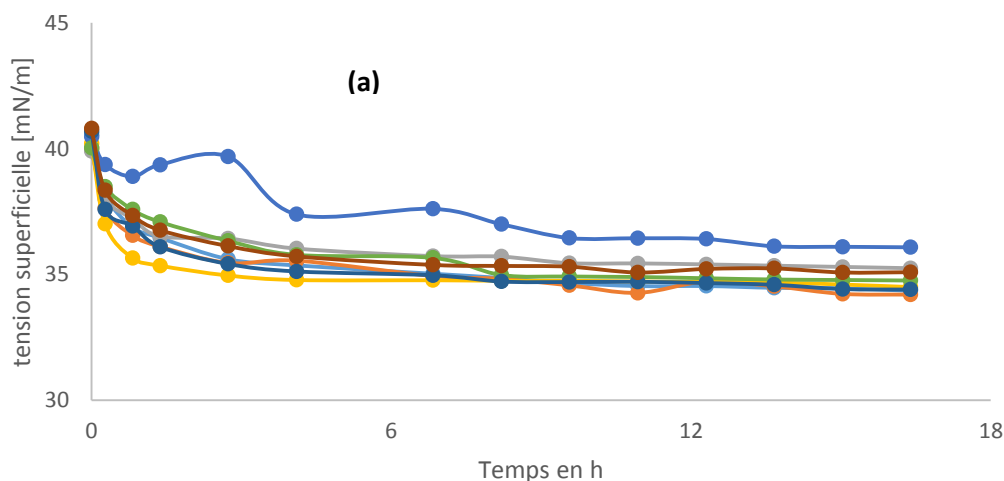
**Figure 19** : tension superficielle d'équilibre d'un mélange à  $6.10^{-3}$  molaire de tween et  $5,3.10^{-3}$  molaire de Solutol®.  $6.10^{-3}$  mol/L représente la moitié de la concentration critique micellaire (CMC) du tween 80.

Peu de chercheurs s'intéressent à l'évaluation des propriétés tensioactives des particules colloïdales ou solides. Dans la littérature seulement quelques études ont été retrouvées à l'instar de celle de Binks et al ou encore de celle de Okubo et al. Ces auteurs ont mesuré la tension de surface eau/air impliquant des nanoparticules de silice, et des particules de polystyrène [146,148]. Ces particules diffèrent cependant morphologiquement et du point de vue composition chimique des nôtres (NCL). En effet il s'agit là des particules de nature inorganiques métalliques et cristallines qui sont obtenues à partir des métaux réduits en particules de dimensions nanométriques. A l'opposé, les NCL sont des particules organiques obtenues à partir d'ingrédients lipidiques grâce à un procédé d'inversion de phase basée sur la température.

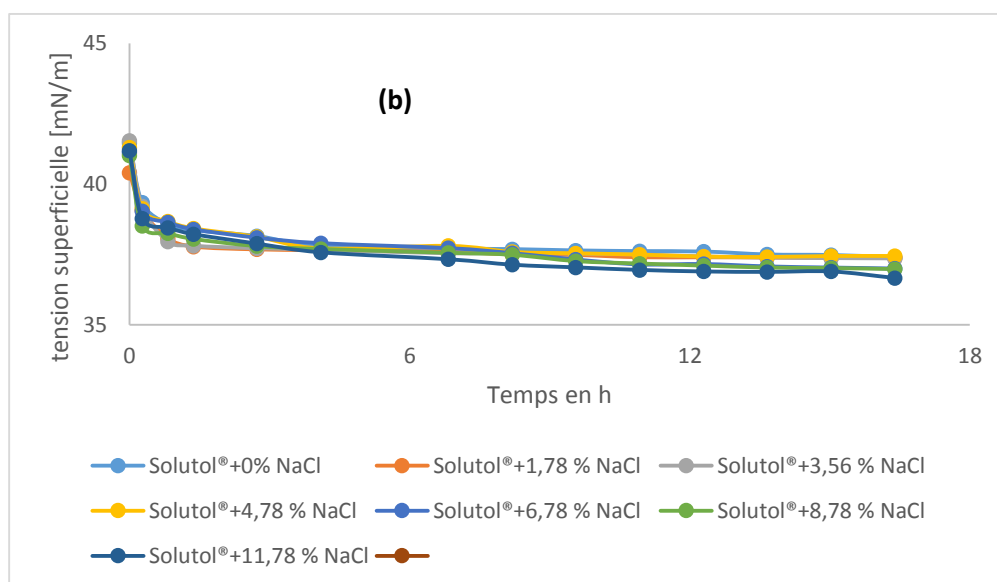
Par ailleurs, l'optimisation de l'adsorption des NCL à l'interface air-eau nous a semblé opportune car lors de l'étude des propriétés tensioactives des NCL sur les bulles nous avons constaté que les cinétiques d'adsorption des particules pouvaient être assez longues. Contre toute attente, le recours au principe « salting out » n'a rien

## Discussion générale

amélioré (figure 20 a et 20 b). L'effet « salting out » se définit par la diminution de la solubilité aqueuse d'un surfactant, d'une protéine, d'un polymère ou encore d'un colloïde en présence d'un sel organique [237,238]. Pour des contraintes techniques, nous n'avons pas pu évaluer complètement l'effet de la température.



—●— NCL 50 + 1,78% NaCl —●— NCL 50+3,56% de NaCl —●— LNC 50+4,78% NaCl  
—●— NCL 50+6,78% NaCl —●— NCL 50+ 8,78% NaCl —●— NCL 50+ 11,78% NaCl  
—●— NCL 50+3,56 %CaCl2 —●— NCL 50+0% NaCl



—●— Solutol®+0% NaCl —●— Solutol®+1,78 % NaCl —●— Solutol®+3,56 % NaCl  
—●— Solutol®+4,78 % NaCl —●— Solutol®+6,78 % NaCl —●— Solutol®+8,78 % NaCl  
—●— Solutol®+11,78 % NaCl —●—

**Figure 20 :** évolution de la tension superficielle en fonction du temps après addition de sel. Addition du NaCl et du CaCl<sub>2</sub> à la dispersion primaire de NCL (a) ; addition du NaCl à la solution primaire du Solutol® (b).

Et pour clore cette partie d'évaluation physicochimique, les propriétés rhéologiques des interfaces eau-air stabilisées par les NCL ont été évaluées pour nous permettre de comprendre la qualité de la couche de stabilisation qu'elles forment autour des bulles. Cette rhéologie interfaciale a été réalisée suivant la technique du tensiomètre à goutte ; toutefois nous n'avons pas pu répéter certaines expériences du fait d'une panne importante de l'appareil. En se fiant à l'analyse des premiers résultats, nous pouvons dire que la couche formée paraît suffisamment stable dans le temps pour résister aux diverses contraintes mécaniques inhérentes à la présence des bulles en suspension aqueuse comme l'indiquent les valeurs calculées des paramètres d'élasticité (chapitre 2).

### ***Axe galénique***

Dans cette partie du travail, nous allons discuter des différentes stratégies que nous avons testées pour formuler des microbulles de gaz.

Après avoir fait un état des lieux des systèmes thérapeutiques existants (voir article de revue), nous avons constaté que peu de recherches étaient consacrées aux microbulles de gaz stabilisées par des particules colloïdales (système Pickering like) [180,181]. Toutefois avec l'évolution des techniques, on y intègre aussi aujourd'hui, des systèmes stabilisés par des bactéries ou des spores [34]. La particularité des systèmes Pickering est l'irréversibilité de la stabilité une fois qu'elle est établie[190]. Vu qu'il est très difficile d'assurer la stabilité thermodynamique des bulles, le recours à de tels systèmes serait une solution pour les chercheurs qui sont limités par des difficultés liées au développement des bulles. En effet, peu de travaux détaillant les méthodes de formulation et les caractéristiques physicochimiques des bulles formulées sont publiés. La plupart des travaux publiés et auxquels nous avons eu accès concernent l'évaluation *in vitro* ou *in vivo* des microbulles de gaz chargées en médicaments, en protéines ou en gènes.



## Discussion générale

Les NCL sont des nanoparticules colloïdales constituées d'un compartiment interne lipidique chargé en Labrafac® entouré d'une paroi plus ou moins épaisse (quelques nanomètres) formée par l'enchevêtrement de deux surfactifs (le Solutol® et le Lipoid®). Leur capacité à former des films à l'interface air/eau a été étudiée. Cette propriété présente d'énormes avantages pour leur utilisation en tant que système stabilisant.

La littérature indique que les gaz souvent incorporés dans les microbulles sont des dérivés du perfluorocarbène, lesquels (du fait de leur densité importante par rapport à celle des autres gaz) restent assez inaccessibles financièrement. Dans notre étude, nous avons fixé comme défi d'utiliser un gaz qui soit acceptable du point de vue écologique, répandu et moins cher tout en assurant une meilleure stabilité du système. Comme gaz respectant ces critères l'air ou le CO<sub>2</sub> se sont imposés comme de véritables défis technologiques.

Au début de la thèse, nous avons formulé des microbulles de dioxyde de carbone. Le gaz a été produit *in situ* en s'appuyant sur le principe de l'effervescence. A cette fin, le bicarbonate de sodium et le citrate de sodium ont été sélectionnés respectivement comme base et acide organique. Nous récapitulons au niveau du tableau 32 les propriétés physicochimiques des deux constituants du couple effervescent utilisé.

	Formule	MM (g/mol)	Pka <sub>1</sub>	Pka <sub>2</sub>	Pka <sub>3</sub>	Solubilité (g/L)
Acide Citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192,14	3,1	4,8	6,4	592
Bicarbonate de Sodium	NaHCO <sub>3</sub>	84,01	10,3			87

**Tableau 32 : Propriétés physicochimiques du bicarbonate de sodium et de l'acide citrique.**

**MM= masse molaire**

## *Discussion générale*

Pour le premier et le deuxième essais de formulation (tableau 33), la quantité d'acide citrique a été fixée à 100mg et nous avons déduit celle du bicarbonate de sodium. Les quantités ont été ajoutées par incrément de 100mg jusqu'à atteindre la quantité finale. Le pH du milieu a été relevé avant et après l'ajout des quantités. L'ordre de mélange a été interverti afin d'investiguer sur une éventuelle modification liée à ce changement. Pour la troisième tentative, nous avons recalculé les quantités nécessaires en tenant compte de la solubilité aqueuse du dioxyde de carbone (1,69 g/l ou 88 ml/100 ml). En effet, pour que le gaz puisse diffuser il faut qu'il soit en quantité suffisante, autrement dit il faut que sa concentration soit à une valeur supérieure à sa solubilité. Nous avons en conséquence déterminé la quantité des constituants nécessaires pour être à une valeur 34 fois supérieure à cette solubilité (essai 3). Cette nouvelle quantité calculée n'a pas pu permettre de générer des bulles. Nous avons donc gardé les proportions utilisées lors de l'essai 2.

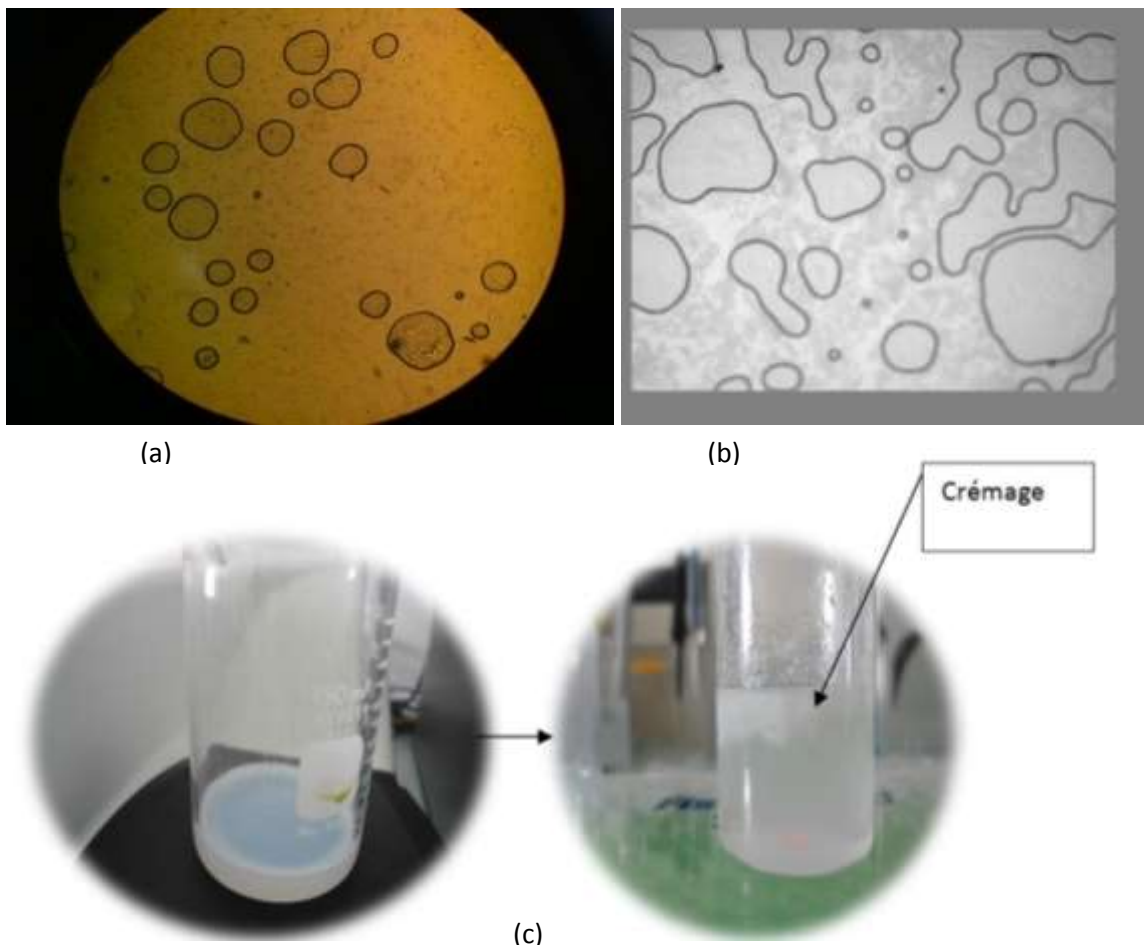
	Acide citrique(B)	Bicarbonate de sodium (A)	Volume de dispersion de NCL(C)	Volume d'eau MilliQ	pH initial	pH final	Ordre de mélange
Essai 1	900 mg	1180,53 mg	10 ml		7	8	C+B+A
Essai 2	954,9 mg	1251,9 mg	10 ml		7	7,12	B+C+A
					7	6,74	A+C+B
					7	7,66	A+B+C
	954,9/10ml eau MilliQ	1251,9/10 ml eau MilliQ	10 ml		7	7,22	C+ B et A
Essai 3	17,55 mg	23,052mg	40 ml	10			C+B+A+ eau

**Tableau 33 : Récapitulatif des différents essais de formulation et leurs résultats.**

En utilisant les proportions de l'essai 2 des formulations ont été préparées et observé au microscope optique, aussitôt après formulation et 24 h après. A J0 nous notons la présence de quelques objets avec un contour bien délimité. Après 24h, ces

## Discussion générale

particules subissent une déformation notable (image à J1). En outre, comme nous pouvons le constater sur la figure 21, un phénomène de crémage apparaît dans le tube de droite après 24h de conservation. Par ailleurs, nous avons eu l'impression que le gaz libéré ne pouvait être confiné. De plus, lorsqu'on tente d'augmenter les proportions des différents constituants dans l'objectif de produire plus de bulles, les NCL ont tendance à crémager à la surface de la suspension une fois que la quantité de bicarbonate de sodium utilisée dépasse 1000mg/10 ml de NCL. Au regard de ces limitations, nous avons alors très tôt abandonné cette stratégie.



**Figure 21** : Images prises au microscope optique des bulles obtenues par production in situ de CO<sub>2</sub>. Toutes les images ont été prises avec l'objectif 100. Bulles observées aussitôt après formulation, image à J0 (a) ; bulles observées après 24 heures, image à J1 (b) ; tube à gauche sur image (c) : aspect des NCL avant addition des constituants effervescents (c) ; tube à droite sur l'image (c) ; aspect des NCL après addition des constituants

Dans une seconde étude, nous avons essayé de formuler des bulles d'air par la méthode de sonication en utilisant un générateur d'ultrasons Misonix XL2007 sonicator (Misonix, Inc., Farmingdale, USA). Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau 34.

<b>Dispersion de NCL native</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>Puissance (W)</b>	<b>Durée de la sonication</b>	<b>Position de la sonde</b>
50, 25,100nm	5;10	8;12;20	30S;60s; 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20min et 30 min	En surface, au fond

**Tableau 34 : Conditions opératoires pour la formulation des bulles par sonication**

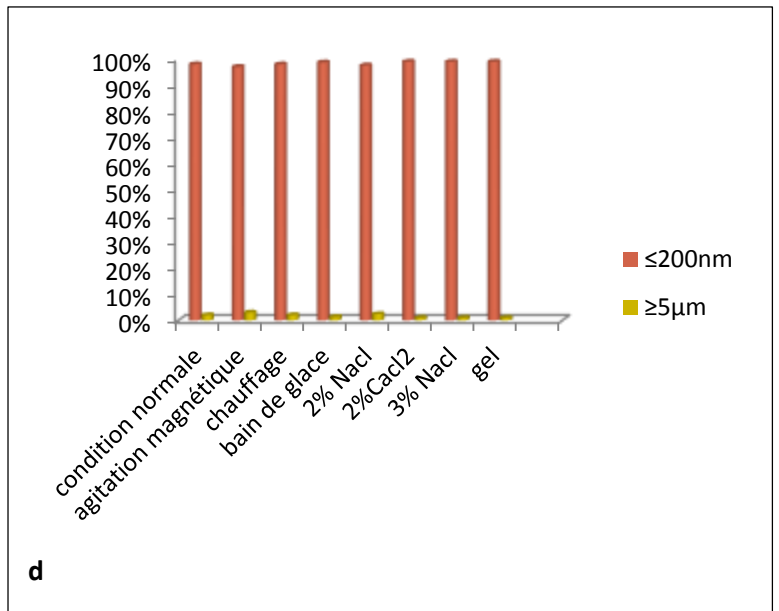
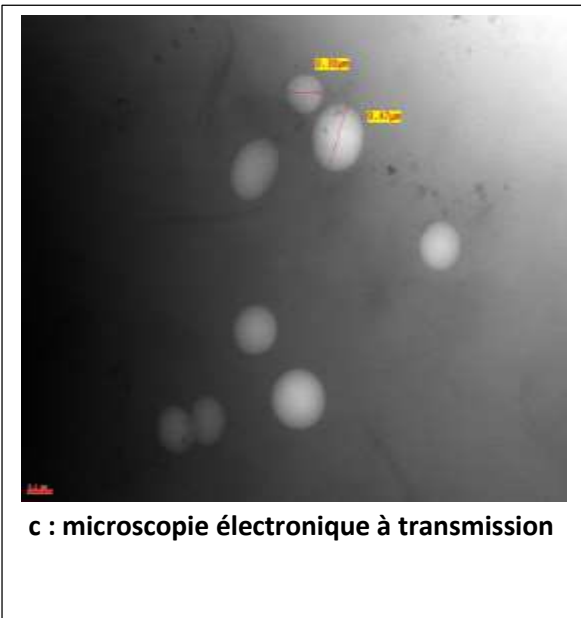
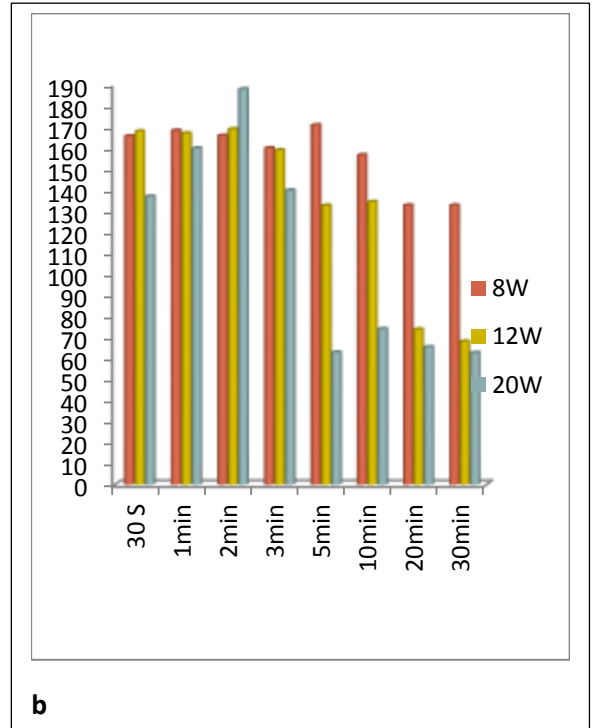
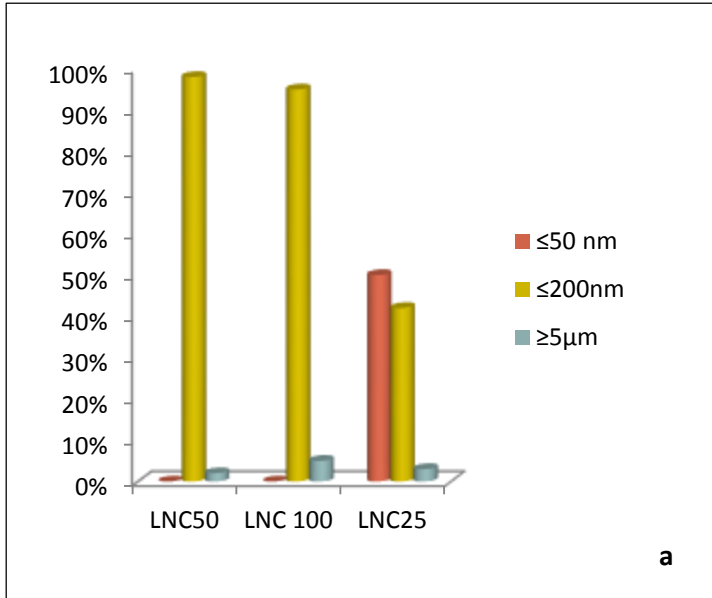


Figure 22 : Caractéristiques de taille des bulles obtenues suivant la méthode de sonication

Sur la figure 22 a est présentée la distribution de taille des bulles en fonction de la taille des NCL utilisées comme support. Des trois types de NCL, les 50 nm permettent d'avoir une meilleure distribution de taille des bulles. Sur la figure 22b, à une puissance de 8W les particules de 200nm sont les plus nombreuses lorsque la durée de sonication est inférieure ou égale à 10min. À partir de 20 min, nous notons une diminution de taille des bulles. Pour les puissances de 12W et de 20W, la diminution de taille est obtenue dès la 5ème minute de sonication. En outre, la température du milieu, relevée lors de la sonication, a permis de constater que pour la puissance de 8W, la température du milieu se trouve inférieure à 60°C en considérant les durées inférieures à 10min tandis que pour des durées supérieures à 10 min, la température mesurée est au-delà de 75°C. Pour les puissances de 12W et 20W, les températures dépassent 75°C pour les durées supérieures à 5min. Ces constatations peuvent expliquer la diminution de taille observée et qui laisse croire que les NCL n'ont pas été transformées au cours du processus de sonication. En effet, 75°C est la température d'inversion de phase du Solutol® (principal surfactant constituant la paroi des NCL) et si pendant la sonication, la température locale dépasse 75°C, une inversion de phase pourrait se produire entraînant une destruction des NCL. On pense que pendant le choc mécanique les particules fusionnent entre elles pour donner celles de taille plus importante, d'où cette taille de 200nm mesurée au nanosizer ZS. Une augmentation de taille similaire a aussi été rapportée au cours des études sur la nébulisation des NCL [43,137].

Pour confirmer la fusion des NCL au cours de la sonication, le mélange des ingrédients des NCL a été placé sous US et la mesure de taille des particules obtenues a donné une valeur qui corrobore le résultat rapporté pour la dispersion de NCL. De même lorsque nous avons placé sous US, les dispersions de NCL 50 à 8W pendant 30 min en présence d'un bain de glace, les particules obtenues sont identiques à celles obtenues lorsque nous faisons une sonication classique (8W, pendant 1 min et sans bain de glace). Ceci signifie que l'inversion de phase empêchée par le bain de glace n'a pas eu lieu. Lorsque nous observons l'image de la figure 22c, nous pouvons remarquer la présence des particules pleines colloïdales qui sont presque de même aspect que les

particules obtenues après la nébulisation des NCL ou celles obtenues en observant au microscope électronique à transmission les NCL 100 (résultat non montré). Lorsque nous avons préparé des bulles en utilisant des dispersions de NCL 50 chargées en Nile Red, leur observation au microscope confocal a révélé des particules pleines, entièrement colorées en rouge. Ces résultats viennent conforter les conclusions de la microscopie électronique. En effet, l'air ne saurait être coloré en présence du Nile Red, on en déduit donc que les objets observés ne sont pas des bulles mais des agrégats colloïdaux de NCL.

Les tentatives d'optimisation de la méthode de sonication n'ont pas pour autant amélioré la nature et la distribution de taille des particules (figure 22d). Nous avons de nouveau abandonné cette méthode pour explorer la méthode d'agitation.

Cette nouvelle méthode a été utilisée pour formuler les microbulles et s'est montrée plus efficace que les deux premières, puisque aussitôt après l'agitation, une couche de particules affleure à la surface de la dispersion de départ. Cette couche est facilement récupérable grâce à la décantation. L'inconvénient de cette méthode est qu'après avoir récupéré les bulles, le résidu obtenu est plus important que la quantité de bulles obtenue. De plus la couche de bulles récupérées est constituée de différentes populations de taille. Nous avons donc procédé à des décantations supplémentaires avant de pouvoir isoler les bulles de taille désirable. Le ratio d'air incorporé est de 0,17 ce qui n'est pas loin des constats de Xu et collaborateurs [67]. Nous avons cherché à réduire le volume du résidu et par conséquent augmenter la concentration de bulles formulées. Pour cela, plusieurs tentatives ont été mises en route (voir chapitre 4) mais aucune d'elles n'a donné de résultat satisfaisant, ce qui laisse croire que le ratio d'air incorporé dépend plus de la méthode utilisée et dans une moindre mesure de la composition du milieu comme certains auteurs l'ont également mentionné.

Nous avons pu mettre au point des bulles qui sont conservables pendant 7 jours au moins à température ambiante. Ceci est déjà un meilleur résultat en comparaison avec certaines études publiées [74,93]. Toutefois cette stabilité obtenue ne nous a pas

semblé assez bonne et nous avons essayé de l'améliorer en utilisant des agents dispersants et des modificateurs de densité (voir chapitre 5). L'ajout de ces constituants a ralenti le crémage des bulles et donc prolongerait leur durée de vie. Il faut noter qu'en ajoutant ces agents viscosifiants, la viscosité de la préparation passe de  $1,14 \cdot 10^{-3}$  Pa.s pour les NCL classiques à une valeur comprise entre  $7,65 \cdot 10^{-3}$ - $7,75 \cdot 10^{-2}$  Pa.s en fonction du viscosifiant considéré. Nous avons considéré ces valeurs de viscosité acceptables vu que notre préparation n'est pas nécessairement destinée à l'administration parentérale. Et même dans ce cas, la viscosité ne constituerait pas un facteur limitant puisque à notre connaissance, aucune valeur de référence n'a été donnée dans la littérature concernant la viscosité des préparations injectables. Toutefois, certaines de nos valeurs de viscosité sont proches de celles obtenues par Vrignaud et al. et par Hureaux et al.[239,240].

Malgré toutes ces difficultés rencontrées, l'encapsulation d'un actif dans les bulles a été faite puisque l'un des objectifs visés est de provoquer la libération du contenu des bulles développées en appliquant des ondes ultrasonores. Il s'agit d'évaluer la capacité des bulles à pouvoir osciller en présence des ondes ultrasonores. Pour cette expérience le fusidate sodique a été retenue comme « molécule traceur ». Dans un premier temps, la méthode adéquate permettant d'encapsuler aisément la molécule dans les bulles a été identifiée via plusieurs essais. A l'issue de ces différents tests, la méthode de post-insertion s'est révélée la plus efficace. Le taux d'encapsulation des bulles a été déterminé ainsi que celui des nanocapsules lipidiques natives. Il s'est avéré que les NCL encapsulent jusqu'à 98 % de la charge initiale contre 31 % pour les bulles. L'expérience de relargage a été faite dans des conditions bien définies. Une fois les ultrasons focalisés, les NCL libèrent 12-14 % de leur contenu. Néanmoins, la libération n'a pas été influencée par la présence des ondes ultrasonores, d'autant plus qu'il n'existe pas de différence significative entre les valeurs obtenues en présence ou en absence d'ultrasons focalisés. Quant-aux bulles, cette libération a été influencée par l'application des ultrasons. En effet, les bulles ont relargué 40-45 % de leur contenu en absence d'ultrasons, sachant que cette libération a été augmentée à



## *Discussion générale*

---

50 voire 55 % lorsque les ultrasons ont été appliqués. L'expérience ne s'est pas faite sans obstacles mais nous avons obtenu des taux d'encapsulation et de libération qui permettent d'envisager nonobstant les difficultés une évaluation in vitro du système mis au point (voir chapitre 5).

*Conclusion générale*

## *Conclusion générale*

---

L'objectif de ce travail était d'évaluer les propriétés physicochimiques de nanocapsules lipidiques pour les utiliser comme agents de stabilisation de microbulles utilisées comme systèmes de délivrance de médicaments.

Au terme de ce travail nous aboutissons à la conclusion selon laquelle on peut générer des bulles à partir des NCL grâce à leurs propriétés intrinsèques qui se prêtent bien à la stabilisation de tels systèmes de nature très labile.

Ce travail nous a permis de répondre à plusieurs questions qui longtemps sont restées non élucidées :

- La première réponse apportée par ce travail est que les nanocapsules lipidiques dans leur forme native sont capables de diminuer la tension de surface et donc d'être utilisées en lieu et place d'un surfactant pour stabiliser une interface eau-air.
- La seconde conclusion est que les NCL sont capables de stabiliser les bulles en formant une couche résistante qui protégera la formulation contre les déstabilisations pouvant survenir pendant leur conservation.
- La troisième conclusion est que grâce à une simple méthode d'agitation, les bulles sont formulées à partir des NCL. Toutefois le rendement de la méthode de formulation reste à optimiser.

Concernant l'amélioration du rendement, il serait intéressant d'essayer les méthodes microfluidiques, l'électrolyse ou l'introduction du gaz sous pression.

Toujours dans le cadre de l'amélioration de la méthode de formulation, on pourrait être amené à modifier les constituants des NCL. Voici quelques pistes que nous aurions voulu explorer :

- ✓ Mettre au point un système associatif en formulant des bulles d'air entourées de chitosan et d'un phospholipide cationique. Cette particule chargée positivement pourrait être associée aux NCL qui seront chargées négativement.
- ✓ Mettre au point un système associatif composé de l'association des bulles d'air de charge négative en les entourant d'alginate et d'un surfactant anionique et

## *Conclusion générale*

---

des NCL chargées positivement (charge positive pouvant être obtenue par greffage de stéarylamine par exemple).

Du point de vue industriel, la durée de conservation de 15 jours rapportée constituerait une limite pour la commercialisation du produit en l'état. Le développement de systèmes « Pressure type micro Kit ou SGP Filter Kit » ou des formes sèches serait un apport de solution.

Les essais d'encapsulation pourraient être approfondis en essayant l'encapsulation d'autres actifs pharmaceutiques afin de comparer les résultats. Il serait également intéressant de trouver des meilleures conditions d'insonation pour avoir un pourcentage de principe actif libéré plus important lorsque les ultrasons sont appliqués.

Pour la mise en évidence de l'air dans les bulles, des méthodes indirectes ont été utilisées pour confirmer l'obtention des bulles ; on peut être amené à utiliser les méthodes directes telles l'échographie et des méthodes pointues telles que la RMN (que nous n'avons pas pu optimiser) ou la méthode de diffision des rayons X aux petits angles SAXS (small-angle X-ray scattering) pour laquelle nous avons déjà commencé par établir des collaborations.

A long terme il serait bien d'étudier les propriétés électrocinétiques des bulles formulées et leur comportement après étalement sur la balance de Langmuir. L'évaluation du vecteur *in vitro* sur des cultures cellulaires (cancéreuse ou bactérienne) constitue aussi un axe de recherche futur.

En considérant l'échelle de niveau de maturité technologique d'un projet de développement du médicament (échelle TRL : Technology readiness Level), nous dirons, vu le niveau d'évolution de notre travail, qu'il se situe au niveau TRL 3 sachant qu'il existe 9 niveaux de développement. Nous n'avons pas pu aller plus loin vu qu'il était difficile de déterminer le rendement de formulation des bulles et donc par

## *Conclusion générale*

---

ricochet la détermination du « drug payload » de la molécule encapsulée s'avère impossible.

*Références*

- [1] Lacoeyille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, et al. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 2007;344:143–9.
- [2] Lamprecht A, Bouligand Y, Benoit JP. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J Control Release* 2002; 84:59–68.
- [3] Vrignaud S, Anton N, Gayet P, Benoit J-P, Saulnier P. Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: a novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:197–204.
- [4] Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. *Revue de la littérature. La Rev Médecine Interne* 2001;22:141–50.
- [5] Caldeira LR, Fernandes FR, Costa DF, Frézard F, Afonso LCC, Ferreira LAM. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci* 2015; 70:125–31.
- [6] Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007;3:20–31. doi:10.1016/j.nano.2006.11.008.
- [7] Raynes JK, Carver J a., Gras SL, Gerrard J a. Protein nanostructures in food – Should we be worried? *Trends Food Sci Technol* 2014; 37:42–50.
- [8] Horenstein MN. Electrostatics and nanoparticles: What's the same, what's different? *J Electrostat* 2009; 67:384–93.
- [9] Uskoković V. Nanotechnologies: What we do not know. *Technol Soc* 2007;29:43–61.
- [10] Khawaja AM. The legacy of nanotechnology: revolution and prospects in neurosurgery. *Int J Surg* 2011;9:608–14.
- [11] Hull LC, Farrell D, Grodzinski P. Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research--view from NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Biotechnol Adv* 2013;32:666–78. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.003.
- [12] Gao Y, Xie J, Chen H, Gu S, Zhao R, Shao J, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnol Adv* 2013;32:761–77.
- [13] Janib SM, Moses AS, MacKay JA. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1052–63.

- [14] Kiessling F, Fokong S, Koczera P, Lederle W, Lammers T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J Nucl Med* 2012;53:345–8.
- [15] Dijkmans P a, Juffermans LJM, Musters RJP, van Wamel a, ten Cate FJ, van Gilst W, et al. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *Eur J Echocardiogr* 2004;5:245–56.
- [16] Portalez D. Échographie de contraste des tumeurs hépatiques Contrast ultrasonography of liver tumours 2004;1:196–215.
- [17] Geers B, Dewitte H, De Smedt SC, Lentacker I. Crucial factors and emerging concepts in ultrasound-triggered drug delivery. *J Control Release* 2012;164:248–55.
- [18] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1153–66.
- [19] Kopeček J a, Haworth KJ, Radhakrishnan K, Huang S-L, Klegerman ME, McPherson DD, et al. The impact of bubbles on measurement of drug release from echogenic liposomes. *Ultrason Sonochem* 2013;20:1121–30.
- [20] Miller DL. Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:314–30.
- [21] Delalande A, Kotopoulis S, Postema M, Midoux P, Pichon C. Sonoporation: mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene* 2013;525:191–9.
- [22] Oerlemans C, Deckers R, Storm G, Hennink WE, Nijssen JFW. Evidence for a new mechanism behind HIFU-triggered release from liposomes. *J Control Release* 2013;168:327–33.
- [23] Li P, Zheng Y, Ran H, Tan J, Lin Y, Zhang Q, et al. Ultrasound triggered drug release from 10-hydroxycamptothecin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy in mice. *J Control Release* 2012;162:349–54.
- [24] Rai P, Mallidi S, Zheng X, Rahmanzadeh R, Mir Y, Elrington S, et al. Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1094–124.
- [25] Cai X, Yang F, Gu N. Applications of magnetic microbubbles for theranostics. *Theranostics* 2012;2:103–12.



- [26] Mura S, Couvreur P. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1394–416.
- [27] Feshitan J a, Vlachos F, Sirsi SR, Konofagou EE, Borden M a. Theranostic Gd(III)-lipid microbubbles for MRI-guided focused ultrasound surgery. *Biomaterials* 2012;33:247–55.
- [28] Ren S-T, Liao Y-R, Kang X-N, Li Y-P, Zhang H, Ai H, et al. The antitumor effect of a new docetaxel-loaded microbubble combined with low-frequency ultrasound in vitro: preparation and parameter analysis. *Pharm Res* 2013;30:1574–85.
- [29] Liu H, Chang S, Sun J, Zhu S, Pu C, Zhu Y, et al. Ultrasound-mediated destruction of LHRHa-targeted and paclitaxel-loaded lipid microbubbles induces proliferation inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells. *Mol Pharm* 2014;11:40–8.
- [30] Tinkov S, Coester C, Serba S, Geis N a, Katus H a, Winter G, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in-vivo characterization. *J Control Release* 2010;148:368–72.
- [31] Rapoport N, Nam K-H, Gupta R, Gao Z, Mohan P, Payne A, et al. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. *J Control Release* 2011;153:4–15.
- [32] Yan F, Li X, Jin Q, Jiang C, Zhang Z, Ling T, et al. Therapeutic ultrasonic microbubbles carrying paclitaxel and LyP-1 peptide: preparation, characterization and application to ultrasound-assisted chemotherapy in breast cancer cells. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:768–79.
- [33] Binks BP, Clint JH, Mackenzie G, Simcock C, Whitby CP. Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions. *Langmuir* 2005;21:8161–7.
- [34] Dorobantu LS, Yeung AKC, Foght JM, Gray MR. Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:6333–6.
- [35] Chevalier Y, Bolzinger M-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2013;439:23–34.
- [36] Frelichowska J, Bolzinger MA, Chevalier Y. Pickering emulsions with bare silica. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2009;343:70–4.
- [37] Deshmukh OS, van den Ende D, Stuart MC, Mugele F, Duits MHG. Hard and soft colloids at fluid interfaces: Adsorption, interactions, assembly & rheology. *Adv*

- Colloid Interface Sci 2014;1–13.
- [38] Guzman E, Orsi D, Cristofolini L, Liggieri L, Ravera F. Two-Dimensional DPPC Based Emulsion-like Structures Stabilized by Silica Nanoparticles. *Langmuir* 2014;30:11504–12.
- [39] Qiao X, Zhou J, Binks BP, Gong X, Sun K. Magnetorheological behavior of Pickering emulsions stabilized by surface-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2012;412:20–8.
- [40] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002;19:875–80.
- [41] Cahouet A, Denizot B, Hindré F, Passirani C, Heurtault B, Moreau M, et al. Biodistribution of dual radiolabeled lipidic nanocapsules in the rat using scintigraphy and  $\gamma$  counting. *Int J Pharm* 2002;242:367–71.
- [42] Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 2009;379:201–9.
- [43] Umerska A, Mouzouvi CRA, Bigot A, Saulnier P. Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers. *Int J Pharm* 2015;493:224–32.
- [44] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003;18:55–61.
- [45] Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 2004;278:407–14.
- [46] Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessières A, Jaouen G, et al. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 2008;130:146–53.
- [47] Malzert-Fréon A, Vrignaud S, Saulnier P, Lisowski V, Benoit JP, Rault S. Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent. *Int J Pharm* 2006;320:157–64.
- [48] Vanpouille-Box C, Lacoëuille F, Roux J, Aubert C, Garcion E, Lepareur N, et al. Lipid nanocapsules loaded with Rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 2011;6 :e16926

- [49] Resnier P, David S, Lautram N, Delcroix GJR, Clavreul A, Benoit JP, et al. EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. *Int J Pharm* 2013;454:748–55.
- [50] David S, Carmoy N, Resnier P, Denis C, Misery L, Pitard B, et al. In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model. *Int J Pharm* 2012;423:108–15.
- [51] André EM, Passirani C, Seijo B, Sanchez A, Montero-Menei CN. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington’s disease. *Biomaterials* 2016;83:347–62.
- [52] Daviaud N, Garbayo E, Schiller PC, Perez-Pinzon M, Montero-Menei CN. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp Neurol* 2013;248:429–40.
- [53] Valcourt C, Saulnier P, Umerska A, Zanelli MP, Montagu A, Rossines E, et al. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *Int J Pharm* 2016;498:23–31.
- [54] Montagu A, Rossines E, Cayon J, Kempf M, Saulnier P, Albarracín VH, et al. Stress Conditions Induced by Carvacrol and Cinnamaldehyde on *Acinetobacter baumannii* 2016;7:1–9.
- [55] Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Verger R. Reorganization of lipid nanocapsules at air–water interface I. Kinetics of surface film formation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;45:24–34.
- [56] Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P. Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface. Part 2. Properties of the formed surface film. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2005;44:197–203.
- [57] *Echographie de contraste: Méthodologie et applications cliniques/* ed. by François Tranquant, Jean-Michel Correas AB. Paris: Springer-Verlag. 2007:17-57.
- [58] Klibanov AL. Preparation of targeted microbubbles: ultrasound contrast agents for molecular imaging. *Med Biol Eng Comput* 2009;47:875–82.
- [59] Cheung JS, Chow AM, Guo H, Wu EX. Microbubbles as a novel contrast agent for brain MRI. *Neuroimage* 2009;46:658–64.
- [60] De Guio F, Benoit-Cattin H, Davenel A. Signal decay due to susceptibility-induced

- intravoxel dephasing on multiple air-filled cylinders: MRI simulations and experiments. *MAGMA* 2008;21:261–71.
- [61] Musse M, De Guio F, Quellec S, Cambert M, Challoy S, Davenel A. Quantification of microporosity in fruit by MRI at various magnetic fields: comparison with X-ray microtomography. *Magn Reson Imaging* 2010;28:1525–34.
- [62] Wong KK, Huang I, Kim YR, Tang H, Yang ES, Kwong KK, et al. In vivo study of microbubbles as an MR susceptibility contrast agent. *Magn Reson Med* 2004; 52:445–52.
- [63] Unger EC, Matsunaga TO, McCreery T, Schumann P, Sweitzer R, Quigley R. Therapeutic applications of microbubbles. *Eur J Radiol* 2002;42:160–8.
- [64] Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1291–314.
- [65] Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. *J Control Release* 2006;114:89–99.
- [66] Borrelli MJ, O'Brien WD, Bernock LJ, Williams HR, Hamilton E, Wu J, et al. Production of uniformly sized serum albumin and dextrose microbubbles. *Ultrason Sonochem* 2012;19:198–208.
- [67] Xu Q, Nakajima M, Ichikawa S, Nakamura N, Shiina T. A comparative study of microbubble generation by mechanical agitation and sonication. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008;9:489–94.
- [68] Farook U, Zhang HB, Edirisinghe MJ, Stride E, Saffari N. Preparation of microbubble suspensions by co-axial electrohydrodynamic atomization. *Med Eng Phys* 2007;29:749–54.
- [69] Okada K, Shimizu M, Isobe T, Kameshima Y, Sakai M, Nakajima A, et al. Characteristics of microbubbles generated by porous mullite ceramics prepared by an extrusion method using organic fibers as the pore former. *J Eur Ceram Soc* 2010;30:1245–51.
- [70] Kukizaki M, Baba Y. Effect of surfactant type on microbubble formation behavior using Shirasu porous glass (SPG) membranes. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2008;326:129–37.

- [71] Matsuki N, Ichiba S, Ishikawa T, Nagano O, Takeda M, Ujike Y, et al. Blood oxygenation using microbubble suspensions. *Eur Biophys J* 2012;41:571–8.
- [72] Liao A-H, Wu S-Y, Wang H-E, Weng C-H, Wu M-F, Li P-C. Evaluation of <sup>18</sup>F-labeled targeted perfluorocarbon-filled albumin microbubbles as a probe for microUS and microPET in tumor-bearing mice. *Ultrasonics* 2013;53:320–7.
- [73] Cavalli R, Bisazza A, Rolfo A, Balbis S, Madonnaripa D, Caniggia I, et al. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. *Int J Pharm* 2009;378:215–7.
- [74] Pancholi KP, Farook U, Moaleji R, Stride E, Edirisinghe MJ. Novel methods for preparing phospholipid coated microbubbles. *Eur Biophys J* 2008;37:515–20.
- [75] Wrenn SP, Mleczko M, Schmitz G. Phospholipid-stabilized microbubbles: Influence of shell chemistry on cavitation threshold and binding to giant unilamellar vesicles. *Appl Acoust* 2009;70:1313–22.
- [76] Bioley G, Lassus A, Bussat P, Terrettaz J, Tranquart F, Corthésy B. Gas-filled microbubble-mediated delivery of antigen and the induction of immune responses. *Biomaterials* 2012;33:5935–46.
- [77] Xing Z, Ke H, Wang J, Zhao B, Yue X, Dai Z, et al. Novel ultrasound contrast agent based on microbubbles generated from surfactant mixtures of Span 60 and polyoxyethylene 40 stearate. *Acta Biomater* 2010;6:3542–9.
- [78] Xu Q, Liu Z, Nakajima M, Ichikawa S, Nakamura N, Roy P, et al. Characterization of a soybean oil-based biosurfactant and evaluation of its ability to form microbubbles. *Bioresour Technol* 2010;101:3711–7.
- [79] Sciallero C, Paradossi G, Trucco A. A preliminary in vitro assessment of polymer-shelled microbubbles in contrast-enhanced ultrasound imaging. *Ultrasonics* 2012;52:456–64.
- [80] Arbeille P. 14 - Les effets biologiques des ultrasons Ph. Arbeille 1 n.d.
- [81] Hussein G a, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1137–52.
- [82] Ibsen S, Benchimol M, Simberg D, Schutt C, Steiner J, Esener S. A novel nested liposome drug delivery vehicle capable of ultrasound triggered release of its payload. *J Control Release* 2011;155:358–66.
- [83] Mulvana H, Browning RJ, Tang M-X, Hajnal J V, Eckersley RJ. Albumin coated

- microbubble optimization: custom fabrication and comprehensive characterization. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:1599–607.
- [84] Stride E, Edirisinghe M. Novel microbubble preparation technologies. *Soft Matter* 2008;4:2350.
- [85] Tinkov S, Bekeredjian R, Winter G, Coester C. Characterization of ultrasound-mediated destruction of drug-loaded microbubbles using an improved in vitro model. *Appl Acoust* 2009;70:1323–9.
- [86] Wu C, Nasset K, Masliyah J, Xu Z. Generation and characterization of submicron size bubbles. *Adv Colloid Interface Sci* 2012;179–182:123–32.
- [87] Martin RMS, Otero A. F, Cruz A. Use of quillaja saponins (*Quillaja saponaria* Molina) to control acid mist in copper electrowinning processes: Part 2: Pilot plant and industrial scale evaluation. *Hydrometallurgy* 2005;77:171–81.
- [88] Xu Q, Nakajima M, Ichikawa S, Nakamura N, Roy P, Okadome H, et al. Effects of surfactant and electrolyte concentrations on bubble formation and stabilization. *J Colloid Interface Sci* 2009;332:208–14.
- [89] Farook U, Stride E, Edirisinghe MJ, Moaleji R. Microbubbling by co-axial electrohydrodynamic atomization. *Med Biol Eng Comput* 2007;45:781–9.
- [90] Farook U, Stride E, Edirisinghe MJ. Preparation of suspensions of phospholipid-coated microbubbles by coaxial electrohydrodynamic atomization. *J R Soc Interface* 2009;6:271–7.
- [91] Enayati M, Farook U, Edirisinghe M, Stride E. Electrohydrodynamic preparation of polymeric drug-carrier particles: mapping of the process. *Int J Pharm* 2011;404:110–5.
- [92] Ahmad Z, Zhang HB, Farook U, Edirisinghe M, Stride E, Colombo P. Generation of multilayered structures for biomedical applications using a novel tri-needle coaxial device and electrohydrodynamic flow. *J R Soc Interface* 2008;5:1255–61.
- [93] Enayati M, Chang M-W, Bragman F, Edirisinghe M, Stride E. Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2011;382:154–64.
- [94] Stride E, Edirisinghe M. Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison. *Med Biol Eng Comput* 2009;47:883–92.
- [95] Kukizaki M. Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG)

- membranes and porous ceramic membranes: A comparative study. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2009;340:20–32.
- [96] Kukizaki M, Goto M. Size control of nanobubbles generated from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. *J Memb Sci* 2006;281:386–96.
- [97] Kukizaki M, Wada T. Effect of the membrane wettability on the size and size distribution of microbubbles formed from Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2008;317:146–54.
- [98] Vladisavljević GT, Kobayashi I, Nakajima M. Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices. *Microfluid Nanofluidics* 2012;13:151–78.
- [99] Talu E, Hettiarachchi K, Zhao S, Powell RL, Lee AP, Longo ML, et al. Tailoring the size distribution of ultrasound contrast agents: possible method for improving sensitivity in molecular imaging. *Mol Imaging* 6:384–92.
- [100] Talu E, Hettiarachchi K, Powell RL, Lee AP, Dayton PA, Longo ML. Maintaining monodispersity in a microbubble population formed by flow-focusing. *Langmuir* 2008;24:1745–9.
- [101] Hettiarachchi K, Talu E, Longo ML, Dayton PA, Lee AP. On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging. *Lab Chip* 2007;7:463–8.
- [102] Bjercknes K, Sontum P., Smistad G, Agerkvist I. Preparation of polymeric microbubbles: formulation studies and product characterisation. *Int J Pharm* 1997;158:129–36.
- [103] Hou Z, Li L, Zhan C, Zhu P, Chang D, Jiang Q, et al. Preparation and in vitro evaluation of an ultrasound-triggered drug delivery system: 10-hydroxycamptothecin loaded PLA microbubbles. *Ultrasonics* 2012;52:836–41.
- [104] Néstor M-M, Kei N-PE, Guadalupe N-AM, Elisa M-ES, Adriana G-Q, David Q-G. Preparation and in vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) air-filled nanocapsules as a contrast agent for ultrasound imaging. *Ultrasonics* 2011;51:839–45.
- [105] Cavalli R, Bisazza A, Trotta M, Argenziano M, Civra A. New chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated gene delivery: preparation and in vitro characterization. *Int J Nanomedicine* 2012;7:3309–18.

- [106] Nogueira E, Gomes AC, Preto A, Cavaco-Paulo A. Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015;136:514–26.
- [107] Zhao Y-Z, Liang H-D, Mei X-G, Halliwell M. Preparation, characterization and in vivo observation of phospholipid-based gas-filled microbubbles containing hirudin. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:1237–43.
- [108] Phillips LC, Klibanov AL, Wamhoff BR, Hossack J a. Localized ultrasound enhances delivery of rapamycin from microbubbles to prevent smooth muscle proliferation. *J Control Release* 2011;154:42–9.
- [109] Shih C-P, Chen H-C, Chen H-K, Chiang M-C, Sytwu H-K, Lin Y-C, et al. Ultrasound-aided microbubbles facilitate the delivery of drugs to the inner ear via the round window membrane. *J Control Release* 2013;167:167–74.
- [110] Wheatley M a, Forsberg F, Oum K, Ro R, El-Sherif D. Comparison of in vitro and in vivo acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent. *Ultrasonics* 2006;44:360–7.
- [111] Olbrich C, Hauff P, Scholle F, Schmidt W, Bakowsky U, Briel A, et al. The in vitro stability of air-filled polybutylcyanoacrylate microparticles. *Biomaterials* 2006;27:3549–59.
- [112] Liu Y-L, Wu Y-H, Tsai W-B, Tsai C-C, Chen W-S, Wu C-S. Core–shell silica-chitosan nanoparticles and hollow chitosan nanospheres using silica nanoparticles as templates: Preparation and ultrasound bubble application. *Carbohydr Polym* 2011;84:770–4.
- [113] Min HS, Kang E, Koo H, Lee J, Kim K, Park R-W, et al. Gas-generating polymeric microspheres for long-term and continuous in vivo ultrasound imaging. *Biomaterials* 2012;33:936–44.
- [114] Hettiarachchi K, Lee AP. Polymer-lipid microbubbles for biosensing and the formation of porous structures. *J Colloid Interface Sci* 2010;344:521–7.
- [115] Wang Y, Li X, Zhou Y, Huang P, Xu Y. Preparation of nanobubbles for ultrasound imaging and intracellular drug delivery. *Int J Pharm* 2010;384:148–53.
- [116] Cavalli R, Bisazza a, Giustetto P, Cibra a, Lembo D, Trotta G, et al. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. *Int J Pharm* 2009;381:160–5.



- [117] Oeffinger BE, Wheatley MA. Development and characterization of a nano-scale contrast agent. *Ultrasonics* 2004;42:343–7.
- [118] Solis C, Forsberg F, Wheatley M a. Preserving enhancement in freeze-dried contrast agent ST68: Examination of excipients. *Int J Pharm* 2010;396:30–8.
- [119] Xing Z, Ke H, Liu S, Dai Z, Wang J, Liu J. Preparation of Polyelectrolyte Multilayer Coated Microbubbles for Use as Ultrasound Contrast Agent. *Chinese Med Sci J* 2008;23:103–7.
- [120] Chapuis J, Schmaltz RM, Tsosie KS, Belohlavek M, Hecht SM. Carbohydrate Dependent Targeting of Cancer Cells by Bleomycin - Microbubble Conjugates Carbohydrate Dependent Targeting of Cancer Cells by. *Communication* 2009:2438–9.
- [121] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release* 2000;65:271–84.
- [122] Maeda H, Tominaga K, Iwanaga K, Nagao F, Habu M, Tsujisawa T, et al. Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. *J Oral Pathol Med* 2009;38:572–9.
- [123] Fang J-Y, Hung C-F, Liao M-H, Chien C-C. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67:67–75.
- [124] Yan F, Li L, Deng Z, Jin Q, Chen J, Yang W, et al. Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J Control Release* 2013;166:246–55.
- [125] Wang X, Liu P, Yang W, Li L, Li P, Liu Z, et al. Microbubbles coupled to methotrexate-loaded liposomes for ultrasound-mediated delivery of methotrexate across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine* 2014;9:4899–909.
- [126] Tinkov S, Winter G, Coester C, Bekerredjian R. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I--Formulation development and in-vitro characterization. *J Control Release* 2010;143:143–50.
- [127] Wang F, Shi Y, Lu L, Liu L, Cai Y, Zheng H, et al. Targeted delivery of GDNF through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *PLoS One*

- 2012;7:e52925.
- [128] Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids* 2009;162:1–16.
- [129] Herwadkar A, Sachdeva V, Taylor LF, Silver H, Banga AK. Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *Int J Pharm* 2012;423:289–96.
- [130] Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, et al. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. *Ultrason Sonochem* 2011;18:425–30.
- [131] Niu C, Wang Z, Lu G, Krupka TM, Sun Y, You Y, et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* 2013;34:2307–17.
- [132] Cavaliere F, Finelli I, Tortora M, Mozetic P, Chiessi E, Polizio F, et al. Polymer Microbubbles As Diagnostic and Therapeutic Gas Delivery Device. *Chem Mater* 2008;20:3254–8.
- [133] Riess JG. Blood substitutes and other potential biomedical applications of fluorinated colloids 2002;114:119–26.
- [134] Cavalli R, Akhter AK, Bisazza A, Giustetto P, Trotta F, Vavia P. Nanosponge formulations as oxygen delivery systems. *Int J Pharm* 2010;402:254–7.
- [135] Matougui N, Boge L, Groo A-C, Umerska A, Ringstad L, Bysell H, et al. Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. *Int J Pharm* 2016;502:80–97.
- [136] Umerska, A., Matougui, N., Groo, A.-C., Saulnier P. Understanding the adsorption of salmon calcitonin, antimicrobial peptide AP114 and polymyxin B onto lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2016;506:191–200.
- [137] Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Clavreul A, Roger E, et al. Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:239–46.
- [138] Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Clavreul A, Benoit JP, Urban T. The adaptation of lipid nanocapsule formulations for blood administration in animals. *Int J Pharm* 2009;379:266–9.

- [139] Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C, Benoit JP. Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: Influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis* 2005;26:2066–75.
- [140] Paillard A, Hindré F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 2010;31:7542–54.
- [141] Hirsjärvi S, Bastiat G, Saulnier P, Benoît JP. Evaluation of surface deformability of lipid nanocapsules by drop tensiometer technique, and its experimental assessment by dialysis and tangential flow filtration. *Int J Pharm* 2012;434:460–7.
- [142] Berry J, Neeson M., Dagastine R., Chan DY., Tabor R. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *J Coll Interf Sci* 2015;454:226–37.
- [143] Fathi-Azarbayjani A, Jouyban A, Chan S. Impact of Surface Tension in Pharmaceutical Sciences n.d.;12:218–28.
- [144] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Benoît J., Proust J. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2003;30:225–35. doi:10.1016/S0927-7765(03)00096-1.
- [145] Schreier S, Malheiros SV., de Paula E. Surface active drugs : self-association and interactions with membranes and surfactants. *Physicochemical and biological aspects. Biochim Biophys Acta* 2000;1508.
- [146] Bernard P. Binks. Particles as surfactants: similarities and differences. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2002;7:21–41.
- [147] Fan H, Striolo A. Nanoparticle effects on the water-oil interfacial tension. *Phys Rev E* 2012;86:051610, 11pp.
- [148] Okubo T. Surface Tension of Structured Colloidal Suspensions of Polystyrene and Silica Spheres at the Air-Water Interface. *J Colloid Interface Sci* 1995;171:55–62.
- [149] Blute I, Pugh RJ, van de Pas J, Callaghan I. Industrial manufactured silica nanoparticle sols. 2: Surface tension, particle concentration, foam generation and stability. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2009;337:127–35.
- [150] Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Verger R. Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: 3. Action of hydrolytic enzymes HLL and

- pancreatic PLA2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2005;45:24–34.
- [151] Ivanova T, Mircheva K, Balashev K, Minkov I, Saulnier P, Panaiotov I. Interfacial behavior of lipid nanocapsules spread on model membrane monolayers. *Colloid Polym Sci* 2014;1307–18.
- [152] Adamson AW, Gast A. *Physical chemistry of surfaces*. 6th ed. Wiley, 1997.
- [153] Labourdenne S, N.Gaudry-Rolland, S.Letellier, M.Lin, A.Cagna, Esposito G, et al. The oil-drop tensiometer: potential applications for studying the kinetics of (phospho)lipase action kinetics of (phospho)lipase action. *Chem Phys Lipids* 1994;71:163–73.
- [154] Shinoda K, Hutchinson E. Pseudo-phase separation model for thermodynamic calculations on micellar solutions. *J Phys Chem* 1962;66:577–82.
- [155] Shinoda K, Arai H. The Correlation between Phase Inversion Temperature In Emulsion in Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier. *J Phys Chem* 1964;68:3485–90.
- [156] Umerska A, Cassisa V, Matougui N, Joly-Guillou M-L, Eveillard M, Saulnier P. Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;108:100–10.
- [157] Petelska A., Figaszewski Z. Interfacial tension of bilayer lipid membrane formed from phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 2002;1576:76–86.
- [158] Umerska, A., Paluch, K.-J., Santos-Martinez, M.-J., Corrigan, O.I., Medina, C., Tajber L. Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte nanoplexes: synthesis, stability, biocompatibility and potential use as peptide carriers. *J Biomed Nanotechnol* 2014;10:3658–76.
- [159] Umerska, A., Corrigan, O.I., Tajber L. Design of chondroitin sulfate-based polyelectrolyte nanoplexes: Formation of nanocarriers with chitosan and a case study of salmon calcitonin. *Carbohydr Polym* 2017:276–84.
- [160] Florence AT, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. fourth ed. Pharmaceutical Press, 2006.
- [161] Hsu C-T, Chang C-H, Lin S-Y. Comments on the Adsorption Isotherm and Determination of Adsorption Kinetics. *Langmuir* 1997;13:6204–10.
- [162] Miles G, Shedlovsky L. Minima in surface tension-concentration curves of solutions of sodium alcohol sulfates. *J Phys Chem* 1944;48:57–62.

- [163] Vafaei S, Purkayastha A, Jain A, Ramanath G, borca-Tasciuc T. The effect of nanoparticles on the liquid-gas surface tension of Bi<sub>2</sub>Te<sub>3</sub> nanofluids. *Nanotechnology* 2009;20:185702,6pp.
- [164] Raneva V, Ivanova T, Lazariva G, Proust L, Panaiotov I. Kinetics of spreading of photodamaged DOPC liposomes at the air-water interface. *Colloid Polym Sci* 1995.;273:150–5.
- [165] Panaiotov I, Ivanova T, Balashev K, Proust J. Spreading kinetics of dimyristoylphosphatidylcholine liposomes at the air/water interface below and above the main phase-transition temperature. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 1995;102:159–65.
- [166] Gugliotti M, Politi M., Chaimovich H. A simple surface tension method for demonstrating the L $\beta$ -L $\alpha$  transition in biological membranes. *Biochem Educ* 1998;26:233–8.
- [167] Lemkadem B, Boury F, Saulnier P, Proust J. Interfacial behavior of HDL3 spread at air/water interface. I. Dynamic properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 1999;17:1–9.
- [168] Luo M, Dai L. Molecular dynamics simulations of surfactant and nanoparticle self-assembly at liquid-liquid interfaces. *J Phys Condens Matter* 2007;19.
- [169] Biresaw G. Chapter 11: biosurfactants. In: *Surfactant science and technology: Retrospects and prospects*. Ed. By L.S. Romsted. CRC Press Taylor&Francis Group. :2014.
- [170] Czajka A, Hazell G, Eastoe J. Surfactants at the Design Limit. *Langmuir* 2015;31:8205–8217.
- [171] Dulieu C, Bazile D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm Res* 2005;22:285–92.
- [172] Kutuzov S, He J, Tangirala R, Emrick T, Russell T., Böker A. On the kinetics of nanoparticle self-assembly at liquid/liquid interfaces 2007;9:6351–8.
- [173] Du K, Glogowski E, Emrick T, Russell T., Dinsmore AD. Adsorption energy of nano- and microparticles at liquid– liquid interfaces. *Langmuir* 2010; 15:518–22.
- [174] Nambam JS, Philip J. Competitive adsorption of polymer and surfactant at a liquid droplet interface and its effect on flocculation of emulsion. *J Colloid Interface Sci* 2012; 366:88–95.

- [175] Bouyer E, Mekhloufi G, Rosilio V, Grossiord JL, Agnely F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int J Pharm* 2012; 436:359–78.
- [176] Rodriguez Patino JM, Pilosof AMR. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocoll* 2011; 25:1925–37.
- [177] Nobre TM, Wong K, Zaniquelli MED. Equilibrium and dynamic aspects of dodecyltrimethylammonium bromide adsorption at the air/water interface in the presence of lambda-carrageenan. *J Colloid Interface Sci* 2007; 305:142–9.
- [178] Kotsmar C, Pradines V, Alahverdijeva VS, Aksenenko EV, Fainerman VB, Kovalchuk VI, et al. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein–surfactant interfacial layers. *Adv Colloid Interface Sci* 2009; 150:41–54.
- [179] Wang H, Hobbie E. Amphiphobic carbon nanotubes as macroemulsion surfactants. *Langmuir* 2003; 19:3090–3.
- [180] Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv Colloid Interface Sci* 2003; 100–102:503–46.
- [181] Arditty S, Schmitt V, Giermanska-Kahn J, Leal-Calderon F. Materials based on solid-stabilized emulsions. *J Colloid Interface Sci* 2004; 275:659–64.
- [182] Xiao Q, Tan X, Ji L, Xue J. Preparation and characterization of polyaniline/nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composites via a novel Pickering emulsion route. *Synth Met* 2007; 157:784–91.
- [183] He Y, Yu X. Preparation of silica nanoparticle-armored polyaniline microspheres in a Pickering emulsion. *Mater Lett* 2007; 61:2071–4.
- [184] Cartron J-P, Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. *Transfus Clin Biol* 2008; 15:39–50.
- [185] Dinsmore AD, Hsu MF, Nikolaidis MG, Marquez M, Bausch AR, Weitz DA. Colloidosomes: selectively permeable capsules composed of colloidal particles. *Science* 2002; 298:1006–9.
- [186] Pickering SU. Emulsions. *J Chem Soc Trans* 1907; 91:2001–21.
- [187] Ramsden W. The separation of solid materials on the surface of solutions and suspensions. Observations concerning surface diaphragms, foam blisters, emulsions and. *Proc Roy Soc* 1903; 23:156–64.

- [188] Kaewsaneha C, Tangboriboonrat P, Polpanich D, Eissa M, Elaissari A. Preparation of Janus colloidal particles via Pickering emulsion: An overview. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2013; 439:35–42.
- [189] Luu X, Striolo A. Ellipsoidal Janus Nanoparticles Assembled at Spherical Oil / Water Interfaces. *J Phys Chem B* 2014; 118:13737–43.
- [190] Glaser N, Adams DJ, Bo A, Krausch G. Janus Particles at Liquid - Liquid Interfaces. *Langmuir* 2006; 22:5227–9.
- [191] Miller R, Fainerman VB, Kovalchuk VI, Grigoriev DO, Leser ME, Michel M. Composite interfacial layers containing micro-size and nano-size particles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 128–130:17–26.
- [192] Wang W, Zhou Z, Nandakumar K. Effect of charged colloidal particles on adsorption of surfactants at oil–water interface. *J Colloid Interface Sci* 2004; 274:625–30.
- [193] Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Control Release* 2008; 128:185–99.
- [194] Anton N, Gayet P, Benoit JP, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int J Pharm* 2007; 344:44–52.
- [195] Anton N, Mojzisova H, Porcher E, Benoit JP, Saulnier P. Reverse micelle-loaded lipid nano-emulsions: New technology for nano-encapsulation of hydrophilic materials. *Int J Pharm* 2010; 398:204–9.
- [196] Vrignaud S, Benoit J-P, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32:8593–604.
- [197] Abdel-Mottaleb MM a, Neumann D, Lamprecht A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *Int J Pharm* 2010;390:208–13.
- [198] Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit J-P. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 2009; 140:174–81.
- [199] Roger E, Lagarce F, Benoit JP. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *Eur J Pharm Biopharm*

- 2011; 79:181–8.
- [200] Vrignaud S, Hureauux J, Wack S, Benoit JP, Saulnier P. Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. *Int J Pharm* 2012;436:194–200.
- [201] Saliou B, Thomas O, Lautram N, Clavreul A, Hureauux J, Urban T, et al. Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. *Eur J Pharm Sci* 2013;50:172–80.
- [202] Roger M, Clavreul A, Huynh NT, Passirani C, Schiller P, Vessires A, et al. Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy. *Int J Pharm* 2012; 423:63–8.
- [203] Malzert-Fréon A, Vrignaud S, Saulnier P, Lisowski V, Benoît JP, Rault S. Formulation of sustained release nanoparticles loaded with a triptentone, a new anticancer agent. *Int J Pharm* 2006; 320:157–64.
- [204] Szymczyk K, Jan B. The Properties of a Binary Mixture of Nonionic Surfactants in Water at the Water / Air Interface. *Langmuir* 2007:4972–81.
- [205] Zhmud B, Tiberg F. Interfacial dynamics and structure of surfactant layers. *Adv Colloid Interface Sci* 2005; 113:21–42.
- [206] Zhmud B V, Tiberg F, Kizling J. Long-time Interfacial Relaxation in Aqueous Butanol Solutions. *Langmuir* 2000, 2000:7685–90.
- [207] Biswas SC, Dubreil L, Marion D. Interfacial Behavior of Wheat Puroindolines : Study of Adsorption at the Air – Water Interface from Surface Tension Measurement Using Wilhelmy Plate Method 1. *J Colloid Interface Sci* 2001; 244:245–53.
- [208] Zhmud B V, Tiberg F, Kizling J. Dynamic Surface Tension in Concentrated Solutions of C n E m Surfactants : A Comparison between the Theory and Experiment. *Langmuir* 2006; 16:2557–65.
- [209] JOOS P, RILLAERTS E. Theory on the Determination of the Dynamic Surface Tension with the Drop Volume and Maximum Bubble Pressure Methods. *J Colloid ...* 1981;79:96–100.
- [210] Saulnier P, Boury F, Malzert A, Heurtault B, Ivanova T, Cagna A, et al. Rheological model for the study of dilational properties of monolayers. Comportment of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the dichloromethane (DCM)/water



- interface under ramp type or sinusoidal perturbations. *Langmuir* 2001;17:8104–11.
- [211] Anton N, Saulnier P, Boury F, Foussard F, Benoit JP, Proust JE. The influence of headgroup structure and fatty acyl chain saturation of phospholipids on monolayer behavior: a comparative rheological study. *Chem Phys Lipids* 2007;150:167–75.
- [212] Béduneau A, Saulnier P, Hindré F, Clavreul A, Leroux J-C, Benoit J-P. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 2007; 28:4978–90.
- [213] Wojciechowski K. Surface activity of saponin from Quillaja bark at the air/water and oil/water interfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013; 108:95–102.
- [214] Bouyer E, Mekhloufi G, Huang N, Rosilio V, Agnely F.  $\beta$ -Lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: Formulation and stabilization mechanisms of pharmaceutical emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2013; 433:77–87.
- [215] Vrignaud S, Anton N, Gayet P, Benoit JP, Saulnier P. Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:197–204.
- [216] Bastiat G, Pritz CO, Roider C, Fouchet F, Lignièrès E, Jesacher A, et al. A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging. *J Control Release* 2013; 170:334–42.
- [217] Farook U, Stride E, Edirisinghe MJ. Stability of microbubbles prepared by co-axial electrohydrodynamic atomisation. *Eur Biophys J* 2009; 38:713–8.
- [218] Jauregi P, Varley J. Colloidal gas aphrons: potential applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 1999; 17:389–95.
- [219] Mengual O, Meunier G, Cayre I, Puech K, Snabre P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 1999; 152:111–23.
- [220] Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Costantini D, Gref R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. vol. 254. 2003.
- [221] Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan Lab® Expert analysis

- of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 72:155-160.
- [222] Dutta A, Chengara A, Nikolov AD, Wasan DT, Chen K, Campbell B. Destabilization of aerated food products: effects of Ostwald ripening and gas diffusion. *J Food Eng* 2004; 62:177–84.
- [223] Kurukji D, Pichot R, Spyropoulos F, Norton IT. Interfacial behaviour of sodium stearylactylate (SSL) as an oil-in-water Pickering emulsion stabiliser. *J Colloid Interface Sci* 2013; 409:88–97.
- [224] Destribats M, Gineste S, Laurichesse E, Tanner H, Leal-Calderon F, Héroguez V, et al. Pickering emulsions: What are the main parameters determining the emulsion type and interfacial properties? *Langmuir* 2014; 30:9313–26.
- [225] Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2009;379:260–5.
- [226] Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:422–9. doi:10.1016/j.ejps.2010.04.015.
- [227] Vonarbourg A, Passirani C, Desigaux L, Allard E, Saulnier P, Lambert O, et al. The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2009; 30:3197–204.
- [228] Rowe RC, Sheskey PJ, Marian E Quinn, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth edit. London. Chicago, UK.USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
- [229] ABITEC. Capmul 907P 2011:7249.consulté le 15 février 2016.
- [230] Nessie. Le gélisucré et les esters de sucre. Consulté le 15 février 2016.
- [231] Calero N, Muñoz J, Cox PW, Heuer A, Guerrero A. Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocoll* 2013; 30:152–62.
- [232] Warram JM, Sorace a G, Saini R, Borovjagin a V, Hoyt K, Zinn KR. Systemic delivery of a breast cancer-detecting adenovirus using targeted microbubbles. *Cancer Gene Ther* 2012; 19:545–52.
- [233] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Sawamura K, Tanaka K, et al. Tumor

- specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release* 2008; 125:137–44.
- [234] Cool SK, Geers B, Roels S, Stremersch S, Vanderperren K, Saunders JH, et al. Coupling of drug containing liposomes to microbubbles improves ultrasound triggered drug delivery in mice. *J Control Release* 2013; 172:885–93.
- [235] Evjen TJ, Hupfeld S, Barnert S, Fossheim S, Schubert R, Brandl M. Physicochemical characterization of liposomes after ultrasound exposure - mechanisms of drug release. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 78–79:118–22.
- [236] Schroeder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J Control Release* 2009; 137:63–8.
- [237] Nishida K, Morita H, Katayama Y, Inoue R, Kanaya T, Sadakane K, et al. Salting-out and salting-in effects of amphiphilic salt on cloud point of aqueous methylcellulose. *Process Biochem* 2016.
- [238] Saien J, Asadabadi S. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* Salting-out effect of NaCl on the rate of mass transfer of liquid – liquid extraction in a two impinging-jets contacting device. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2010;41:295–301.
- [239] Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Rousselet MC, Moal V, Urban T, et al. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. *Pharm Res* 2010;27:421–30.
- [240] Vrignaud S. *Systemes Nanoparticulaires pour l'encapsulation de molecules hydrophiles-156*. Thèse de doctorat : pharmacologie expérimentale : Angers : 2012 ; n°1207.

## Curriculum vitae

### ASSISTANT EN PHARMACIE GALENIQUE

**Celia Rosemonde Ablavi MOUZOUVI**

05 BP 657 Cotonou – Bénin

+22995566814

[rosedescience@yahoo.fr](mailto:rosedescience@yahoo.fr)

32 ans – Mariée - Permis B

Nationalité béninoise

### COMPETENCES CLEES

- Enseignement
- Rédaction d'article et de protocole de recherche, recherche bibliographique
- Développement, formulation et caractérisation de produits pharmaceutiques et de nanoparticules
- Etude des dossiers de demande d'AMM
- Connaissance en fonctionnement d'appareils (HPLC, spectrophotomètre UV, comprimeuse, tensiomètre à goutte, balance de langmuir, granulomètre etc.)
- Réalisation des examens biologiques
- Langues : Français (très bien) Anglais (niveau intermédiaire) et dialectes (Yoruba, Nago, Mina, Adja, Fon et Goun)
- Maîtrise des logiciels : Windows ; Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Publisher), Internet explorer, End note, R studio, Image J, Origine, Mendeley, Read cube, GIMP.

### FORMATIONS et DIPLOMES

Depuis 2013 **PhD en Pharmacie galénique** - FSS Cotonou /Université d'Angers  
(Soutenu le 15 mai 2017)

Octobre 2015 **Diplôme d'école en expérimentation animale, conception et réalisation de procédures expérimentales.** ONIRIS, Nantes, France

Février 2015 **Attestation de formation sur la sensibilisation aux risques professionnels majeurs en laboratoire de recherche pour les nouveaux entrants.**

Hôpital hôtel dieu, Nantes, France

2014 **Attestation en anglais (niveau intermédiaire 1),**

ONG Bénin espoir 2000, Bénin

Juillet 2014 **Formation à l'évaluation technique des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché des médicaments (AMM)**, *DPMED, Cotonou, Bénin*

Mars 2010 **Master en Développement du Médicament** – *UCAD, Dakar, Sénégal.*

2010 **Doctorat d'état en Pharmacie** - *Université d'Abomey-Calavi / FSS, Bénin.*

## ACTIVITES PEDAGOGIQUES

Depuis 2014 **Faculté des Sciences de la santé de Cotonou**

- Encadrement des travaux pratiques et dirigés de pharmacie galénique

Depuis 2013 **DPMED-Bénin**

- participation au comité des experts pour l'évaluation des dossiers de demande d'AMM

Janvier 2012 **ENDSS-Dakar (Sénégal)**

- Enseignement du module de pharmacie galénique en Licence 1 (option délégation médicale)

**Faculté de pharmacie d'Angers, France**

Avril 2015 - participation aux séances d'encadrement des travaux pratiques de pharmacie galénique

## ACTIVITES SCIENTIFIQUES

### PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES INTERNATIONALES

1. Anita Umerska, **Celia R.A. Mouzouvi**, André Bigot, Patrick Saulnier. Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* 493 (2015) 224–232.
2. **Mouzouvi R. A.**, Fall A. B. K., Sarr C.O3., Djego J., Diouf L A., Sy G. Y. , BIGOT K. Comparative study of “Kew” (kaolin of Mali) and heavy kaolin excipients properties on ibuprofen release profiles from ointments. *ScienceLib Editions Mersenne: Volume6, N° 140409ISSN 2111-4706. 2014.*

### PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES REGIONALES

1. **Mouzouvi R.**, Djègo J. G., Sehonou J., Lalèyè A.1, Priuli F., Bigot A. Effet de l'association *Combretum micranthum* G. Don (Combretaceae) et *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae) dans la prise en charge de l'hépatite virale B. *Revue CAMES – Série Pharm.Méd.Trad.Afr.*, 2014;17(1):10--14
2. **CRA. Mouzouvi**, J. Djègo, J.Sehonou, A.Lalèyè, K.Diombo, A. BIGOT, GB.Priuli. Tolérance de l'association *Combretum micranthum* G. Don (Combretaceae) et *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae) dans la prise en charge des hépatites virales B. *West African Journal of Research for Health volume 001*, 2014

## CONFERENCES ET COMMUNICATIONS

### COMMUNICATIONS ORALES

- 1- **MOUZOUVI Celia R A.**, Bigot André, Saulnier Patrick. *Lipid nanocapsules for air bubbles stabilization. Vème colloque des sciences, cultures et technologies de l'UAC, septembre 2015, UAC, Cotonou, Bénin.*
- 2- **CR A Mouzouvi**, P Saulnier, A Bigot. Use of lipid nanocapsules for air bubble stabilization. *Journées scientifiques de l'EDBS: 9-10 décembre 2014 à Nantes, France.*
- 3- **Mouzouvi C.R. A.**, Fall A. B. K., Sarr C.O., Djego J., Diouf L A., Sy G. Y. , BIGOT K A. Comparative study of "Kew" (kaolin of Mali) and heavy kaolin excipients properties on ibuprofen release profiles from ointments. *Premières Journées Médico-pharmaceutiques de la FSS, 28-30 avril 2014, Cotonou, Bénin.*

### COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 1- **C. R. A. MOUZOUVI**, A. UMERKA , F. FOUCHET , A. BIGOT, P.SAULNIER. Microbubbles stabilization by Lipid Nanocapsules for triggering drug release. 4-7 avril 2016, 10<sup>th</sup> World meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, United kingdom

- 2- **MOUZOUVI Celia R A , UMERSKA Anita, FOUCHET Florian, BIGOT André , SAULNIER Patrick.** Microbubbles formulated with Lipid nanocapsules for a better stabilization. 07-09 mars 2016, 8<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems, Madrid, Spain
- 3- **MOUZOUVI CRM , BIGOT KA , SAULNIER P.** Lipid Nanocapsules for air microbubble stabilization. 11-13 août 2015, OMICS international conference: nanotechnology congress and expo. Frankfurt Germany
- 4- **MOUZOUVI CRM , BIGOT KA , SAULNIER P .**Nanocapsules lipidiques à propriétés tensioactives. 28-3 octobre 2015, Vème colloque de l'Université d'Abomey-calavi, Cotonou, Bénin.
- 5- **Celia Rosemonde A.MOUZOUVI. Patrick SAULNIER, André BIGOT.**: Bulles de gaz: vecteur pour le ciblage et la libération provoquée. 28 septembre 2015, Nuit des chercheurs, château d'Angers, France.
- 6- **MOUZOUVI Celia R A, UMERSKA Anita, FOUCHET Florian, BIGOT André, SAULNIER Patrick.** Use of Lipid Nanocapsules for air bubbles stabilization. 13-14 Avril 2015. 1<sup>st</sup> European Conference on Pharmaceutics Drug Delivery. Reims, France.
- 7- **MOUZOUVI Celia R A, UMERSKA Anita, BIGOT André SAULNIER Patrick.** Lipid nanocapsules stabilize air-water interface of air bubbles. 27 mai 2015, journée de la SFR, faculté de pharmacie d'Angers, France.

## EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis 2013 : **Doctorat du troisième cycle, université d'Abomey-calavi/ Université d'Angers**, thèse en cotutelle

Projet	Microbulles de gaz comme vecteur de médicaments (professeur André BIGOT et Patrick Saulnier)
Développement de nouveaux produits	Formulation et caractérisation des microbulles
Développement et validation de nouvelles méthodes	Validation de méthode de formulation et de caractérisation

- Juin 2012     **Stage au laboratoire de Pharmacie Galénique de Liège**  
Evaluation de la capacité d'adsorption des huiles  
par quelques adsorbants  
Evaluation des propriétés d'écoulement des mélanges excipients+huiles  
Bibliographies sur la formulation et développement des  
<< Self -auto emulsion systems>>
- Fév. 2012     **Stage au laboratoire de pharmacie galénique du Sénégal**  
Investigation sur l'utilisation de l'argile du Mali comme excipient  
dans les formes à application cutanée  
Formulation et caractérisation des pommades
- Juillet 2012   **Stage au Laboratoire National de contrôle de qualité du Sénégal**  
Contrôle de qualité des pommades
- 2011           **AREPHA, chargé de traduction des dossiers d'AMM d'EMS**  
Lecture et traduction des dossiers du portugais ou anglais en français  
Coordination du travail au sein du comité  
Collaboration avec la DPM pour l'obtention de l'AAM
- 2009           **Hôpital saint jean de Dieu de Tanguiéta et centre de transfusion  
de Natitingou (stage rural)**  
Participation au Staff et aux Séances de consultation médicale  
Réalisation de prélèvement sanguin  
Analyse biologiques des échantillons biologiques  
Préparation et conditionnement des produits pharmaceutiques à usage  
hospitalier  
Préparation des phytomédicaments

#### ACTIVITES DE VALORISATION

Juin 2015 et 2014, **Séminaire de formation des pharmaciens d'officine à la stratégie nationale et aux intrants de lutte contre le paludisme** : CIP (Centre d'information et de Promotion) Bénin

- Organisation de la formation

Septembre 2015 **Nuit des chercheurs**

- Poster affiché

#### CENTRES D'INTERETS



**Vie associative**

- Attestation de participation aux XVII<sup>ème</sup> journées scientifiques annuelles de la SOACHIM (août 2016)
- Membre du Forum International Pharmaceutique(FIP), de la Société de Chimie Thérapeutique (SCT), de la Société Française de Nanomédecine (SFN).
- Membre de l'ONG GRADeG- Bénin depuis Mai 2014
- Attestation de participation au 12<sup>ème</sup> forum pharmaceutique international en Juillet 2011
- Ancien membre de la FESPAO (Fédération Des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de l'Ouest)
- Supervision des élections présidentielles de 2006
- Déléguée de classe (2009-2010)
- Ancien membre de l'IPS/FSS (Initiative Plantes et Santé) : promotion des plantes médicinales

**Loisirs**

- Passionnée de lecture, musique gospel et du sport.



# Formulation and nebulization of fluticasone propionate-loaded lipid nanocarriers



Anita Umerska<sup>a,\*</sup>, Celia R.A. Mouzouvi<sup>a,b</sup>, André Bigot<sup>c</sup>, Patrick Saulnier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INSERM U1066, University of Angers, France

## article info

### Article history:

Received 2 May 2015

Received in revised form 1 July 2015

### Keywords:

Lipid  
Nanocarriers

Fluticasone propionate  
Nebulization

Drug delivery system

## abstract

Inhaled fluticasone propionate (FP) is often prescribed as a first-line therapy for the effective management of pulmonary diseases such as asthma. As nanocarriers offer many advantages over other drug delivery systems, this study investigated the suitability of lipid nanocapsules (LNCs) as a carrier for fluticasone propionate, examining the drug-related factors that should be considered in the formulation design and the behaviour of LNCs with different compositions and properties suspended within aerosol droplets under the relatively hostile conditions of nebulization.

By adjusting the formulation conditions, particularly the nanocarrier composition, FP was efficiently encapsulated within the LNCs with a yield of up to 97%, and a concentration comparable to commercially available preparations was achieved. Moreover, testing the solubility of the drug in oil and water and determining the oil/water partition coefficient proved to be useful when assessing the encapsulation of the FP in the LNC formulation.

Nebulization did not cause the FP to leak from the formulation, and no phase separation was observed after nebulization. LNCs with a diameter of 100 nm containing a smaller amount of surfactant and a larger amount of oil provided a better FP-loading capacity and better stability during nebulization than 30 or 60

## 1. Introduction

Pulmonary diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) affect millions of people worldwide. Inhalation is the preferred route of drug administration for asthma treatment (Borgström, 2001). Pulmonary administration offers many advantages for the treatment of respiratory diseases compared with other routes of delivery. Inhalation therapy allows for the direct application of a drug within the lungs (Beck-Broichsitter et al., 2009). Direct delivery of the active substances to the lung enables the administration of lower doses compared with other routes of administration (i.e., oral, buccal, or rectal delivery) with an equivalent therapeutic response and lower systemic exposure (Arzhavitina and Steckel, 2010). Inhaler devices are commonly used for the local delivery of drug molecules to treat pulmonary diseases such as COPD and asthma. Four broad classes of inhalation

devices are used to administer these drugs, including pressurized metered dose inhalers, nebulizers, soft mist inhalers, and dry powder inhalers (Cipolla et al., 2014). Nebulizers are recommended for children and adults have difficulty coordinating inspiration and aerosol actuation and in acute severe episodes of bronchospasms. Nebulization can also be indicated when a patient requires large doses of inhaled drugs (Arzhavitina and Steckel, 2010).

Inhaled glucocorticosteroids are often prescribed as the first-line therapy for the effective management of persistent asthma (Dahl, 2006). The most commonly prescribed inhaled corticosteroid is fluticasone propionate (FP), a highly potent anti-inflammatory drug with good pharmacokinetic and pharmacodynamic properties (Chiang et al., 2010). Compared with other inhaled corticosteroids (triamcinolone acetonide, flunisolide, beclomethasone dipropionate, and budesonide), FP has the highest affinity to the corticosteroid receptor relative to dexamethasone (RRA = 1800) and the lowest systemic bioavailability (<1%). Reports have indicated that 80% of FP is bound to plasma proteins (Derendorf et al., 1998).

Drug absorption and retention in the lungs is dependent on many factors such as the physico-chemical properties of the drug,

\* Corresponding author at: INSERM U1066, IBS-IRIS Niveau 3, Rue des Capucins,

49933 Angers Cedex 9, France.

the formulation and the method of delivery (Yang et al., 2008). Fluticasone for inhalation is available as a dry powder inhaler, an inhalation aerosol (a suspension of FP with suitable propellants in a pressurized container) and a micronized suspension for nebulization.

Recently, the use of nanoparticles for drug delivery has received a great deal of attention from researchers due to their efficacy and safety, and the advantages offered by nanoparticles are widely accepted by industry (Chiang et al., 2010). Nanoparticles offer numerous advantages over other delivery systems due to their special characteristics including their small particle size and large surface area and the ability to control their surface properties (Azarmi et al., 2008). Drug encapsulation within nanocarriers protects the encapsulated molecules from direct biological interactions, protects them from degradation, and reduces their potential systemic toxicity. Encapsulation can also improve the therapeutic efficiency by controlling the biodistribution and release kinetics of the active pharmaceutical ingredient (API; Delmas et al., 2012). Nanoscale suspensions offer several advantages compared with solutions and dry powder formulations including their suitability for poorly soluble crystalline compounds (therefore eliminating the need for solubilization), the ease of dosing with a syringe-type delivery device in animal studies (leading to more consistent drug distribution in the lung compared with dry powder formulations), and the ability to control the particle size (reducing the variability in drug absorption) (Yang et al., 2008).

The fate of inhaled nanomaterials depends on regional distribution in the lung (Sakagami, 2006). The inertial impaction and sedimentation occur during the passage through the oropharyngeal region or the bronchial region, respectively, and it affects particles larger than 10  $\mu\text{m}$  in diameter. At the other extreme, particles smaller than 1  $\mu\text{m}$  are likely to reach the alveolar region, but they are expected to be exhaled rather than deposited. Particles with aerodynamic diameters between 1 and 5  $\mu\text{m}$  are likely to be deposited in the lung periphery (Bailey and Berkland, 2009). Individual nanoparticles are too small to be deposited in the alveoli and the majority of the administered dose is exhaled. The nanoparticles are most often delivered to the lungs via nebulization of colloidal suspensions (Sung et al., 2007), and in this case it is the size of the aqueous droplet that determines the fate of the inhaled nanocarriers. To administer the nanoparticles in the solid state form, Trojan particles (nanoparticles incorporated into microparticles) can be employed (Tsapis et al., 2002).

Lipids have been widely used in a variety of drug delivery systems such as liposomes, emulsions, solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs). These formulations were not developed specifically for pulmonary applications, but they have since been used for respiratory delivery as scientists have explored novel applications in various pharmaceutical areas (Cipolla et al., 2014). A number of pharmaceutical liposome formulations have reached the market, and many liposome formulations have shown promise as inhaled products (Cipolla et al., 2014). In contrast, the evaluation of the potential of SLNs and NLCs to provide therapeutic benefit as inhaled products is at an earlier stage (Weber et al., 2014). Lipid nanocarriers can be used to solubilize poorly water-soluble drugs. One major advantage of these systems is that their solubilization capacity is retained on administration, in contrast to formulations based on conventional solubilization approaches. Formulations containing cosolvents or surfactant micelles may partially lose their solubilization potential upon dilution with aqueous media (Bunjes, 2010).

A broad range of drugs, mainly drugs with lipophilic properties, has already been incorporated into lipid nanocapsules (LNCs), including ibuprofen (Lamprecht et al., 2004), etoposide (Lamprecht and Benoit, 2006), paclitaxel (Hureauux et al., 2009), and amiodarone (Lamprecht et al., 2002). LNCs can be considered as drug carriers

for various routes of administration, including oral and local delivery (Huynh et al., 2009). Recently, researchers have investigated pulmonary administration of LNCs (Hureauux et al., 2009). Hureauux et al. (2009) examined the nebulization of drug-free and paclitaxel-loaded LNCs. That study focused on the selection of the nebulizer device and the properties of the resulting aerosol. However, the influence of nanoparticle characteristics and concentration were not investigated, with only 50 nm LNCs tested at one concentration. The characteristics of nanoparticles and liposomes including their composition have been shown to exert an important influence on their stability and possible aggregation upon nebulization (Dailey et al., 2003; Kleemann et al., 2007). Indeed, the performance of liposomes during nebulization strongly depended on the composition of the lipids and the drug, with characteristics such as particle size and surface charge exhibiting significant effects (Niven and Schreier, 1990; Niven et al., 1991; Desai et al., 2002). As the size and composition of LNCs can vary (Heurtault et al., 2002; Lamprecht et al., 2002; Huynh et al., 2009), it is important to examine the influence of these factors on the behaviour of nanocarriers during nebulization.

The objective of this study was to investigate the suitability of LNCs as carriers for fluticasone propionate and to determine which drug factors should be considered in the formulation design. Another important goal of this work was to examine the behaviour of the different LNCs suspended within aerosol droplets under the relatively aggressive conditions of nebulization.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Labrafac<sup>®</sup> CC (caprylic/capric acid triglycerides-C8/C10-TG) was kindly provided by Gattefossé S.A. (France). Lipoid<sup>®</sup> S75-3 (hydrogenated lecithin) and Solutol<sup>®</sup> HS15 (macrogol 15 hydroxystearate, polyoxyl 15 hydroxystearate) were kindly provided by Lipoid GmbH (Germany) and BASF (Germany), respectively. Fluticasone propionate was purchased from Kemprotec (UK). All other chemicals and solvents were of analytical grade. Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices were obtained from Millipore (USA).

### 2.2. Solubility in oil and in water

In a glass scintillation vial, 50 mg of FP and 10 ml of C8/C10-TG, water or a 0.5% (w/v) aqueous solution of polyoxyl 15 hydroxystearate were heated up to 95–100 °C for 5 min. Samples were cooled down to room temperature and centrifuged (16,000  $\times g$ , 5 min) to remove undissolved FP, and the supernatant was diluted with acetonitrile (1:20 and 1:1 volume ratios for the C8/C10-TG and aqueous solutions, respectively). The solubility of FP was determined by measuring the absorbance at an operating wavelength of 250 nm in optically homogenous quartz cuvettes (Hellma) with a light path of 10 mm, with mixtures of C8/C10-TG/acetonitrile, water/acetonitrile, and polyoxyl 15 hydroxystearate solution/acetonitrile used as references. The absorbance measurements were performed using a UV-2600 spectrophotometer (Shimadzu).

### 2.3. Thermal stability of FP

1 mg of FP dissolved in 10 ml of C8/C10-TG was heated up to 95–100 °C and then cooled to 60 °C; this cycle was repeated three times, and after the final cycle the dispersion was cooled down to room temperature. Then, 0.2 ml of the solution of FP in C8/C10-TG was mixed with 1.8 ml of acetonitrile (1:10 v/v dilution, 10  $\mu\text{g}$  of FP/ml). As a control, FP was dissolved in acetonitrile and mixed with C8/C10-TG without heating. Due to the high absorbance of the

**Table 1**

	LNC30 (%)	LNC60 (%)	LNC100 (%)
Polyoxyl 15 hydroxystearate	67.76	43.41	27.38
Hydrogenated lecithin			
C8/C10-TG	2.60	3.85	4.24

samples at lower wavelengths (190–250 nm), it was necessary to further dilute (1:200, v/v dilution, 0.5 µg of FP/ml) the samples in acetonitrile.

Samples and the reference (acetonitrile) were placed in optically homogenous quartz cuvettes (Hellma) with a 10 mm light path. The UV spectra of the solutions were recorded at wavelengths between 190 and 400 nm using a UV-2600 spectrophotometer (Shimadzu).

#### 2.4. Lipophilic/hydrophilic drug properties

To examine the partition of FP between water and C8/C10-TG, FP was dissolved in C8/C10-TG at 0.25 mg/ml and mixed with water at a 1:1 (v/v) ratio. The mixture was magnetically stirred (900 rpm) and heated to 95 °C and then cooled to 60 °C; this cycle was repeated three times, and after the final cycle the dispersion was cooled to room temperature. The bottom phase (water) remained transparent, while the upper phase (C8/C10-TG) became turbid. As a control, the mixture of water and C8/C10-TG (1:1, v/v ratio) was also exposed to the same heating/cooling cycles, and the upper oil phase also became turbid in the control sample. Then, 1 ml of the bottom aqueous phase was diluted with 1 ml of acetonitrile and 0.2 ml of the upper phase (C8/C10-TG) was diluted with 1.8 ml of acetonitrile. After dilution with acetonitrile, the C8/C10-TG dispersion became transparent. The absorbance at an operating wavelength of 250 nm was recorded as described in Section 2.2.

#### 2.5. Preparation of LNCs

LNCs were prepared following the procedure described by Heurtault et al. (2002) at a concentration of 177 mg/ml, with the composition of each formulation presented in Table 1. The components of the LNCs (polyoxyl 15 hydroxystearate, hydrogenated lecithin, and C8/C10-TG) and NaCl (0.089 g) were weighed, mixed with 1.1 or 3.1 ml of water (LNC30 and LNC60, LNC100, respectively) and heated to 95–100 °C. Optionally, 0.125, 0.25, or 0.5 ml of FP dissolved in acetone at 20 mg/ml was added. The samples were cooled to 60 °C. The samples were treated with three heating-cooling cycles, and during the last cooling cycle, at 80–90 °C (the temperature of the phase inversion) the system was diluted with cold (~4 °C) water up to a final volume of 10 ml. Formulations were left overnight to allow acetone to evaporate, and additional water was added to return the final volume to 10 ml if necessary.

#### 2.6. Selection of a wavelength for FP quantification and preparation of calibration curves

The spectra of an FP solution (0.06 mg/ml) in acetonitrile or in a mixture of acetonitrile and water (1:1 and 5:1) were recorded at wavelengths between 190 and 400 nm. To prepare calibration curves, FP was dissolved in acetonitrile or in the mixture of acetonitrile and water (1:1 and 5:1 ACN to W volume ratios). The absorbances of FP solutions at concentrations between 1 and 500 µg/ml were measured using appropriate solvent mixtures as references. To prepare the calibration curves, the absorbance of FP solutions at concentrations between 0.1 and 500 µg/ml in acetonitrile or in water/acetonitrile mixtures were measured at 250 nm. The calibration curves obtained for different water/acetonitrile

ratios were found to be linear for FP concentrations between 0.5 and 125 µg/ml.

#### 2.7. Separation of FP from the nanocarriers and quantification of FP

FP was separated from the LNC suspension by centrifugation (4500 × g, 10 min). The sediment (non-encapsulated FP) was washed twice with water, dried, and dissolved in acetonitrile. The supernatant containing FP-loaded LNCs and dissolved non-encapsulated FP was subjected to a combined ultrafiltration-centrifugation technique using Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices with a molecular weight cut off (MWCO) of 10 kDa. Then, 2 ml of drug loaded LNCs (or unloaded control LNCs) were added to the filter device and centrifuged for 2 h (4500 × g). Then, deionized water was added to the sample remaining in the filter device (containing encapsulated FP) to a volume of 2 ml. Of this volume, 0.4 ml was then transferred into a 2 ml Eppendorf tube and diluted with 1.6 ml acetonitrile to break up the particles and extract the encapsulated FP, and then centrifuged (16,000 × g) for 30 min to remove aggregated particles. The absorbance of the supernatant was then measured at 250 nm with a 1:5 water:acetonitrile mixture as a reference. The filtrate containing non-encapsulated FP, collected from the bottom of the centrifuge tube, was diluted with acetonitrile at a 1:1 volume ratio, and its absorbance was measured at an operating wavelength of 250 nm as described in Section 2.2, using a 1:1 acetonitrile:water mixture as a reference. LNC formulations without FP were also subjected to the same procedures. Their absorbance was treated as a blank and was subtracted from the reading of FP-loaded formulations.

The encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) were calculated using the following equations:

$$EE = \frac{B}{A} * 100\% \quad (1)$$

where *A* is the total amount (mass) of the FP, and *B* is the mass of the encapsulated FP;

$$DL = \frac{B}{C} * 100\% \quad (2)$$

where *C* is the total weight of all components of the LNCs.

#### 2.8. Characterization of LNCs

The intensity-averaged particle diameter and the polydispersity indexes of the LNCs were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) with 173° backscatter detection. The electrophoretic mobility values measured by Laser Doppler Velocimetry (LDV) were converted to zeta potential by the Smoluchowski equation. Both DLS and LDV measurements were carried out on a Zetasizer nano series Nano-ZS fitted with a 633 nm laser (Malvern Instruments, UK). The measurements were performed at an LNC concentration of 3 mg/ml, obtained after dilution with MilliQ water. Each analysis was carried out at 25 °C in triplicate.

To obtain the size distribution by intensity, volume and number, data were processed using the Zetasizer software (version 7.02), and the multiple narrow modes (high resolution) model was applied.

#### 2.9. Nebulization of LNCs

The e-Flow® rapid vibrating mesh nebulizer was used to nebulize 3 ml of LNC dispersions. LNCs without FP were nebulized at three concentrations: 177, 17.7, and 3.54 mg/ml, while FP-loaded formulations were nebulized only at the highest concentrations

**Table 2**

Solubility of FP in different solvents, approximate weight of solvent necessary to dissolve 1 g of FP (the density values used for calculation were: 1000 g/L for water and

Solvent	Solubility of FP	Approximate weight of solvent (g) necessary to dissolve 1 g of FP	Description of solubility according to European Pharmacopeia or USP
C8/C10-TG	$2.25 \pm 0.04$ mg/g	420	Slightly soluble
0.5%, w/v aqueous solution of polyoxyl 15 hydroxystearate	$62 \pm 13$ $\mu$ g/g	1,428,571	Practically insoluble

(177 and 17.7 mg/ml). Formulations were diluted with 0.9% (w/v) NaCl aqueous solution.

The volume of the sample remaining in the nebulizer after nebulization was measured each time and was found to be approximately 1 ml. The nebulization time was also measured. To calculate the nebulizer output, the nebulization time was divided by the amount of the formulation nebulized (2 ml).

FP was extracted from LNCs and quantified (see Section 2.7) before and after nebulization.

### 2.10. Statistical analysis

The statistical significance of the differences between samples was determined using one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

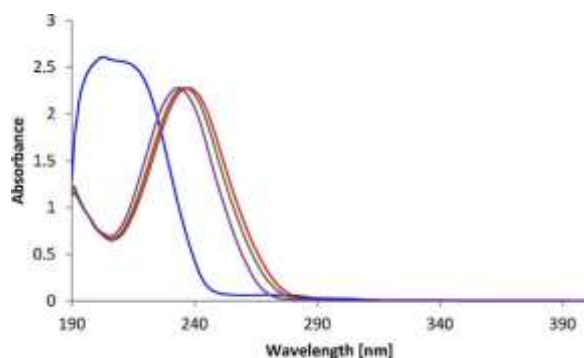
## 3. Results and discussion

### 3.1. Selection of a wavelength for FP quantification

To investigate the possibility of interference from other formulation components, the spectra of FP and the LNCs without FP were recorded. The results show that the spectra of FP in mixtures of water (W) and acetonitrile (ACN) at different volume ratios are similar (Fig. 1). The highest absorbance of UV radiation by FP was observed at approximately 240 nm, and the maximum was slightly shifted towards higher wavelengths as the W/ACN (water/acetonitrile) ratio increased (a bathochromic shift). However, the spectra of supernatants from disrupted LNCs demonstrate that other components of the formulation also exhibited a significant absorbance at 240 nm. Therefore, 250 nm was selected as the wavelength for FP quantification.

### 3.2. Drug factors to be considered in formulation design

Each dosage form requires careful study of the physical and chemical properties of active ingredients to achieve a stable, efficacious product. Previous studies of LNCs (Heurtault et al., 2002;



**Fig. 1.** UV spectra of FP solutions in acetonitrile (violet), water/acetonitrile 1/5 (v/v) (green), water/acetonitrile 1/1 (v/v) (red) and the supernatant from the LNC100 preparation in acetonitrile 1/5 (v/v) (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Huynh et al., 2009; Hirsjarvi et al., 2012) suggest that the following properties may be important: drug solubility, partition coefficient, and thermal stability.

The solubilities of FP in water, an aqueous solution of polyoxyl 15 hydroxystearate and C8/C10-TG are reported in Table 2. FP is practically insoluble in water, in good agreement with its pharmacopeial monograph. While the addition of polyoxyl 15 hydroxystearate led to a 90-fold increase in the solubility of FP 90, according to the pharmacopeial definition FP remained practically insoluble.

Solutol® HS15 (polyoxyl 15 hydroxystearate) consists of polyglycol mono- and di-esters of 12-hydroxystearic acid and approximately 30% free polyethylene glycol. Solutol® is a non-ionic solubilizer and an o/w emulsifying agent with an HLB value between 14 and 16. Solutol is soluble in water, but its solubility decreases with increasing temperature (manufacturer's data). Polyoxyethylene-type non-ionic surfactants become more lipophilic as temperature increased due to the dehydration of polyoxyethylene chains resulting from the breakdown of hydrogen bonds with water molecules (Huynh et al., 2009). Solubility studies (Section 2.2) demonstrated that the cloud point (the temperature at which the surfactant is no longer completely soluble) of polyoxyl 15 hydroxystearate was approximately 63 °C.

FP was slightly soluble in C8/C10-TG. This is in agreement with the data obtained by Doktorová et al. (2010) that the solubility of FP in a wide array of solid and liquid lipids was below 0.3% despite the high lipophilicity of FP. Poorly water-soluble drugs do not necessarily display high lipid solubility. When strong intermolecular binding forces resulting in a high crystal lattice energy are present, drug substances usually have a high melting point and are often not very soluble in either water or oil. Indeed, drugs successfully formulated in emulsions are often characterized by a rather low melting temperature (Bunjjes, 2010). The high melting point of FP (272–273 °C) may explain its relatively low solubility in C8/C10-TG.

Apart from its solubility in oil, partitioning of the drug between the oil and aqueous phases has to be considered during LNC formulation design. The log *P* value defines the ratio at which a drug will dissolve in each phase of an oil-water system, and thus represents a measure of the hydrophobicity of the drug. After mixing C8/C10-TG with water, the upper oil-rich phase became turbid in both the FP sample and the control (C8/C10-TG and water without FP). In the FP sample,  $97.7 \pm 2.3\%$  was detected in the oil phase and only  $0.6 \pm 0.25\%$  was present in the aqueous phase (Table 3). This distribution of FP between the aqueous and oil phases is in agreement with the solubility data. The concentration of FP in the oil phase is approximately 163 times higher than that in water, and the logarithm of the ratio of the concentrations in the solvents, log *P*, is 2.2.

One of the most important aspects of LNC formulations is the chemical stability of the drug. During formulation in LNCs, the drug

**Table 3**

Phase	FP conc [ $\mu$ g/ml]	% of the total amount of FP
Oil	$244 \pm 6$	$97.7 \pm 2.3$
Water	$1.5 \pm 0.6$	$0.6 \pm 0.25$

may be exposed to high temperatures up to 100 °C. As FP does not dissolve in water or in a water–oil mixture and it is mainly present in the oil phase, the stability studies were performed in C8/C10-TG. The UV spectra of FP dissolved in C8/C10-TG before and after heating were superimposable (not shown), indicating that the chemical integrity of FP was maintained. As the conditions of LNC preparation do not induce degradation or structural changes in FP molecules, this drug can be safely encapsulated within LNCs.

### 3.3. Encapsulation of fluticasone propionate in LNCs

Small, homogeneously dispersed LNCs (PDI < 0.01) were successfully obtained (Table 4). The particle diameter was strongly dependent on the proportions of the LNC components as previously reported (Heurtault et al., 2002; Huynh et al., 2009; Hirsjarvi et al., 2012). The amount of the hydrophilic surfactant (polyoxyl 15 hydroxystearate) in the LNCs was the main factor influencing the particle size (Heurtault et al., 2002). Varying the mass ratio of the LNC components (polyoxyl 15 hydroxystearate and C8/C10-TG) yielded particles with sizes ranging between 30 and 100 nm. Formulations with diameters of 30, 60, and 100 nm are named LNC30, LNC60, and LNC100, respectively, and the PDI values of these formulations did not differ significantly. All formulations were characterized by slightly negative zeta potential values between –3.5 and –10.6 mV. LNC100 exhibited a more negative zeta potential than LNC30 ( $p = 0.0166$ ). The negative zeta potential values may be attributed to hydrogenated lecithin, as soy lecithin dispersions in NaCl solutions have been shown to bear negative zeta potentials (Manconi et al., 2003).

The incorporation of FP in LNCs did not change the LNC characteristics. The particle size, polydispersity index and zeta potential of the FP-loaded LNCs were the same as those of drug-free LNCs with the same composition. This may indicate that the drug is uniformly distributed within the core of the LNCs and that there is no significant drug adsorption on the particle surface. The lack of an influence of drug encapsulation on the LNC properties might also be due to the relatively low drug content in the particles (0.05–0.2%). Similar results were obtained by Lamprecht and Benoit (2006) for etoposide-loaded LNCs, where the incorporation of the API did not change either the particle size or the zeta potential of the LNCs (the drug loading for these LNCs was between 0.06% and 0.09%). Comparably, the encapsulation of nilered in lipid nanoparticles (drug loading 0.01–0.1%) did not significantly affect either the surface charge or the size of the carriers (Delmas et al., 2012). In contrast, the encapsulation of ibuprofen significantly affected both the size and zeta potential of the LNCs, leading to a decrease in particle size and an increase in zeta potential. The ibuprofen content in the oil phase was markedly high in these LNCs (20, 100 or 200 mg were dissolved in 993, 913 or 813 mg of C8/C10-TG, respectively) (Lamprecht et al., 2004). The encapsulation of amiodarone in LNCs did not change either the diameter or the size

distribution of the LNCs, although a change in zeta potential was observed (20 mg of amiodarone were dissolved in 0.85–1.23 g of C8/C10-TG) (Lamprecht et al., 2002). Malzert-Fréon et al. (2010) examined the encapsulation of tripartone in LNCs containing the solubility enhancer with the commercial name Labrasol®. At drug-loading levels below 0.5%, the tripartone-loaded LNCs were similar in size to empty LNCs, and drug loading levels between 0.5% and 6.5% significantly increased the particle size, with a linear relationship observed between drug loading and particle size.

The FP-loaded LNCs are the smallest FP carriers described thus far. The nanoparticles produced by Doktorová et al. (2010) were significantly larger, with sizes between 316 and 408 nm. Nirale et al. (2009) described 700–800 nm liposomes with a PDI of 0.1–0.3 as carriers for FP. These liposomes also exhibited higher polydispersity index values (0.45–0.9). Yang et al. (2008) used a wet milling method with glass beads to formulate nanosuspensions of fluticasone and budesonide with a particle size (D90) of 0.4 µm. Chiang et al. (2009, 2010) produced a nanosuspension of fluticasone using a bench scale wet milling (micronization) device with glass beads; the size of the bulk material was reduced from a D50 of 35 to 0.24 µm.

As a satisfactory mass balance was obtained between the encapsulated and non-encapsulated fractions in all cases (100 ± 10%), only the encapsulated % of FP is presented in Table 4. The non-encapsulated fraction constitutes the remainder. The concentration of FP dissolved in the aqueous phase ranged between 1% and 4% of the total amount of FP. The remaining non-encapsulated FP, which comprises most of the non-encapsulated fraction, precipitated and was separated from the LNCs by sedimentation. Among FP-loaded formulations, sediment was observed in all cases with the exception of LNC100FP250. In contrast to polyelectrolyte complex nanoparticles described previously (Umerska et al., 2014a,b, 2015), the excessive amount of the API did not lead to destabilization or change the properties of the LNCs.

The encapsulation efficiency depended on the composition of the nanocarriers and the initial FP concentration. The formulation process was optimized to obtain LNCs with high encapsulation efficiency values up to 97%. High entrapment efficiency (96–97% and 95–98%) was also achieved for nanostructured lipid carriers and liposomes by Doktorová et al. (2010) and Nirale et al. (2009), respectively. The final FP concentration and the drug loading mainly depended on the composition of the formulation. In contrast to encapsulation efficiency, the drug loading did not depend on the initial amount of FP used. The FP concentrations in the LNC30, LNC60, and LNC100 formulations were approximately 0.1, 0.18, and 0.24 mg/ml. The concentration of FP in the LNC100 formulation was similar to the concentration in the manufactured product, Flixotide Nebules (0.5 mg/2 ml), indicating that this level of API encapsulation in the LNCs can be considered satisfactory despite low drug loading. LNC30, LNC60, and LNC100 formulations contain different quantities of C8/C10-TG, indicating that each LNC

Table 4

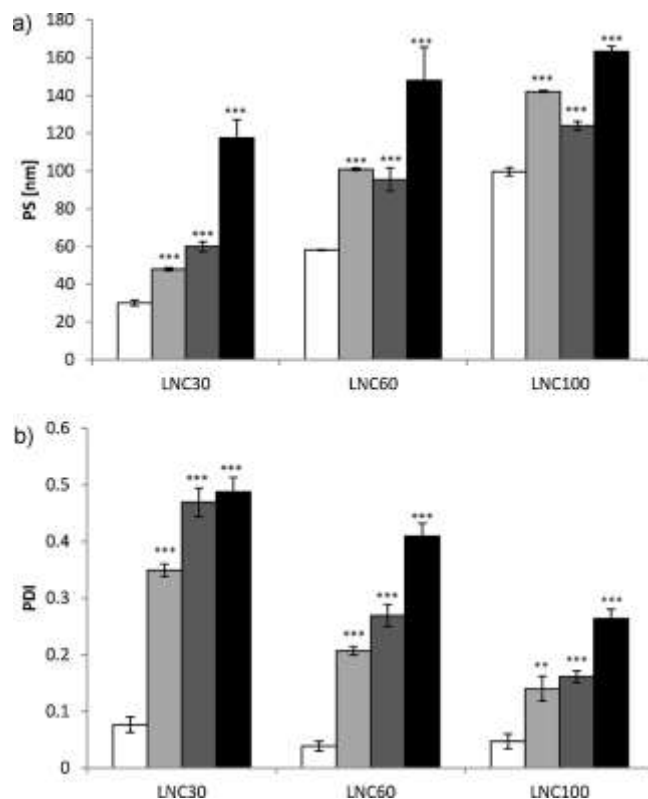
	EE	DL	Final conc. of FP	PS	PDI	ZP
LNC30	0	0	0	30.2 ± 1.5	0.081 ± 0.026	–4.98 ± 1.57
LNC30FP250						
LNC30FP500	38.6 ± 5.0	0.055 ± 0.007	0.097 ± 0.013	28.4 ± 0.3	0.060 ± 0.014	–4.10 ± 0.29
LNC30FP1000						
LNC60	20.8 ± 2.0	0.059 ± 0.006	0.104 ± 0.010	28.2 ± 0.2	0.070 ± 0.028	–3.47 ± 0.58
LNC60FP250						
LNC60FP500	11.1 ± 2.3	0.063 ± 0.013	0.111 ± 0.023	28.9 ± 0.8	0.076 ± 0.014	–4.35 ± 0.76
LNC60FP1000						
LNC100	0	0	0	58.1 ± 0.3	0.038 ± 0.009	–8.61 ± 2.51
LNC100FP250						
LNC100FP500	72.6 ± 7.4	0.103 ± 0.011	0.182 ± 0.019	58.5 ± 2.1	0.035 ± 0.009	–7.32 ± 1.02
LNC100FP1000						
	36.4 ± 4.6	0.103 ± 0.014	0.182 ± 0.022	58.2 ± 1.1	0.045 ± 0.011	–6.78 ± 1.20

formulation is capable of encapsulating a certain quantity of FP depending on the quantity of oil in the formulation. Therefore, the LNC100 formulation has a better encapsulation efficiency than the LNC60 and LNC30 formulations. Samples with higher initial FP concentrations had lower EEs. FP was slightly soluble in C8/C10-TG and practically insoluble in other components of the formulation. Therefore, when the amount of FP exceeded the maximum amount that could be dissolved in C8/C10-TG, the excess FP precipitated. After FP encapsulation, the FP concentration in the C8/C10-TG in the oil phase of the formulations was close to 0.2% (i.e., 2 mg of FP/g of oil), in good agreement with the solubility data. This loading is higher than that in the nanostructured lipid carriers described by Doktorová et al. (2010), who obtained 0.1% loading of FP in the lipid phase. The saturation concentration of many drug molecules (including for hydrophobic drugs) in lipids is known to be relatively low (below 1%) and is further reduced in crystalline lipids (Cipolla et al., 2014). For instance, Nile red was found to crystallize at concentrations above 0.1% in all tested lipid mixtures, and its maximal loading in lipid nanoparticles was found to be approximately 0.1% (Delmas et al., 2012). Lipid nanoparticles and other lipophilic carriers are generally characterized by lower drug loading (0.5–5%) compared with hydrophilic carriers intended for the encapsulation of hydrophilic compounds, where drug loading values up to 50% can be achieved with optimized formulation processes (Umerska et al., 2014a,b).

Lamprecht et al. (2002) examined the influence of particle size (and consequently the composition) on the encapsulation of amiodarone in LNCs. The encapsulation efficiency values obtained were highly similar across LNCs in this study, ranging from  $92.1 \pm 1.3\%$  to  $93.0 \pm 2.5\%$ . This may be due to the different experimental design in this study, in which amiodarone was dissolved prior to the formulation of the LNCs, with the result that amiodarone was sufficiently soluble in the oil phase and the limiting dose was not achieved. The high EE values were attributed to the 'nearly negligible' solubility of amiodarone in water. Similarly, high encapsulation efficiencies in LNCs were obtained for ibuprofen (Lamprecht et al., 2004) due to its low solubility in the external aqueous phase. Tripartone-loaded LNCs were also characterized by a high EE (Malzert-Fréon et al., 2010). High encapsulation efficiencies (between 86.4% and 93.4%) were also observed in etoposide-loaded LNCs (Lamprecht and Benoit, 2006), with 25 nm LNCs characterized by a lower EE than 100 nm LNCs ( $86.4 \pm 3.2\%$  and  $93.4 \pm 2.5\%$  for 25 nm and 100 nm LNCs, respectively). The drug loading in this study (0.058–0.091%) was comparable to our results. In conclusion, the encapsulation of lipophilic compounds in LNCs depends on the solubility of the drug in the oil phase. A high encapsulation efficiency can be obtained if this solubility is not exceeded, with the solubility of the drug in water and the lipid/water partition coefficient also exerting effects. If the quantity of the lipophilic drug in the LNCs is higher than the solubility of the drug in the oil phase, the drug precipitates and phase separation can be observed. The precipitated drug does not influence the properties of the carrier and can be separated by sedimentation. If the solubility of the drug in oil is limited, then formulations containing higher oil/surfactant mass mixing ratios are preferred as they have better loading capacities. Moreover, examining the solubility of the drug in oil and water as well as the oil/water partition coefficient is useful in assessing the drug encapsulation in the LNC formulation.

#### 3.4. Nebulization of the LNCs

The vibrating mesh nebulizer offered important advantages over air-jet and ultrasonic nebulizers for the nebulization of liposomal formulations of iloprost, including high output, protecting the stability of nebulized liposomes, and the production of small

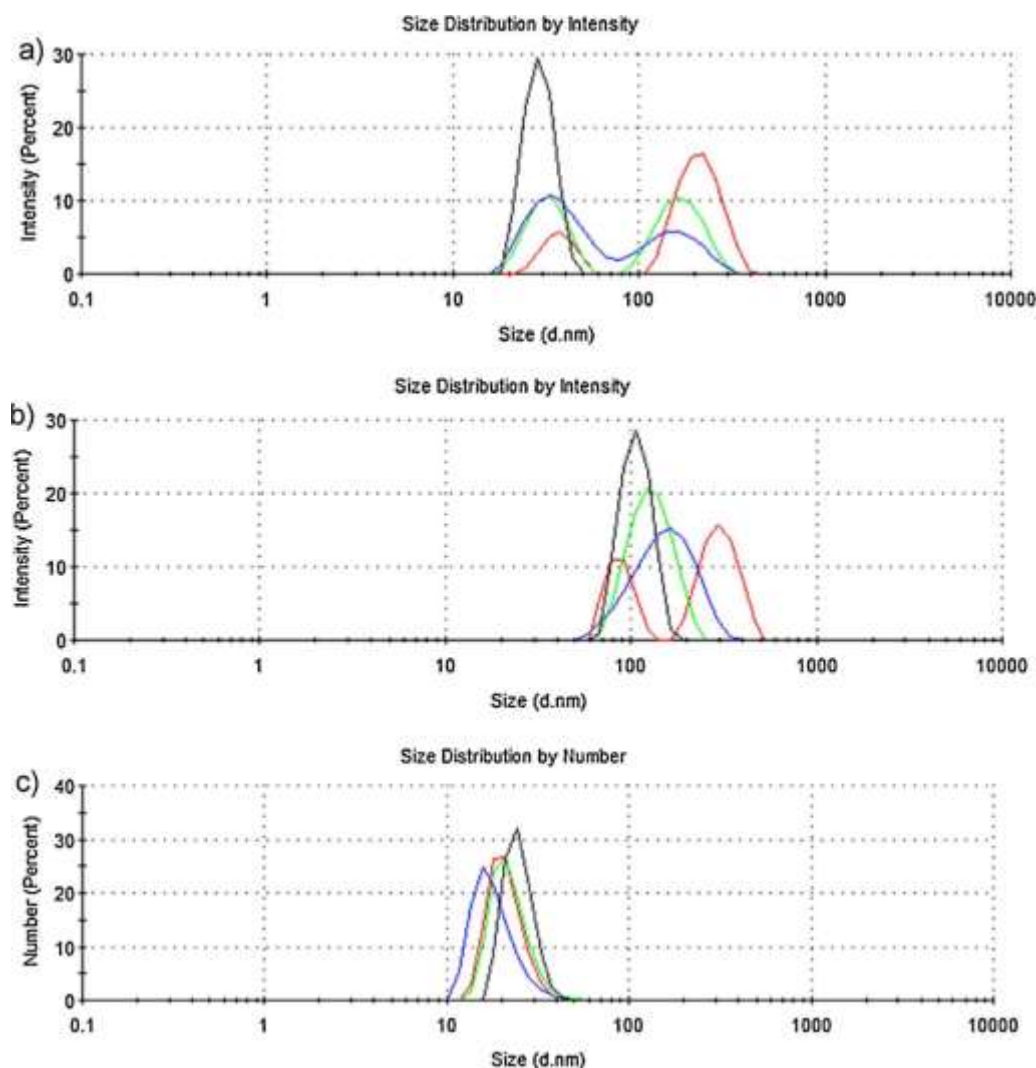


**Fig. 2.** The properties of LNCs before nebulization (white bars) and after nebulization at 177 mg/ml (light grey bars), 17.7 mg/ml (dark grey bars) and 3.54 mg/ml (black bars); (a) particle size and (b) polydispersity index. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and

aerosol droplets (Kleemann et al., 2007). The vibrating mesh nebulizer was selected for the nebulization studies here, as it has previously been shown to perform better than jet or ultrasonic nebulizers (Hureaux et al., 2009).

Neither phase separation nor macroscopic aggregation was observed after the nebulization of the LNC formulations. The zeta potential of the LNCs was the same before and after nebulization (not shown). DLS measurements revealed that the particle size and polydispersity index increased significantly after nebulization (Fig. 2). Surprisingly, the increase in particle size was greater in less concentrated formulations for all LNC compositions tested here. LNC30 were more markedly affected by the nebulization than the other LNCs. The particle size of this formulation increased fourfold after nebulization at a concentration of 3.5 mg/ml, and the size doubled after nebulization at 17.7 mg/ml (Fig. 2a). LNC60 doubled in size after nebulization at concentrations of 17.7 and 177 mg/ml, and increased threefold in size after nebulization at 3.5 mg/ml. The physico-chemical characteristics of LNC100 were best preserved, increasing 40%, 20%, and 60% after nebulization at concentrations of 177, 17.7, and 3.5 mg/ml, respectively, significantly smaller than the increases observed for the other formulations.

Similarly to particle size, the largest increase in polydispersity index was observed for the LNC30 formulations (Fig. 2b). The PDI values increased from less than 0.1 to 0.32–0.51 depending on the concentration. Therefore, after nebulization this formulation can no longer be considered homogeneously dispersed. The polydispersity index of LNC60 also increased after nebulization from less than 0.1 to 0.20–0.27 when nebulized at concentrations of 17.7 or 177 mg/ml, or to 0.41 when nebulized at a concentration of 3.5 mg/ml. The PDI of nebulized LNC100 also increased from less than 0.1 to 0.12–0.14, 0.16–0.17, and 0.27 when nebulized



**Fig. 3.** Size distribution by intensity and number of drug-free LNC formulations before nebulization (black), and after nebulization at 177 mg/ml (blue), 17.7 mg/ml (green), and 3.5 mg/ml (red). Data were processed using Zetasizer software, and the multiple narrow modes (high resolution) model was applied (a) LNC100 size distribution by intensity, (b) LNC60 size distribution by intensity, (c) LNC30 size distribution by intensity, (d) LNC30 size distribution by volume, (e) LNC30 size distribution by number. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

at concentrations of 177, 17.7, and 3.5 mg/ml, respectively. These increases were markedly smaller compared with those observed for LNC30 and LNC60. The results obtained for the LNC60 formulations are in good agreement with the data presented by Hureauux et al. (2009).

As the largest increase in particle size was observed at the lowest concentration tested, FP-loaded LNCs were only nebulized at concentrations of 17.7 and 177 mg/ml. The incorporation of FP did not have any important effect on the properties of nebulized LNCs (not shown).

The intensity distribution curves of the nebulized LNCs most often exhibited a bimodal size distribution, implying that particle aggregation occurred during the nebulization process (Fig. 3). Either 2 or 3 peaks were observed in the size distribution by intensity curves for LNC30 (Fig. 3a) and LNC60 (not shown). The size distribution was bimodal after nebulization of LNC100 at 3.5 mg/ml, but when LNC100 were nebulized at higher concentrations (17.7 and 177 mg/ml) only one peak was observed, indicating that despite an increase in the PDI value, the homogenous size distribution was maintained (Fig. 3b). Therefore the intensity-averaged particle size calculated by the instrument for samples with bimodal or multimodal size distribution is not representative for the

particle population. Fig. 3c shows the number distribution of the entire particle population for LNC30, the properties of which were more affected by nebulization compared with the LNC60 and LNC100 formulations. The intensity of the scattered light ( $I$ ) is proportional to the diameter of the particle to the power 6 ( $d^6$ ) according to the Rayleigh approximation. This  $d^6$  factor means that the total light scattered by small particles is relatively small compared to the amount of light scattered by larger particles. A small number of larger aggregates may be responsible for the larger particle diameter peaks in the intensity distribution. Indeed, the volume and number size distribution graphs show that the size of the majority of the particles did not increase. Similar phenomena were observed by Dailey et al. (2003) for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles and confirmed by microscopic images. PLGA nanoparticles were also prone to aggregation, although the amount of particle aggregation remained generally low (Dailey et al., 2003). The aggregation was attributed to the possible increase in fluid concentration during jet nebulization due to solvent evaporation, the shear forces involved in the generation of the aerosol, and the specific design of the jet nebulizer system, all of which contribute to the higher frequency of particle contact. The tendency towards aggregation was particularly great for particles with



relatively hydrophobic surfaces, with less aggregation observed for nanoparticles with hydrophilic surfaces. Factors increasing the frequency of particle contact may also play a role in the increase in the LNC particle size after nebulization, although the greater increase in particle size when nebulization occurs at lower concentrations implies that other issues need to be considered as well.

In many ways, colloidal particles act in like surfactant molecules in various types of dispersions (Binks, 2002). LNCs have been shown to adsorb at the air/water interface, forming a monolayer (Heurtault et al., 2003; Minkov et al., 2005). At the air/water interface, some of the polyoxyl 15 hydroxystearate molecules are thought to be released from the particle surface, followed by the reorganization of the LNC structure. The spreading of polyoxyl 15 hydroxystearate molecules at air/water interface is slower than that of triglycerides (Heurtault et al., 2003; Minkov et al., 2005). During the nebulization process, the bulk liquid is transformed into an aerosol, which has a far greater air/water interface area compared with bulk liquid. The LNCs adsorb at the increased air/water interface until the surface is fully covered by the particles. As the polyoxyl 15 hydroxystearate molecules are released, the LNCs may fuse and aggregate. This phenomenon could be more pronounced at lower LNC concentrations, where the ratio of the amount of LNCs adsorbed at the air/water interface to the amount of LNCs remaining in the bulk of the liquid or in the water droplet is larger than at higher LNC concentrations, increasing the percentage of LNCs affected by aggregation. Lecithin stabilized the LNC structure, and nanocapsules with greater lecithin content were found to be more stable at the interface compared with the LNCs with lower lecithin quantities (Minkov et al., 2005). This is in agreement with our results on the stability after nebulization of LNC100 > LNC60 > LNC30, corresponding to a decreasing quantity of lecithin in the formulation. As the amount of lecithin is markedly smaller than polyoxyl 15 hydroxystearate or C8/C10-TG, it is likely that two populations of the LNCs exist, one without lecithin molecules and another one with tightly packed lecithin monolayer around the triglyceride core (Minkov et al., 2005). It was previously established (Minkov et al., 2005) that the LNCs without phospholipid molecules lose their mechanical stability and undergo disaggregation at air/water interface leading to the formation of a true monolayer composed of triglycerides from the core of LNCs. In the case of FP-loaded LNCs, the film at the air/water interface of microdroplets may contain some FP molecules. The importance of such effect could depend mainly on the percentage of the LNCs without lecithin in the formulation. The mechanisms of formation and composition of interfacial layer containing intact LNCs and eventually triglyceride and FP molecules depend on the degree of surface saturation. Minkov et al. (2005) performed their experiments on the flat surface of a bulk liquid, and it must be mentioned that the size and the curvature of the surface of aqueous aerosol droplets could affect significantly the diffusion flux of LNCs towards the surface and the amount and composition of the spread material.

In contrast to the conventional microparticle suspensions for nebulization, the nanoparticles in aqueous colloidal dispersions can be more easily incorporated into the respirable fraction of aerosol droplets (Mc Callion et al., 1996). Using the nano-sized dispersion increases the probability that the drug distribution in the droplets is homogenous. Ostrander et al. (1999) demonstrated that 12.5 drug crystals of 200 nm in diameter would be contained in each 2 µm droplet and only 1.25 drug crystals of 2 µm would be contained in each 100 droplets. The mass median aerodynamic diameter of the nebulized LNC aqueous dispersion was  $2.7 \pm 0.1$  µm (Hureaux et al., 2009), therefore the FP within 30–100 nm LNCs is likely to be homogeneously distributed among the droplets.

The encapsulation efficiency after nebulization was the same as before nebulization, indicating that the FP remained associated with the LNCs during the nebulization process. Similarly, no change

**Table 5**

Nebulization time (in minutes) of LNC formulations nebulized at different concentrations. The nebulizer output can be calculated dividing the nebulization time by

LNC concentration	177 mg/ml	17.7 mg/ml	3.54 mg/ml
LNC30	9–10	4–5	3.5–4.5
LNC30FP250			
LNC30FP500	9–10	4–5	–
LNC30FP1000			
LNC60	9–10	4–5	–
LNC60FP250			
LNC60FP500	9–10	4–5	– 3.5–
LNC60FP1000			4.5
LNC100			
LNC100FP250	9–10	4–5	–
LNC100FP500			
LNC100FP1000	9–10	4–5	–

in the drug encapsulation in paclitaxel-loaded LNCs was observed after nebulization (Hureaux et al., 2009). In contrast, the disruption of liposomes and leakage of the encapsulated ciprofloxacin was observed (Finlay and Wong, 1998). In another study by Kleemann et al. (2007), leakage of iloprost was observed from nebulized liposomes (20–70% drug encapsulation post-nebulization), which was accompanied by a decrease in particle size. On the other hand, Hajos et al. (2008) did not observe the release of vasoactive intestinal peptide (VIP) from nebulized liposomes. The VIP molecules were efficiently associated with the liposomal formulation, exhibiting a strong negative surface charge, resulting in electrostatic interactions (Hajos et al., 2008). Therefore, the drug release from the nanocarriers during nebulization may depend on the partition of the drugs between the nanocarriers and the medium. If the drug is lipophilic or if strong interactions occur between the drug and the carrier, the drug remains associated with the carrier. On the other hand, if the drug is encapsulated inside the nanocarrier, as in the case of liposomes, disruption of the carrier structure may induce drug release.

Apart from particle characteristics, stability during nebulization and aerosol characteristics, other important factors such as the output rate should also be considered. Nebulized medications and excipients can change the aerosol output and the nebulization time due to changes in the physico-chemical properties of the solution or suspension, e.g., surface tension, viscosity, and density (Arzhavitina and Steckel, 2010). The study by Hureaux et al. (2009) showed that 3 ml of the 50 nm LNCs were nebulized by the eFlow nebulizer in less than 9 min. This study demonstrated that the nebulization time was not affected by either drug concentration or particle size (Table 5). The nebulization time and the output rate were mainly dependent on the LNC concentration. LNCs at 177 mg/ml were nebulized within 8–10 min, and 10-fold dilution decreased the nebulization time by approximately half.

#### 4. Conclusions

FP was successfully loaded into LNCs, with the encapsulation efficiency found to depend on the quantity of FP added to the formulation and on the composition of the formulation, especially the quantity of the oil (C8/C10-TG). Small, homogeneously dispersed nanocapsules were obtained, and the size could be conveniently modulated by modifying the composition of the sample. The information about the solubility of the drug in oil and water as well as the oil/water partition coefficient can be useful tools to assess the encapsulation of the drug in the LNC formulation.

Although the particle size and size distribution of nebulized LNCs were observed to increase significantly compared with control LNCs before nebulization, nebulization did not lead to the leakage of FP from the formulation. Additionally, despite the

increase in particle size, no phase separation was observed, and most nebulized LNCs were characterized by a small size below 150 nm. A small fraction of larger aggregates was responsible for the increase in the intensity-averaged particle diameter. LNC100 can be considered superior to LNC30 and LNC60, as these particles exhibit a better FP-loading capacity and better stability during nebulization.

### Acknowledgements

This study was funded by Zcube (Italy). Author CRA Mouzouvi was funded by 'Service de Cooperation et d'Action Culturelle' of the French Embassy in Benin and by 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique du Bénin'.

### References

- Arzhavtina, A., Steckel, H., 2010. Surface active drugs significantly alter the drug output rate from medical nebulizers. *Int. J. Pharm.* 384, 128–136.
- Azarmi, S., Roa, W.H., Löbenberg, R., 2008. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 863–875.
- Bailey, M.M., Berkland, C.J., 2009. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med. Res. Rev.* 29, 196–212.
- Beck-Broichsitter, M., Gauss, J., Packhaeuser, C.B., Lahnstein, K., Schmehl, T., Seeger, W., Kissel, T., Gessler, T., 2009. Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an *ex vivo* lung model. *Int. J. Pharm.* 367, 169–217.
- Binks, B.P., 2002. Particles as surfactants – similarities and differences. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 21–41.
- Borgström, L., 2001. The importance of the device in asthma therapy. *Resp. Med.* 95, S26–S29.
- Bunjes, H., 2010. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1637–1645.
- Mc Callion, O.N.M., Taylor, K.M.G., Thomas, M., Taylor, A.J., 1996. Nebulisation of monodisperse latex sphere suspensions in air-jet and ultrasonic nebulisers. *Int. J. Pharm.* 133, 203–214.
- Chiang, P.-C., Hu, Y., Thurston, A., Sommers, C.D., Guzova, J.A., Kahn, L.E., Lai, Y., Blom, J.D., 2009. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the suitability of using fluticasone and an acute rat lung inflammation model to differentiate lung versus systemic efficacy. *J. Pharm. Sci.* 98, 4354–4364.
- Chiang, P.-C., Hu, Y., Blom, J., Thompson, D.C., 2010. Evaluating the suitability of using rat models for preclinical efficacy and side effects with inhaled corticosteroids nanosuspension formulations. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 1010–1019.
- Cipolla, D., Shekunov, B., Blanchard, J., Hickey, A., 2014. Lipid-based carriers for pulmonary products: preclinical development and case studies in humans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75, 53–80.
- Dahl, R., 2006. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir. Med.* 100, 1307–1317.
- Dailey, L.A., Schmehl, T., Gessler, T., Wittmar, M., Grimminger, F., Seeger, W., Kissel, T., 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J. Control. Release* 86, 131–144.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P., 2002. A novel phase-inversion based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Benoit, J.P., Proust, J.E., 2003. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Colloid Surf. B* 30, 225–235.
- Hirsjarvi, S., Bastiat, G., Saulnier, P., Benoit, J.-P., 2012. Evaluation of surface deformability of lipid nanocapsules by drop tensiometer technique, and its experimental assessment by dialysis and tangential flow filtration. *Int. J. Pharm.* 434, 460–467.
- Hureau, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Vecellio, L., Clavreul, A., Roger, E., Kempf, M., Racineux, J.-L., Diot, P., Benoit, J.-P., Urban, T., 2009. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 239–246.
- Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int. J. Pharm.* 379, 201–209.
- Kleemann, E., Schmehl, T., Gessler, T., Bakowsky, U., Kissel, T., Seeger, W., 2007. Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm. Res.* 24, 277–287.
- Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J.-P., 2002. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J. Control. Release* 84, 59–68.
- Lamprecht, A., Saumet, J.-L., Roux, J., Benoit, J.-P., 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* 278, 407–414.
- Lamprecht, A., Benoit, J.-P., 2006. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Control. Release* 112, 208–213.
- Malzert-Fréon, A., Saint-Lorant, G., Hennequin, D., Gauduchon, P., Poulain, L., Rault, S., 2010. Influence of the introduction of a solubility enhancer on the formulation of lipidic nanoparticles with improved drug loading rates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75, 117–127.
- Manconi, M., Aparicio, J., Vila, A.O., Pendás, J., Figueruelo, J., Molina, F., 2003. Viscoelastic properties of concentrated dispersions in water of soy lecithin. *Colloid Surf. A* 222, 141–145.
- Minkov, I., Ivanova, Tz., Panaiotov, I., Proust, J., Saulnier, P., 2005. Reorganization of lipid nanocapsules at air–water interface. I. Kinetics of surface film formation. *Colloids Surf. B* 45, 14–23.
- Nirale, N.M., Vidhate, R.D., Nagarsenker, M.S., 2009. Fluticasone propionate liposomes for pulmonary delivery. *Ind. J. Pharm. Sci.* 71, 709–711.
- Niven, R.W., Schreier, H., 1990. Nebulization of liposomes. I. Effect of lipid composition. *Pharm. Res.* 7, 1127–1133.
- Niven, R.W., Speer, M., Schreier, H., 1991. Nebulization of liposomes. II. The effects of size and modeling of solute release profiles. *Pharm. Res.* 8, 217–221.
- Ostrander, K.D., Bosch, H.W., Bondanza, D.M., 1999. An in-vitro assessment of a NanoCrystal™ beclomethasone dipropionate colloidal dispersion via ultrasonic nebulization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 207–215.
- Sakagami, M., 2006. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1030–1060.
- Sung, J.C., Pulliam, B.L., Edwards, D.A., 2007. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol.* 25, 563–570.
- Tsapis, N., Bennett, D., Jackson, B., Weitz, D.A., Edwards, D.A., 2002. Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *Prot. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12001–12005.

## Thèse de Doctorat

Celia Rosemonde Ablavi MOUZOUVI

Microbulles de gaz comme vecteurs de médicament

Microbubbles of gas as drug carriers

### Résumé

Nous proposons dans cette thèse une étude sur la stabilisation de microbulles d'air dispersées en solution aqueuse par des nanocapsules lipidiques (NCL). L'objectif est le développement d'un système de libération d'actifs pharmaceutiques provoquée par l'application d'un champ ultrasonore adéquat. Préalablement, est évaluée la potentialité des NCL à se comporter comme de vrais agents de stabilisation interfaciale air/eau. Les NCL sont capables de diminuer la tension de surface plus que le Solutol®, principal surfactif pégylé rentrant dans leur composition.

La méthode d'agitation mécanique s'est révélée la mieux adaptée pour formuler des microbulles d'air stabilisées. Les microbulles générées ont une taille moyenne inférieure à  $2\mu\text{m}$  avec une concentration de  $2,72 \cdot 10^{12}$  /mL. La distribution de taille est assez homogène avec un indice de polydispersité acceptable. Le ratio d'incorporation d'air dans les bulles est de 0,17. Les microbulles sont entourées d'un film constitué principalement de Solutol® et de Lipoïd®. En dispersion aqueuse, la stabilité des bulles à température ambiante ( $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) est maintenue jusqu'à 7 jours au moins. Le fusidate sodique utilisé comme actif pharmaceutique modèle et comme traceur est encapsulé avec un taux de 27-35%. Un taux de libération de 40-50% est obtenu dans des conditions normales de libération. Ce pourcentage atteint 50-55% après application d'ultrasons.

### Mots clés

Nanocapsules lipidiques, microbulles d'air, fusidate sodique, tension de surface, stabilisation interfaciale air/eau, particules colloïdales

### Abstract

This work deals with the stabilization of air microbubbles dispersed in aqueous solutions by using Lipid NanoCapsules (LNC). The main objective is the development of a Drug Delivery System where the release is triggered by ultrasonation. Firstly, we investigated the ability of LNC to behave as real air/water interfacial stabilization agents. It is shown that LNC can decrease the surface tension at the air/water interface more than the Solutol®, main pegylated surfactant of the LNC.

Usual stirring method seems the more efficient to produce stabilized air microbubbles. Microbubbles are characterized by a mean size below  $2\mu\text{m}$  and are concentrated at  $2,72 \cdot 10^{12}$  /mL. The size distribution is homogeneous with a convenient polydispersity index. The gas holdup inherent to the microbubbles was estimated to 0.17. Microbubbles are surrounded by a film constituted by Solutol® and Lipoïd®. Their stability at room temperature was kept up to 7 days. Sodium Fusidate was chosen as a drug model with an encapsulation rate in a 27-35% range. The drug release upon ultrasound was between 50-55 % in comparison with 40-50 % without ultrasounds focusing.

### Key Words

Lipid nanocapsules, microbubbles of air, sodium fusidate, surface tension, interfacial air/water stabilization, colloidal particles.