



Développement de nanovecteurs multicompartimentaux à base de cyclodextrines amphiphiles et de lipides pour des applications en nanomédecine

Leïla Zerkoune

► To cite this version:

Leïla Zerkoune. Développement de nanovecteurs multicompartimentaux à base de cyclodextrines amphiphiles et de lipides pour des applications en nanomédecine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114837 . tel-02954352

HAL Id: tel-02954352

<https://theses.hal.science/tel-02954352>

Submitted on 1 Oct 2020

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
ÉCOLE DOCTORALE :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2014-2015

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée
À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI
par
ZERKOUNE Leïla

**Développement de nanovecteurs multicompartimentaux à
base de cyclodextrines amphiphiles et de lipides pour des
applications en nanomédecine**

Soutenue le : 29 septembre 2015

Rapporteur :	Dr Muriel Blanzat
Rapporteur :	Pr David Landy
Examineur :	Pr Amélie Bochot
Examineur :	Pr Denis Wouessidjewe
Directeur de thèse :	Dr Sylviane Lesieur
Co-directeur de thèse :	Dr Angelina Angelova

***A la famille ZERKOUNE :
Lakhdar, Zouina, Hassane, Abbas, Samir, Sabrina, Sonia, Lyam et Yannis***

REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Pr David Landy et Dr Muriel Blanzat pour avoir accepté la charge d'être rapporteurs malgré leur emploi du temps très chargé.

Je souhaite remercier le Dr Sylviane Lesieur qui m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir donnée la chance de travailler dans un domaine aussi riche que complexe ainsi que le Dr Angelina Angelova qui a co-encadré cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble de l'équipe de *Physico-chimie des Systèmes polyphasés* :

A Vincent, Claudie et François-Xavier pour votre aide, votre soutien et les déjeuners très récréatifs. Merci à toi en particulier FX pour ta disponibilité, ton aide notamment sur l'utilisation d'Excel et le temps passés sur de nombreux calculs.

Aux anciens ou actuels doctorants: Bouchera et Eloïsa pour leur gentillesse et leur sens de l'écoute, Benoît pour m'avoir conseillé notamment d'anticiper l'écriture de la partie expérimentale et Boris, pour m'avoir réconforté en me disant qu'il avait également eu des difficultés pour la rédaction de son manuscrit.

Je tiens aussi à remercier :

Mon ancien collègue de bureau : David Chaperon pour son aide et pour m'avoir supporté le radiateur et moi pendant 3 ans,

Fanny pour m'avoir proposé son aide et soutenu pendant les derniers moments de rédaction,

Jean-Jacques pour m'avoir aidé pour la mise en route de plusieurs manips,

Le Dr Jean-Luc Puteaux (CERMAV, Grenoble) pour votre disponibilité et l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Enfin, je souhaite également exprimer ma plus profonde gratitude aux personnes qui me sont le plus chères :

Tout d'abord : Un grand Merci à mes parents et plus particulièrement à ma mère pour m'avoir soutenu et poussée à aller si loin. Vous m'avez encouragé et donné l'envie d'apprendre.

A mes trois grands frères : Hassane et Abbas pour vos cours particuliers en maths et en physique-chimie, à Samir, son épouse Sonia et leurs deux merveilleux enfants, Lyam et Yannis qui m'ont appris à relativiser et à me détendre dans mes nombreux moments de stress.

Un merci particulier à ma sœur Sabrina qui m'a toujours, toujours soutenu et aidé à la mise en page de plusieurs rapports et notamment de ce manuscrit.

AVANT-PROPOS

Les travaux qui ont été menés durant cette thèse s'inscrivaient dans le cadre du projet ANR CYDEXCAR (Nanosciences-Blanc SIMI 10, 2011) coordonné par Denis Wouessidjewe (Université Grenoble I, Joseph Fourier). Ce projet consistait à étudier les nanoassemblages à base de cyclodextrines bioestérifiées pour des applications potentielles en nanomédecine.

Les objectifs du projet CYDEXCAR étaient les suivants :

- Synthétiser des quantités substantielles de cyclodextrines amphiphiles par biotransestérification enzymatique, les caractériser sur le plan physicochimique et vérifier leur capacité d'auto-assemblage.
- Elaborer des nanosystèmes : i) des nanoparticules à base de bêta- et gamma-CD-C10 de première génération (vecteurs passifs); ii) décoration surfacique de vecteurs passifs pour les rendre furtifs et prolonger leur temps de résidence vasculaire, ensuite attacher un ligand de reconnaissance tissulaire; iii) nanoparticules hybrides, bi- et multicompartimentées à base de beta- ou gamma-CD-C10 / lipides.
- Caractériser la morphologie des nanosystèmes et résoudre leur ultrastructure afin de tirer des enseignements pour la formulation.
- Etudier le devenir in vivo des nanoparticules blanches et chargées en principe actif : biodistribution, furtivité, tolérance et profil toxicologique.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale **1**

Références Bibliographiques **6**

Partie 1 : Bibliographie **10**

Notions **11**

Les cyclodextrines **12**

1. Les cyclodextrines natives **12**

1.1. Propriétés structurales des cyclodextrines **12**

1.2. Applications des cyclodextrines **14**

2. Les cyclodextrines modifiées **15**

2.1. Les cyclodextrines conjuguées à des polymères **18**

2.2. Les cyclodextrines modifiées par greffage de résidus hydrophobes : les cyclodextrines amphiphiles **21**

2.3. Cyclodextrines amphiphiles obtenues par bioestérification **22**

3. Les systèmes mixtes cyclodextrines amphiphiles/lipides **26**

Revue : Nano-Assemblies of Modified Cyclodextrins and Their Complexes with Guest Molecules: Incorporation in Nanostructured Membranes and Amphiphile Nanoarchitectonics Design **27**

Références bibliographiques **53**

Les lipides **63**

1. Les lipides **63**

1.1. Généralités **63**

1.2. Les phosphatidylcholines dont la 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine ou DMPC **69**

1.3. Le 1-monooléyl-rac-glycérol ou monooléine **74**

1.4. Les lipides solubles non-ioniques de classe IIIA **78**

Références Bibliographiques **80**

PARTIE 2 : MATÉRIELS, TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES **83**

Matériels, techniques et méthodologies **84**

1. Matériels **84**

2. Diffusion quasi-élastique de la lumière **84**

2.1. Principe **84**

2.2. Méthodologie **85**

3. Spectroscopie de fluorescence et FRET	85
3.1. Principe et rappels théoriques	85
3.1.2 Phénomène de FRET	87
3.2. Fluorophores utilisés	89
3.3. Conditions expérimentales et méthodologies	94
4. Turbidimétrie et expériences de solubilisation des nanosphères de β CD-C10	98
4.1. Principe de la mesure de turbidité en continu	98
4.2. Construction du diagramme d'état	100
4.3. Préparation des échantillons et méthodologie	105
5. Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET)	108
5.1. Principe	108
5.2. Méthodologie	109
5.3. Echantillons pour les observations en Cryo-MET	109
6. Microscopie confocale de fluorescence	112
6.1. Principe	112
6.2. Méthodologie	113
6.3. Echantillons pour les observations en Microscopie confocale de fluorescence	113
7. Microscopie optique à contraste de phase	113
7.1. Principe	113
7.2. Méthodologie	114
8. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	115
8.1. Principe	115
8.2. Méthodologie	116
9. Diffraction des rayons X	117
9.1. Principe	117
9.2. Appareil de mesure	118
9.3. Echantillons et Méthodologie	120
10. Spectrophotométrie d'absorption UV-Visible	120
10.1. Caractérisation du colorant OR en milieu micellaire	121
10.2. Etude des systèmes MO/P80/OR/ β CD-C10	122
Références Bibliographiques	134
PARTIE 3: RÉSULTATS	136
PUBLICATIONS	137
<i>Publication n°1 : Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées et de tensioactifs</i>	138
<i>Publication n° 2 : Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées, de monooléine et de polysorbate 80</i>	182

ÉTUDES DE L'INTERACTION PHOSPHOLIPIDE/CYCLODEXTRINE AMPHIPHILE – SYSTÈME DMPC/βCD-C10	217
1. Systèmes mixtes DMPC/βCD-C10 hydratés à 80% en masse d'eau	219
1.1 Expériences de DSC	219
1.2 Expériences de Diffraction des Rayons X	220
1.3 Bilan DSC-Diffraction des rayons X et principales conclusions	224
2. Obtention de vésicules mixtes DMPC/βCD-C10 de dimensions colloïdales	226
3. Conclusions	231
<i>Références Bibliographiques</i>	232
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	233
ANNEXES	239
Communications lors de congrès scientifiques	240
Articles publiés	241
ARTICLE	242
Bioesterified polysubstituted-cyclodextrin/surfactant nanoparticles obtained by multilevel self-assembly.	242

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Figure 1. Exemples d'applications potentielles des cyclodextrines (CDs)	2
Figure 2. Schéma récapitulatif de la stratégie mise en place pour répondre au sujet de la thèse	5
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE	
LES CYCLODEXTRINES	12
Figure 1.1 - Structure des cyclodextrines natives les plus courantes (A) α -cyclodextrine, (6 unités glucopyranose) (B) β -cyclodextrine, (7 unités glucopyranose), (C) γ -cyclodextrine, (8 unités glucopyranose)	12
Figure 1.2 - Représentation schématique des différentes stœchiométries classiquement rencontrées pour les complexes d'inclusion de cyclodextrines	13
Figure 1.3 - Propriétés des cyclodextrines exploitant la capacité d'inclusion de substances invitées	14
Figure 1.4 - Principales applications des cyclodextrines	15
Figure 2.1 - Groupes hydroxyle réactifs d'une unité glucopyranose d'une molécule de cyclodextrine	15
Figure 2.2 - Stratégies de modification chimique des cyclodextrines dans le domaine du transport ou de la vectorisation de substances actives	16
Figure 2.3 - Structure de composés formés par association de cyclodextrines (CDs) à des polymères	18
Figure 2.4 - Nano-assemblages de cyclodextrines conjuguées à des polymères utilisées pour la vectorisation de principes actifs. A : nanosphère, B : vésicule, C : nanogel, D : micelle	19
Figure 2.5 - Représentation schématique des cyclodextrines amphiphiles	22
Figure 2.6 - Synthèse de la β CD-C10 catalysée par la thermolysine	23
Figure 2.7 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de β CD-C10 substituées par des chaînes de longueurs allant de C6 à C14	24
Figure 2.8 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules d' α CD-C10 (a), β CD-C10 (d) et γ CD-C10 (c)	24
Figure 2.9 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de β CD-C10 avec différents degrés de substitution: (a) 3.8, (b) 5.3, et (c) 6.6. Barre d'échelle : 100 nm	25
LES LIPIDES	63
Figure 1.1 - Classification des lipides d'origine naturelle	63
Figure 1.2 - Représentation de structures de lipides non polaires et polaires	64
Figure 1.3 - Formation de micelles dans un environnement polaire	66
Figure 1.4 - Caractéristiques géométriques impliquées dans le paramètre d'empilement $P=V/aL$	67

Figure 1.5 - Paramètre d'empilement P et topologie de l'organisation des assemblages lipidiques	68
Figure 1.6 - Formation des glycérophospholipides et entités liées au groupement polaire : exemple des lipides d'origine naturelle	69
Figure 1.7 - Diagramme de phase binaire de la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC)	70
Figure 1.8 - Profils de DSC, de SAXS et de WAXS de DPPC en excès d'eau (80 % masse) enregistrés à une vitesse de chauffage de 0,5°C/min	71
Figure 1.9 - Structure de la DMPC	72
Figure 1.10 - Profil de l'enregistrement par calorimétrie (ou enthalpimétrie) différentielle à balayage (DSC) des transitions thermiques d'un échantillon de DMPC en excès d'eau (80 % masse) enregistré à une vitesse de chauffage de 2°C/min	72
Figure 1.11 - Mécanisme de formation des liposomes à partir d'un film	73
Figure 1.12 - Structure du 1-monooléyl-rac-glycérol	74
Figure 1.13 - Diagramme de phase de la monooléine en fonction de la teneur en eau et de la température	74
Figure 1.14 - Structure des différentes mésophases bicontinues inverses	75
Figure 1.15 - Structure des différentes mésophases formées par la monooléine hydratée	76
Figure 1.16 - Images obtenues par cryo-MET de cubosomes de phytantriol (A) et B) d'un mélange de glycérol monooléate/Poloxamer 403 (92 /8 m/m)	76
Figure 1.17 - Exemple de cubosomes montrant les compartiments permettant l'encapsulation de principes actifs	77
Figure 1.18 - Structure et caractéristiques des tensioactifs non-ioniques utilisés au cours des travaux de thèse	78
Figure 1.19 - Diagramme de phase schématique binaire tensioactif non-ionique/eau en fonction de la température	79

PARTIE 2 : MATÉRIELS, TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES

Figure 3.1 - Schéma simplifié du phénomène de fluorescence	86
Figure 3.2 - Diagramme simplifié du phénomène de FRET	88
Figure 3.3 - Structure chimique et caractéristiques du Rouge de Nile (RN)	89
Figure 3.4 - Spectres et propriétés de fluorescence du Rouge de Nile dans divers solvants de polarités différentes	90
Figure 3.5 - (a) Spectres d'absorption du Rouge de Nile dans l'eau (i) et en présence de β CD et (b) spectres d'absorption du Rouge de Nile dans l'eau (i) et en présence de γ CD	91
Figure 3.6 - Caractéristiques spectrales du Rouge de Nile en milieu aqueux contenant des cyclodextrines	91
Figure 3.7 - Spectres d'émission de fluorescence normalisés du Rouge de Nile à 2.10^{-6} M dans du tampon Tris-HCl à pH 7,4 incorporé dans vésicules de DMPG ou de DMPC, en présence ou non de β -cyclodextrine	92
Figure 3.8 - Structure chimique et caractéristiques de l'hydrochlorure d'acriflavine	93
Figure 3.9 - Spectres d'excitation et d'émission de l'hydrochlorure d'acriflavine dans l'eau	93

Figure 3.10 - Récapitulatif des compositions des échantillons analysés par spectroscopie de fluorescence	96
Figure 3.11 -Schéma de l'extrudeur utilisé pour préparer des liposomes	97
Figure 4.1 - Dispositif expérimental de mesure de turbidité en continu	99
Figure 4.2 - Evolution de la turbidité des nanoparticules de β CD-C10 en fonction du temps	101
Figure 4.3 - Détermination des évènements et des tangentes locales encadrant les ruptures de courbes de turbidité	102
Figure 4.4 - Diagramme d'état DM/ β CD-C10 en excès d'eau	103
Figure 4.5 - Représentation des lois de variation du DM au sein des assemblages mixtes DM/ β CD-C10 en fonction de la fraction molaire du DM dans la phase aqueuse	105
Figure 4.6 - Schéma du procédé de préparation des nanoparticules de β CD-C10 par nanopréciipitation	106
Figure 4.7 - Représentation de la distribution du diamètre hydrodynamique (A, axe de droite) et de la fraction cumulée (B, axe de gauche) des nanoparticules de β CD-C10 par DQEL	106
Figure 4.8 - Diamètres hydrodynamiques des agrégats formés à la fin de chaque expérience de solubilisation	108
Figure 5.1 - Profils de DQEL des objets contenus dans les échantillons analysés par cryo-MET à 25°C	111
Figure 6.1 - Schéma d'un microscope confocal de fluorescence	112
Figure 7.1 - Images de microscopie optique à contraste de phase des échantillons dont les compositions sont répertoriées dans le tableau 7.1	115
Figure 8.1 - Thermogrammes de DMPC et d'un mélange DMPC/ β CD-C10 (96/4 mol%) hydratés à 80 % en masse	117
Figure 9.1 - Principe de la diffraction de rayons X selon la loi de Bragg représentant le chemin optique des rayons X se diffractant sur un échantillon cristallin avec l'angle θ correspondant à l'angle d'incidence du rayonnement sur les plans atomiques de l'échantillon	118
Figure 9.2 - Représentation schématique du montage de diffraction de rayons X du laboratoire	119
Figure 10.1 - Structure chimique et caractéristiques de l'Oil Red	120
Figure 10.2 - Caractéristiques spectrales du colorant Oil Red (OR) dans différents milieux	121
Figure 10.3 - Spectres d'absorbance des micelles de P80 à 0,12 mM avec (courbe verte) et sans (courbe noire) Oil Red (OR) à 6.10^{-3} mM et de l'OR après soustraction du spectre d'absorbance référence des micelles de P80 seules (courbe rouge)	122
Figure 10.4 - Profils de DQEL des objets contenus dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C	125
Figure 10.5 - Diamètres hydrodynamiques moyens (D_h) des nanoagrégats de MO/P80 à 5 mol% et de MO/P80 5 mol%/ β CD-C10 mol% en présence de quantités croissantes d'OR (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mol%)	126
Figure 10.6 - Spectres UV-Visible de l'OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C	127
Figure 10.7 - Spectres UV-Visible de l'OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C	128
Figure 10.8 - Spectres UV-Visible de l'Oil Red (OR) à différentes concentrations dans de l'éthanol à 25°C	128
Figure 10.9 - Courbe étalon de l'OR dans l'éthanol. Les densités optiques sont celles relevées à 516 nm	129

Figure 10.10 - Représentation de la composition molaire réelle en OR dans les échantillons en fonction de la composition molaire théorique en OR **130**

Figure 10.11 - Spectre d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/ β CD-C10 et MO/5 mol% P80/ β CD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% **131**

Figure 10.12 - Spectre d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/ β CD-C10 et MO/5 mol% P80/ β CD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% **131**

Figure 10.13 - Spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/ β CD-C10 et MO/5 mol% P80/ β CD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% **132**

Figure 10.14 - Spectres d'absorbance corrigés des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et spectres d'absorbance corrigés des échantillons MO/5 mol% P80/ β CD-C10 et MO/5 mol% P80/ β CD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% **132**

Figure 10.15 - Densités optiques de l'OR au maximum d'absorption relevé à 524 nm sur les spectres corrigés en fonction de la concentration en OR réellement extraite dans les nanoagrégats **133**

PARTIE 3 : RÉSULTATS

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées et de tensioactifs **138**

Figure 1. Chemical structures of the studied amphiphilic building blocks and fluorescent molecules **143**

Figure 2. Possible topologies of mixed nano-objects formed by self-assembly of surfactant and amphiphilic cyclodextrin β CD-nC10 molecules with indicated probable locations of the lipophilic probe Nile red in the interfacial region of the supramolecular nanoassemblies **144**

Figure 3. (A) Fluorescence excitation and emission spectra of Nile red in polysorbate 80 (P80) micellar solutions with concentration equal to CMC_{x10}. (B) Size distribution plotted from intensity measurements by quasi-elastic light scattering of the amphiphilic nano-objects formed in the self-assembled mixture of Nile red (NR) and micelles of P80 at concentration equal to CMC_{x10} **148**

Figure 4. (A) Fluorescence emission spectra of Nile red in mixed nano-objects formed in the NR/ β CD-nC10/DDM self-assembled mixture in excess aqueous phase. (B) NR/ β CD-nC10/DDM nanoassembly size distribution plotted from intensity measurements by the QELS method **149**

Figure 5. Image of NR/ β CD-nC10/P80 mixed self-assembled objects acquired by confocal fluorescence microscopy **150**

Figure 6. FRET experiments in nanostructured medium of NR/DDM micellar assemblies. The fluorescence intensity I₀/I ratios are determined at progressively increasing concentrations of the acceptor dye Nile red, [NR], at a constant donor dye (acriflavine) concentration in the aqueous phase **152**

Figure 7. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) from acriflavine (donor) to Nile red (acceptor) in (A) NR/ β CD-nC10/P80, (B) NR/ β CD-nC10/DDM, and (C) NR/ β CD-nC10/Brij®98 self-assembled nano-objects dispersed in excess aqueous phase **153**

Figure 8: Variations of the optical density (OD) determined at $\lambda=400$ nm during continuous addition of surfactant micellar solutions to β CD-nC10 nanospheres. (A) P80 micellar phase; (B) DDM micellar phase, and (C) Brij®98 micellar phase. Left panels: Turbidity curves measured at different initial concentrations of β CD-nC10 nanospheres

156

Figure 9 : Solubilization state diagrams of [CD] versus [P80] (A), [DDM] (B), or [Brij®98] (C) constructed from the break points of the solubilization curves of the β CD-nC10

158

Figure 10. Cryo-TEM images of self-assembled nano-objects (namely tubular and vesicular bilayer assemblies or multicompartiment objects with nanoporous multilamellar shells) formed in mixed NR/ β CD-nC10/Brij®98 and NR/ β CD-nC10/DDM systems

160

Figure S1. Schematic presentation of the thin film method for β CD-nC10/surfactant and NR/surfactant/ β CD-nC10 nanoparticles synthesis through hydration of β CD-nC10 or β CD-nC10/NR films by micellar surfactant solutions (degree of β -CD substitution $n=7.3$)

168

Figure S2. Principle of the nanoprecipitation method for β CD-nC10 ($n=7.3$) nanosphere synthesis

168

Figure S3. Comparison of size distributions plots (determined from intensity measurements by quasi-elastic light-scattering) of amphiphilic nano-objects formed in self-assembled mixtures of Nile red (NR) and micelles of polysorbate 80 (P80), n-dodecyl- β -D maltoside (DDM), and Brij®98: (A) NR/P80, (B) NR/DDM, and (C) NR/Brij®98

169

Figure S4. Comparison of size distributions plotted from intensity measurements of multicomponent (A) NR/ β CD-nC10/P80, (B) NR/ β CD-nC10/DDM, and (C) NR/ β CD-nC10/Brij®98 nano-objects obtained by self-assembly

170

Figure S5. Comparison of fluorescence excitation and emission spectra of Nile red in (A) polysorbate 80 (P80), (B) n-dodecyl- β -D maltoside (DDM), and (C) Brij®98 micellar solutions with concentrations equal to $CMC \times 10$ (see Table S1 for the CMC values of the surfactants)

171

Figure S6. Fluorescence spectra of Nile red (normalized plots) in solvents with different polarities

172

Figure S7. Comparison of the normalized spectra of Nile red fluorescence emission in solvents with different polarities and the corresponding spectra in three types of micellar solutions

173

Figure S8. Comparison of fluorescence emission spectra of Nile red in mixed nano-objects formed by (A) NR/ β CD-nC10/P80, (B) NR/ β CD-nC10/DDM, and (C) NR/ β CD-nC10/Brij®98 self-assembled mixtures in excess aqueous phase

174

Figure S9. Comparison of the normalized emission and excitation spectra of Nile red and acriflavine in nanostructured micellar environment (polysorbate 80)

175

Figure S10. Methodological rationale of the FRET experiments with a plot demonstrating the overlapping spectra of the fluorescence emission of acriflavine and the absorption of Nile red in nanostructured micellar environment (polysorbate 80)

175

Figure S11. Further details of the methodology of the FRET experiments, in which the intensity I_0/I ratios are determined from fluorescence intensities measurements at progressively increasing concentrations of the acceptor dye Nile red, [NR], at a constant donor dye (acriflavine) concentration

176

Figure S12. FRET efficiency plots showing the intensity I_0/I ratios versus the Nile red (RN) molar percent quantity (mol%) in micellar solutions of P80, DDM and Brij®98 177

Figure S13. FRET efficiency plots showing the intensity I_0/I ratios versus the β CD-nC10 (CD) molar percent quantity (mol%) in micellar solutions of P80, DDM and Brij®98 at a constant content of Nile red (2 mol%) 177

Figure S14. Dependence of the wavelength of the maximal fluorescence emission (λ_{max}) on the β CD-nC10 (CD) content in the nano-objects 177

Figure S15. Determination of the compositions of the mixed nano-aggregates studied by cryo-TEM imaging from the solubilization state diagrams of [β CD-nC10] versus [P80] (A), [DDM] (B), or [Brij®98] (C) measured from optical density (OD) data at $\lambda=400$ nm during continuous addition of surfactant micellar phases to β CD-nC10 nanospheres. 178

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées, de monooléine et de polysorbate 80 182

Figure 1. Chemical structures of the amphiphilic biotransesterified cyclodextrin derivative β CD-nC10 (degree of substitution by decanoate chains $n=7.3$), the lyotropic nonlamellar monoglyceride lipid monoolein (MO), and the detergent polysorbate 80 (P80) 187

Figure 2. Cross-polarised optical microscopy (POM) images of liquid crystalline lipid membranes of monoolein (MO) containing 4 mol% β CD-nC10 (A). (B) Nondispersed MO/P80/ β CD-nC10 membranes (4 mol% β CD-nC10) with added 15 mol% guest hydrophobic substance Oil red (OR) with regard to the lipid constituent MO 190

Figure 3. Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) image of self-assembled MO/P80/ β -CD-nC10 nanocarriers, involving 4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content, obtained upon dispersion of the lyotropic amphiphilic mixture in the presence of 15 mol% P80 surfactant agent with regard to the nonlamellar lipid MO 191

Figure 4. Cryo-TEM images of self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β -CD-nC10 nanocarriers (4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) produced through dispersion using 10 mol% P80 surfactant additive with regard to the nonlamellar lipid MO 192

Figure 5. Cryo-TEM images of self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β -CD-nC10 nanocarriers obtained upon amphiphile dispersion in the presence of 5 mol% P80 surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO 193

Figure 6. Synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) patterns of (A) MO/P80 (5 mol% P80) and (B) MO/P80/ β CD-nC10 (5 mol% P80; 4 mol% β CD-nC10 deep cavitand) nanocarriers in the presence and absence of loaded hydrophobic guest substance Oil red (OR) at 25 °C 195

Figure 7. (A) Quasi-elastic light scattering (QELS) results showing an exemplary bimodal distribution of hydrodynamic particle diameters in MO/P80 or MO/P80/ β -CD-nC10 dispersed systems loaded with Oil red (OR). (B) Dependence of the hydrodynamic diameter on the molar content of OR 198

Figure 8. Optical density (OD) plots derived from recording of UV-Vis spectra of Oil red (OR) solubilized in aqueous dispersions of MO/P80 and MO/P80/ β CD-nC10 nanostructured carriers 199

Figure 9. Comparison of the UV-Vis spectra of Oil red in an environment constituted of monoolein (MO), polysorbate 80 (P80) and β -CD-nC10 with those of OR in organic solvents of variable polarities 200

Figure 10. (A) UV-Vis spectra of OR measured after dissolution of the nanocarrier formulations (100 μ L) in ethanol solvent; (B) Standard calibration plot (absorbance versus OR concentration) used for quantification of the nanoencapsulated OR in MO/P80 and MO/P80/ β CD-nC10 prepared from mixed films containing 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mol% OR with regard to the nonlamellar lipid MO **201**

Figure S1. Chemical structure of Oil red O (OR): 1-[2,5-Dimethyl-4-(2,5-dimethylphenylazo) phenylazo]-2-naphthol **209**

Figure S2. Nano-object hydrodynamic diameter measurements by quasi-elastic light scattering presented as intensity and volume distribution plots for self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β CD-nC10 nanocarriers (4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) produced through dispersion by 15 mol% P80 surfactant additive with regard to the nonlamellar lipid MO **210**

Figure S3. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/P80 nanocarriers obtained upon lipid film dispersion in the presence of variable quantities of surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO **210**

Figure S4. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/P80/ β CD-nC10 nanocarriers (4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) produced upon dispersion of a mixed film in the presence of variable quantities of surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO **211**

Figure S5. Nano-object hydrodynamic diameter measurements by quasi-elastic light scattering presented as intensity and volume distribution plots for self-assembled MO/5 mol% P80 and MO/5 mol% P80/ β CD-nC10 nanocarriers (4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) encapsulating variable quantities of hydrophobic guest substance Oil red **211**

Figure S6. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/5 mol% P80/OR nanocarriers produced upon dispersion of a mixed amphiphilic film **212**

Figure S7. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/5 mol% P80/ β CD-nC10/OR nanocarriers (4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) produced upon dispersion of a mixed film encapsulating guest OR dye with regard to the lipid MO **213**

Figure S8. Optical density versus concentration curves of oil red (OR) dissolved in ethanol solvent. Standard plot for determination of the molar extinction coefficient of OR ($\epsilon=26994 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) at $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$ **214**

Figure S9. Relationship between the theoretical molar percentage of nanoencapsulated Oil red (OR) in MO/5 mol% P80 assemblies and MO/5 mol% P80/ β CD-nC10/OR nanocarriers (at 4 mol% β CD-nC10 deep cavitand content) versus the experimentally determined values of nanoencapsulated OR **215**

Études de l'interaction Phospholipide/Cyclodextrine amphiphile Système DMPC/CD-C10 **218**

Figure 1. Thermogrammes de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H₂O) enregistrés à une vitesse de chauffage de 2°C /min **219**

Figure 2. Diagrammes de diffraction aux petits et grands angles, enregistrés à partir de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H₂O) à 10°C **221**

Figure 3. Diagrammes de diffraction aux petits et grands angles, enregistrés à partir de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H₂O) à 35°C **223**

Figure 4. Ebauche du diagramme de phase du mélange binaire DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H₂O) **225**

Figure 5. Histogrammes reportant les distributions en diamètres hydrodynamiques déterminées par DQEL à 25°C, des objets obtenus pour les trois systèmes étudiés (A). Paramètres caractéristiques des distributions (B) **227**

Figure 6 : Images réalisées par cryo-MET des objets obtenus avec la DMPC seule dans l'eau ([DMPC]= $1,0 \cdot 10^{-3}$ M) **228**

Figure 7 : Images réalisées par cryo-MET des objets mixtes DMPC/ β CD-C10 dans l'eau ([DMPC]= $1,0 \cdot 10^{-3}$ M ; 4 mol% β CD-C10) **229**

Figure 8: Images réalisées par cryo-MET des objets mixtes DMPC/ β CD-C10 dans l'eau ([DMPC]= $1,0 \cdot 10^{-3}$ M; 7 mol% β CD-C10) **230**

Liste des tableaux

PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE

Les cyclodextrines

Tableau 1.1 - Caractéristiques structurales des cyclodextrines natives **13**

Tableau 2.1 - Exemples de polymères associés aux CDs et leurs applications potentielles dans le domaine biomédical **20**

PARTIE 2 : MATÉRIELS, TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES

Tableau 3.1 - Constantes diélectriques et moments dipolaires des solvants utilisés **94**

Tableau 3.2 - Longueurs d'ondes correspondant aux maxima d'excitation et d'émission du RN à 3,1 μ M dans différents solvants **95**

Tableau 3.3 : Concentrations en tensioactifs et en RN présents dans les échantillons analysés **96**

Tableaux 3.4 - Compositions du phospholipide DMPC et de la β CD-C10 présents dans les échantillons analysés en Cryo-MET ainsi que les diamètres hydrodynamiques moyens et les indices de polydispersité des agrégats formés par ces deux composés **98**

Tableau 4.1 : Conditions expérimentales utilisées pour réaliser les expériences de solubilisation des nanoparticules de β CD-C10 par des tensioactifs **107**

Tableau 5.1 : Concentrations et nombres de moles des différents composants constituant les échantillons analysés par Cryo-MET **110**

Tableau 5.2 : Concentrations et nombres de moles des différents composants constituant les échantillons analysés par cryo-TEM **111**

Tableau 6.1: Compositions en mol% et concentrations des échantillons TA/ β CD-C10 observés par microscopie confocale de fluorescence **113**

Tableau 7.1: Ratios molaires des différents composants constituant les échantillons analysés par microscopie optique à contraste de phase **114**

Tableau 10.1: Ratios molaires des différents composants constituant les échantillons analysés par spectrophotométrie UV-Visible **123**

Tableau 10.2 : Diamètre hydrodynamique (D_h), intensité et largeur des différentes populations obtenus par DQEL **123**

Tableau 10.3 : Concentrations en OR extraite par les nanoagrégats et concentrations initiales totales en OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible **129**

Tableau 10.4 : Compositions molaires réelles et théoriques de l'OR dans les échantillons MO/ 5 mol% P80 et MO/ 5 mol% 80/ 4 mol% β CD-C10. **130**

PARTIE 3: RÉSULTATS

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées et de tensioactifs **138**

Table S1. Critical micellar concentrations (CMC) of the investigated surfactants **169**

Table S2. Dielectric constants (ϵ) of the investigated solvents **172**

Table S3. Molecular ratios (R^{ag}) in mixed β CD-nC10/P80 surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[P80]^{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates **178**

Table S4. Molecular ratios (R^{ag}) in mixed β CD-nC10/DDM surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[DDM]^{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates **179**

Table S5. Molecular ratios (R^{ag}) in mixed β CD-nC10/Brij 98 surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[Brij\ 98]^{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates **179**

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées, de monooléine et de polysorbate 80 **182**

Table S1. Physico-chemical properties of cyclodextrin nanocavities **209**

Études de l'interaction Phospholipide/Cyclodextrine amphiphile
Système DMPC/ β CD-C10 **218**

Tableau 1. Paramètres structuraux des mélanges binaires β CD-C10/DMPC en excès d'eau déterminés par diffraction des rayons X à 10°C **222**

Tableau 2. Paramètres structuraux des mélanges binaires β CD-C10/DMPC en excès d'eau déterminés par diffraction des rayons X à 35°C **224**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

« ...Au delà de la chimie moléculaire, fondée sur la liaison covalente, s'étend ainsi un domaine qu'on peut nommer supramoléculaire: la chimie des interactions moléculaires, des associations de deux ou plusieurs espèces chimiques, les complexes, et de la liaison intermoléculaire... »

Ainsi, lors de sa leçon inaugurale au Collège de France en 1980, Jean-Marie Lehn définissait la chimie supramoléculaire comme étant une discipline à part entière, relevant des sciences chimiques et dont la vocation est d'étudier et créer des édifices complexes de molécules, ces derniers étant organisés à l'échelle du nanomètre et construits à partir d'interactions non covalentes, par essence de faible énergie et réversibles. Cette démarche est non seulement à la base de la compréhension des systèmes vivants et des mécanismes biologiques, notamment issus de processus de reconnaissance intermoléculaire, mais couvre également de nombreux domaines d'application. Citons par exemple ceux des moteurs moléculaires, de la catalyse chimique, des (bio)matériaux fonctionnels ou des nanotechnologies (Lehn, 2007 ; Kaittanis et al, 2014 ; Costa et al, 2015 ; Loo et al, 2012; Iost et Crespilho, 2012 ; Raynal et al, 2014).

Les interactions non covalentes mises en jeu sont principalement les liaisons hydrogène ou de coordination, le transfert de charge donneur-accepteur, les forces attractives électrostatiques et de Van der Waals, les effets extrinsèques liés au solvant (force d'hydratation, effet hydrophobe). Selon la nature des composés chimiques, leur mode d'association ou le type de liaison intermoléculaire concerné, se distinguent deux grandes catégories d'édifices supramoléculaires (Lehn, 1991) :

- **Les supermolécules**, de structure et stœchiométrie généralement bien définies, sont formées par association de deux ou plusieurs entités chimiques indépendantes qui présentent une affinité spécifique (ex : complexes organométalliques, composés d'inclusion organiques, couples enzyme-substrat ou ligand-récepteur).
- **Les architectures polymoléculaires** résultent de l'assemblage d'un grand nombre de molécules de la même espèce chimique ou d'espèces différentes constituant généralement un état thermodynamique homogène, c'est-à-dire une seule phase dont les caractéristiques macroscopiques gouvernent les propriétés physiques de l'assemblage et dont l'organisation microscopique, plus ou moins bien définie, en détermine la fonctionnalité. Ces systèmes sont générés selon des processus spontanés non orientés ou supportés notamment par un centre inducteur, une interface de milieux liquides non miscibles, un support solide (ex : membranes biologiques, films monomoléculaires, couches de Langmuir-Blodgett, phases cristal-liquide ou mésophases, vésicules, micelles).

Les systèmes étudiés dans le cadre de cette thèse relèvent majoritairement de la seconde catégorie d'édifices supramoléculaires et résultent de l'auto-assemblage mixte de molécules appartenant à deux familles différentes de composés amphiphiles capables individuellement de former des

édifices supramoléculaires : d'une part les dérivés alkyle de cyclodextrines et d'autre part les lipides polaires lyotropes. Il s'agit plus précisément de concevoir de nouveaux objets plurimoléculaires constitués de cyclodextrines amphiphiles, obtenues par un procédé original de bio-estérification, et d'entités lipidiques indépendantes. Ces objets doivent être de dimension colloïdale et posséder la propriété structurale essentielle de multi-compartmentation, apte à incorporer des substances hôtes, avec pour finalité de pouvoir être utilisés en tant que systèmes transporteurs ou vecteurs de biomolécules thérapeutiques.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques dérivés de l'amidon et délimitant une cavité interne hydrophobe, propice à former des complexes d'inclusion avec des substances hôtes lipophiles. De telles molécules-cages sont également dotées de groupes hydroxyle réactifs permettant de les modifier chimiquement, ce qui, dans le contexte de la chimie supramoléculaire fait de ces macrocycles des briques élémentaires modulables du point de vue de leurs propriétés physicochimiques, telles que leur solubilité et leur mode d'assemblage non covalent, tout en préservant leur capacité d'inclusion.

Qu'elles soient natives ou modifiées, les cyclodextrines ouvrent aujourd'hui de nombreuses voies d'applications (catalyse, chimie analytique, biotechnologie, secteurs biomédical et pharmaceutique, industries agroalimentaire et cosmétique, agrochimie...) et restent éminemment attractives pour le développement de futurs systèmes fonctionnels innovants issus d'une démarche conceptuelle fondamentale (Challa et al, 2005 ; Del Valle, 2004 ; Morin-Crini et Crini, 2013 ; Lopez-Nicolas et al, 2014 ; Pinho et al, 2014) (**Figure 1**).

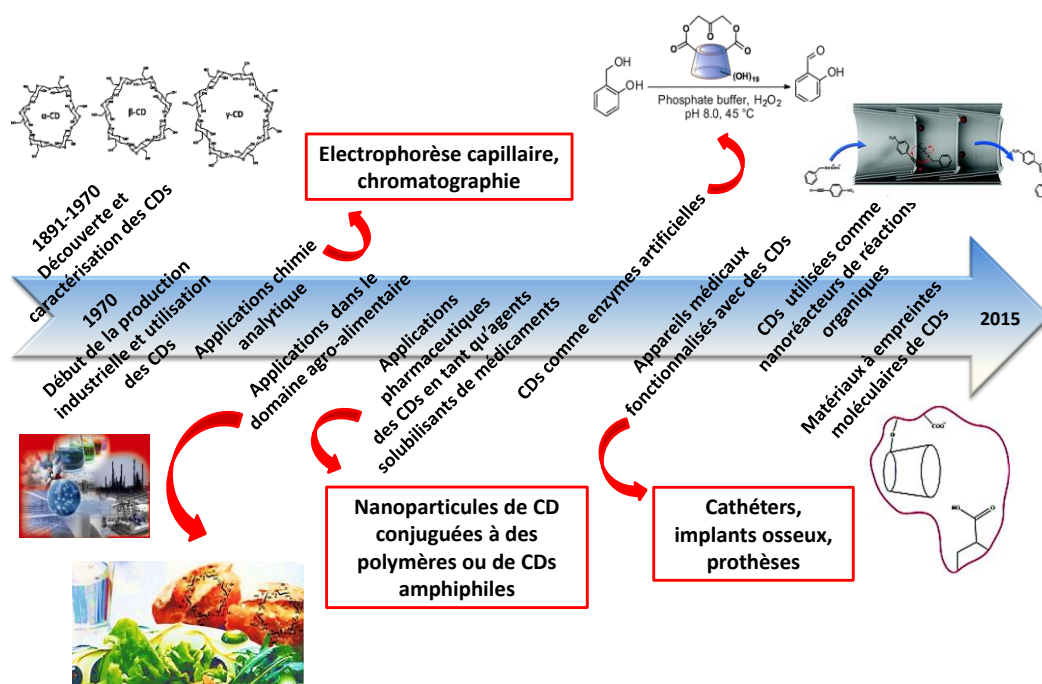


Figure 1. Exemples d'applications potentielles des cyclodextrines (CDs).

Spécialement dans le domaine pharmaceutique, pour lequel les concepts de stabilisation, de biodisponibilité et de vectorisation des principes actifs sont la base de l'innovation galénique, l'inclusion d'une substance thérapeutique dans une molécule de cyclodextrine constitue un intérêt

démonstré. En effet, ce procédé permet d'augmenter la solubilité apparente d'un principe actif hydrophobe en milieu aqueux et dans les fluides physiologiques, de diminuer ses effets secondaires tout en le protégeant de dégradations chimiques éventuelles et de moduler sa cinétique de libération.

Le potentiel des cyclodextrines peut être considérablement renforcé en les incorporant dans des systèmes particuliers (Zafar et al, 2014) et/ou en les modifiant chimiquement. Dans le second cas, les dérivés de cyclodextrines sont tout d'abord élaborés pour stabiliser les complexes d'inclusion et augmenter leur solubilité intrinsèque tout en améliorant l'efficacité de délivrance des substances hôtes dans les organes ou tissus à traiter (Loftsson et Brewster, 1996, 2011; Brewster et Loftsson, 2007). Ainsi, on dispose aujourd'hui de préparations injectables de principes actifs insolubles véhiculés au sein de la cavité de cyclodextrines modifiées (Loscher et al, 1995; Bhatt et Patel, 2011). La seconde génération de dérivés de cyclodextrines a pour but d'obtenir des briques élémentaires ayant la propriété de s'auto-organiser et de former des objets colloïdaux capables de transporter des molécules biologiquement actives (Bilensoy et Hincal, 2009 ; Parrot-Lopez et al, 2010; Roux et al, 2007 ; Yaméogo et al, 2014). A noter que le caractère amphiphile de tels dérivés permet de les associer avec d'autres composés amphiphiles tels que des lipides et peut favoriser leurs interactions avec les membranes cellulaires et le passage des barrières biologiques.

Au-delà, il est possible d'envisager le greffage d'entités de reconnaissance sur les cyclodextrines amphiphiles afin d'assurer une fonction de ciblage actif, c'est à dire diriger leurs nanoassemblages vers les cellules à traiter (Guo et al, 2010; Su et al, 2014).

Les lipides polaires lyotropes présentent une structure chimique de base composée d'un résidu hydrocarboné hydrophobe sur lequel est fixée une entité polaire hydrophile de nature variable. Selon la dimension et l'encombrement relatifs de ces deux groupements et le compromis des interactions intermoléculaires qu'ils engendrent, forces attractives pour les résidus hydrocarbonés et forces répulsives pour les entités polaires, une fois placés en milieu aqueux, les lipides polaires présentent des limites de solubilité variable, au-delà desquelles ils forment des mésophases constituées d'architectures supramoléculaires hydratées de topologies extrêmement versatiles. Ces assemblages ont la propriété essentielle de pouvoir admettre au sein de leur organisation, des substances hôtes hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles sans perdre leur structure de base. Une illustration particulièrement complexe de ce comportement est donnée par la membrane biologique dont l'architecture est assurée par un assemblage complexe de lipides accueillant une grande variété de protéines.

Les systèmes artificiels construits à partir de l'auto-assemblage de lipides polaires d'origine naturelle ou synthétique, miment d'assez près les édifices lipidiques retrouvés dans le vivant. Ceci leur confère une certaine biocompatibilité liée non seulement à la nature des lipides utilisés mais également au fait que les assemblages non covalents qu'ils forment sont fragiles donc, dans une certaine mesure, aisément assimilables et dégradables.

Dans le domaine pharmaceutique, les objets issus de mésophases lipidiques sont donc des systèmes de transport ou des vecteurs de molécules actives très intéressants pour l'administration de médicaments (Elizondo et al, 2011 ; Zabara et Mezzenga, 2014 ; Guo et al, 2010 ; Müller-Goymann, 2004). Différents types de systèmes lipidiques submicroniques ont ainsi été développés

tels que, liposomes, cubosomes ou micelles, véritables nano-réservoirs ayant l'avantage de protéger la molécule hôte de sa dégradation dans l'organisme tout en diminuant ses effets secondaires (Estanqueiro et al, 2015 ; Garg et Saraf, 2007 ; Huynh et al, 2009 ; Nguyen et al, 2011 ; Mc Clements, 2015 ; Gan et al, 2010). Dans le domaine biomédical, ils trouvent également des applications en imagerie ou en médecine régénérative (Koo et al, 2005 ; Monteiro et al, 2014 ; Zhou et al, 2014).

En adaptant la composition des briques lipidiques, voire en les modifiant chimiquement, différentes stratégies ont été proposées pour promouvoir l'efficacité des vecteurs. La libération des principes actifs véhiculés peut se faire via un stimulus extérieur (Kneidl et al, 2014 ; Madni et al, 2014 ; Montis et al, 2014). Le greffage de chaînes de polymère hydrophile de type poly(éthylène glycol) permet de prolonger significativement leurs demi-vies plasmatiques et exploiter ainsi le ciblage passif par effet EPR (« *Enhanced Permeability and Retention* » effect) de certains tissus comme les tumeurs cancéreuses (Zhou et al, 2014 ; Huynh et al, 2011). La modification de surface par des ligands spécifiques conduit au ciblage actif (Schwendener et al, 2014 ; Madni et al, 2014 ; Dwi et al, 2015). L'association d'un matériau compatible avec l'assemblage et présentant une propriété physique adaptée conduit également à de nouvelles voies pour des applications thérapeutiques, par exemple en incorporant un fluide magnétique (Ito et al, 2005 ; Marie et al, 2013 ; Estelrich et al, 2015).

Dans un tel contexte, l'idée directrice de ce travail de thèse est d'introduire au sein de mésophases lipidiques des molécules de β -cyclodextrine. Le design du futur système, destiné à des applications pharmaceutiques en vectorisation, a un triple objectif: (i) exploiter la faculté de ce macrocycle à inclure une substance hôte hydrophobe ; (ii) le concentrer dans une nanoparticule protectrice, biocompatible et facilitant le passage des barrières biologiques; (iii) co-incorporer une seconde substance d'intérêt au sein de la nanoparticule.

Afin d'évaluer la possibilité de réaliser un tel système et d'apporter les premiers éléments de preuve de concept, nous sommes partis d'un dérivé amphiphile de β -cyclodextrine issu de la substitution d'une partie des hydroxyles secondaires par des chaînes hydrocarbonées saturées à dix atomes de carbone et obtenu par synthèse enzymatique selon un procédé original conduisant à d'excellents rendements (Choisnard et al, 2006, 2007, 2011). En effet, le caractère amphiphile était supposé favoriser l'association cyclodextrine-lipide au sein des futurs objets. Nous avons choisi d'examiner le cas de deux classes de lipides polaires lyotropes.

D'une part, des lipides polaires présentant une solubilité effective dans l'eau et formant seuls des systèmes micellaires.

Notre choix a porté sur trois agents tensioactifs non-ioniques : le Polysorbate 80 et le Brij 98 ayant comme groupe polaire une chaîne de poly(éthylène glycol) et un dérivé de sucre, le n-dodécyl- β -D-maltoside. La seconde classe concernée correspond à des lipides insolubles mais capables de former soit une phase lamellaire conduisant à des liposomes, la 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC), soit une phase cubique bicontinue conduisant à des cubosomes, le 1-monooléoyl-rac-glycérol ou monooléine (**Figure 2**).

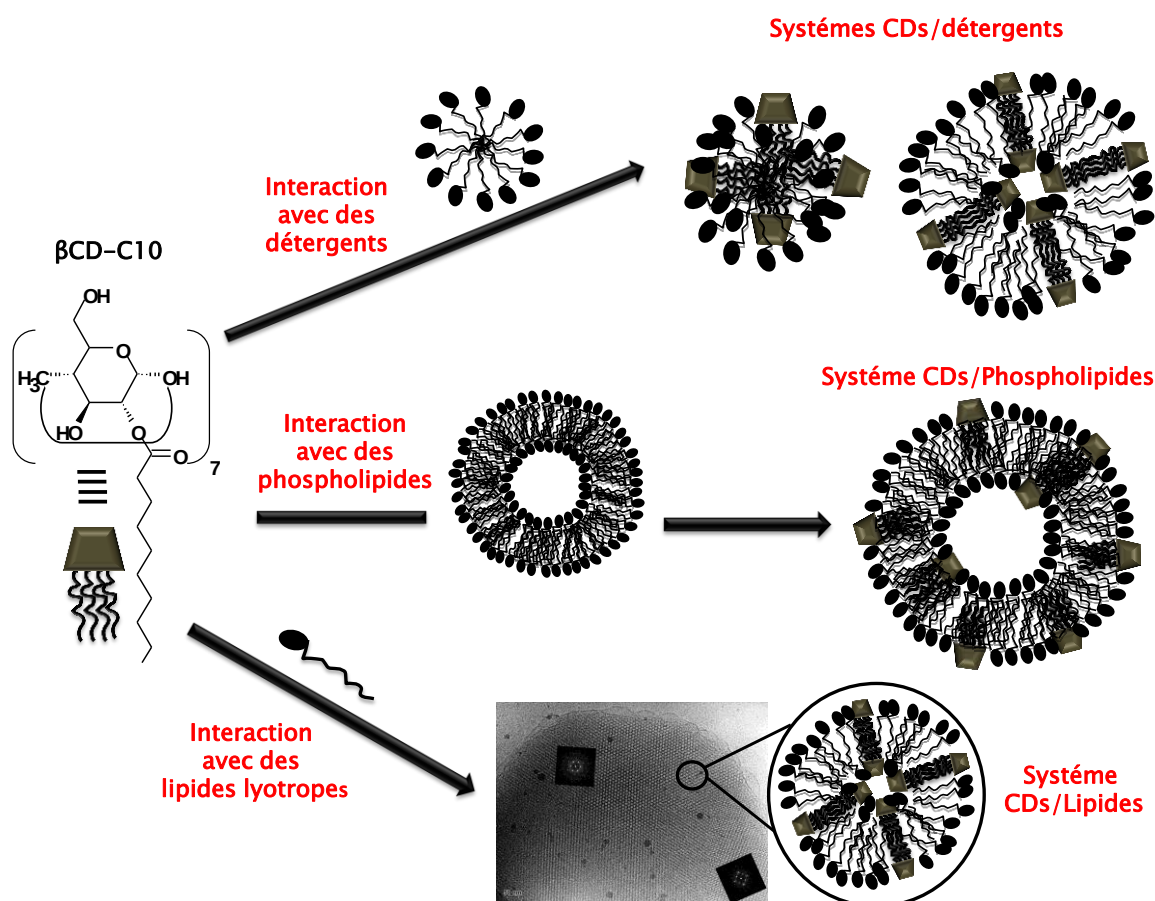


Figure 2. Schéma récapitulatif de la stratégie mise en place pour répondre au sujet de la thèse.

La première partie de ce mémoire est consacrée à une présentation bibliographique des connaissances relatives aux différentes briques élémentaires concernées par nos travaux sur leur aptitude, seules ou en mélange, à initier la formation d'assemblages plurimoléculaires. Pour mener à bien nos investigations, nous avons mis en œuvre un certain nombre de techniques et développé des méthodologies d'étude adaptées à notre questionnement. La seconde partie du mémoire présente l'ensemble de cette approche expérimentale. La troisième partie, divisée en trois chapitres distincts dont deux rédigés sous forme d'articles, concerne les résultats obtenus suivis de discussions argumentées. Le mémoire s'achève par une conclusion générale sur les apports majeurs de nos travaux et certaines perspectives qu'ils suggèrent.

Références Bibliographiques

Bhatt K. and Patel P.R., Formulation and evaluation of diclofenac sodium injection using 2-hydroxy propyl beta-cyclodextrin. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3, **2011**, 250-252.

Bilensoy E. and Hincal A., Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, **2009**, 1161-1173.

Brewster M.E. and Loftsson T., Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 59, **2007**, 645-666.

Challa R., Ahuja A., Ali J., and Khar R.K., Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *PharmSciTech.* 6, **2005**, 329-357.

Choisnard L., Gèze A., Puteaux J.L., Wong Y.S., Wouessidjewe D., Nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified β -cyclodextrin. *Biomacromolecules*, 7, **2006**, 515-520.

Choisnard L., Gèze A., Vanhaverbeke C., Yaméogo J.B.G., Puteaux J.L., Wouessidjewe D., Miscellaneous nanoaggregates made of β -CD esters synthesised by an enzymatic pathway. *International Journal of Pharmaceutics.* 344, **2007**, 26-32.

Choisnard L., Gèze A., Vanhaverbeke C., Yaméogo J.B.G., Puteaux J.L., Brasme B., Jullien L., Boulanger S., Elfakir C., Wouessidjewe D., Physicochemical characterization of α -, β -, and γ -Cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12, **2011**, 3031-3038.

Costa R.R., Alatorre-Meda M., Mano J.F., Drug nano-reservoirs synthesized using layer-by-layer technologies. *Biotechnology Advances*, **2015**, 1-17, *Article in press*.

Del Valle E.M.M., Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry.* 39, **2004**, 1033-1046.

Dwi Y. and Banerjee S., Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 479, **2015**, 364-373.

Elizondo E., Moreno E., Cabrera I., Cordoba A., Sala S., Veciana J. and Ventosa N., Liposomes and other vesicular systems: Structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 104, **2011**, 1-52.

Estanqueiro M., Amaral M.H., Conceição J., Lobo J.M.S., Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, **2015**, 631-648.

Estelrich J., Sànchez-Martin M.J., Busquets M.A., Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*, 10, **2015**, 727-1741.

Gan L., Han S., Shen J., Zhu J., Zhu C., Zhang X., Gan Y., Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving preocular retention and ocular bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*. 396, **2010**, 179-187.

Garg G. and Saraf S., Cubosomes: An Overview. *Biol. Pharm. Bull.* 30, **2007**, 350-353.

Guo J., Fisher K.A., Darcy R., Cryan J.F. and O'Driscoll C., Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery. *Mol. BioSyst.* 6, **2010**, 1143-1161.

Huynh N.T., Passirani C., Saulnier P., Benoit J.P., Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*. 379, **2009**, 201-209.

Huynh N.T., Morille M., Bejaud J., Legras P., Vessieres A., Jaouen G., Benoit J.P., Passirani C., Treatment of 9L gliosarcoma in rats by ferrociphenol-loaded lipid nanocapsules based on a passive targeting strategy via the EPR effect. *Pharm Res.* 28, **2011**, 3189-3198.

Iost R.M., Crespilho F.N., Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronic. *Biosensors and Bioelectronics*. 31, **2012**, 1-10.

Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100, **2005**, 1-11.

Kaittanis C., Shaffer T.M., Thorek D.L.J., Grimm J., Dawn of advanced molecular medicine: nanotechnological advancements in cancer imaging and therapy. *Crit Rev Oncoq*, 19, **2014**, 143-176.

Kneidl B., Peller M., Winter G., Lindner L.H., Hossann M., Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International Journal of Nanomedicine*. 9, **2014**, 4387-4398.

Koo O.M., Rubinstein I., Onyuksel H., Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1, **2005**, 193-212.

Lehn J.M., Perspectives en chimie supramoléculaire. *Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences*. 30, **1991**, 145-165.

Lehn J.M., From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chem Soc Rev*, 36, **2007**, 151-160.

Loftsson T. and Brewster M.E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 63, **2011**, 1119-1135.

Loftsson T. and Brewster M.E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 85, **1996**, 1017-1025.

Loo Y., Zhang S., Hauser C.A.E., From short peptides to nanofibers to macromolecular assemblies in biomedicine. *Biotechnology Advances*. 30, **2012**, 593-603.

Lopez-Nicolas J.M., Rodriguez-Bonilla P., Garcia-Carmona F., Cyclodextrins and antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, **2014**, 251-276.

Loscher W., Honack D., Richter A., Schulz H.U., Schurer M., Dusing R., and Brewster M.E., New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol-based formulation. *Epilepsia*. 36, **1995**, 255-261.

Madni A., Sarfraz M., Rehman M., Ahmad M., Akhtar N., Ahmad S., Tahir N., Ijaz S., Al-Kassas R. and Löbenberg R., Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci*, 17, **2014**, 401-426.

Marie H., Plassat V., Lesieur S., Magnetic-fluid-loaded liposomes for MR imaging and therapy of cancer. *J. Drug Del. Sci Techn*, 23(1), **2013**, 25-37.

McClements D.J., Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2015**, 27-53. Article in press.

Monteiro N., Martins A., Reis R.L. and Neves N.M., Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface*. 11, **2014**, 1-24.

Montis C., Castroflorio B., Mendoza M., Salvatore A., Berti D., Baglioni P., Magnetocubosomes for the delivery and controlled release of therapeutics. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2014**, 317-326. Article in press.

Morin-Crini N. and Crini G., Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Progress in Polymer Science*. 38, **2013**, 344-368.

Müller-Goymann C.C., Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58, **2004**, 343-356.

Nguyen T.H., Hanley T., Porter C.J.H., Boyd B.J., Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration. *Journal of Controlled Release*. 153, **2011**, 180-186.

Parrot-Lopez H., Perret F., Bertino-Ghera B., Les cyclodextrines amphiphiles et leurs applications. Élaboration de nanoparticules de cyclodextrines amphiphiles pour des applications biomédicales. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 68, **2010**, 12-26.

Pinho E., Grootveld M., Soares Graça S., Henriques M., Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*. 101, **2014**, 121-135.

Raynal M., Ballester P., Vidal-Ferran A. and Van Leeuwen P.W.N.M., Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics. *Chem. Soc. Rev.* 43, **2014**, 1734-1787.

Roux M., Perly B., Djedaïni-Pilard F., Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrines. *Eur Biophys J*, 36, **2007**, 861-867.

Schwendener R.A., Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2, **2014**, 159-182.

Su C., Li H., Shi Y., Wang G., Liu L., Zhao L., Sub R., Carboxymethyl- β -cyclodextrin conjugated nanoparticles facilitate therapy for folate receptor-positive tumor with the mediation of folic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 474, **2014**, 202-211.

Yaméogo J.B.G., Gèze A., Choïnard L., Putaux J.L., Semde R. and Wouessidjewe D., Progress in developing amphiphilic cyclodextrin-based nanodevices for drug delivery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14, **2014**, 526-541.

Zabara A. and Mezzenga R., Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. *Journal of Controlled Release*. 188, **2014**, 31-43.

Zafar N., Fessi H., Elaissari A., Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 461, **2014**, 351-366.

Zhou Q.L, Chen Z.Y., Wang Y.X., Yang F., Lin Y., and Liao Y.Y., Ultrasound-mediated local drug and gene delivery using nanocarriers. *BioMed Research International*. **2014**, 1-13.

PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE

Notions

Le terme amphiphile (du grec amphi : « des deux côtés, en double, à la fois » et phile : « qui aime ») désigne des composés résultant de l'association covalente d'entités chimiques polaires avec des entités chimiques apolaires ou très peu polaires. Cette structure particulière dote les composés amphiphiles d'une double affinité, d'une part pour les milieux solvants très polaires comme l'eau et d'autre part pour les milieux solvants hydrophobes. Il existe un grand nombre de familles de molécules possédant un caractère amphiphile. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux d'entre elles : les lipides et les cyclodextrines. Ce chapitre en présente les principales caractéristiques, notamment les relations entre leur structure chimique et leurs propriétés physicochimiques en milieu aqueux en approfondissant le cas des composés que nous avons étudiés.

Les cyclodextrines

1. Les cyclodextrines natives

1.1. Propriétés structurales des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques d'origine naturelle provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par la cyclodextrine glucosyltransférase. Les trois types de cyclodextrines natives les plus couramment rencontrées sont l' α -, la β - et la γ -cyclodextrine constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranose (**Figure 1.1**). Ces unités, en conformation chaise sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α -(1,4). Cet arrangement explique la forme des cyclodextrines qui ressemble à celle d'un cône tronqué possédant une cavité centrale (Saenger, 1980 ; Duchêne et al, 1984 ; Crini, 2014).

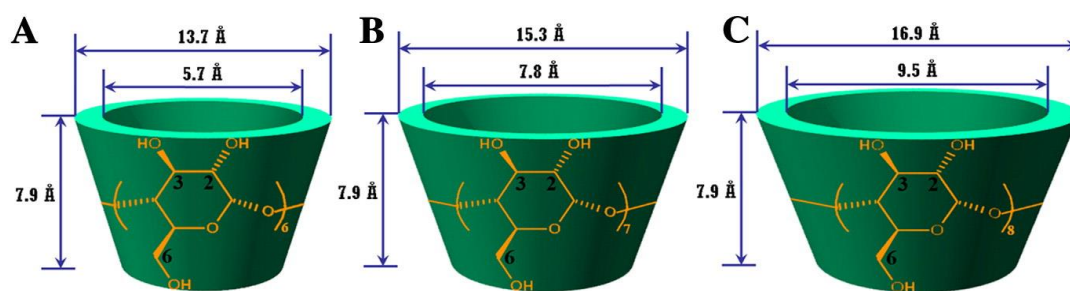


Figure 1.1 - Structure des cyclodextrines natives les plus courantes (A) α -cyclodextrine, (6 unités glucopyranose) (B) β -cyclodextrine, (7 unités glucopyranose), (C) γ -cyclodextrine, (8 unités glucopyranose) (Zhang et Ma, 2013; Szejtli, 1998).

A l'extérieur de la cavité, au niveau des deux ouvertures du cône tronqué se trouvent l'ensemble des groupements hydroxyle des unités glucose, conférant à l'ensemble de la molécule une forte affinité pour les milieux aqueux. Les hydroxyles secondaires portés par les atomes de carbone en position 2 et 3 se situent du côté de l'ouverture la plus large ou face secondaire tandis que les hydroxyles primaires liés aux atomes de carbone en position 6 se trouvent du côté de l'ouverture la plus étroite ou face primaire. L'intérieur de la cavité est tapissé par les atomes d'hydrogène portés par les atomes de carbone en position 3 et 5 des cycles glucose ce qui lui confère un caractère hydrophobe. En résumé, les molécules de cyclodextrine possèdent une partie externe polaire hydrophile et une cavité interne hydrophobe, les dotant d'un caractère amphiphile particulier (Lopez et al, 2013).

Il est important de noter que les groupes hydroxyle possèdent une réactivité chimique intéressante pour envisager l'obtention de dérivés par voie de synthèse, réactivité qui diffère selon leur position sur la molécule. En effet, les hydroxyles primaires sont plus nucléophiles, plus basiques et sont des

sites de réactions plus accessibles que les hydroxyles secondaires (Khan et al, 1998 ; Rong et D'Souza, 1990 ; Saenger et al, 1998).

Les principales caractéristiques structurales des cyclodextrines natives courantes sont rassemblées dans le tableau suivant (Salústio et al, 2011).

Tableau 1.1 - Caractéristiques structurales des cyclodextrines natives.

	α -cyclodextrine	β -cyclodextrine	γ -cyclodextrine
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Formule Brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau (mol.L ⁻¹)	0,149	0,016	0,179
Diamètre de la cavité (Å)	5,7	7,8	9,5
Hauteur du cône (Å)	7,9	7,9	7,9

Depuis leur découverte en 1891 par Villiers, les cyclodextrines ne cessent de faire l'objet d'investigations aussi bien au niveau fondamental que dans de nombreux domaines d'applications. En effet, leur structure particulière est à l'origine de propriétés essentielles.

Au même titre que les éthers couronnes, les calixarènes et les cryptands, les cyclodextrines sont des molécules cages. Les cyclodextrines forment ainsi des complexes d'inclusion grâce à leur cavité hydrophobe permettant l'internalisation de substances très peu ou non polaires lorsque leur dimension le permet, tandis que les fonctions hydroxyle assurent une bonne solubilisation des complexes dans l'eau (Rajendiran et al, 2014 ; Zhou et al, 2014; Aree, 2013 ; Crini, 2014). Les interactions entre l'hôte et l'invité sont de faible énergie et peuvent être de différentes natures : interactions dipolaires, de Van der Waals, liaisons hydrogène. Les complexes d'inclusion les plus fréquemment rencontrés sont de type 1:1. Mais il est possible d'obtenir des complexes d'inclusion de types 2:1, 1:2 et 2:2 (**Figure 1.2**).

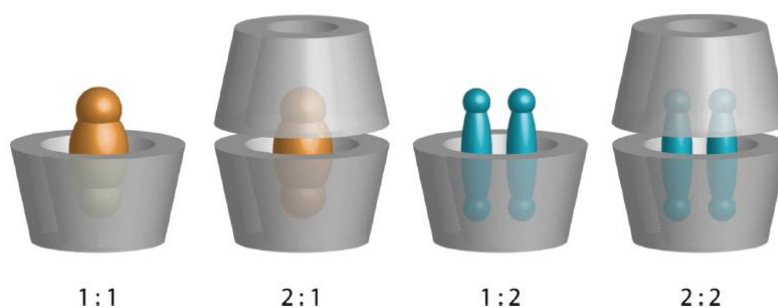


Figure 1.2 - Représentation schématique des différentes stœchiométries classiquement rencontrées pour les complexes d'inclusion de cyclodextrines (Crini, 2014).

L'aptitude à former des complexes d'inclusion permet notamment d'utiliser les cyclodextrines dans le domaine de la catalyse chimique (Zhao et Zhong, 2012 ; Hapiot et al, 2011) mais également en tant qu'outils analytiques ou séparatifs pertinents étant donné que les cyclodextrines sont des molécules chirales de par la présence de cinq atomes de carbone asymétriques par unité glucopyranose (**Figure 1.3**) (Giuffrida et al, 2014 ; Escuder-Gilaber et al, 2014 ; Weatherly et al, 2014).

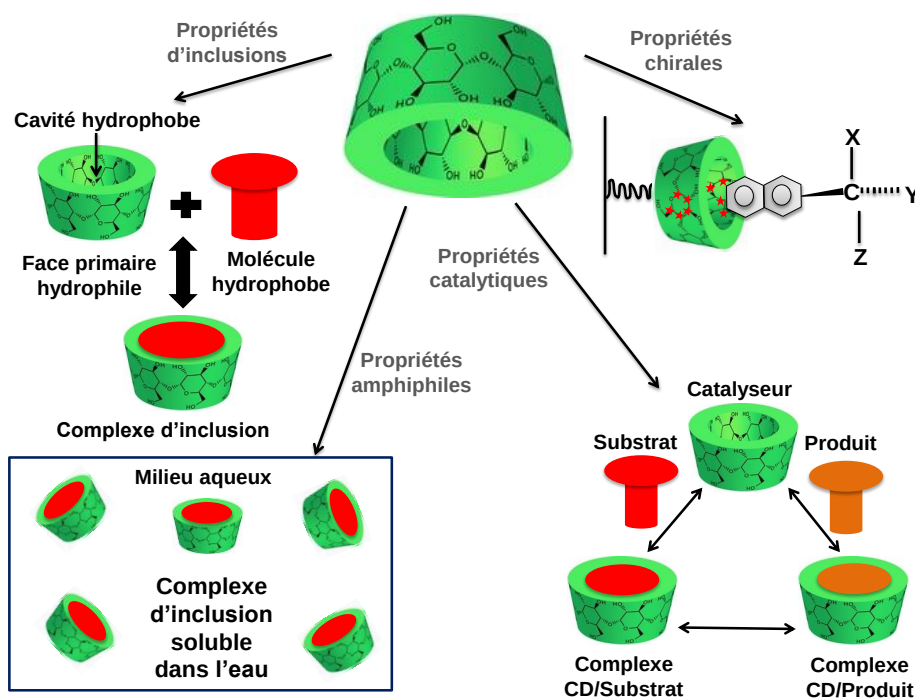


Figure 1.3 - Propriétés des cyclodextrines exploitant la capacité d'inclusion de substances invitées.

1.2. Applications des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux domaines applicatifs tels que l'industrie pharmaceutique ou agro-alimentaire, le domaine biomédical, la chimie analytique ou de catalyse tout en étant l'objet de constantes recherches fondamentales (**Figure 1.4**).

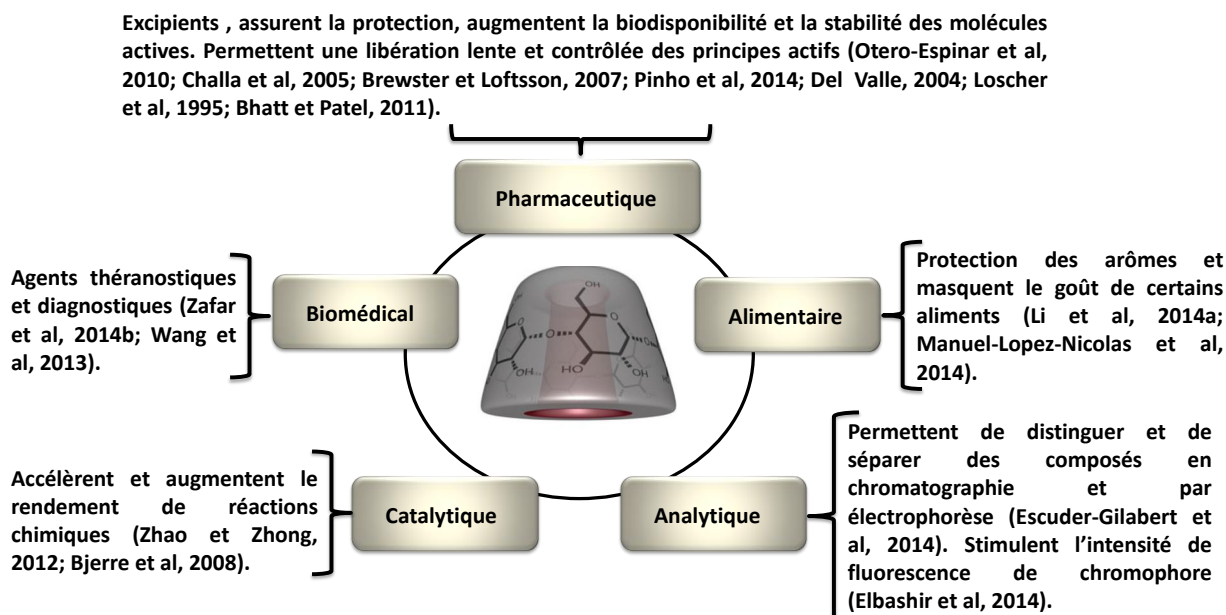


Figure 1.4 - Principales applications des cyclodextrines.

2. Les cyclodextrines modifiées

De nombreux dérivés de cyclodextrines sont décrits dans la littérature. En effet, les macrocycles constituant les molécules de cyclodextrines possèdent trois groupes hydroxyle par unité glucose. C'est autant de possibilité pour greffer des entités chimiques modulant les propriétés physico-chimiques des cyclodextrines et, le cas échéant, leur apportant une fonctionnalité supplémentaire d'intérêt (**Figure 2.1**).

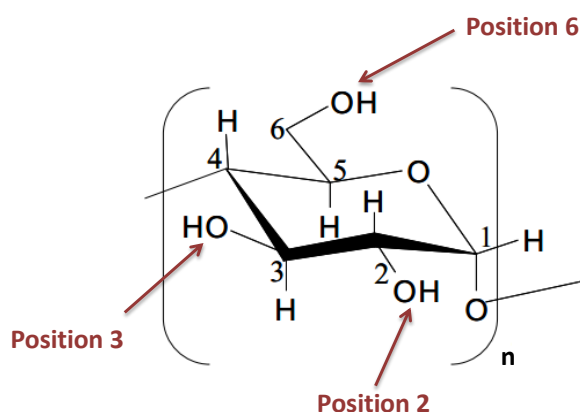


Figure 2.1 - Groupes hydroxyles réactifs d'une unité glucopyranose d'une molécule de cyclodextrine.

Dans le domaine pharmaceutique, les cyclodextrines sont modifiées chimiquement afin d'augmenter leur potentiel dans le domaine de la délivrance ou de la vectorisation de principes actifs thérapeutiques (Zafar et al, 2014a ; Challa et al, 2005 ; Stella et He, 2008).

Il existe globalement trois stratégies pour développer des systèmes de transport de médicaments à base de cyclodextrines : la fixation de groupements de nature variable de faible masse moléculaire, leur greffage sur des polymères ou la substitution de leurs groupes hydroxyle par des chaînes hydrocarbonées (**Figure 2.2**).

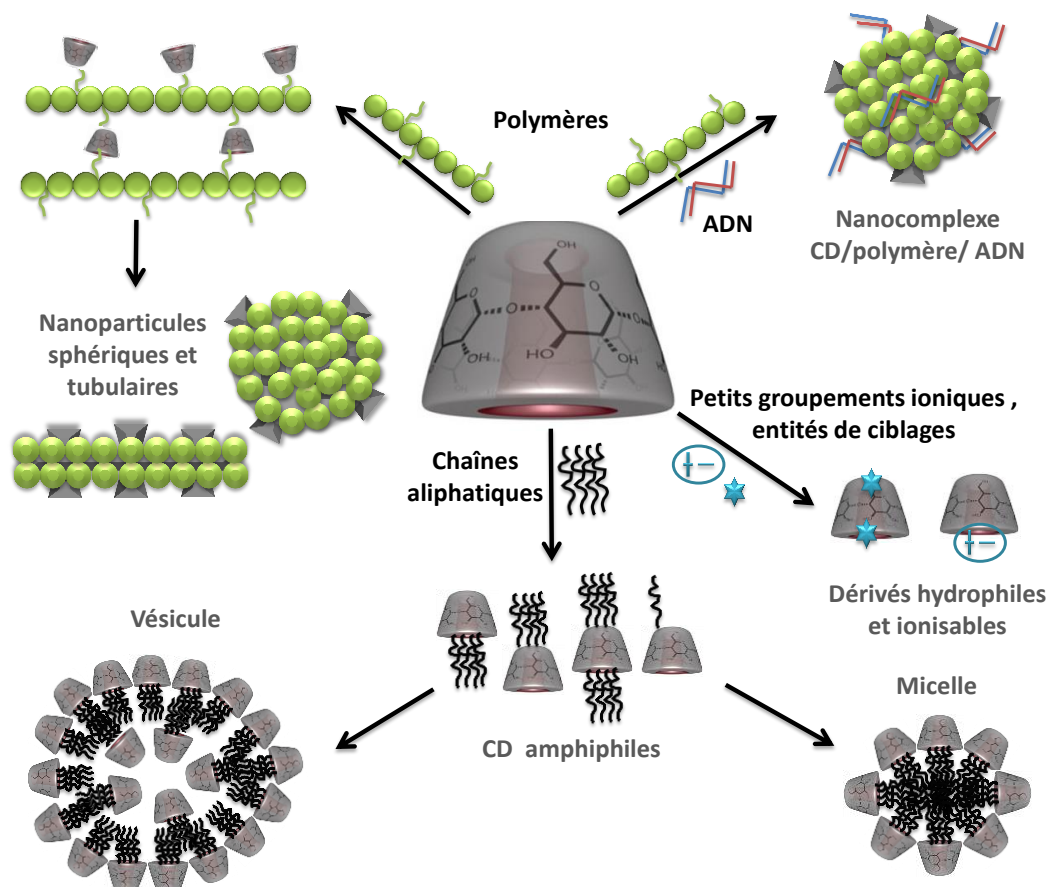


Figure 2.2 - Stratégies de modification chimique des cyclodextrines dans le domaine du transport ou de la vectorisation de substances actives.

- Dans le premier cas, l'augmentation de la solubilité en milieu aqueux des composés d'inclusion et/ou une meilleure interaction entre la molécule invitée et la cyclodextrine comptent parmi les objectifs majeurs (Loftsson et Brewster, 1996, 2011). Une raison également motrice pour laquelle les chimistes se sont lancés dans la synthèse de dérivés de cyclodextrines natives est leur toxicité intrinsèque, en particulier leur néphrotoxicité et leur hématotoxicité.

L'ajout d'entités chimiques de natures variables et de petites masses moléculaires ont permis d'améliorer la solubilité des cyclodextrines en milieu aqueux tout en conservant leurs propriétés de complexation et de diminuer conjointement la toxicité des cyclodextrines (Monnaert et al, 2004 ; Challa et al, 2005 ; Stella et He, 2008 ; Dou et al, 2014 ; Liu et al, 2014). Cette toxicité est diminuée car l'ajout d'entités rend, d'une part, moins affines les cyclodextrines aux phospholipides constitutifs des membranes des cellules empêchant ainsi leur extraction et par voie de conséquence l'éclatement des cellules. D'autre part, les cyclodextrines ont moins tendance à s'agglomérer pour former des « amas

solides » en milieu plasmatique. Il est possible de citer l'exemple de deux médicaments antifongiques mis sur le marché à base de cyclodextrines modifiées : l'itraconazole, associé avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (Sopranox) et le posaconazole combiné avec la sulfobutyléthér- β -cyclodextrine (Noxafil) (Challa et al, 2005 ; Vecsernyés et al, 2014), soit sous forme de comprimés pour la voie orale soit sous forme de solution injectable.

- Une autre démarche est de moduler les propriétés amphiphiles des cyclodextrines par la diminution de leur solubilité de façon à les rendre compatibles avec les barrières biologiques telles que les membranes cellulaires et/ou de produire des composés capables de s'auto-assembler dans le but d'obtenir des objets contenant un grand nombre de cages. Ces composés sont obtenus soit par le greffage de chaînes aliphatiques sur les hydroxyles primaires, secondaires, partiellement ou totalement, soit par le greffage de polymères sur les cyclodextrines ou par la formation de complexe d'inclusion avec le polymère. Ces modifications engendrent, compte tenu de la longueur des chaînes et du type de polymère, différentes possibilités d'auto-assemblage : nanoparticules matricielles, vésicules, micelles (Sortino et al, 2006 ; Duchêne et al, 1999ab ; Cavalli et al, 2007 ; Gèze et al, 2002, 2007, 2009 ; Yaméogo et al, 2012, 2014; Memisoglu-Bilensoy et al, 2005; Bertino Ghera et al, 2009 ; Perret et al, 2013ab ; Wu et al, 2009 ; Zhou et al, 2010).
- Le ciblage moléculaire par greffage de substances dotées de propriétés de reconnaissance spécifiques dirigées vers un type de cellule ou de tissu cibles a été parallèlement envisagé (Guo et al, 2010 ; Su et al, 2014).

Dans le cas de dérivés porteurs de chaînes aliphatiques, la possibilité de s'associer avec d'autres composés amphiphiles, notamment les lipides, offre un réservoir conséquent d'architectures mixtes potentiellement intéressantes pour la délivrance de substances actives. La suite de ce paragraphe développe les voies de modification chimique des cyclodextrines pour la mise au point de systèmes plurimoléculaires, argument principal ayant justifié les travaux effectués au cours de cette thèse.

2.1. Les cyclodextrines conjuguées à des polymères

Parmi les dérivés formés par l'association covalente ou non de molécules de cyclodextrines avec des entités polymères (Yan et al, 2014 ; Gidwani et Vyas, 2014 ; Di Cagno et al, 2014 ; Oh et al, 2014 ; Xiong et al, 2014), on distingue principalement trois catégories (**Figure 2.3**):

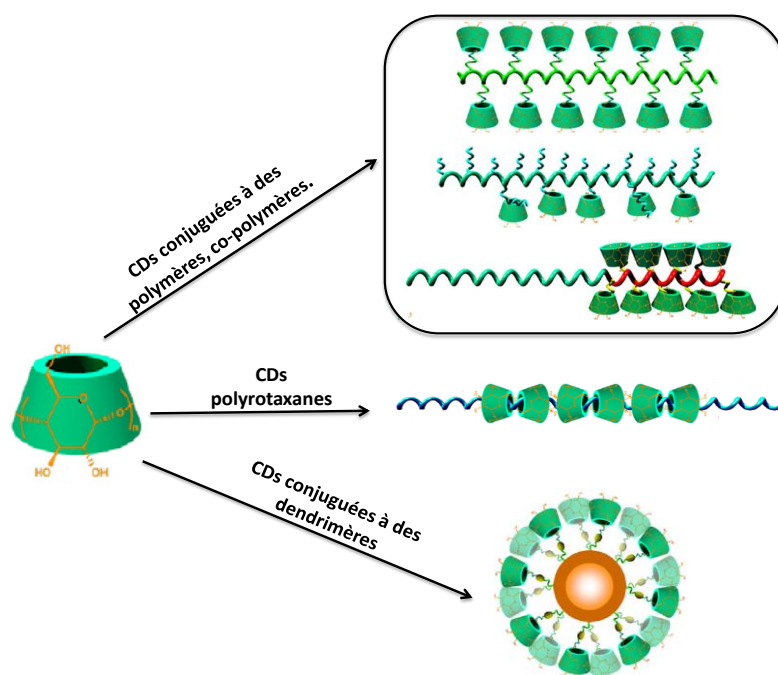


Figure 2.3 - Structure de composés formés par association de cyclodextrines (CDs) à des polymères (d'après Zhang et Ma, 2013).

Les dérivés covalents comportent :

- **Les dérivés mixtes polymères/cyclodextrines** synthétisés pour obtenir de nouveaux matériaux nano-structurés à haute teneur en cyclodextrines de topologies variables selon la nature du polymère et la liaison cyclodextrine-polymère. Des nano-objets tels que des nanosphères, des nanogels, des micelles et des vésicules peuvent être formés à partir de ces dérivés (Zhang et Ma, 2013 ; Moya-Ortega et al, 2012; Varan et Bilensoy, 2014 ; Xiong et al, 2014 ; Oh et al, 2014). Certains de ces systèmes ont été conçus pour conduire à la formation spontanée de nanoparticules utilisables notamment comme vecteurs de substances thérapeutiques pour des applications en nanomédecine (Folch-Cano et al, 2014 ; Varan et Bilensoy, 2014 ; Fülöp et al, 2013 ; Zhang et Ma, 2010; Kim et al, 2011 ; Zhao et al, 2014 ; Lu et al, 2011 ; Liu et al, 2014) ou en thérapie génique (Lai, 2014 ; Lai et Jung, 2014 ; Yu et Wu, 2013; Ping et al, 2013 ; Li et al, 2013, Li et al, 2014b ; Hu et al, 2012 ; Dou et al, 2014 ; Islam et al, 2014) ou des matériaux supramoléculaires (Harada et al, 2014 ; Liu et al, 2013 ; Concheiro et al, 2013).

En effet, les nano-assemblages développés se caractérisent par la juxtaposition confinée au sein des particules de nanodomains hydrophiles et/ou hydrophobes permettant le transport de molécules bioactives polaires et apolaires (**Figure 2.4**).

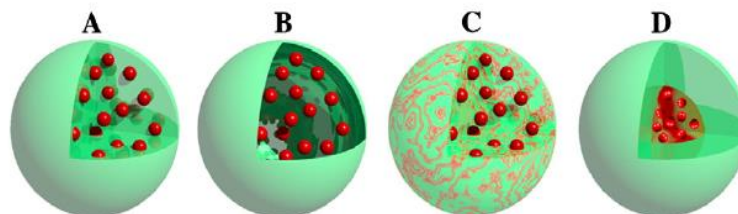


Figure 2.4 - Nano-assemblages de cyclodextrines conjuguées à des polymères utilisées pour la vectorisation de principes actifs. A : nanosphère, B : vésicule, C : nanogel, D : micelle (Zhang et Ma, 2013).

- **Les dérivés mixtes dendrimères/cyclodextrines**, utilisées également comme vecteurs de substances thérapeutiques (Arima et Motoyama, 2009 ; Arima et al, 2012 ; Namazi et Hamrahloo, 2011).

Le **tableau 2.1** regroupe des exemples de polymères de cyclodextrines et leurs applications dans le domaine biomédical.

Tableau 2.1 - Exemples de polymères associés aux CDs et leurs applications potentielles dans le domaine biomédical.

Polymère	Cyclodextrine	Applications	Référence
Dextrane et ses dérivés	β CD	Vectorisation de principes actifs	Fülop et al, 2013
Chitosane	Carboxyméthyl β CD	Vectorisation de principes actifs	Ammar et al, 2012
Polycaprolactone	Hydroxypropyl β CD	Vectorisation de principes actifs	Varan et Bilensoy, 2014
Poly(éthylènimines) Branchés, greffés et linéaires	β CD	Vectorisation de principes actifs, thérapie génique	Lu et al, 2011 Hu et al, 2012 Ping et al, 2013 Lai et Jung, 2014 Islam et al, 2014
Dendrimère poly(amines) : structure en étoile avec 4 ramifications	β CD	Thérapie génique	Kim et al, 2011
Cyclodextrine modifiée par 4 bras polymériques : -Piperazine -N-(aminoethyl)piperazine -N-(3-amino-propyl)-2-pyrrolidinone fonctionnalisés avec le poly(glycidyl méthacrylate)	β CD	Thérapie génique	Li et al, 2014b

2.2. Les cyclodextrines modifiées par greffage de résidus hydrophobes : les cyclodextrines amphiphiles

L'association covalente des cyclodextrines avec des lipides présente certains avantages tels que la nature de ces derniers, acceptée comme biocompatible (dans la thèse, nous avons choisi notamment des phospholipides ou des lipides solubles admis par la pharmacopée) et leur comportement associatif par liaisons faibles non covalentes facilitant (1) l'interaction avec les membranes biologiques (2) l'élimination des systèmes *in vivo* (3) dans une certaine mesure limitant le recours à des procédés de synthèse plus difficiles à mettre en œuvre pour la fabrication de conjugués covalents avec des polymères.

La synthèse de tels dérivés ou cyclodextrines amphiphiles a pour but de combiner la propriété des cyclodextrines qui est d'inclure des substances hydrophobes au sein de leur cavité, avec celles des composés amphiphiles de structure lipidique, à savoir de former des assemblages supramoléculaires organisés ou de pouvoir s'insérer ou franchir les membranes biologiques. De tels dérivés sont obtenus par introduction de groupements aliphatiques ou fluorocarbonés, le plus souvent des chaînes linéaires, soit sélectivement au niveau de l'une des faces du macrocycle, soit au niveau de ses deux faces. Lorsque le greffage est partiel, la persistance de groupes hydroxyle non modifiés préserve la polarité des molécules de cyclodextrines. Ainsi, les nouvelles molécules issues de ces modifications chimiques présentent une partie polaire et une partie apolaire (résidus hydrophobes greffés) ce qui leur confère un caractère amphiphile assimilable à celui des lipides.

De tels dérivés forment des monocouches à l'interface air-eau et s'auto-assemblent dans l'eau en une large variété de structures supramoléculaires telles que des micelles, vésicules ou nanoparticules matricielles & selon leur aptitude à s'hydrater ou encore peuvent constituer des assemblages mixtes avec certains lipides tels que les phospholipides (Roux et al, 2007a; Duchêne et al, 1999 ab ; Roling et al, 2013 ; Kausher et al, 2013 ; Lemos-Senna et al, 1998 ; Lesieur et al, 2000). Ces structures particulières de dimensions submicroniques représentent des réservoirs moléculaires potentiellement intéressants pour des applications dans le domaine pharmaceutique notamment en ce qui concerne la vectorisation et le ciblage de principes actifs (Parrot-Lopez et al, 2010).

Les nombreux dérivés obtenus se déclinent selon deux catégories : les cyclodextrines monosubstituées, c'est-à-dire ne portant qu'un seul résidu hydrophobe par macrocycle, et les cyclodextrines polysubstituées (Sallas et Darcy, 2008) (**Figure 2.5**). En fonction de la position des résidus, plusieurs sous-catégories ont reçu des appellations particulières reflétant la structure moléculaire des dérivés générés:

- Les dérivés monosubstitués sur un des hydroxyles de la face primaire parmi lesquels on retrouve les cyclodextrines « lollipop » et « cup and balls » (Silva et al, 2008 ; Lin et al, 1998 ; Sun et al, 2011, 2012 ; Auzély-Velty et al, 1999, 2000; Bonnet et al, 2012 ; Roux et al, 2002, 2007ab, 2013 ; Angelova et al, 2008 ; Gervaise et al, 2012 ; Bonnet et al, 2013; Miao et al, 2014).

- Les cyclodextrines dites « medusa-like » (Persubstitution ou polysubstitution sur la face primaire) (Memisoglu et al, 2003 ; Falvey et al, 2005 ; Roling et al, 2013 ; Bilensoy et al, 2008ab ; Quaglia et al, 2009 ; Perret et al, 2013b ; Seyedi et al, 2010, 2011).
- Les cyclodextrines dites « skirt-shaped » (Persubstitution ou polysubstitution sur la face secondaire) (Zhang et al, 1991 ; Skiba et al, 1996ab ; Pedersen et al, 2005 ; Choisnard et al, 2006, 2007, 2011 ; Lesieur et al, 2000).
- Les cyclodextrines dites « bouquet-shaped » (Persubstitution ou polysubstitution en C2 et C6) (Kauscher et al, 2013 ; Sortino et al, 2006 ; Callari et al, 2008 ; Vinodh et al, 2012 ; Mazzaglia et al, 2013 ; Lombardo et al, 2004).

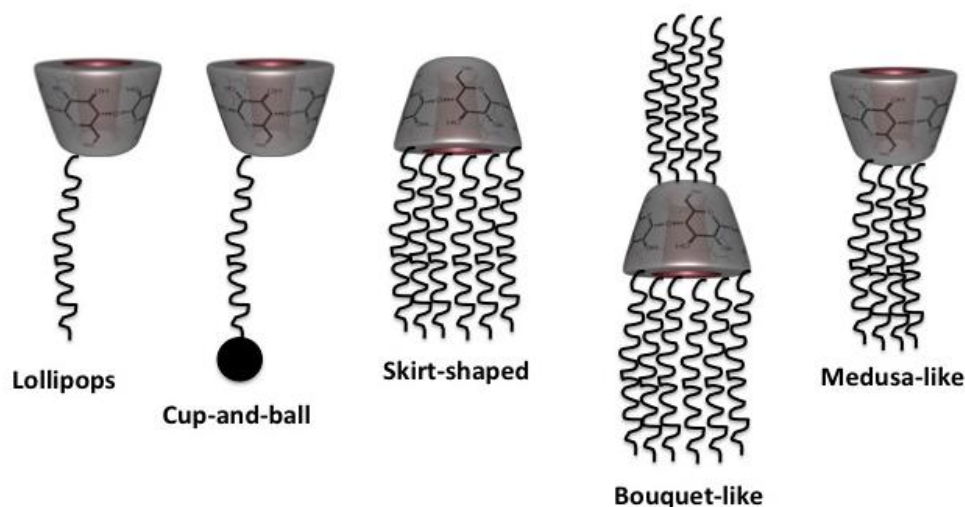


Figure 2.5 - Représentation schématique des cyclodextrines amphiphiles (D'après Roux et al, 2007a).

2.3. Cyclodextrines amphiphiles obtenues par bioestérification

Les cyclodextrines amphiphiles que nous avons étudiées au cours de cette thèse sont de type « skirt-shaped » et ont été obtenues par un procédé de synthèse original permettant de réaliser différents taux de substitution des hydroxyles situés en face secondaire en une seule étape (Choisnard et al, 2006, 2011). Ce procédé repose sur la mise en œuvre d'une réaction de transestérification en présence d'alcanoate de vinyle, catalysée par une enzyme, la thermolysine (Pedersen et al, 2005; Choisnard et al, 2006 ; Perez-Victoria et Morales, 2006). C'est une réaction irréversible se déroulant sans protection des alcools primaires. De plus, la spécificité de l'enzyme ainsi que les conditions réactionnelles favorisent l'acylation sur les hydroxyles en position C2 (Pedersen et al, 2005; Choisnard et al, 2006 ; Perez-Victoria et Morales, 2006). Cette bioestérification permet d'obtenir facilement et en grande quantité des dérivés amphiphiles α , β et γ portant des chaînes alkyles de longueurs variables allant de C4 à C14 sur la face secondaire (Choisnard et al, 2007, 2011; Gèze et al, 2009).

La **Figure 2.6** illustre ce procédé dans le cas des dérivés substitués par des chaînes à dix atomes de carbone qui correspond à l'objet d'étude de la thèse.

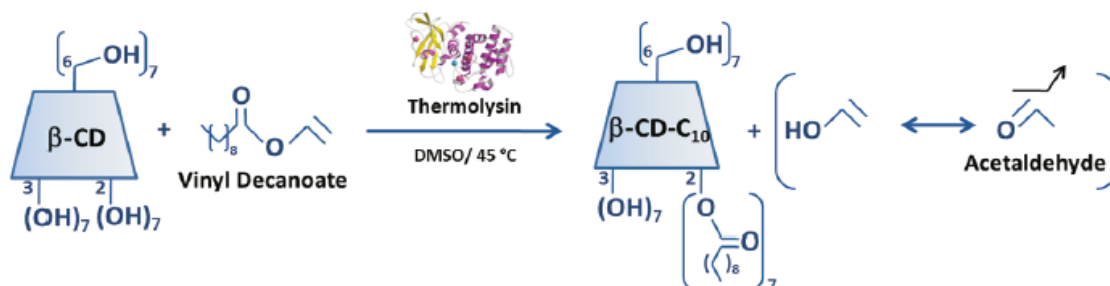


Figure 2.6 - Synthèse de la β CD-C10 catalysée par la thermolysine (Choisnard et al, 2011).

Différentes méthodes analytiques (RMN, Spectroscopie de masse...) ont été utilisées pour identifier la formule chimique des cyclodextrines modifiées par bioestérification et pour caractériser leur structure (Choisnard et al, 2006, 2011; Gèze et al, 2009). Ces analyses ont montré que les produits réactionnels sont constitués d'un mélange de cyclodextrines estérifiées présentant différents degrés de substitution et de stéréo-isoméries différentes pour le même degré de substitution (Choisnard et al, 2006, 2007, 2011 ; Gèze et al, 2009 ; Yaméogo et al, 2012, 2014). Ces études ont également montré que les cyclodextrines bioestérifiées sont majoritairement substituées en position 2 (Pedersen et al, 2005 ; Choisnard et al, 2006 ; Yaméogo et al, 2012).

La simplicité du procédé réactionnel et l'utilisation de ces différentes techniques d'analyses permettent d'avoir un contrôle sur la composition des produits de réaction.

Les cyclodextrines amphiphiles estérifiées sur la face secondaire par substitution enzymatique de chaînes aliphatiques sont capables de s'auto-organiser et de former des systèmes colloïdaux tels que des nanosphères ou des vésicules par simple changement de milieu solvant selon la méthode de nanopréciipitation (Gèze et al, 2009 ; Yaméogo et al, 2012, 2014). Cependant, le type d'auto-assemblage obtenu dépend étroitement de la longueur des chaînes aliphatiques, position et degré de substitution (Yaméogo et al, 2012 ; Choisnard et al, 2006, 2007, 2011).

Les images de la **Figure 2.7** montrent que plusieurs architectures selon le type de dérivé :

- sphériques sans organisation visible (β CD-C6),
- sphériques mais avec une structure multilamellaire (β CD-C10),
- à des nano-objets en forme de tonneaux (β CD-C8 et β CD-C14).

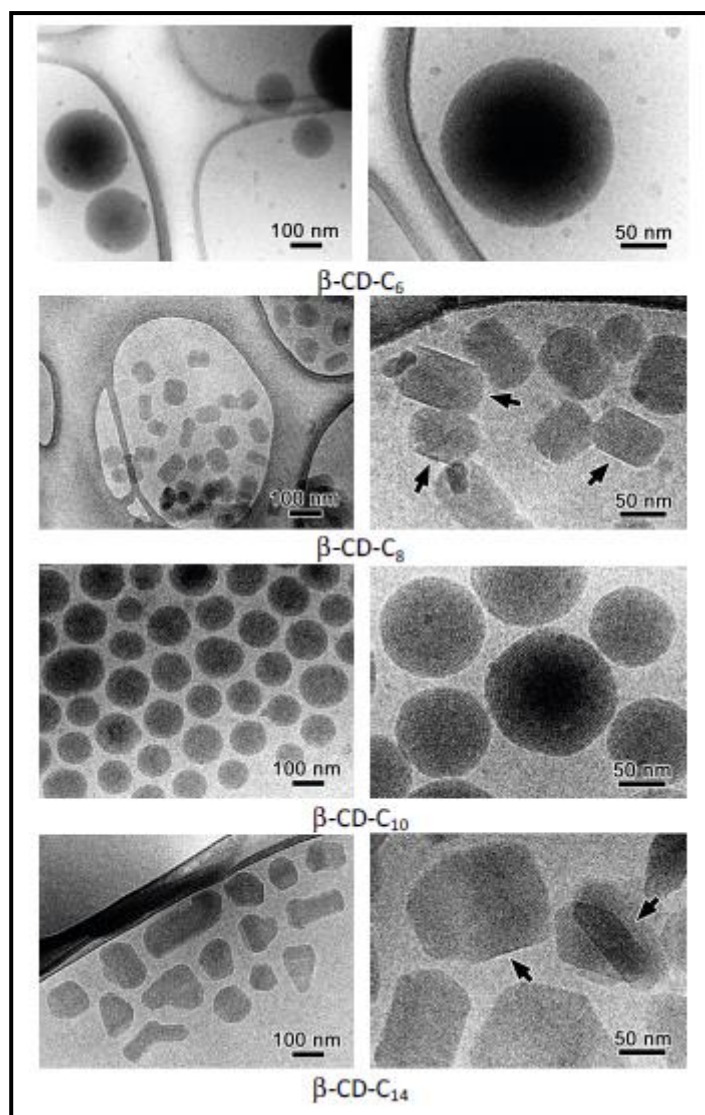


Figure 2.7 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de β CD-C10 substituées par des chaînes de longueurs allant de C6 à C14 (Choisnard et al, 2007).

D'autres observations de particules d' α -, β - et γ -cyclodextrines ont été réalisées par Cryo-MET et montrent également ces différences de morphologies cette fois selon la dimension de la cage (**Figure 2.8**).

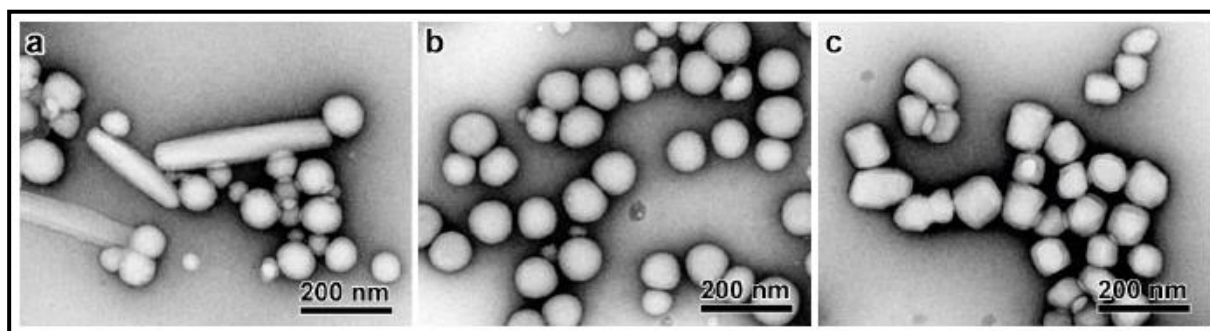


Figure 2.8 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules d' α CD-C10 (a), β CD-C10 (b) et γ CD-C10 (c) (Yaméogo et al, 2012 ; Gèze et al, 2009).

L'étude du dérivé β CD-C10 par Cryo-MET ont montré que selon le degré de substitution de ce dérivé, il pouvait adopter également différentes structures (**Figure 2.9**)

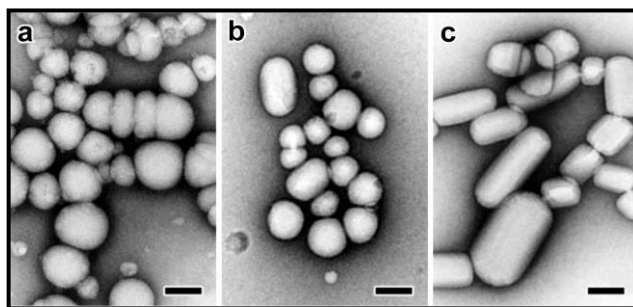


Figure 2.9- Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de β CD-C10 avec différents degrés de substitution: (a) 3.8, (b) 5.3, et (c) 6.6. Barre d'échelle : 100 nm (Choisnard et al, 2011).

Ces structures ont été caractérisées par Diffraction des Rayons X aux petits angles (**Figure 2.10**).

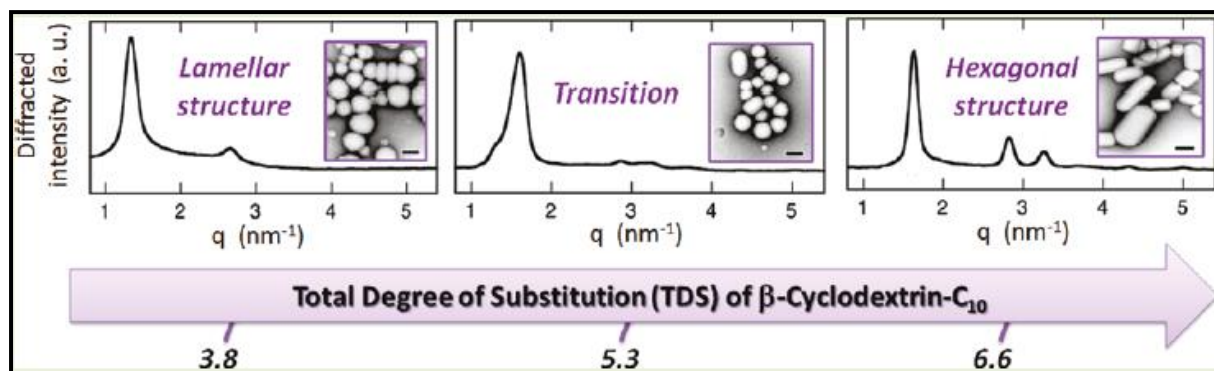


Figure 2.10 - Images de Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de β CD-C10 avec différents degrés de substitution (TDS) et leurs profils de Diffraction de rayons X aux petits angles (Choisnard et al, 2011).

Les dérivés β CD et notamment la β CD-C10 sont donc capables de former des nanoparticules aux architectures variées. Le dérivé utilisé au cours de cette thèse présente un degré de substitution supérieur à 6,6 et forme préférentiellement des tonneaux à structure interne hexagonale après nanoprécipitation.

3. Les systèmes mixtes cyclodextrines amphiphiles/lipides

Les cyclodextrines modifiées par adjonction de résidus hydrocarbonés sur leur cavité offrent la possibilité de les associer à des composés lipidiques eux-mêmes amphiphiles et capables de s'auto-assembler. Ces derniers peuvent être de classes différentes, de préférence polaires pour favoriser une future interaction avec les barrières biologiques que sont les membranes cellulaires lorsque l'on envisage des applications pharmaceutiques. Les lipides polaires d'intérêt sont soit des lipides lyotropes de classe II car ils forment des mésophases que l'on peut disperser en milieu aqueux, soit des lipides solubles de classe IIIA car ils forment des micelles. Dans le chapitre de revue qui suit sont présentées les cyclodextrines amphiphiles et les assemblages mixtes résultant de leur association ou interaction avec d'autres amphiphiles : lipides, tensioactifs ou peptides (Zerkoune et al, 2014).

REVUE

Nano-Assemblies of Modified Cyclodextrins and Their Complexes with Guest Molecules: Incorporation in Nanostructured Membranes and Amphiphile Nanoarchitectonics Design

Nanomaterials **2014**, 4, 741-765; doi:10.3390/nano4030741

Review

Nano-Assemblies of Modified Cyclodextrins and Their Complexes with Guest Molecules: Incorporation in Nanostructured Membranes and Amphiphile Nanoarchitectonics Design

Leïla Zerkoune, Angelina Angelova * and Sylviane Lesieur

CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, Paris-Sud 11 University, 92290 Châtenay-Malabry, France; E-Mails: leila.zerkoune@u-psud.fr (L.Z.); sylviane.lesieur@u-psud.fr (S.L.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: angelina.angelova@u-psud.fr; Tel.: +33-1-46-83-53-49; Fax: +33-1-46-83-53-12.

Received: 13 June 2014; in revised form: 28 July 2014 / Accepted: 28 July 2014 /

Published: 20 August 2014

Abstract: A variety of cyclodextrin-based molecular structures, with substitutions of either primary or secondary faces of the natural oligosaccharide macrocycles of α -, β -, or γ -cyclodextrins, have been designed towards innovative applications of self-assembled cyclodextrin nanomaterials. Amphiphilic cyclodextrins have been obtained by chemical or enzymatic modifications of their macrocycles using phospholipidyl, peptidolipidyl, cholesteryl, and oligo(ethylene oxide) anchors as well as variable numbers of grafted hydrophobic hydrocarbon or fluorinated chains. These novel compounds may self-assemble in an aqueous medium into different types of supramolecular nanoassemblies (vesicles, micelles, nanorods, nanospheres, and other kinds of nanoparticles and liquid crystalline structures). This review discusses the supramolecular nanoarchitectures, which can be formed by amphiphilic cyclodextrin derivatives in mixtures with other molecules (phospholipids, surfactants, and oligonucleotides). Biomedical applications are foreseen for nanoencapsulation of drug molecules in the hydrophobic interchain volumes and nanocavities of the amphiphilic cyclodextrins (serving as drug carriers or pharmaceutical excipients), anticancer phototherapy, gene delivery, as well as for protection of instable active ingredients through inclusion complexation in nanostructured media.

Keywords: amphiphilic cyclodextrins; self-assembly; cyclodextrin nanoassemblies; mixed supramolecular cyclodextrin materials; nanoparticles; nanoencapsulation; gene and drug delivery

1. Introduction

Self-assembled nanomaterials of amphiphilic molecules have attracted considerable recent interest for diverse biomedical applications including the development of drug delivery systems and stimuli-responsive nanodevices [1–10]. Nano-objects (nanoparticles, liposomes, nanocapsules, nanospheres) with interesting properties can be fabricated from lipids, polymers, and/or amphiphilic cyclodextrins among other building blocks. Attention has been paid also to the synthesis of hybrid amphiphilic molecules, which can convey new structural features, bioactive and/or photoactive functionalities, capacity for transport through biomembranes, and a possibility for nanocarrier detection in physiological medium. The investigations of the structure-property and structure-activity relationships are thus of fundamental importance.

Grafting of hydrophobic moieties on the primary or the secondary faces of natural cyclodextrins (cyclic oligosaccharides forming nanocavity structures) confers them an amphiphilic character [11–21]. Synthesis of various modified cyclodextrins has been undertaken because such amphiphilic compounds may self-organize in aqueous phase to form supramolecular assemblies as drug carriers of high stability upon dilution [22–28]. The combination between the ability of the cyclodextrin derivatives to form colloidal suspensions of nano-sized dispersed particles and their capacity to form inclusion complexes with hydrophobic drugs has distinguished these systems as pretty valuable for drug encapsulation [29–39]. An important feature for the drug delivery field comes from the fact that the majority of amphiphilic cyclodextrins are considered to be non-hemolytic and non-cytotoxic [40–48]. Mixed amphiphilic nanostructures of phospholipids and modified cyclodextrin have been of special interest because these systems may display high affinity for interaction with biological membranes [49–57].

The first part of this review briefly presents the different classes of amphiphilic cyclodextrins. The second part describes the supramolecular assemblies of amphiphilic cyclodextrins alone or in self-assembled mixtures with other molecules of therapeutic significance. Different potential applications of the nanoassemblies formed by amphiphilic cyclodextrins upon interaction with biomolecules and other amphiphiles are outlined in the last part of the review.

2. Amphiphilic Cyclodextrins

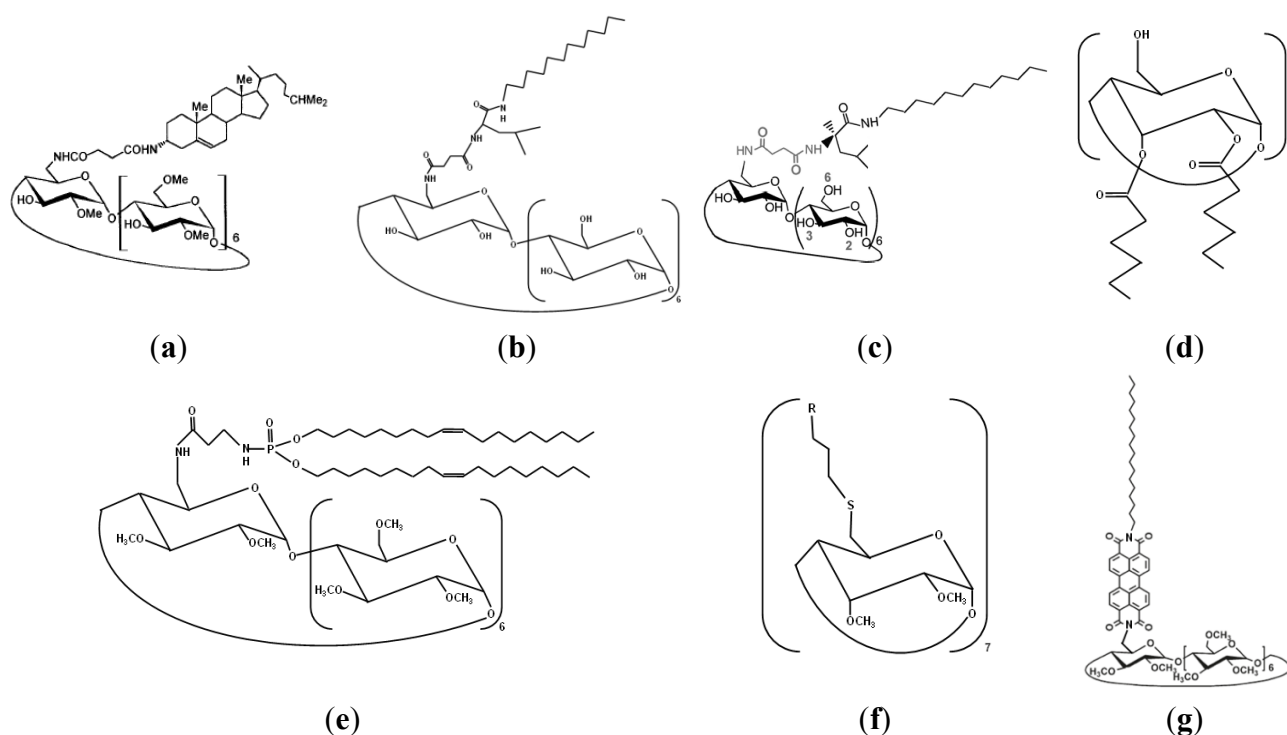
The concept of amphiphilic cyclodextrins is based on modulation of the hydrophobic/hydrophilic balance of their construction as well as of their self-assembly properties through grafting of single or multiple substituents on the primary, secondary or both faces of native cyclodextrins [11–67]. Cyclodextrin modifications can be performed by enzymatic pathways [17,20,22] or by chemical conjugation reactions using amino, amido, thio, ester, ether or fluoro bonds [11,12,42,61–67]. The versatility of this approach has led to the synthesis of a huge number of amphiphilic cyclodextrin systems [68–82].

Three major classes of amphiphilic cyclodextrins can be distinguished as a function of the modifications of the cyclodextrin rims:

- (i) Cyclodextrins with hydrophobic anchors on the primary face: “Medusa-like” molecules;
- (ii) Cyclodextrins with hydrophobic anchors on the secondary face: “Skirt-shaped” molecules;
- (iii) Cyclodextrins with hydrophobic or hydrophilic anchors on the both faces: “Bouquet-like” molecules.

The first two categories of compounds may be subdivided also into monosubstituted and persubstituted amphiphilic cyclodextrins. Figure 1 shows a few examples of modified cyclodextrins as representative derivatives in this review on self-assembled amphiphilic nanoarchitectures.

Figure 1. Amphiphilic cyclodextrins obtained by modifications of the macrocycle: (a) cholesteryl-cyclodextrin; (b) peptidolipidyl-cyclodextrin; (c) monolauryl-cyclodextrin; (d) hexanoyl-cyclodextrin; (e) phospholipidyl-cyclodextrin; (f) fluorinated-cyclodextrin ($\beta\text{C}_6\text{F}_{13}$: $\text{R}=\text{C}_6\text{F}_{13}$); and (g) octadecylperylene-cyclodextrin. The chemical structures in (b), (d), (e), and (f) depict the compounds studied in refs. [12,23,41,42] respectively. (a) Reprinted with permission from [39]. Copyright (2000) American Chemical Society. (c) reprinted with permission from [54]. Copyright (2013) American Chemical Society. (g) reprinted with permission from [38]. Copyright (2010) American Chemical Society. Methylation of the secondary cyclodextrin faces in (a), (e), (f), (g) yields permethylated derivatives.



2.1. Cyclodextrins Modified by Large Moieties on the Primary Face

2.1.1. Monosubstituted Amphiphilic Cyclodextrins

Amphiphilic cyclodextrins, monosubstituted on the primary face, have been obtained by anchoring of single hydrophobic moieties such as cholesterol, alkyl chains of variable lengths, fluorinated chains, or more complex synthetic peptidolipidyl and phospholipidyl substituents (see for instance Figure 1b,c).

One of the purposes of the design and preparation of these amphiphilic derivatives has been the development of nanocarriers with an affinity for insertion into model lipid bilayers and natural biological membranes. Another purpose has been the formation of colloidal supramolecular aggregates, in which the cyclodextrin cavities may serve as drug transporter units.

In this context, Auzély-Velty *et al* [11,39] reported the grafting of cholesteryl moieties, through spacers of various lengths, on the primary hydroxyl groups of the β -cyclodextrin molecule (which was permethylated on its secondary face). The original amphiphilic compounds have shown a capacity to incorporate into phospholipid bilayer systems. This property may be exploited for enhancement of the cellular membrane permeability of drug-loaded cyclodextrin nanocarriers.

2.1.2. Polysubstituted Amphiphilic Cyclodextrins

Di- and polysubstituted amphiphilic cyclodextrins have been obtained by grafting of aliphatic chains or cholesteryl moieties on the primary hydroxyl groups of the cyclodextrin rim via amine, sulphur or sulfoxide linkers [13–16,53,54]. Studies of the interfacial properties of these compounds have shown that they may form stable monomolecular layers at the air-water interface [13–16]. For alkyl chain lengths longer than eight carbon atoms (C_8), the monolayer transfer from the air/water interface to a solid support has yielded Langmuir-Blodgett multilayer films [15]. The recognition properties of the cyclodextrin nanocavities have been demonstrated by the Langmuir-Blodgett technique using azobenzene isomers as guest molecules dissolved in the aqueous subphase beneath the amphiphilic monolayers [14,15]. High monolayer integrity has been observed with a dicholesteryl-substituted cyclodextrin [16]. However, this compound, depending on its molar fraction in binary systems, has shown a tendency for two-dimensional phase segregation in mixed monolayers with phospholipids, for instance those of dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC) [16].

2.2. Cyclodextrins Modified on the Secondary Face

Amphiphilic cyclodextrins of a “skirt-shape” type have been prepared by esterification of the hydroxyl groups on the secondary face of native cyclodextrins using acyl donors with variable chain lengths (C_4 – C_{16}). This esterification has been achieved through chemical or enzymatic pathways [17–26]. The obtained cyclodextrin derivatives (see for instance Figure 1d [23]) have self-organized into various supramolecular assemblies upon nanoprecipitation in solvents [21–23]. Their studies as potential drug carriers have established that the morphological (spherical, rod-like, irregular shape) features of the nanoparticles are crucial in determining the drug transport, the loading capacity of the nanocarriers for drugs, the *in vitro* release profiles, and the associated pharmacological parameters [24–26]. For decanoate- β -cyclodextrin esters, the inner nanoparticle organization has been shown to be of a multilamellar onion-like type [17]. Such multilamellar organization may be expected to provide enhanced nanoencapsulation for guest poor-soluble small drug molecules (e.g., diazepam, indomethacin, bifenazole, clotrimazole). Steric stabilization of the cyclodextrin nanocarriers against aggregation has been achieved by adding of surfactant shells on the particles (e.g., Pluronic F68, Span 85, Montane 80) in some cases [21].

2.3. Cyclodextrins Modified on Both Faces

Figure 1e–g shows examples of cyclodextrin structures modified on both faces, the secondary faces being substituted by methyl groups. In the work of Gervaise *et al* [12], two long phospholipidyl chains were grafted through an amine function on the cyclodextrin ring (Figure 1e). The physicochemical characterization of the obtained cyclodextrin derivatives has established their tensioactive properties, provoking spontaneous self-assembly in water and formation of nanoparticles, which might serve as drug nanocarriers. However, fusion of the nanoparticles into larger aggregates (>350 nm) upon storage has indicated the need of their steric stabilization against aggregation by means of additional polar substitutions.

“Bouquet-like” cyclodextrin molecules have been produced by grafting of hydrophobic (aliphatic chains) and hydrophilic substituents on the primary and secondary faces, respectively, of the cyclodextrin macrocycles in different configurations yielding libraries of new compounds [27–32]. Depending on the balance between the hydrophobic and hydrophilic anchors, supramolecular aggregates have been spontaneously assembled in a broad concentration range in aqueous medium. The introduction of hydrophilic oligo(ethylene glycol) chains onto the secondary face of the cyclodextrin ring has enhanced the aqueous solubility of the novel amphiphilic derivatives [30]. In addition, it has improved the long circulating properties of the nanoassemblies [58]. Based on structural measurements, some of these chemically modified β -cyclodextrins have been suggested to form core-shell types of micellar aggregates of diverse shapes [27]. On the other hand, cyclodextrin compounds modified on both faces have been developed with the purpose to use them as artificial transmembrane receptors [28]. They have been embedded in either liposome membranes or in giant unilamellar vesicles of phospholipids. “Bouquet-like” cyclodextrin derivatives, substituted on both sides of the ring, have been studied as porphyrin-encapsulating carrier-sensitizer system for photodynamic anticancer therapy [29,30,32].

3. Supramolecular Assemblies of Amphiphilic Cyclodextrins

Amphiphilic cyclodextrins may self-assemble into a variety of nanoobjects [18–21,29–48] depending on the chemical nature, geometrical arrangement and lipophilicity of their grafted moieties (Figure 2 and Table 1). The aggregation process upon self-assembly may depend also on the concentration of the studied amphiphiles, the solvent medium, and temperature [38]. Nanoprecipitation has been the first method proposed for nanospheres preparation with high yield [19,23,37].

Figure 2. Schematic presentations of nanoarchitectures and nanoparticles involving amphiphilic cyclodextrins [27,30,38,79,80]. Reprinted with permission from [27]. Copyright (2004) American Chemical Society. Reprinted with permission from [30]. Copyright (2013) American Chemical Society. Reprinted with permission from [38]. Copyright (2010) American Chemical Society. Reprinted with permission from [79]. Copyright (2014) American Chemical Society. Reprinted with permission from [80]. Copyright (2011) American Chemical Society.

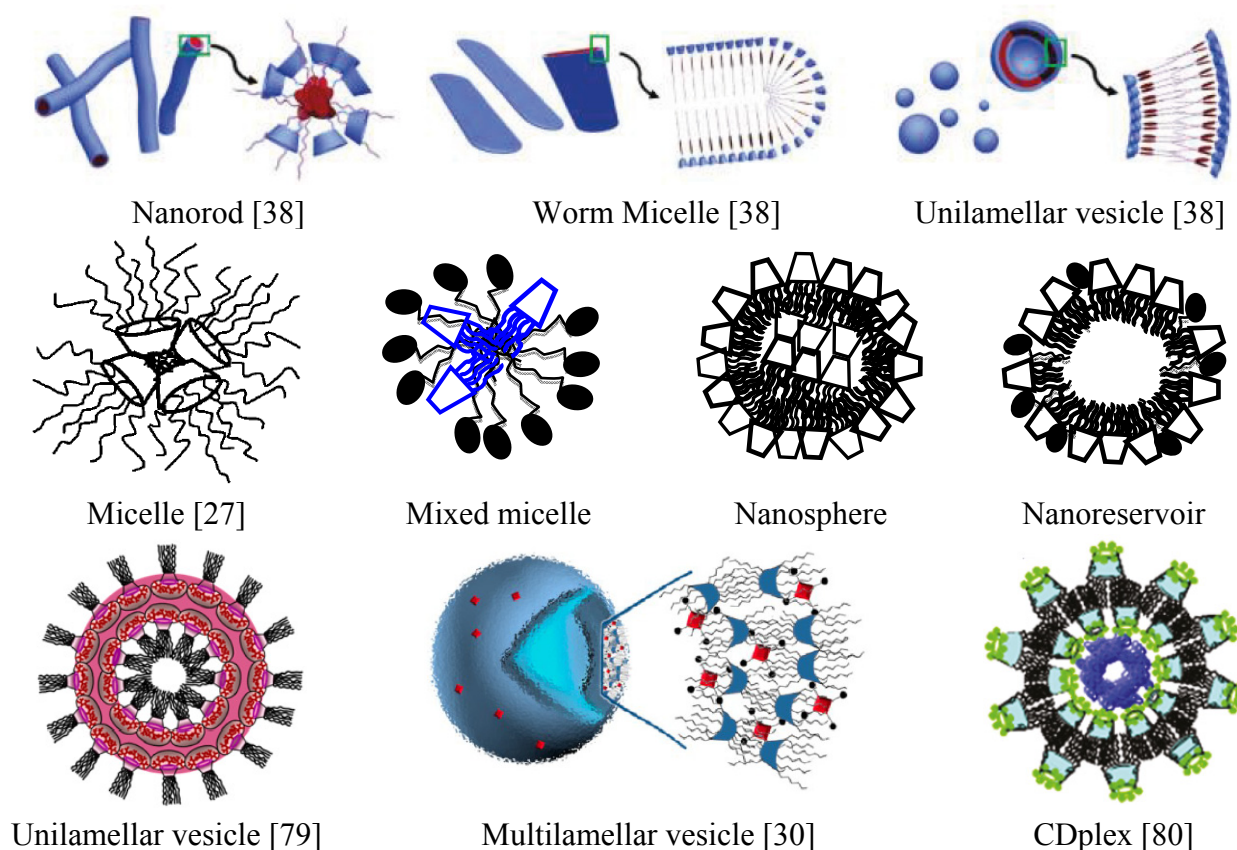


Table 1. Nanosystems formed by self-assembly of amphiphilic cyclodextrins.

Amphiphilic cyclodextrins	Organized systems	Refs.
2,3-diacyl- <i>O</i> - β -cyclodextrin	Nanocapsules	[21]
Heptakis(2- ω -amino- <i>O</i> -oligo(ethylene oxide)-6-hexylthio)- β -CD (SC6CDNH2)	Nanoparticles	[29]
Heptakis(2- <i>O</i> -oligo(ethylene oxide)-6-hexylthio)- β -CD (SC6OH)	Nanoparticles	[30]
2,3-di- <i>O</i> -hexanoyl cyclomaltoheptaose (β CD-C6)	Nanocapsules	[31]
SC6NH2@SC6Dns	Nanoparticles	[32]
2,6-di- <i>O</i> -methyl- β -CD	Micelles	[33]
β CD-C6	Nanospheres/Nanocapsules	[34]
β CD-C6/6- <i>N</i> -CAPRO- β -CD	Nanospheres	[35]
β CD-C6/6- <i>N</i> -MYRISTO- β -CD	Nanocapsules	[36]
β CD-C6/ β CD-C12/ β CD-C14	Nanospheres	[37]

Table 1. Cont.

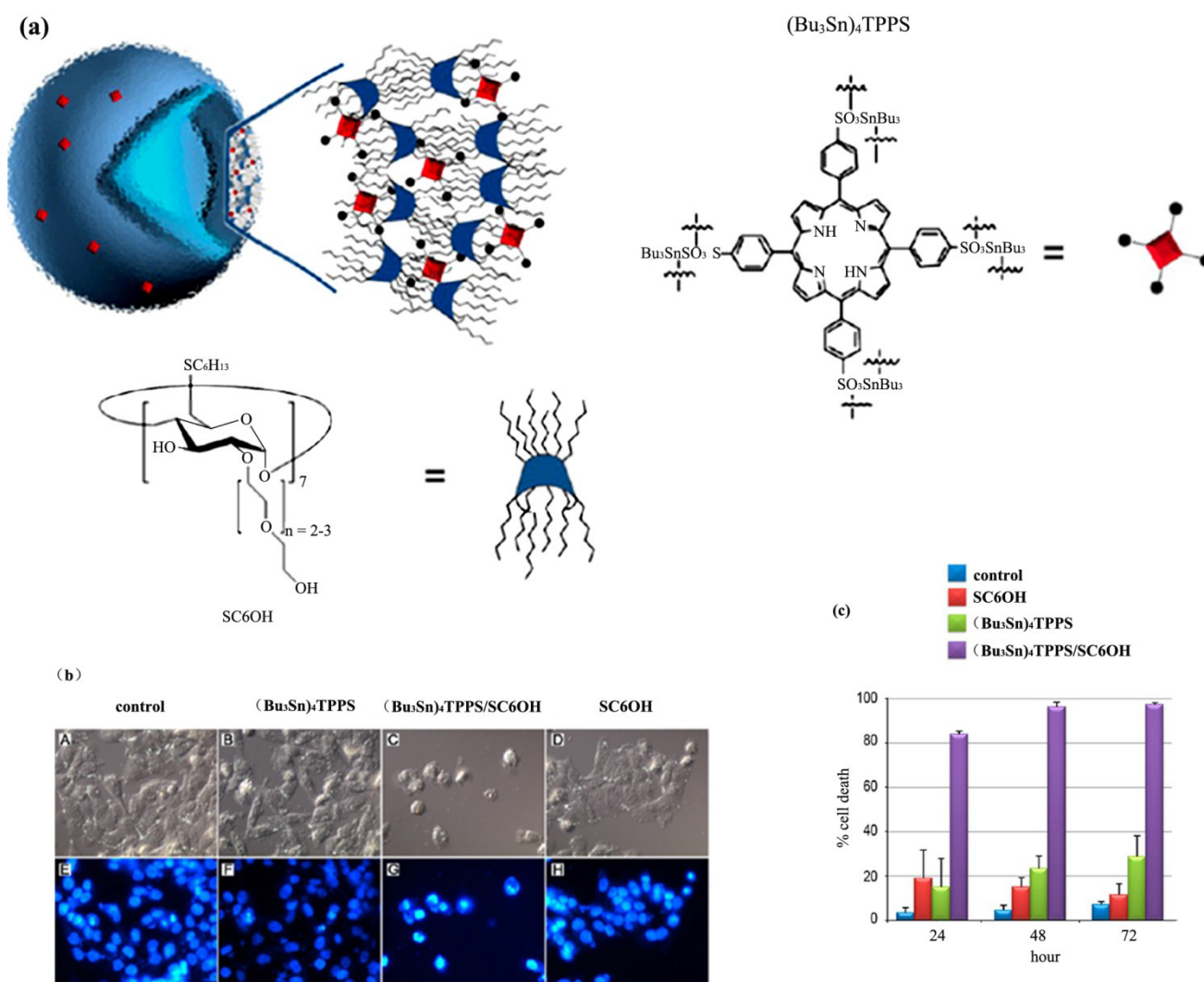
Amphiphilic cyclodextrins	Organized systems	Refs.
N-Octadecylperylene 3,4:9,10 tetra-carboxylic-3,4-permethyl- β -cyclodextrin-9,10-imide	Nanorods, Micelles, Vesicles	[38]
6 ^I -(Cholest-5-en-3 α -ylamido)succinylamido-6 ^I -deoxy- <i>per</i> (2,6-di- <i>O</i> -methyl)cyclomaltoheptaose	Micelles	[39]
Mono [6-(2-aminohexylamino)-6-deoxy]- β -cyclodextrin	Nanorods, vesicles	[40]
Hexakis[6-deoxy-6-(3-perfluorohexylpropanethio)-2,3-di- <i>O</i> -methyl]- α -cyclodextrin (α -C6F13) or β -C6F13	Nanospheres	[41]
<i>N</i> -dodecyl- <i>N</i> α -(6 ^I -amidossuccinyl-6 ^I -deoxy-2 ^I ,3 ^I -di- <i>O</i> -methyl-hexakis-(2 ^{II} -V ^{II} ,3 ^{II} -V ^{II} ,6 ^{II} -V ^{II} tri- <i>O</i> -methyl)-cyclomaltoheptaose)- <i>L</i> -leucine	Micelles/Colloidal aggregates	[42]
Folate-polycationic amphiphilic CD	Nanocomplexes with DNA	[43]
Polycationic amphiphilic CD	Nanocomplexes with siRNA	[44]
Polycationic glyco-amphiphilic CDs	Nanocomplexes with DNA	[45]
Polycationic amphiphilic CD	Nanocomplexes with DNA	[45,46]
Poly-6-cationic amphiphilic CD	Nanocomplexes with DNA	[46]
Cationic amphiphilic β -cyclodextrins (hydrophobic <i>n</i> -alkylthio chains (C16) at the primary hydroxyl face and hydrophilic ω -amino-oligo(ethylene glycol) units at the secondary face)	Bilayer vesicles	[47]
SC8CDcysteamine (lipophilic group on the secondary face)	Nanocomplexes with siRNA	[48]
SC8CDcysteamine (lipophilic group on the primary face)	Nanocomplexes with siRNA	[48]

In the following, we discuss some interesting examples of organized amphiphilic cyclodextrin systems.

3.1. Colloidal Systems Involving Amphiphilic Cyclodextrins

Cyclodextrin/porphyrin (SC6OH/(Bu₃Sn)₄TPPS) nanoassemblies with improved stability in aqueous medium and anticancer properties have been reported by Mazzaglia *et al.* [30]. The balance between the hydrophobic and hydrophilic chains grafted on both sides of the cyclodextrin macrocycle (Figure 3) has been crucial for modulation of the lipophilicity of the generated complexes, their cellular internalization efficiency, and cytotoxicity. Intracellular delivery studies of the SC6OH/(Bu₃Sn)₄TPPS nanoparticles in A375 human melanoma cells have established that the porphyrin species may be transported by the SC6OH nanocarriers in order to enter into the nucleus of the cells and concentrate in the nucleoli. The morphology of the melanoma cells has changed and the cell proliferation has been blocked at low concentration of the nanoassemblies, whereas high concentrations have induced the apoptosis of the A375 melanoma cells.

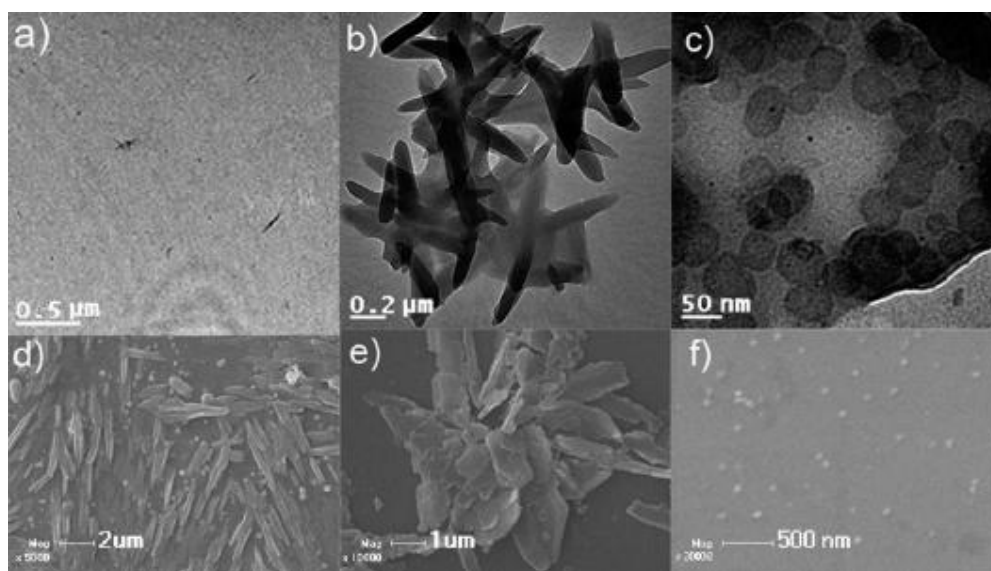
Figure 3. Supramolecular assemblies of amphiphilic cyclodextrins studied *in vitro* as potential nanotherapeutics [30]. (a) Chemical composition of the nanoassemblies of SC6OH (heptakis(2-*O*-oligo(ethylene oxide)-6-hexylthio)- β -CD) and $(\text{Bu}_3\text{Sn})_4\text{TPPS}$ (*meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine tributyltin(IV) derivative) formed in aqueous medium; (b) nuclear morphology of A375 melanoma cells treated with $(\text{Bu}_3\text{Sn})_4\text{TPPS}/\text{SC6OH}$ nanoassemblies; (c) cytotoxic effects of $(\text{Bu}_3\text{Sn})_4\text{TPPS}/\text{SC6OH}$ nanoassemblies on the A375 human melanoma cells viability. Reprinted with permission from [30]. Copyright 2013, American Chemical Society.



The effect of the solvent polarity on the self-assembled morphologies and aggregation behavior of an amphiphilic octadecylperylene-cyclodextrin has been demonstrated by Jiang *et al.* [38]. The authors have synthesized an asymmetric water-insoluble cyclodextrin-perylene conjugate (see the chemical structure shown in Figure 1g, bottom right panel). Depending on the solvent medium (binary water/methanol mixtures of varying volume ratios), the morphologies of the self-assembled cyclodextrin architectures have evolved from nanorods (formed in pure methanol) to floppy micelles (generated in a 4:6 water/methanol mixture) and spherical vesicles (stable in a 9:1 water/methanol mixture) (see the shapes in Figure 2, top line). The microscopic examination of the dry aggregate

morphologies by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) has confirmed the suggested solution-phase self-assembly pathways (Figure 4). Applications of such nanoassemblies have been foreseen in fluorescence sensory materials, photoinduced electron transfer systems, photoresponsive materials, and organic electronic devices [38]. A morphological transformation from nanorods to vesicles has been reported also for a mono[6-deoxy-*N*-*n*-hexylamino-(*N*'-1-anthraquinone)]- β -cyclodextrin derivative as a function of the composition of the aqueous phase [40].

Figure 4. TEM (a–c) and SEM (d–f) images showing the solvent-dependent morphologies of supramolecular assemblies formed by an amphiphilic octadecylperylene-cyclodextrin derivative in mixed solvents with increasing polarity. From left to right: methanol, 4:6 water/methanol mixture, and 9:1 water/methanol mixture [38]. Reprinted with permission from [38]. Copyright 2010, American Chemical Society.

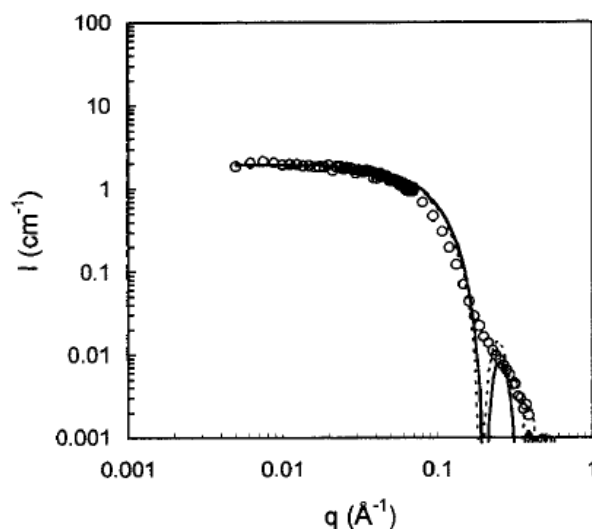


Amphiphilic cholesteryl cyclodextrins, such as Chol-DIMEB, have been shown to self-aggregate into core-shell particles (Figure 5) in the form of micelles that are of interest for drug delivery applications [39]. Because of the small sizes (~ 5 nm) of the micellar structures formed by the monosubstituted cyclodextrins, molecular dynamics simulations and small-angle neutron scattering (SANS) (rather than electron microscopy) have been preferably employed to determine the aggregation number, the dimensions and shape of the resulting supramolecular aggregates [33,39]. The cyclodextrin nanocavities in the micellar assemblies have been established to be exposed toward the aqueous phase. In this manner, they possessed sufficient flexibility for capturing of guest drug molecules [33]. Similarly to non-ionic detergent micelles, the micellar assemblies of amphiphilic cyclodextrins have displayed enhanced solubilization capacity for poor soluble molecules [39].

Chiral peptidolipidyl-cyclodextrins have been designed based on a hybrid concept [42] with the purpose of preparing bioactive nanocarriers adapted for interaction with biological interfaces and membranes. The obtained peptidolipidyl-cyclodextrin derivative *N*-dodecyl- N_{α} -(6^I-amidosuccinyl-6^I-deoxy-2^I,3^I-di-*O*-methyl-hexakis-(2^{II-VII},3^{II-VII},6^{II-VII}-tri-*O*-methyl)-cyclomaltoheptaose)-*L*-leucine has been shown to spontaneously organize in supramolecular architectures upon dispersion in buffer medium. Its propensity to form colloidal aggregates and solubilize hydrophobic dye molecules has been

studied by optical density (OD) measurements, quasi-elastic light scattering (QELS), NMR and UV-Visible spectroscopy [42]. The obtained nanoparticles have been established to exceed in size the dimensions of the globular micelles formed by cholesteryl cyclodextrins [39]. The observed aggregation behavior has been found to be reversible.

Figure 5. SANS spectrum acquired with monodispersed Chol-DIMEB micelles (10^{-2} M) assembled in D_2O solution at 25 °C. The solid line represents the calculated model curve for non-interacting two-shell spherical micelles. The dotted line represents the calculated model curve for independent homogeneous spherical micelles [39]. Reprinted with permission from [39]. Copyright 2000, American Chemical Society.

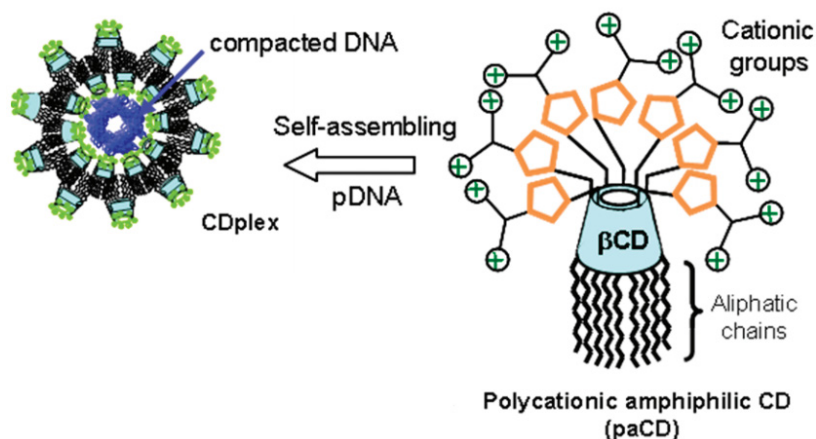


Cyclodextrin nanospheres of 2,3-di-*O*-hexanoyl cyclomaltooctaose (γ -CDC6) have been prepared by the nanoprecipitation method and their physical stability upon addition of solubilizing surfactant *n*-octyl- β -D-glucopyranoside (OG) was examined by Lemos-Senna *et al.* [55]. It has been established that the non-ionic detergent, at a critical ratio reached upon continuous addition of OG solution to the γ -CDC6 nanospheres, begins to disrupt the spherical organization of the initial particles (nanospheres). Evidence for the formation of mixed γ -CDC6-OG micelles has been obtained under solubilizing conditions (*i.e.*, at elevated OG concentrations). Moreover, the detergent interaction with the nanospheres has occurred in a reversible manner. This result has confirmed the higher physical stability of the investigated cyclodextrin nanocarriers in comparison to liposomes formed by phospholipids.

3.2. Organized Nanosystems of Amphiphilic Cyclodextrins as Non-Viral Gene Carriers

The circumstance that nanostructure-mediated non-viral nucleic-acid delivery is insufficiently developed yet for clinical applications has strongly motivated the research on novel synthetic amphiphilic cyclodextrin assemblies as potential non-viral gene carriers [43,45,46,61–64,80]. The successful entry of plasmid DNA (a multianionic macroion) into the living cells requires a complex formation between DNA and cationic carriers (CDplexes) enabling the DNA compaction and facilitating the CDplex adsorption at the negatively charged biomembranes towards cellular internalization and targeted delivery (Figure 6).

Figure 6. Schematic representation of polycationic amphiphilic cyclodextrins (CD) (**right**); which may form nanocomplexes (CDplexes) upon assembly with negatively charged pDNA (**left**) [80]. Reprinted with permission from [80]. Copyright (2011) American Chemical Society.



A library of polycationic amphiphilic cyclodextrins for plasmid DNA (pDNA) delivery has been investigated by O'Neill *et al.* [46,62]. The authors have shown that attachment of functional groups (relevant to development of gene carriers) has been possible on both the primary and the secondary faces of the cyclodextrin ring. In a first instance, amino groups have been conjugated on the primary-hydroxyl face and lipid chains have been anchored on the secondary-hydroxyl face of the macrocycle. Interestingly, the orientation of the lipid tails grafted on the cyclodextrin ring has been established to influence the transfection efficiency of Caco-2 cells (human colon carcinoma), the endocytotic uptake pathway of the cyclodextrin-DNA complexes (CDplexes) in an intestinal epithelium cellular model, and their intracellular trafficking. Fluorescently labelled pDNA has been used for the cellular uptake studies of the CDplexes. It has been shown that the size and charge of the complexes have been less dominant for the cellular association of the nanocarriers as compared to their chemical structure (namely, a cationic primary face and a lipophilic secondary face) [46]. The obtained results have indicated that the cationic nanoparticulate complexes of amphiphilic cyclodextrins with pDNA have been taken by the cells through endocytosis pathways. It has been stressed that the intracellular trafficking properties of these CDplexes would require improvement for the purposes of maximal gene expression [46].

4. Nanosystems of Amphiphilic Cyclodextrins Mixed with Membrane-Forming Molecules and Lipids

The fact that modified cyclodextrins can be mixed in various proportions with phospholipids, cholesterol, and other amphiphilic molecules has been exploited for preparation of functionalized lipid membranes and organized biomimetic systems (Table 2). Hydrated mixtures of lipids and amphiphilic cyclodextrins may spontaneously assemble into unilamellar spherical vesicles (Figure 7a), giant unilamellar vesicles (Figure 7b) or multilamellar liposomes [28,49–57]. More sophisticated hybrid structures, involving cyclodextrin derivatives, have been prepared by controlled deposition techniques employing nanoarchitectonics means [7,14,15]. Molecular recognition reactions, together with self-assembly, have also been used for preparation of cyclodextrin-lipid bilayer architectures in

nanoparticulate carriers (liposomes) [57] or in supported multilamellar membranes embedding cyclodextrin-functionalized lipid vesicles [56].

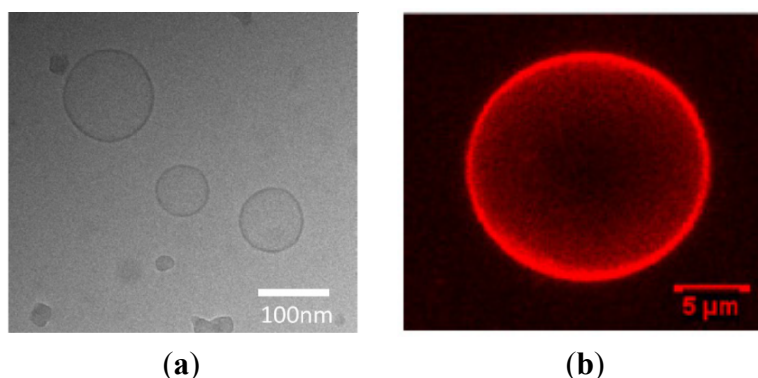
Table 2. Mixed systems formed by amphiphilic cyclodextrins and lipids.

Amphiphilic cyclodextrins	Co-Lipid(s)	Organized systems	Refs.
Per-(6-amino-2,3-di- <i>O</i> -hexyl) β -CD hydrochloride salt (NH_3 - β -CD-OC6)	1,2-dipalmitoyl,3- <i>sn</i> -phosphatidylcholine or 1,2-dipalmitoyl,3- <i>sn</i> -phosphatidic acid	Monolayers	[49]
Per-(6-dodecanoylamino-6-deoxy) β -CD (C_{11}CONH - β -CD)	1,2-dipalmitoyl,3-phosphatidylcholine (DPPC)	Monolayers	[49]
6 ^l -(cholest-5-en-3 α -ylamido)succinylamido-6 ^l -deoxy-per(2,6-di- <i>O</i> -methyl) cyclomaltoheptaose (chol-DIMEB)	Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	Newtons black films	[50]
Heptakis (2,3-di- <i>O</i> -hexanoyl)- β -CD (β CD-C6)	Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	Monolayers and hydrated multibilayers	[51]
Trimethyl- α -CD-Succinyl-Cholesterol (TASC)	Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC)	Monolayers and bilayers	[52]
Trimethyl- β -CD-Succinyl-Cholesterol (TBSC)	Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC)	Monolayers and bilayers	[52]
Trimethyl- β -CD-diSuccinyl-Cholesterol (TBdSC)	Dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC)	Monolayers and bilayers	[52]
Dilauryl- β -CD Dilauryl-di-2,6- <i>O</i> -methyl β -CD Dilauryl-tri-2,3,6- <i>O</i> -methyl β -CD	Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	Lamellar-phase bilayers	[53,54]
2,3-di- <i>O</i> -hexanoyl cyclomaltooctaose (γ CDC6)	n-octyl- β -D-glucopyranoside	Spheres	[55]
Amphiphilic β -CD (modified on the primary face)	Dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE), dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) and cholesterol	Three-dimensional multilayered structures	[56]
Amphiphilic β -CD (substituted with seven hydrophobic <i>n</i> -dodecyl chains on the primary face and seven hydrophilic oligo(ethylene glycol) groups on the secondary face)	Dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE), dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) and cholesterol	Giant unilamellar vesicles (GUV), liposomes, Mixed vesicles	[28]
Mono-(N- <i>n</i> -alkyl,N,N-dimethylamino)- β -CD	Cholesterol/dipalmitoylphosphatidyl choline mixture	Three-dimensional multilayered structures of liposome type	[57]

A number of studies have focused their attention on the affinity of amphiphilic cyclodextrins for incorporation in model and biological membranes. In general, high hydrophobicity of the cyclodextrin derivatives might constitute an obstacle for their inclusion in lipid bilayer membranes owing to the preference for phase separation in two-dimensional domains. A variety of physical and physico-chemical methods (small-angle X-ray scattering (SAXS), X-ray diffraction, small-angle neutron scattering (SANS), X-ray-reflectivity, neutron reflectivity, differential scanning calorimetry (DSC), deuterium

nuclear magnetic resonance (^2H NMR), surface pressure/area isotherms, Brewster angle microscopy (BAM), atomic force microscopy (AFM), cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM), and confocal laser scanning microscopy (CLSM)) have been employed to investigate these effects [11–54].

Figure 7. (a) Cryo-TEM image of binary vesicles consisting of a 1:1 mixture of an amphiphilic β -CD and lipids (DOPC/DOPE/Chol 50/25/25 mol%); (b) 3D reconstructed confocal laser scanning microscopy (CLSM) image of a giant unilamellar vesicle prepared from a lipid film that contains 50 mol% amphiphilic cyclodextrin (CD) (CD/DOPC/DOPE/Chol 50/25/12.5/12.5 mol%) [28]. Reprinted with permission from [28]. Copyright 2013, American Chemical Society.



Auzély-Velty *et al.* [11] have studied the incorporation of monosubstituted cholesteryl-cyclodextrins (Chol- β -CD) into model phospholipid membranes. A lamellar phase of dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) containing varying concentrations of Chol- β -CD has been investigated by means of small-angle X-ray scattering (SAXS), differential scanning calorimetry (DSC), and ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR). The authors have interpreted the presence of four Bragg peaks in the SAXS patterns (see Figure 2 in reference [11]) as due to a coexistence of two lamellar phases in the mixed phospholipid/amphiphilic-cyclodextrin assemblies. The peaks at 0.1005 and $0.2001 \text{ \AA}^{-1}$ have indicated the first- and second-order Bragg peak positions of the lamellar L_α phase of pure DMPC. The peaks at 0.0845 and $0.1672 \text{ \AA}^{-1}$ have been assigned to a coexisting lamellar phase L_{CD} (cyclodextrin-rich lamellar phase) with larger swelling. The obtained results have suggested that the Chol- β -CD molecules were entirely partitioned in the L_{CD} phase, which formed phase-separated domains from the excess L_α -phase of pure DMPC. The microphase separation has been explained by strong attractive interactions between the hydrophobic cholesteryl-cyclodextrin molecules [11].

The mixing behavior of the amphiphilic cyclodextrin $\text{C}_{11}\text{CONH-}\beta\text{-CD}$ (having a hydrophilic secondary face and multiple long alkyl chains grafted on the primary face) with phospholipids has been evaluated by a thermodynamic approach [49] based on determination of monolayer surface pressure/area isotherms under dynamic conditions. Component miscibility has been assessed on the basis of the additivity rule, the Gibbs interaction free energies of mixing, and the dependence of the monolayer collapse pressure on the composition. Thermodynamically stable mixed molecular films have been obtained with slightly negative deviations from an ideal mixing behavior. This has been attributed to the hydrophobic interaction between the alkyl chains of the cyclodextrin and those of

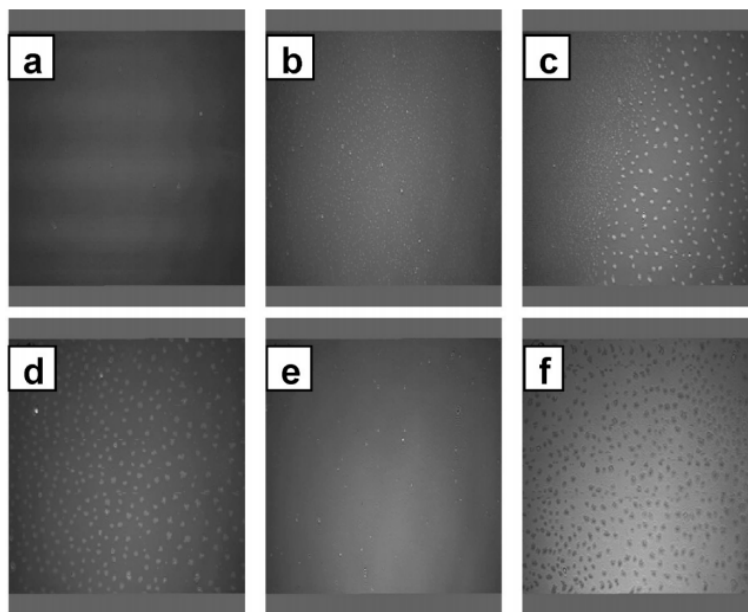
DPPC. The performed study has demonstrated the importance of the alkyl chain length (C_{11}) of the cyclodextrin molecules for the mixing behavior with lipids.

The ability of amphiphilic 2,3-di-*O*-hexanoyl- β -cyclodextrin (β -CDC6), possessing multiple hydrophobic alkyl chains (C_6) on the secondary face, to form mixed membranes with the DMPC lipid has been investigated by monolayer isotherms at the air/water interface, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction of hydrated membranes [51]. The β -CDC6 derivative has shown relatively weak affinity for the DMPC assemblies. Generally, insertion of guest amphiphilic cyclodextrins in lipid membranes may provoke local disturbance of the host membrane organization. The non-ideal behavior of the binary DMPC/ β -CDC6 monolayers, spread at the air/water interface, has indicated the partial mixing of the components. The thermotropic properties of the hydrated phospholipid have been influenced by the presence of β -CDC6. A significant broadening of the endotherms and a depression of the chain melting temperature of DMPC has been observed. At low β -CDC6 molar fractions, a mixed lamellar phase has been evidenced in fully hydrated DMPC/ β -CDC6 multibilayers (water-swollen self-assembled amphiphilic mixtures). The cyclodextrin incorporation in the DMPC lamellar phase has increased its repeat spacing at molar fractions below 7 mol%. The X-ray patterns have evidenced the formation of a new phase at a particular cyclodextrin molar content.

The insertion of monolauryl- and dilauryl- β -cyclodextrin derivatives in DMPC bilayers has been studied by deuterium NMR [53,54]. Lateral phase separation has been established between a cyclodextrin-rich phase (L_{CD}) of the dilauryl derivative and a pure lipid (DMPC) phase. The L_{CD} phase has been stabilized by intermolecular hydrogen bonds between the saccharide groups at the membrane interface. The ordering of the lipid chains, induced by the monodilauryl derivative, has been analyzed as a function of the temperature-dependent phase transitions of the studied amphiphilic mixture.

The in-plane organization of model membranes of DPPC and trimethyl- α -cyclodextrin-succinyl-cholesterol (TASC) or trimethyl- β -CD-disuccinyl-cholesterol (TBdSC), prepared by the Langmuir-Blodgett (LB) technique, has been characterized by Brewster angle microscopy (BAM) and atomic force microscopy (AFM) among other techniques [16,52]. The TASC derivative has been found to be miscible with the fluid DPPC monolayer phase, whereas demixing has been established at high surface pressures. The binary layers have been stable at increasing cyclodextrin percentage in the mixtures. Phase separation into domains has been better pronounced at a surface pressure of 40 mN/m. The cyclodextrins cavities in these domains have been suggested to be accessible for inclusion complexation [52]. Figure 8 shows BAM results of the miscibility of trimethyl- β -CD-disuccinyl-cholesterol (TBdSC) and DPPC in monolayers at the air/water interface [16].

Figure 8. BAM micrographs (image sizes: $480\ \mu\text{m} \times 599\ \mu\text{m}$) of 33 mol% TBdSC (trimethyl- β -CD-disuccinyl-cholesterol) in DPPC Langmuir monolayers at the air/water interface at $20\ ^\circ\text{C}$ and from upper left at (a) 0; (b) 14; (c) 22; (d) 34; (e) 40; and (f) 44 mN/m [16]. Reprinted with permission from [16]. Copyright 2011, American Chemical Society.

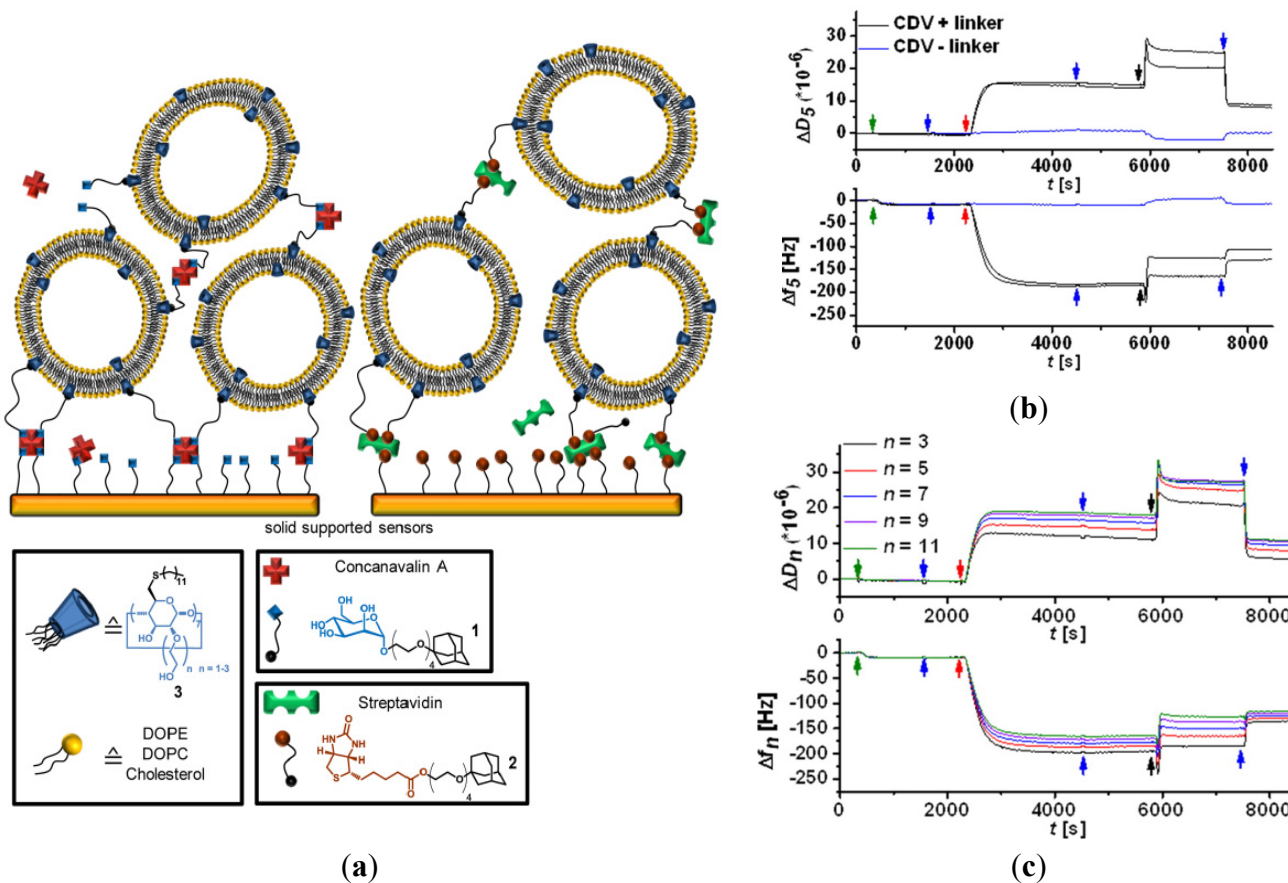


Layer-by-layer (LbL) deposition is a key method in nanoarchitectonics [7] permitting the fabrication of functional multilayer architectures based on electrostatic and/or high affinity intermolecular interactions. A hierarchical supramolecular nanoarchitecture, involving cyclodextrin-containing vesicles, has been prepared by a biomimetic approach [56]. Three-dimensional vesicle multilayers (mimicking cellular assembly constructs) have been produced in a layer-by-layer fashion using noncovalent interactions (cyclodextrin-adamantane, biotin-streptavidin and mannose-Concavalin A) allowing the formation of intervesicular bridges (Figure 9). Bifunctional ligand molecules (adamantane-biotin and adamantane-mannose) have been chosen for the formation of inclusion complexes with the cyclodextrin cavities embedded in the vesicles (on one hand) and with the protein functionalities serving as intervesicular linkers (on the other hand). Repeating deposition cycles, exploiting host-guest chemistry and affinity interactions, have yielded multilayers of immobilized vesicles on sensor surfaces.

“Bottom-up” assembly of binary phospholipid/cholesterol liposomes with amphiphilic cyclodextrin nanocavities (synthetic mono-(*N-n*-alkyl,*N,N*-dimethylamino)- β -cyclodextrin, DMA- C_n -CD) and subsequent molecular recognition reaction of the nanocavities with adamantoylglucose ligands has permitted the design of supramolecular constructs for targeting of the blood-brain-barrier (BBB) [57]. The obtained liposome nanoparticles have been decorated by glucose ligands that have been surface-exposed to bind the receptors at the BBB. The suggested supramolecular strategy has aimed to evaluate the impact of saccharide ligands on the transport of cyclodextrin-modified liposomes through the BBB. Indeed, the glucose ligand-functionalized “supramolecular” liposomes have shown a 5-fold increased capacity to enter the BBB-endothelial cells as compared to nonfunctionalized naked

liposomes. Fluorescence measurements after 4 h of liposome incubation have established that 30% of the saccharide-coated liposomes have been incorporated into the endothelial cells due to the recognition process by the BBB receptors that have provoked enhanced interactions. At the same time, only 6% of the naked liposomes (lacking surface decoration by glucose-cyclodextrin complexes) have been able to permeate the BBB cellular model [57]. These results have elucidated the mechanism of nanocarrier transport through the BBB model suggesting that the liposomes may reach the cytoplasm through a non-specific pathway.

Figure 9. (a) Schematic representation of layer-by-layer deposition of vesicle multilayers mediated by noncovalent supramolecular interactions between the cyclodextrin cavities and guest units. The latter provide intervesicular links through the creation of adamantane-biotin-streptavidin or adamantane-mannose-Concavalin A complexes; (b,c) QCM-D data for the immobilization of cyclodextrin vesicles (CDV) via streptavidin-biotin interactions. (b) Fifth resonance frequency overtone of vesicle suspensions with adamantane biotin linker (black curve) and a negative control without a linker (blue curve): top, dissipation data; bottom, frequency data; (c) third to eleventh resonance frequency overtones of a vesicle sample with linker: (top), dissipation data; (bottom), frequency data. The arrows indicate the injection of streptavidin (green), HEPES buffer (blue), vesicles (red), and deionized water (black) [56]. Reprinted with permission from [56]. Copyright 2013, American Chemical Society.



5. Potential Application of Supramolecular Assemblies of Amphiphilic Cyclodextrins

Nanoassemblies of fluorinated amphiphilic cyclodextrins have been used as drug carriers of a novel indenoindole-type inhibitor of the enzyme casein kinase 2 (CK2) upon tumour targeting [41]. The purpose of the study has been to improve the drug (1-amino-5-isopropyl-5,6,7,8-tetrahydroindeno[1,2-*b*]indole-9,10-dione) biodisponibility through nanoencapsulation and inclusion complexation. Nanoparticulate complexes between the indenoindole CK2 inhibitor and different amphiphilic cyclodextrin derivatives have been produced through nanoprecipitation. The encapsulation efficiency of the fluorinated amphiphilic cyclodextrin hexakis[6-deoxy-6-(3-perfluorohexylpropanethio)-2,3-di-*O*-methyl]- α -cyclodextrin (α -C6F13) nanocarriers for the indenoindole drug has been determined to be 65%, which corresponded to a considerable advance in pharmaceutical nanotechnology. The indenoindole CK2 inhibitor-loaded cyclodextrin nanospheres have shown sustained release profiles over hours. The results obtained with diverse cancer cell lines (e.g., LNCaP, PC-3, MCF-7, Caco-2) have appeared to be promising for future *in vivo* applications of the fluorinated cyclodextrin delivery systems in targeting of breast, liver, pancreas, and prostate cancer using new protein kinase CK2 inhibitors.

Emulsion-solvent evaporation [58] and nanoprecipitation techniques [59] have been employed for preparation of anticancer drug delivery systems of improved safety thanks to the use of amphiphilic cyclodextrin derivatives (SC16OH and 6-*O*-CAPRO- β -CD) (Table 3). The encapsulation efficiency of docetaxel in SC16OH nanocarriers has been determined to be 100%. These carriers have displayed vesicular shapes and a mean particle diameter of about 95 nm. An important characteristic has been the established sustained release of the drug over 8 weeks [58]. Therefore, the amphiphilic SC16OH cyclodextrin nanocarriers have shown essential promise for solid tumour therapy.

Table 3. Amphiphilic cyclodextrins derivatives and their potential application fields.

Amphiphilic CDs	Systems	Potential applications	Refs.
Heptakis (2- <i>O</i> -oligo(ethyleneoxide)-6-hexadecylthio)- β -CD (SC16OH)	Nanoparticles	Drug carriers (docetaxel)	[58]
6- <i>O</i> -CAPRO- β -CD	Nanoparticles (nanospheres, nanocapsules, vesicles)	Drug carriers (paclitaxel, camptothecin)	[59,60]
β CD-C6/6- <i>N</i> -CAPRO- β -CD 6- <i>N</i> -MYRISTO- β -CD	Nanospheres Nanocapsules	Drug carriers (progesterone, camptothecin)	[35,36,60]
Oligoethyleneimine- β CD	CDplexes	Gene delivery	[61]
Heptakis[6-(2-amino-ethylthio)-6-deoxy-2- <i>O</i> -octylsulfanylpropyl]- β -cyclodextrin hepta- <i>N</i> -trifluoroacetate	CDplexes	Gene delivery	[62]
Heptakis[6-diBoc-guanidinoethylthio-2- <i>O</i> -(<i>N</i> -(ω -(<i>p</i> -methoxybenzamido)-PEG440-yl)-1' <i>H</i> -triazole-4'-yl-methyl)]- β -cyclodextrin	CDplexes	Gene delivery	[63]
Heptakis[6-deoxy-6-(2-(<i>N</i> '-(2-(<i>N,N</i> -di-2-aminoethyl)amino)ethyl)thioureido)ethylthio)-2,3-di- <i>O</i> -hexanoyl] cyclomaltoheptaose	CDplexes	Gene delivery	[64]

Heptakis(6-dodecylthio-2-oligo(ethylenoxide)- β -cyclodextrin-2-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy) acetate	Vesicles	Phototherapy	[65]
Heptakis(2- <i>O</i> -oligo(ethylene oxide)-6-hexylthio)- β -CD (SC6OH)	Nanoparticles	Phototherapy	[30]
SC ₆ NH ₃ - β -CD; SC ₁₆ NH ₃ - β -CD	Multilayer films	Photoresponsive multilayer films	[66]
Peptidyl- β -cyclodextrins	Assemblies with biological membranes	Artificial receptors	[67]
Amphiphilic β -cyclodextrins with <i>n</i> -dodecyl groups and <i>n</i> -hexadecyl chains on both faces	Assemblies with biological membranes	Artificial receptors	[28]

The investigation of Bilensoy *et al.* [59] has been motivated by the problems of recrystallization and precipitation of the paclitaxel drug after injection from a commercial formulation. (The associated undesired effects have caused severe necrosis in cancer patients). The new cyclodextrin nanoparticles [59], encapsulating paclitaxel, have been characterized by spherical shapes, high drug encapsulation rate (65%), and good physical stability in the absence of surfactants. They have caused essentially lower hemolysis of erythrocytes in comparison to the commercial drug formulation (cremophor/ethanol 50/50 v/v). The cytotoxicity of the blank cyclodextrin (6-*O*-CAPRO- β -CD) nanocarriers to L929 cells has also been lower with respect to the cremophor/ethanol commercial formulation. The anticancer efficacy of paclitaxel-loaded cyclodextrin nanoparticles has been evaluated in a MCF-7 cell line. The results have been equivalent to those with the commercial vehicles [59].

Cyclodextrin-based nanoparticles, produced by self-assembly of amphiphilic polycationic derivatives (with hydrophobic chains grafted on the primary face and cationic groups conjugated to the secondary face of the ring or vice versa), have been investigated as carriers of siRNA (short interfering RNAs) in therapeutic approaches requiring gene silencing [43,44,48,63]. Godinho *et al.* [44] have discussed the advantages of chemically-modified β -cyclodextrin (SC12 CD) particles, characterized by low toxicity and low immunogenicity, for siRNA delivery to the central nervous system. Cyclodextrin-siRNA nanoparticulate complexes (~200 nm in diameter) have been assembled as stable entities in artificial cerebrospinal fluid. Towards transfection purposes, they have been injected into the striatum of R6/2 mice in an *in vitro* model of Huntington's disease (HD). The transfected nanoassemblies have been able to significantly reduce the expression of the gene of the toxic Huntingtin (HTT) protein (by ~85% after 4 h) [44]. Furthermore, cyclodextrin-based siRNA carriers have been suggested to be applicable also to other neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Functionalization of amphiphilic cyclodextrin molecules by receptor ligands has been employed in targeted gene delivery [43,45]. For instance, CDplexes have been obtained by self-assembly of polycationic amphiphilic cyclodextrin (containing 14 hexanoyl chains on the secondary face and 14 primary amino groups at the primary face) and plasmid DNA (pDNA). The surface of the CDplex nanoparticles has been decorated by folic acid [43]. Folic acid ligands have been chosen because the folate receptor is highly over-expressed in various carcinomas. Thus, the enhanced transfection of the CDplexes (structural organization shown in Figure 2, bottom right panel) in human cervix adenocarcinoma HeLa cells has been favored by the folate-receptor-mediated internalization of the folate-decorated nanocarriers.

Table 3 presents valuable examples of recently reported applications of organized amphiphilic cyclodextrin assemblies [28,30,35,36,58–67]. For a broader range of potential applications of cyclodextrin-based nanomaterials, the reader is advised to consult previous publications [68–82].

6. Conclusions

Nanoarchitectonics has emerged as a fast developing field [7], which has recently encompassed new directions of research on cationic and amphiphilic cyclodextrins, *i.e.*, nanoarchitectonics with cavity-type self-assembled nanomaterials. The modulation of the hydrophilic–hydrophobic balance of the modified cyclodextrin molecules governs the type of the self-assembled nanostructures and their complexes with guest molecules. This causes corresponding differences in the interaction of the amphiphilic nanoassemblies with living cells and tissues, as well as changes in their capacity to encapsulate and deliver active ingredients. One of the interesting applications of the innovative cyclodextrin-based supramolecular complexes includes the neuronal siRNA delivery. The projected structural modifications at both faces of the cyclodextrin macrocycles (e.g., lipophilic groups on the secondary face and cationic groups on the primary face) are responsible for the control of the transfection efficiency of the siRNA nanocarriers. The siRNA nanocarrier ability to mediate gene silencing is dependent on the relative facial positioning of the lipophilic and the cationic moieties in the amphiphilic cyclodextrin structure (primary or secondary sides of the molecule). It is noteworthy that the cyclodextrin-siRNA complexes were able to provide protection of the siRNAs from serum nucleases. In addition, site-specific gene delivery using polycationic amphiphilic cyclodextrins has been suggested as a safety method for neurodegenerative disease therapies. Oral delivery of gene therapeutics through complexation with cationic amphiphilic cyclodextrin carriers should avoid invasive surgery and may be recommended for treatment of colon cancer and inflammatory bowel disease.

Further possibilities exist for the use of amphiphilic cyclodextrins in drug delivery applications. Photosensitizer drugs, encapsulated in amphiphilic cyclodextrin particles, have efficiently induced photodynamic damage of cancer cells. Advancements have been achieved also in treatment of solid tumours by docetaxel and paclitaxel using novel cyclodextrin-based nanocarriers obtained by emulsion-solvent evaporation or nanoprecipitation methods. They have been characterized by high drug encapsulation efficiency (65% for paclitaxel and 100% for docetaxel). Sustained drug release provided up to two months, as well as lower toxicity and lack of hemolysis, has presented evidence for the beneficial properties of the amphiphilic cyclodextrin nanocarriers with regards to commercially available antitumor drug formulations. Affinity of the modified cyclodextrins to biological membranes has been revealed by studies of mixed phospholipid/cyclodextrin assemblies.

Acknowledgments

Leïla Zerkoune acknowledges a fellowship granted by the program ANR SIMI10 Nanosciences in the framework of the ANR CYDEXCAR project.

Author Contributions

Leila Zerkoune performed the bibliographic research and prepared the figures and tables. Sylviane Lesieur organized critical discussions on the subject and supervised the table preparation. Angelina Angelova wrote the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Angelova, A.; Angelov, B.; Mutafchieva, R.; Lesieur, S.; Couvreur, P. Self-assembled multicompartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 147–156.
2. Fong, C.; Le, T.; Drummond, C.J. Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-Assembly materials by design. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1297–1322.
3. Angelov, B.; Angelova, A.; Filippov, S.; Drechsler, M.; Štěpánek, P.; Lesieur, S. Multicompartment lipid cubic nanoparticles with high protein upload: Millisecond dynamics of formation. *ACS Nano* **2014**, *8*, 5216–5226.
4. Conn, C.E.; Drummond, C.J. Nanostructured bicontinuous cubic lipid self-assembly materials as matrices for protein encapsulation. *Soft Matter* **2013**, *9*, 3449–3464.
5. Angelov, B.; Angelova, A.; Filippov, S.K.; Narayanan, T.; Drechsler, M.; Štěpánek, P.; Couvreur, P.; Lesieur, S. DNA/fusogenic lipid nanocarrier assembly: Millisecond structural dynamics. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1959–1964.
6. Angelov, B.; Angelova, A.; Garamus, V.M.; Drechsler, M.; Willumeit, R.; Mutafchieva, R.; Štěpánek, P.; Lesieur, S. Earliest stage of the tetrahedral nanochannel formation in cubosome particles from unilamellar nanovesicles. *Langmuir* **2012**, *28*, 16647–16655.
7. Ramanathan, M.; Shrestha, L.K.; Mori, T.; Ji, Q.; Hill, J.P.; Ariga, K. Amphiphile nanoarchitectonics: From basic physical chemistry to advanced applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 10580–10611.
8. Angelov, B.; Angelova, A.; Mutafchieva, R.; Lesieur, S.; Vainio, U.; Garamus, V.M.; Jensen, G.V.; Pedersen, J.S. SAXS Investigation of a cubic to a sponge (L₃) phase transition in self-assembled lipid nanocarriers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 3073–3081.
9. Angelov, B.; Angelova, A.; Filippov, S.; Karlsson, G.; Terrill, N.; Lesieur, S.; Štěpánek, P. Topology and internal structure of PEGylated lipid nanocarriers for neuronal transfection: Synchrotron radiation SAXS and cryo-TEM studies. *Soft Matter* **2011**, *7*, 9714–9720.
10. Angelova, A.; Angelov, B.; Garamus, V.M.; Couvreur, P.; Lesieur, S. Small-angle X-ray scattering investigations of biomolecular confinement, loading, and release from liquid crystalline nanochannel assemblies. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 445–457.
11. Auzély-Velty, R.; Perly, B.; Taché, O.; Zemb, T.; Jéhan, P.; Guenot, P.; Dalbiez, J.-P.; Djedaïni-Pilard, F. Cholesteryl-cyclodextrins: Synthesis and insertion into phospholipid membranes. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, 82–90.

12. Gervaise, C.; Bonnet, V.; Wattraint, O.; Aubry, F.; Sarazin, C.; Jaffrès, P.-A.; Djedaïni-Pilard, F. Synthesis of lipophosphoramidyl-cyclodextrins and their supramolecular properties. *Biochimie* **2012**, *94*, 66–74.
13. Kawabata, Y.; Matsumoto, M.; Nakamura, T.; Tanaka, M.; Manda, E.; Takahashi, H.; Tamura, S.; Tagaki, W.; Nakahara, H.; Fukuda, K. Langmuir-Blodgett films of amphiphilic cyclodextrins. *Thin Solid Films* **1988**, *159*, 353–358.
14. Tanaka, M.; Azumi, R.; Tachibana, H.; Nakamura, T.; Kawabata, Y.; Matsumoto, M.; Miyasaka, T.; Tagaki, W.; Nakahara, H.; Fukuda, K. Recognition properties of amphiphilic cyclodextrin monolayers at the air-water interface. *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 832–835.
15. Matsuzawa, Y.; Noguchi, S.; Sakai, H.; Abe, M.; Matsumoto, M. Hybrid Langmuir and Langmuir-Blodgett films composed of amphiphilic cyclodextrins and hydrophobic azobenzene derivative. *Thin Solid Films* **2006**, *510*, 292–296.
16. Klaus, A.; Fajolles, C.; Bauer, M.; Collot, M.; Mallet, J.-M.; Daillant, J. Amphiphilic behavior and membrane solubility of a dicholesteryl-cyclodextrin. *Langmuir* **2011**, *27*, 7580–7586.
17. Choisnard, L.; Gèze, A.; Putaux, J.-L.; Wong, Y.-S.; Wouessidjewe, D. Nanoparticles of β -cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified β -cyclodextrins. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 515–520.
18. Memisoglu, E.; Bochot, A.; Özalp, M.; Sen, M.; Duchêne, D.; Hincal, A.A. Direct formation of nanospheres from amphiphilic-cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 117–125.
19. Skiba, M.; Duchêne, D.; Puisieux, F.; Wouessidjewe, D. Development of a new colloidal carrier from chemically-modified cyclodextrins nanospheres and influence of physicochemical and technological factors on particle size. *Int. J. Pharm.* **1996**, *129*, 113–121.
20. Choisnard, L.; Gèze, A.; Vanhaverbeke, C.; Yaméogo, J.B.G.; Putaux, J.-L.; Brasme, B.; Jullien, L.; Boullanger, S.; Elfakir, C.; Wouessidjewe, D. Physicochemical characterization of α -, β -, and γ -cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3031–3038.
21. Skiba, M.; Nemati, F.; Puisieux, F.; Duchêne, D. Spontaneous formation of drug-containing β -cyclodextrin nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **1996**, *145*, 241–245.
22. Choisnard, L.; Gèze, A.; Yaméogo, B.G.J.; Putaux, J.-L.; Wouessidjewe, D. Miscellaneous nanoaggregates made of β -CD esters synthesised by an enzymatic pathway. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 26–32.
23. Gèze, A.; Aous, S.; Baussanne, I.; Putaux, J.; Defaye, J.; Wouessidjewe, D. Influence of chemical structure of amphiphilic β -cyclodextrins on their ability to form stable nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 301–305.
24. Yaméogo, J.B.G.; Gèze, A.; Choisnard, L.; Putaux, J.-L.; Gansané, A.; Sirima, S.B.; Semdé, R.; Wouessidjewe, D. Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers—I: Formulation, lypoavailability and *in vitro* antimalarial activity assessment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 508–517.
25. Gèze, A.; Chau, L.T.; Choisnard, L.; Mathieu, J.-P.; Marti-Batlle, D.; Riou, L.; Putaux, J.-L.; Wouessidjewe, D. Biodistribution of intravenously administered amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 135–142.

26. Gèze, A.; Choisnard, L.; Putaux, J.-L.; Wouessidjewe, D. Colloidal systems made of biotransesterified α , β and γ cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 458–462.
27. Lombardo, D.; Longo, A.; Darcy, R.; Mazzaglia, A. Structural properties of nonionic cyclodextrin colloids in water. *Langmuir* **2004**, *20*, 1057–1064.
28. Kauscher, U.; Stuart, M.C.A.; Drücker, P.; Galla, H.-J.; Ravoo, B.J. Incorporation of amphiphilic cyclodextrins into liposomes as artificial receptor units. *Langmuir* **2013**, *29*, 7377–7383.
29. Sortino, S.; Mazzaglia, A.; Monsù Scolaro, L.; Marino Merlo, F.; Valveri, V.; Sciortino, M.T. Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4256–4265.
30. Mazzaglia, A.; Bondi, M.L.; Scala, A.; Zito, F.; Barbieri, G.; Crea, F.; Vianelli, G.; Mineo, P.; Fiore, T.; Pellerito, C.; *et al.* Supramolecular assemblies based on complexes of nonionic amphiphilic cyclodextrins and a *meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine tributyltin(IV) derivative: Potential nanotherapeutics against melanoma. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3820–3829.
31. Skiba, M.; Morvan, C.; Duchêne, D.; Puisieux, F.; Wouessidjewe, D. Evaluation of gastrointestinal behaviour in the rat of amphiphilic β -cyclodextrin nanocapsules, loaded with indomethacin. *Int. J. Pharm.* **1995**, *126*, 275–279.
32. Mazzaglia, A.; Valerio, A.; Micali, N.; Villari, V.; Quaglia, F.; Castriciano, M.A.; Scolaro, L.M.; Giuffrè, M.; Siracusano, G.; Sciortino, M.T. Effective cell uptake of nanoassemblies of a fluorescent amphiphilic cyclodextrin and an anionic porphyrin. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9140–9142.
33. Wang, T.; Chipot, C.; Shao, X.; Cai, W. Structural characterization of micelles formed of cholesteryl-functionalized cyclodextrins. *Langmuir* **2011**, *27*, 91–97.
34. Memisoglu-Bilensoy, E.; Vural, I.; Bochot, A.; Renoir, J.M.; Duchene, D.; Hincal, A.A. Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles: *In vitro* characterization and cytotoxicity. *J. Controll. Release* **2005**, *104*, 489–496.
35. Memişoğlu, E.; Bochot, A.; Şen, M.; Duchêne, D.; Hincal, A.A. Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2003**, *251*, 143–153.
36. Ringard-Lefebvre, C.; Bochot, A.; Memisoglu, E.; Charon, D.; Duchêne, D.; Baszkin, A. Effect of spread amphiphilic β -cyclodextrins on interfacial properties of the oil/water system. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2002**, *25*, 109–117.
37. Skiba, M.; Wouessidjewe, D.; Puisieux, F.; Duchêne, D.; Gulik, A. Characterization of amphiphilic β -cyclodextrin nanosphères. *Int. J. Pharm.* **1996**, *142*, 121–124.
38. Jiang, B.-P.; Guo, D.-S.; Liu, Y. Self-assembly of amphiphilic perylene-cyclodextrin conjugate and vapor sensing for organic amines. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7258–7264.
39. Auzély-Velty, R.; Djedaïni-Pilard, F.; Désert, S.; Perly, B.; Zemb, T.H. Micellization of hydrophobically modified cyclodextrins. 1. Micellar structure. *Langmuir* **2000**, *16*, 3727–3734.
40. Sun, T.; Zhang, H.; Kong, L.; Qiao, H.; Li, Y.; Xin, F.; Hao, A. Controlled transformation from nanorods to vesicles induced by cyclomaltoheptaoses (β -cyclodextrins). *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 285–293.

41. Perret, F.; Marminon, C.; Zeinyeh, W.; Nebois, P.; Bollacke, A.; Jose, J.; Parrot-Lopez, H.; Le Borgne, M. Preparation and characterization of CK2 inhibitor-loaded cyclodextrin nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441*, 491–498.
42. Angelova, A.; Fajolles, C.; Hocquelet, C.; Djedaïni-Pilard, F.; Lesieur, S.; Bonnet, V.; Perly, B.; Lebas, G.; Mauclaire, L. Physico-chemical investigation of asymmetrical peptidolipidyl-cyclodextrins. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *322*, 304–314.
43. Aranda, C.; Urbiola, K.; Méndez Ardoy, A.; García Fernández, J.M.; Ortiz Mellet, C.; de Ilarduya, C.T. Targeted gene delivery by new folate–polycationic amphiphilic cyclodextrin-DNA nanocomplexes *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 390–397.
44. Godinho, B.M.D.C.; Ogier, J.R.; Darcy, R.; O’Driscoll, C.M.; Cryan, J.F. Self-assembling modified β -cyclodextrin nanoparticles as neuronal siRNA delivery vectors: Focus on Huntington’s disease. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 640–649.
45. Díaz-Moscoso, A.; Guilloteau, N.; Bienvenu, C.; Méndez-Ardoy, A.; Jiménez Blanco, J.L.; Benito, J.M.; Le Gourrière, L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Defaye, J.; *et al.* Mannosyl-coated nanocomplexes from amphiphilic cyclodextrins and pDNA for site-specific gene delivery. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7263–7273.
46. O’Neill, M.J.; Guo, J.; Byrne, C.; Darcy, R.; O’ Driscoll, C.M. Mechanistic studies on the uptake and intracellular trafficking of novel cyclodextrin transfection complexes by intestinal epithelial cells. *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 174–183.
47. Donohue, R.; Mazzaglia, A.; Ravoo, B.J.; Darcy, R. Cationic β -cyclodextrin bilayer vesicles. *Chem. Commun.* **2002**, *2002*, 2864–2865.
48. O’Mahony, A.M.; Doyle, D.; Darcy, R.; Cryan, J.F.; O’Driscoll, C.M. Characterisation of cationic amphiphilic cyclodextrins for neuronal delivery of siRNA: Effect of reversing primary and secondary face modifications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 896–903.
49. Kasselouri, A.; Coleman, A.W.; Baszkin, A. Mixed monolayers of amphiphilic cyclodextrins and phospholipids: I. Miscibility under dynamic conditions of compression. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *180*, 384–397.
50. Javierre, I.; Nedyalkov, M.; Petkova, V.; Benattar, J.-J.; Weisse, W.; Auzély-Velty, R.; Djedaïni-Pilard, F.; Perly, B. Direct investigation of the vectorization properties of amphiphilic cyclodextrins in phospholipid films. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *254*, 120–128.
51. Lesieur, S.; Charon, D.; Lesieur, P.; Ringard-Lefebvre, C.; Muguet, V.; Duchêne, D.; Wouessidjewe, D. Phase behavior of fully hydrated DMPC-amphiphilic cyclodextrin systems. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 127–144.
52. Bauer, M.; Charitat, T.; Fajolles, C.; Fragneto, G.; Daillant, J. Insertion properties of cholesteryl cyclodextrins in phospholipid membranes: A molecular study. *Soft Matter* **2012**, *8*, 942–953.
53. Roux, M.; Moutard, S.; Perly, B.; Djedaïni-Pilard, F. Lipid lateral segregation driven by diacyl cyclodextrin interactions at the membrane surface. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1620–1629.
54. Roux, M.; Sternin, E.; Bonnet, V.; Fajolles, C.; Djedaïni-Pilard, F. Dynamic lipid lateral segregation driven by lauryl cyclodextrin interactions at the membrane surface. *Langmuir* **2013**, *29*, 3677–3687.
55. Lemos-Senna, E.; Wouessidjewe, D.; Duchêne, D.; Lesieur, S. Amphiphilic cyclodextrin nanospheres: Particle solubilization and reconstitution by the action of a non-ionic detergent. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1998**, *10*, 291–301.

56. Roling, O.; Wendeln, C.; Kauscher, U.; Seelheim, P.; Galla, H.-J.; Ravoo, B.J. Layer-by-layer deposition of vesicles mediated by supramolecular interactions. *Langmuir* **2013**, *29*, 10174–10182.
57. Machut-Binkowski, C.; Hapiot, F.; Cecchelli, R.; Martin, P.; Monflier, E. A versatile liposome/cyclodextrin supramolecular carrier for drug delivery through the blood-brain barrier. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 567–572.
58. Quaglia, F.; Ostacolo, L.; Mazzaglia, A.; Villari, V.; Zaccaria, D.; Sciortino, M.T. The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **2009**, *30*, 374–382.
59. Bilensoy, E.; Gürkaynak, O.; Doğan, A.L.; Hıncal, A.A. Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.* **2008**, *347*, 163–170.
60. Çirpanli, Y.; Bilensoy, E.; Lale Doğan, A.; Çaliş, S. Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *73*, 82–89.
61. Martínez, Á.; Bienvenu, C.; Jiménez Blanco, J.L.; Vierling, P.; Mellet, C.O.; García Fernández, J.M.; Di Giorgio, C. Amphiphilic oligoethyleneimine- β -cyclodextrin “click” clusters for enhanced DNA delivery. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8143–8148.
62. O’Neill, M.J.; O’Mahony, A.M.; Byrne, C.; Darcy, R.; O’Driscoll, C.M. Gastrointestinal gene delivery by cyclodextrins—*In vitro* quantification of extracellular barriers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456*, 390–399.
63. Guo, J.; Ogier, J.R.; Desgranges, S.; Darcy, R.; O’Driscoll, C. Anisamide-targeted cyclodextrin nanoparticles for siRNA delivery to prostate tumours in mice. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7775–7784.
64. Díaz-Moscoso, A.; Vercauteren, D.; Rejman, J.; Benito, J.M.; Ortiz Mellet, C.; De Smedt, S.C.; Fernández, J.M.G. Insights in cellular uptake mechanisms of pDNA-polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (CDplexes). *J. Controll. Release* **2010**, *143*, 318–325.
65. Kauscher, U.; Samanta, A.; Ravoo, B.J. Photoresponsive vesicle permeability based on intramolecular host-guest inclusion. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 600–606.
66. Valli, L.; Giancane, G.; Mazzaglia, A.; Scolaro, L.M.; Conoci, S.; Sortino, S. Photoresponsive multilayer films by assembling cationic amphiphilic cyclodextrins and anionic porphyrins at the air/water interface. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1660–1663.
67. Seyedi, S.M.; Sadeghian, H.; Jabbari, A.; Assadi, A.; Momeni, H. Design and synthesis of a new series of amphiphilic peptide- β -cyclodextrins as phase transfer carriers for glucosamine. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6754–6760.
68. Angelova, A.; Ringard-Lefebvre, C.; Baszkin, A. Drug-cyclodextrin association constants determined by surface tension and surface pressure measurements. I. Host-guest complexation of water soluble drugs by cyclodextrins: Polymyxin B-beta-cyclodextrin system. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 275–279.
69. Angelova, A.; Ringard-Lefebvre, C.; Baszkin, A. Drug-cyclodextrin association constants determined by surface tension and surface pressure measurements. II. Sequestration of water insoluble drugs from the air/water interface: Retinol-beta-cyclodextrin system. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 280–285.

70. Yaméogo, J.B.G.; Gèze, A.; Choisnard, L.; Putaux, J.-L.; Semdé, R.; Wouessidjewe, D. Progress in developing amphiphilic cyclodextrin-based nanodevices for drug delivery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 526–541.
71. Zhang, J.; Ma, P.X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215–1233.
72. Messner, M.; Kurkov, S.V.; Jansook, P.; Loftsson, T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2010**, *387*, 199–208.
73. Roux, M.; Perly, B.; Djedaïni-Pilard, F. Self-assemblies of amphiphilic cyclodextrins. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 861–867.
74. Jiang, L.; Yan, Y.; Huang, J. Versatility of cyclodextrins in self-assembly systems of amphiphiles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *169*, 13–25.
75. He, Y.; Fu, P.; Shen, X.; Gao, H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* **2008**, *39*, 495–516.
76. Li, J.; Loh, X.J. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Synthesis, structures, and applications for drug and delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1000–1017.
77. Sallas, F.; Darcy, R. Amphiphilic cyclodextrins—Advances in synthesis and supramolecular chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 957–969.
78. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1650–1662.
79. Shao, S.; Si, J.; Tang, J.; Sui, M.; Shen, Y. Jellyfish-shaped amphiphilic dendrimers: Synthesis and formation of extremely uniform aggregates. *Macromolecules* **2014**, *47*, 916–921.
80. Mendez-Ardoy, A.; Guilloteau, N.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Santoyo-Gonzalez, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernandez, J.-M. β -Cyclodextrin-based polycationic amphiphilic “click” clusters: Effect of structural modifications in their DNA complexing and delivery properties. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882–5894.
81. Ghera, B.B.; Perret, F.; Chevalier, Y.; Parrot-Lopez, H. Novel nanoparticles made from amphiphilic perfluoroalkyl alpha-cyclodextrin derivatives: Preparation, characterization and application to the transport of acyclovir. *Int. J. Pharm.* **2009**, *375*, 155–162.
82. Hu, Q.-D.; Tang, G.-P.; Chu, P.K. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular nanoparticles for delivery: From design to applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *7*, 2017–2025.

Szejtli J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 98, **1998**, 1743-1753

Varan C. and Bilensoy E., Development of implantable hydroxypropyl- β -cyclodextrin coated polycaprolactone nanoparticles for the controlled delivery of docetaxel to solid tumors. *J.Incl Phenom. Macrocycl. Chem.* 80, **2014**, 9-15.

Vecsernyés M., Fenyvesi F., Bacsakay I., Deli M.A., Szente L., and Fenyvesi E., Cyclodextrins, blood-brain barrier, and treatment of neurological diseases. *Archives of Medical Research*. **2014**, 1-19.

Vinodh M., Alipour F.H., Mohamod A.A. and Al-Azemi T.F., Molecular assemblies of porphyrins and macrocyclic receptors: Recent developments in their synthesis and applications. *Molecules*. 17, **2012**, 11763-11799.

Wang L., Li L.L, Fan Y.S., and Wang H., Host–guest supramolecular nanosystems for cancer diagnostics and therapeutics. *Advanced Materials*. 25, **2013**, 3888-3898.

Weatherly C.A., Naa Y.C., Nanayakkara Y.S., Woods R.M., Sharma A., Lacour J., Armstrong D.W., Reprint of: Enantiomeric separation of functionalized ethano-bridged Tröger bases using macrocyclic cyclofructan and cyclodextrin chiral selectors in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with application of principal component analysis. *Journal of Chromatography B*. 968, **2014**, 40-48.

Wu Y-L., Li J., Synthesis of supramolecular nanocapsules based on threading of multiple cyclodextrins over polymers on gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, **2009**, 3842-3845.

Xiong Q., Zhang M., Zhang Z., Shen W., Liu L., Zhang Q., Anti-tumor drug delivery system based on cyclodextrin-containing pH-responsive star polymer: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 474, **2014**, 232-240.

Yaméogo J.B.G., Gèze A., Choisnard L., Putaux J.L., Gansané A., Sirima S.B., Semdé R., Wouessidjewe D., Self-assembled biotransesterified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers: Formulation, lyoavailability and in vitro animalarial activity assessment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 80, **2012**, 508-517.

Yaméogo B.G., Gèze A., Choisnard L., Putaux J.P., RSemde R. and Wouessidjewe D., Progress in developing amphiphilic cyclodextrines-based nanodevices for drug delivery. *Current topics in medicinal chemistry*. 14, **2014**, 526-541.

Yue Y. and Wu C., Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomater. Sci.* 1, **2013**, 152-170.

Yan Y., Xing J., Xu W., Zhao G., Dong, K., Zhang L., Wang K., Hydroxypropyl- β -cyclodextrin grafted polyethyleneimine used as transdermal penetration enhancer of diclofenac sodium. *International Journal of Pharmaceutics*. 474, **2014**, 182-192.

Zafar N., Fessi H., Elaissari A., Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 461, **2014a**, 351-366.

Zafar N., Fessi H., Elaissari A., Colloidal particles containing labeling agents and cyclodextrins for theranostic applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 472, **2014b**, 118-129.

Zerkoune L., Angelova A. and Lesieur S., Nano-assemblies of modified cyclodextrins and their complexes with guest molecules: Incorporation in nanostructured membranes and amphiphile nanoarchitectonics design. *Nanomaterials*, 4, **2014**, 741-765.

Zhang J. and Ma P.X., Host-guest interactions mediated nano-assemblies using cyclodextrin-containing hydrophilic polymers and their biomedical applications. *Nano Today*. 5, **2010**, 337-350.

Zang J. and Ma P.X., Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65, **2013**, 1215-1233.

Zhang P., Ling C.C., Coleman A.W., Parrot-Lopez H. and Galons H., Formation of amphiphilic cyclodextrines via hydrophobic esterification at the secondary hydroxyl face. *Tetrahedron Letters*. 32, (24), **1991**, 2769-2770.

Zhao W., and Zhong Q., Recent advance of cyclodextrins as nanoreactors in various organic reactions: a brief overview. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 72, **2012**, 1-14.

Zhao F., Yin H., Li J., Supramolecular self-assembly forming a multifunctional synergistic system for targeted co-delivery of gene and drug. *Biomaterials*. 35, **2014**, 1050-1062.

Zhou J. and Ritter H., Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. *Polym. Chem*. 1, **2010**, 1552-1559.

Zhou S.Y., Ma S.X., Cheng H.L., Yang L.J., Chen W., Yin Y.Q., Shi Y.M., Yang X.D., Host-guest interaction between pinocembrin and cyclodextrins: Characterization, solubilization and stability. *Journal of Molecular Structure*. 1058, **2014**, 181-188.

Les lipides

1. Les lipides

1.1. Généralités

Un lipide est défini, au sens large, comme une substance d'origine naturelle ou synthétique comportant un ou plusieurs résidus hydrocarbonés, très généralement aliphatiques, sur lesquels peut être greffé ou non un groupement polaire hydrophile ionique, non-ionique ou zwitterionique. Les lipides d'origine naturelle dérivent tous soit de l'isoprène soit des acides gras (**Figure 1.1**).

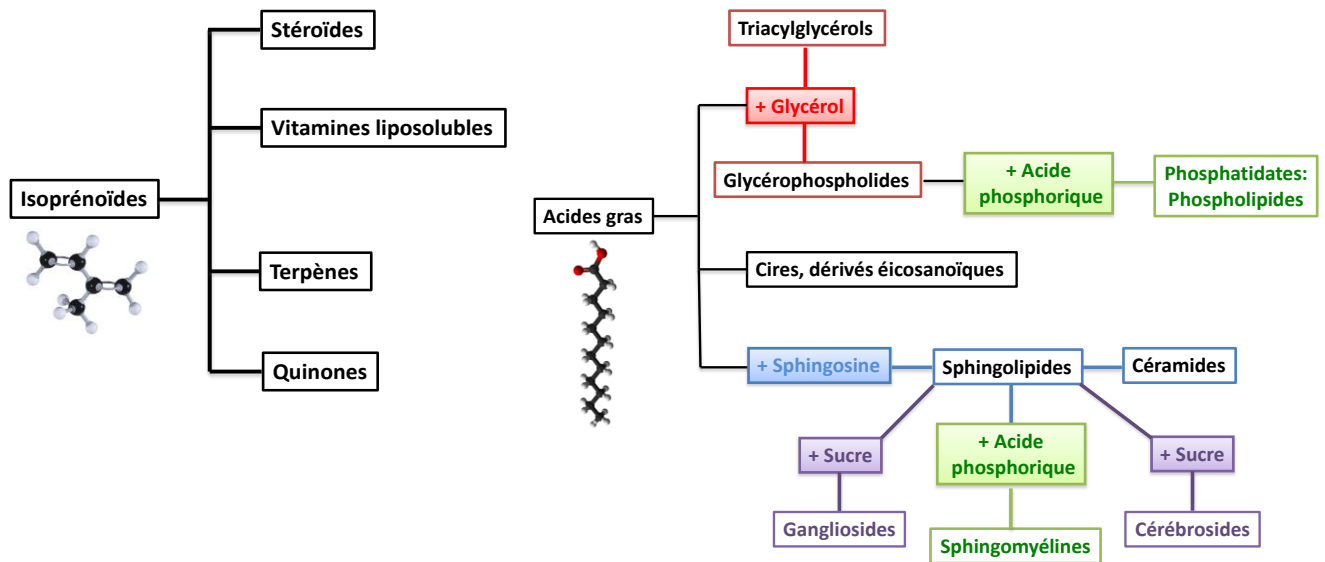
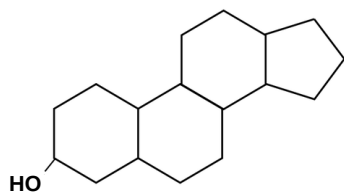


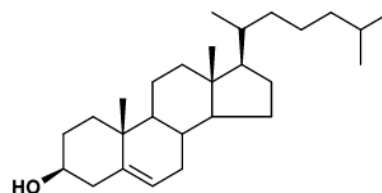
Figure 1.1 - Classification des lipides d'origine naturelle.

Les structures formées par les lipides ainsi que leurs propriétés de solubilité, notamment en milieu aqueux, dépendent étroitement de la proportion relative entre leurs parties hydrocarbonée et polaire constitutives. On distingue alors (**Figure 1.2**):

- Les lipides apolaires ou très peu polaires. Ces lipides, qualifiés de lipides neutres, sont insolubles dans l'eau. Ils peuvent être totalement hydrophobes comme les alcanes, les cires ou les alcools et amines à longues chaînes hydrocarbonées, ou amphiphiles comme les triglycérides ou le cholestérol, capables de s'organiser à l'interface air/eau.
- Les lipides polaires, tous amphiphiles de par leur structure de base, présentent une affinité plus ou moins marquée pour l'eau pouvant aller, pour les plus polaires d'entre eux, à une solubilité partielle. On peut citer la famille des glycérophospholipides, les sphingolipides, les monoglycérides et l'ensemble des composés tensioactifs micellaires.

Lipides non polaires :

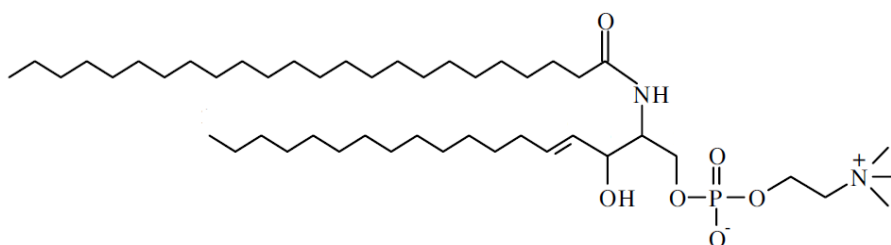
Stérol



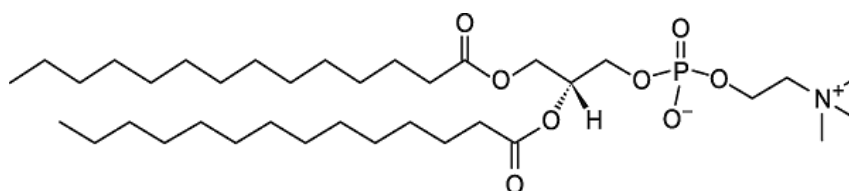
Cholestérol

Lipides polaires :

Sphingomyéline



1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

**Figure 1.2** - Représentation de structures de lipides non polaires et polaires.

1.1.1. Classification physico-chimique des lipides

D'après la classification de Small (1986) : tout lipide peut être classé selon son aptitude à se placer à l'interface air-eau pour former une monocouche dite de Langmuir.

On distingue alors les lipides ne présentant aucune activité de surface, totalement hydrophobes qui ne forment pas de monocouche de Langmuir des lipides amphiphiles, capables de se placer à l'interface air-eau.

Selon l'importance et la nature de leur partie polaire, les lipides amphiphiles s'organisent en monocouches de Langmuir stables lorsqu'ils sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau ou instables lorsqu'ils présentent une solubilité effective dans l'eau.

Ainsi, trois classes peuvent être distinguées selon leurs propriétés physico-chimiques et plus précisément en fonction de leur interaction avec l'eau. On distingue :

- les *classes I et II* qui sont constituées par les lipides insolubles ou très peu solubles dans l'eau. Ces lipides possèdent une caractéristique commune : celle de former une monocouche stable à l'interface entre un milieu aqueux et l'air. La différence entre les deux classes réside dans le lyotropisme des lipides, c'est à dire dans leur capacité à former des structures hydratées. Ces structures mixtes lipide-eau présentent une organisation particulière dont les propriétés physiques sont intermédiaires entre l'état solide cristallin tridimensionnel et l'état liquide désordonné : il s'agit d'un quatrième état de la matière ou état cristal-liquide. Les phases hydratées formées par ces lipides sont qualifiées de mésophases. La classe I correspond aux lipides qui ne lient pas de molécules d'eau et ne peuvent donc s'hydrater (ex : cholestérol, triglycérides), tandis que la classe II représente les lipides polaires lyotropes (ex : glycérophospholipides, monoglycérides).
- Les lipides polaires présentant une solubilité notable dans les milieux aqueux composent la *classe III*. Ces lipides forment tous à relativement faible concentration et dans certains intervalles de température, des solutions aqueuses au sein desquelles les molécules s'organisent en agrégats transitoires ou micelles au-delà d'une concentration critique appelée concentration micellaire critique. On distingue cependant deux sous-catégories de lipides solubles : Les lipides de *classe IIIA* qui présentent un comportement lyotrope dans l'eau au-dessus de leur limite de solubilité (ex : tensioactifs monocaténaires ioniques, oxyéthyléniques ou glycosylés, lysophospholipides), alors que les lipides de *classe IIIB* ne forment pas de mésophases avec l'eau : au-delà de leur limite de solubilité, ils cristallisent (ex : sels biliaires).

1.1.2. Concentration Micellaire Critique

La concentration micellaire critique (cmc) est une caractéristique importante pour les tensioactifs. Elle correspond à la concentration en tensioactif dans un milieu à partir de laquelle les micelles se forment de façon spontanée.

En dessous de celle-ci, le tensioactif forme une couche en surface du liquide et le reste est dispersé dans la solution en tant que molécules indépendantes.

Une fois la valeur de la cmc atteinte, la surface du liquide est saturée de tensioactif et les molécules excédentaires se regroupent spontanément dans la solution pour minimiser le contact de leur résidu hydrocarboné avec l'eau, laissant les groupements polaires hydrophiles orientés vers l'extérieur des agrégats ou micelles (**Figure 1.3**).

Les micelles sont caractérisées par leur géométrie et leur dimension moyenne relatives à leur nombre d'agrégation (nombre de molécules composant l'agrégat).

Quand la concentration totale de tensioactifs est supérieure à la cmc, la concentration en monomères dans la solution reste égale à la cmc.

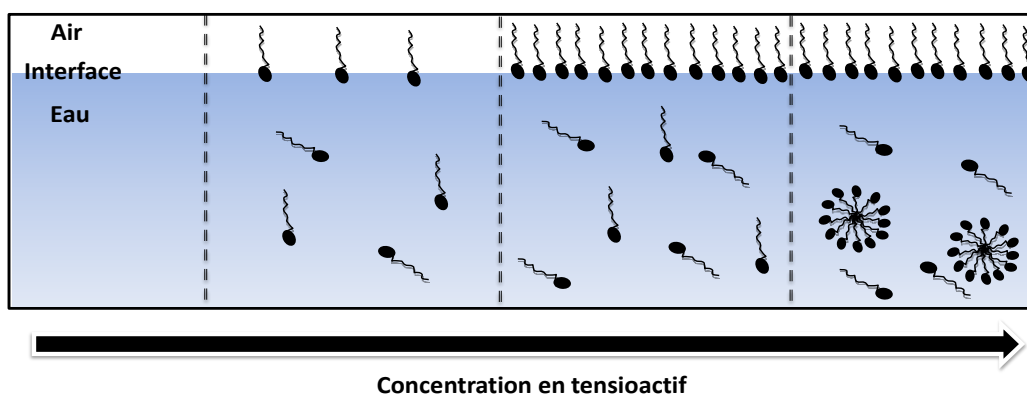


Figure 1.3 - Formation de micelles dans un environnement polaire.

1.1.3. Le paramètre d'empilement : relation entre géométrie moléculaire des lipides et topologie de leurs assemblages en milieu aqueux

L'assemblage supramoléculaire de molécules amphiphiles dépend de plusieurs facteurs: (i) les interactions attractives entre les résidus hydrocarbonés (forces de van der Waals) modulées par leur structure (longueur, nombre et degré d'insaturation), (ii) les interactions répulsives entre les groupes polaires (volume exclu ou stérique, hydratation, forces électrostatiques), (iii) les paramètres extrinsèques tels que température, pH, nature des sels présents dans la phase aqueuse, force ionique du milieu (...).

En milieu aqueux, les lipides polaires s'auto-assemblent pour minimiser le contact, énergétiquement défavorable, de leurs résidus hydrocarbonés avec l'eau selon une première contrainte géométrique : la contrainte de cœur. La dimension locale de l'assemblage lipidique ne peut en effet excéder la dimension de deux résidus hydrocarbonés placés bout à bout sous peine de laisser des lacunes accessibles aux molécules d'eau. Pour des lipides comportant des chaînes aliphatiques, cette contrainte correspond à deux longueurs de chaînes étirées.

Les groupes polaires des molécules lipidiques vont parallèlement moduler l'empilement des résidus hydrocarbonés, ceci en fonction de leur propre encombrement géométrique auquel s'ajoute une enveloppe supplémentaire traduisant leurs interactions répulsives. Ceci produit une courbure locale spontanée de l'empilement. Cette courbure est directement reliée à l'aire moléculaire effectivement occupée à l'interface hydrophile-hydrophobe, expérimentalement accessible à partir de mesures réalisées sur des monocouches formées à l'interface air-eau. Cette approche, basée sur le principe thermodynamique de minimisation de l'énergie libre des systèmes et sur des critères géométriques simples, a été introduite en 1975 par Israelachvili *et al* en définissant le paramètre d'empilement P ou « packing parameter » des composés amphiphiles de structure lipidique selon l'expression : $P = V/aL$.

Le paramètre d'empilement P est un rapport volumétrique entre la partie hydrophobe d'une molécule lipidique (volume du résidu hydrocarboné V) et sa partie polaire hydrophile comptabilisée comme le volume obtenu par projection de l'aire moléculaire effective à l'interface hydrophile-hydrophobe (a) sur la longueur maximale du résidu hydrocarboné (L) (**Figure 1.4**).

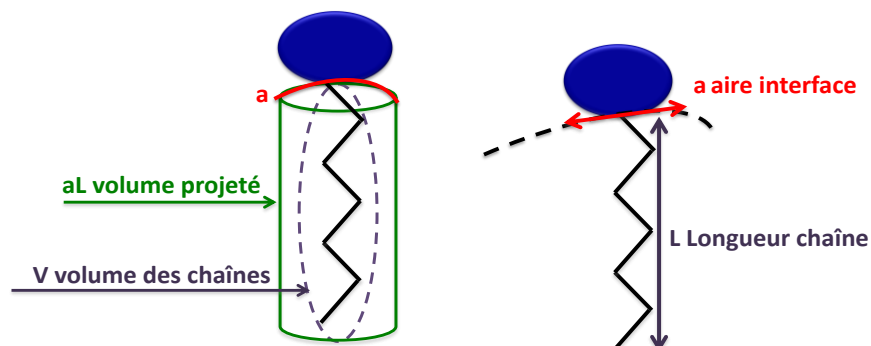


Figure 1.4 - Caractéristiques géométriques impliquées dans le paramètre d'empilement $P=V/aL$: V et L , volume et longueur des chaînes hydrocarbonées à leur maximum d'étirement, a , aire par groupe polaire à l'interface hydrophile/hydrophobe.

Il est important également de noter que l'aire moléculaire à l'interface et donc l'encombrement effectif des parties polaires au sein de l'assemblage lipidique inclut leur hydratation, c'est-à-dire le nombre de molécules d'eau de solvation des parties polaires.

La comparaison de la valeur de P au rapport volume/surface de formes géométriques simples (sphère, cylindre, plan infini) permet d'anticiper la topologie de base des assemblages lipidiques (**Figure 1.5**).

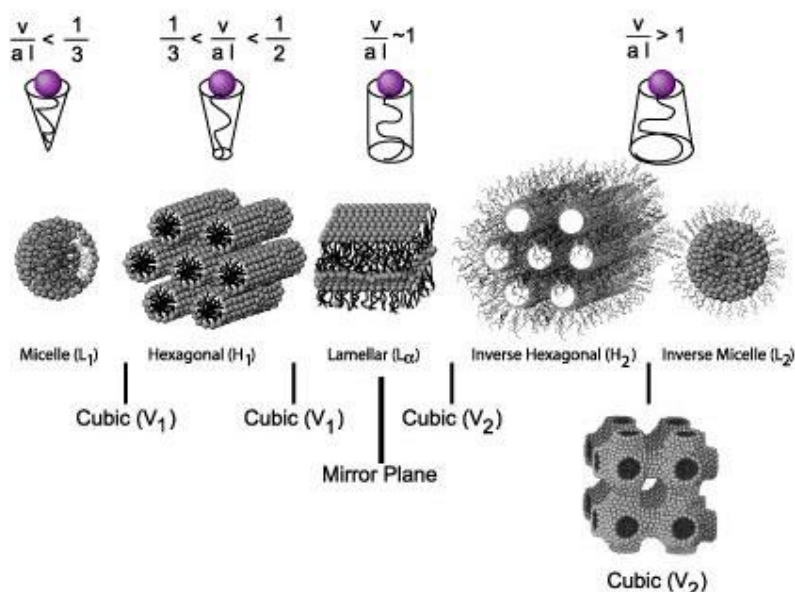


Figure 1.5 - Paramètre d'empilement P et topologie de l'organisation des assemblages lipidiques (adapté d'Israelachvili et al, 1975).

Ainsi, selon la valeur de P , il est possible d'anticiper la géométrie spontanément adoptée par les assemblages lipidiques, la courbure de l'interface hydrophile/hydrophobe déterminant leur topologie.

- assemblages de forte courbure tels que des micelles globulaires de géométrie sphériques ($P \leq 1/3$),
- assemblages de courbure intermédiaire tels que des micelles cylindriques directes ou des structures hexagonales directes ($1/3 < P < 1/2$),
- assemblages de courbure très faible ou nulle formées généralement de bicouches de lipides ou lamelles pouvant adopter des topologies très diverses telles que vésicules uni-lamellaires fermées, empilement smectique de bicouches ou phase multi-lamellaire, phases non lamellaires bicontinues ($1/2 < P < 1$),
- assemblages de courbure inverse ou négative tels que structures hexagonales inverses ou micelles inverses ($P > 1$).

La suite de ce chapitre porte plus particulièrement sur les lipides qui ont fait l'objet de nos travaux expérimentaux, d'une part deux lipides lyotropes de classe II, une phosphatidylcholine et un monoglycéride, d'autre part trois lipides solubles non-ioniques de classe IIIA, possédant des propriétés de détergence.

Pour chacun d'entre eux, nous resituerons ces molécules dans leurs familles respectives et justifierons notre choix avant de résumer les connaissances relatives à leur comportement en milieu aqueux.

1.2. Les phosphatidylcholines dont la 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine ou DMPC

Les diacyl glycérophospholipides résultent de la fixation de deux molécules d'acides gras sur une molécule de glycérol elle-même substituée par de l'acide phosphorique. L'acide phosphorique forme également un ester avec un alcool aminé (ex : sérine, choline, éthanolaamine) ou un polyol (ex : inositol ou glycérol) (**Figure 1.6**).

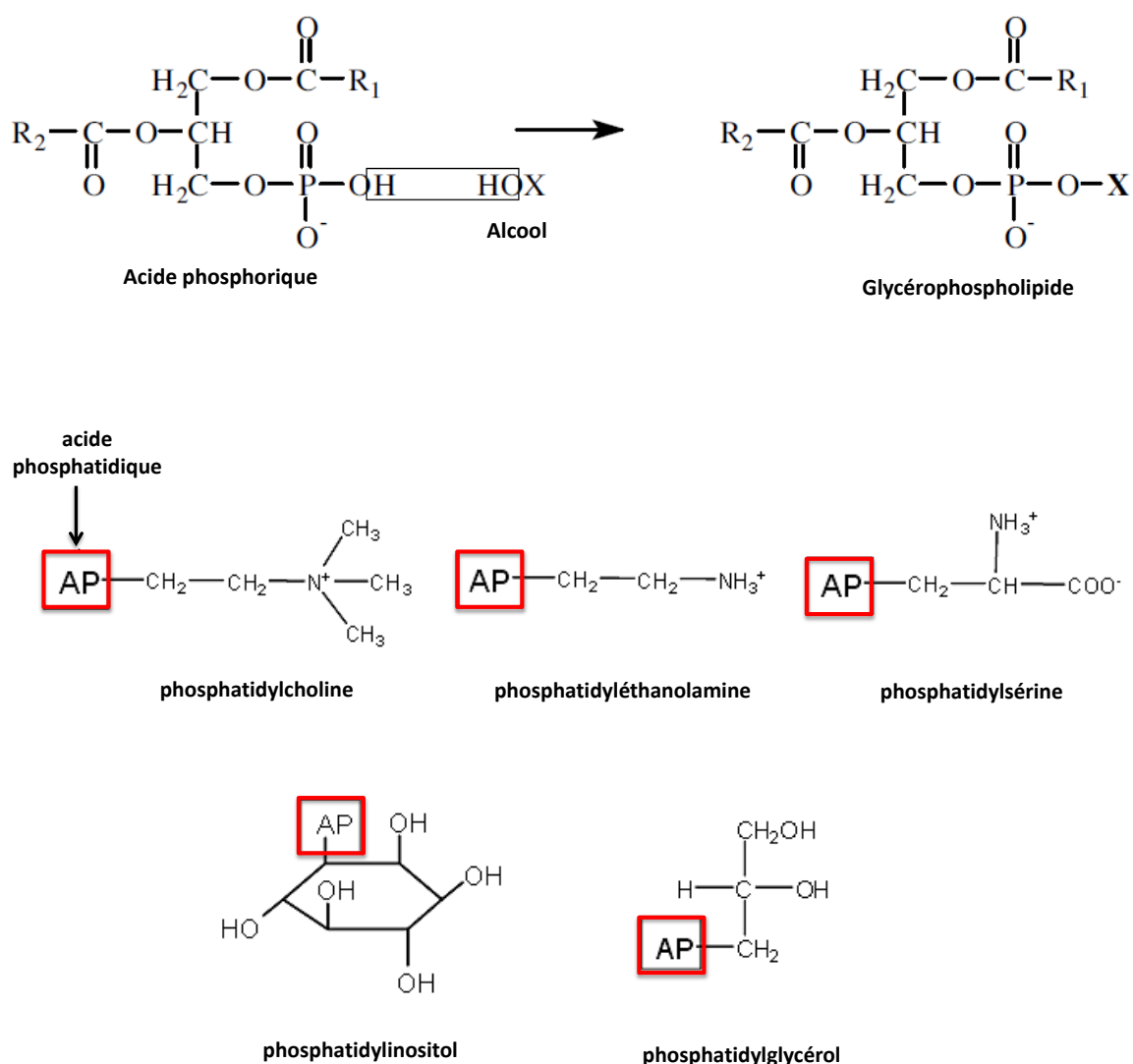


Figure 1.6 - Formation des glycérophospholipides et entités liées au groupement polaire : exemple des lipides d'origine naturelle.

En milieu aqueux, pour un seul type de lipide, différentes structures peuvent se former. Néanmoins, le type d'association intermoléculaire est le résultat de nombreux facteurs tels que la longueur des chaînes des acides gras et leur degré de liaisons insaturées, la nature du groupe polaire, la concentration (niveau d'hydratation), la température, la composition du milieu aqueux dispersant. Pour un lipide donné, il est nécessaire d'établir le diagramme de phase binaire lipide/eau (milieu aqueux) en fonction de la température afin de pouvoir contrôler les assemblages formés. La teneur

en eau conditionne les propriétés lyotropes du système tandis que la variation de température renseigne sur ses propriétés thermotropes. Dans le cas des dérivés d'alcools aminés, le pH de la phase aqueuse est un paramètre important car le groupe polaire peut être anionique (pH élevé), cationique (pH faible) ou zwitterionique (pH modéré). Les diagrammes de phase d'un grand nombre de glycérophospholipides naturels ou synthétiques ont été établis (Koynova et al, 1996 ; Koynova et Caffrey, 1998, 2002 ; Koynova et Tenchov, 2013).

La **Figure 1.7** présente celui de la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine ou 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), comportant deux chaînes saturées à 16 atomes de carbone et qui compte parmi ceux les mieux explorés (Lee, 1977 ; Grabielle-Madelmont et Perron, 1983 ; Matsuki et al, 2013).

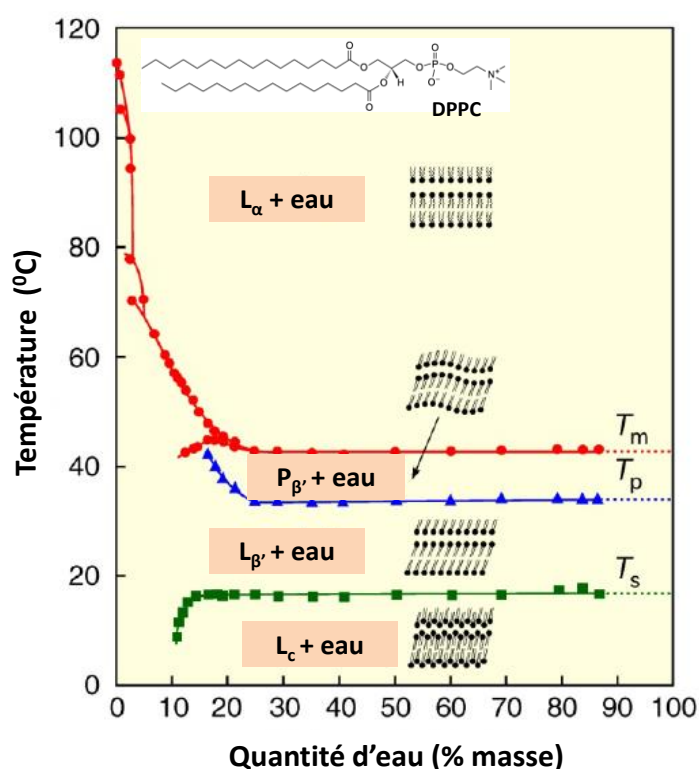


Figure 1.7 - Diagramme de phase binaire de la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC). Les transitions de phase de la DPPC en fonction de la température sont représentées en vert pour la sub-transition (T_s), en bleu la pré-transition (T_p) et en rouge la transition principale (T_m) (d'après Matsuki et al, 2013).

Le diagramme de phase de la DPPC met en évidence à partir de 15% d'eau, l'existence de différentes organisations multilamellaires ou empilements smectiques de bicouches lipidiques. Ceci est en accord avec le paramètre d'empilement proche de 1 de la DPPC (Troutier et al, 2005). Chacune de ces organisations diffère par l'état physique et l'orientation des chaînes hydrocarbonées au sein des bicouches et présente un domaine d'existence correspondant à un intervalle de température précis.

Les températures limites ou températures de transition de phase indiquent un changement d'état des chaînes hydrocarbonées. La particularité des phases lipidiques observées, dites lamellaires, est leur

hydratation propre qui est limitée de sorte que l'eau d'hydratation inter-bicouche atteint un seuil maximum au-delà duquel la structure smectique ne gonfle plus et l'eau excédentaire forme une phase séparée. A basse température, la phase L_c correspond à un arrangement cristallin tri-dimensionnel des molécules de DPPC dont l'hydratation est limitée à 2 molécules d'eau. A la température $T_s = 18,8^\circ\text{C}$, le phospholipide s'hydrate fortement pour former des bicouches régulièrement empilées et séparées par de l'eau liée à la structure : la première mésophase hydratée appelée $L_{\beta'}$ apparaît. Au sein des bicouches, les chaînes hydrocarbonées sont dans un état solide cristallin compact de structure orthorhombique et inclinées par rapport au plan des bicouches. A la température de pré-transition $T_p = 35,6^\circ\text{C}$, les chaînes sont toujours dans leur état solide mais changent d'organisation pour adopter une structure hexagonale induisant une ondulation des bicouches au sein de leur empilement smectique, c'est la phase $P_{\beta'}$. La température $T_m = 41,1^\circ\text{C}$ ou température de transition principale (également notée T_c) correspond à la transition solide-liquide des chaînes et à la formation de la phase lamellaire fluide L_α (Kodama et al, 1982 ; Koynova et al, 1996 ; Leekumjorn et al, 2007). Les différentes transitions de structures de la DPPC ont été caractérisées en fonction de la température par diffraction des rayons X couplée avec la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) (Keller et al, 1998 ; Ollivon et al, 2007). Le couplage diffraction des rayons X aux petits (SAXS) et grands angles (WAXS) avec la DSC, permet d'identifier la nature des phases aux différentes températures de transition (**Figure 1.8**).

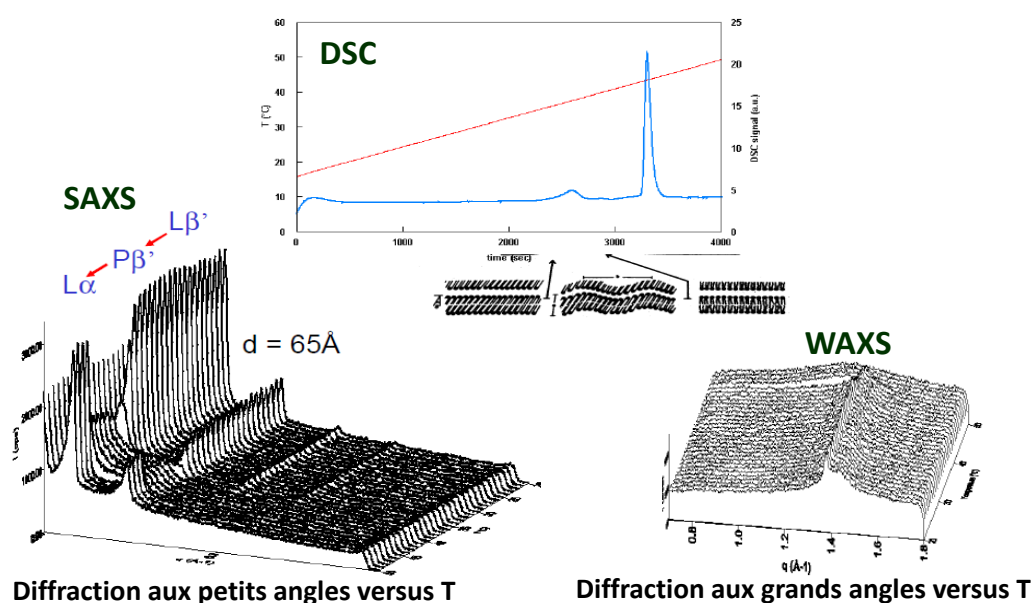


Figure 1.8 - Profils de DSC, de SAXS et de WAXS de DPPC en excès d'eau (80 % masse) enregistrés à une vitesse de chauffage de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ (d'après Ollivon et al, 2007).

La 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine ou 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ne diffère de la DPPC que par la longueur de ses chaînes hydrocarbonées qui comportent 2 atomes de carbone de moins (chaînes en C_{14}). Son diagramme de phase est similaire à celui de la DPPC, excepté la valeur des températures de transitions d'état structural (**Figure 1.9**).

Ce phospholipide est très utilisé pour modéliser les membranes biologiques (Serro et al, 2014 ; Lopes et al, 2012).

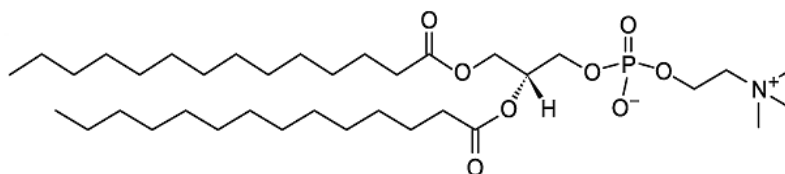


Figure 1.9 - Structure de la DMPC.

La **Figure 1.10** présente l'allure du thermogramme obtenu pour la DMPC en excès d'eau.

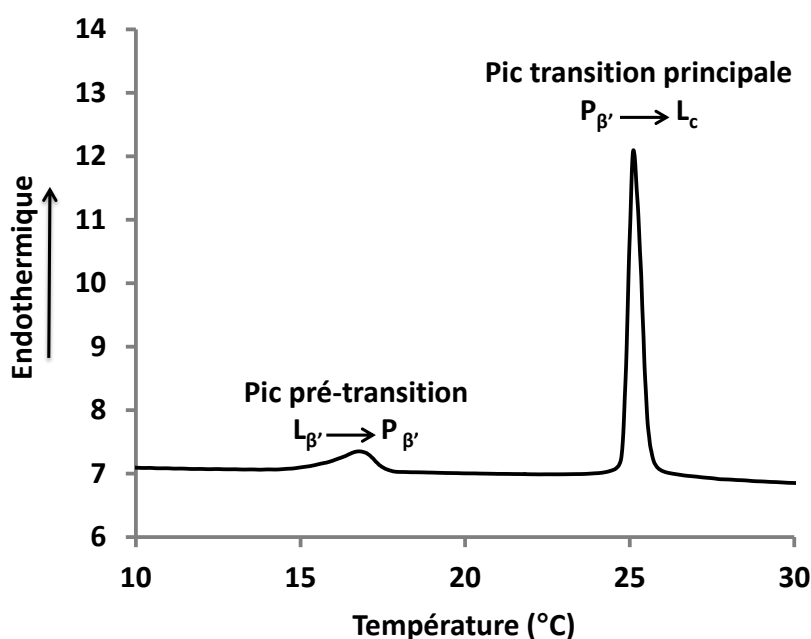


Figure 1.10 - Profil de l'enregistrement par calorimétrie (ou enthalpimétrie) différentielle à balayage (DSC) des transitions thermiques d'un échantillon de DMPC en excès d'eau (80 % masse) enregistré à une vitesse de chauffage de 2°C/min.

Les phosphatidylcholines comptent parmi les lipides naturels les plus abondants dans la composition des membranes cellulaires où elles se présentent en mélange et comportent une distribution de longueurs de chaînes principalement entre C₁₄ et C₁₈ avec des insaturations. La présence de ces dernières et l'effet de mélange induisent une simplification du comportement thermotrope qui voit la température de transition principale fortement abaissée et voisine de 0°C (Small 1986).

Dans le contexte de modélisation des membranes biologiques, l'interaction de substances exogènes peut être aisément approchée par mesure de calorimétrie type DSC sur des assemblages simples de phosphatidylcholines à chaînes saturées.

En effet, toute insertion au sein des bicouches lipidiques influence l'état d'organisation des chaînes du lipide et induit une modification de leurs températures de transition solide-solide ou solide-liquide ainsi que des variations d'enthalpies associées. La DMPC est notamment utilisée pour cette approche en raison de sa température de transition principale voisine de 20°C, de telle sorte qu'à 37°C, température physiologique, elle se trouve dans sa phase hydratée L_α qui correspond à l'état physique des membranes cellulaires.

Une propriété importante et largement exploitée des phases lamellaires L_α de phosphatidylcholine est la possibilité, par apport complémentaire d'énergie, de les fragmenter pour former des structures fermées délimitées par une ou plusieurs bicouches enfermant une fraction du volume aqueux dans lequel elles baignent (**Figure 1.11**).

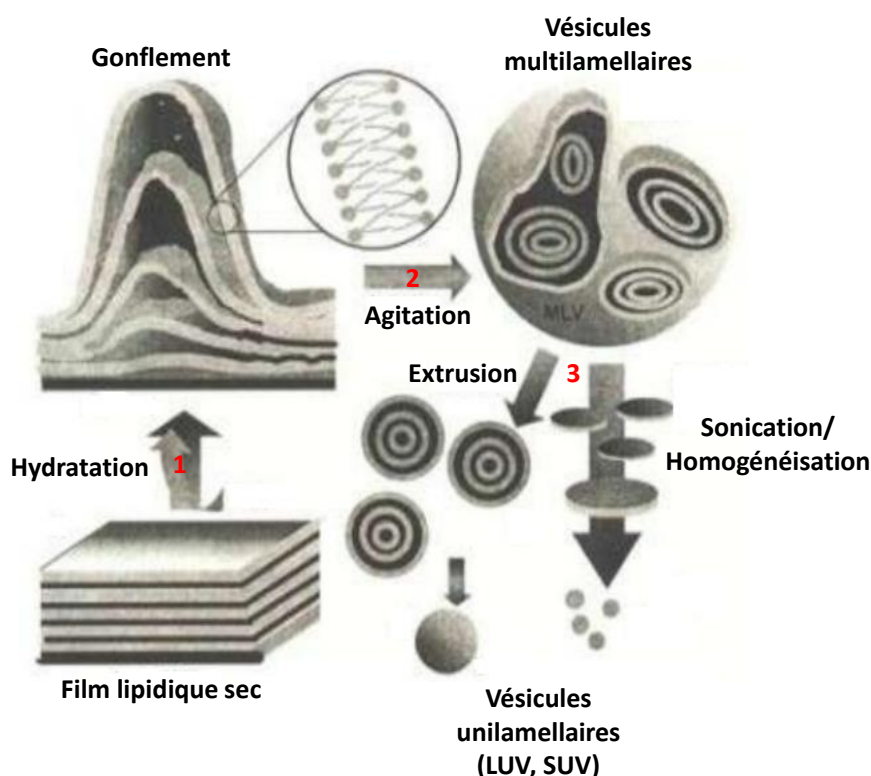


Figure 1.11 - Mécanisme de formation des liposomes à partir d'un film
(d'après http://www.etseq.urv.cat/dinamic/catala/places/postdoc_sullivan2.htm).

Les bicouches de phospholipides dont les phosphatidylcholines présentent la capacité d'admettre au sein de leur structure des substances hôtes hydrophobes ou amphiphiles, et dans le cas des liposomes, d'encapsuler des composés hydrosolubles dans le volume aqueux interne. Ces structures de vésicules ou liposomes ont donc trouvé un grand nombre d'applications dans le secteur biomédical, en particulier dans le développement de formes pharmaceutiques innovantes et ont été largement utilisés comme modèles extrêmement simplifiés des membranes biologiques (Lorin et al, 2004 ; Maherani et al, 2011).

En regard de nos travaux de thèse, l'incorporation de cyclodextrines amphiphiles au sein d'assemblages lamellaires de phosphatidylcholines a été étudiée d'une part pour modéliser

l'interaction des cyclodextrines amphiphiles avec les membranes biologiques et d'autre part d'évaluer la possibilité de préparer des assemblages mixtes phospholipide-cyclodextrine (Kauscher et al, 2013).

1.3. Le 1-monooléyl-rac-glycérol ou monooléine

Les monoesters de glycérol et d'acide gras sont des lipides monocat  naires de classe II (**Figure 1-12**).

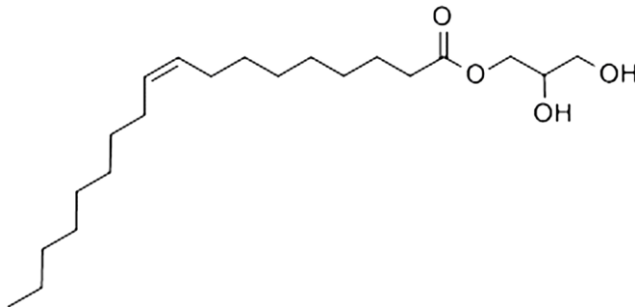


Figure 1.12- Structure du 1-monooléyl-rac-glycérol.

1.3.1. Comportement lyotrope de la monooléine

La monooléine est l'un des mieux caractérisé à ce jour. Une représentation du diagramme de phase binaire monooléine/eau en fonction de la température est reportée **figure 1.13**.

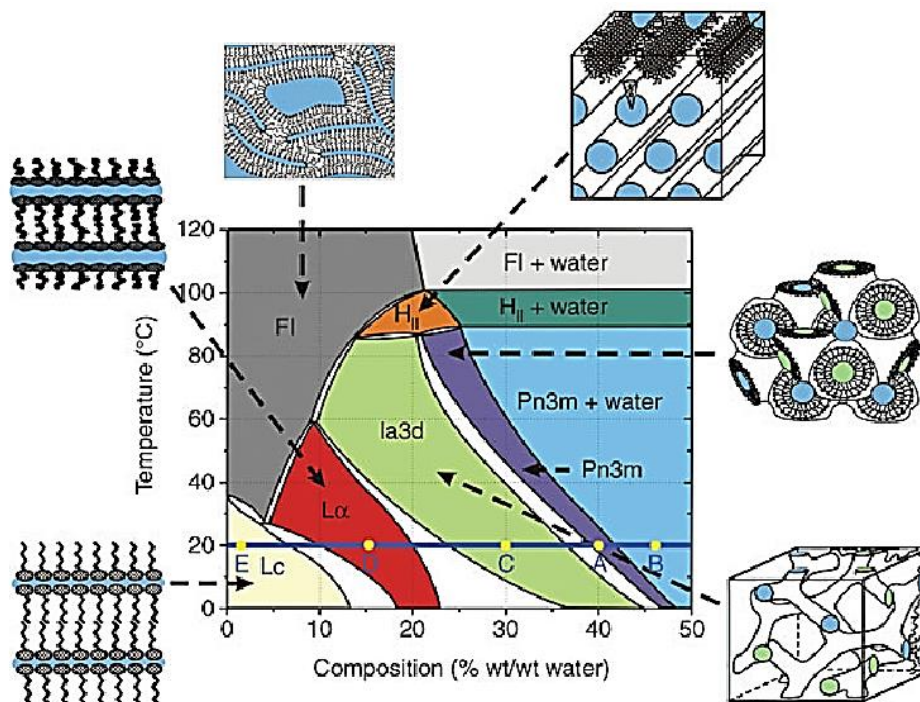


Figure 1.13 - Diagramme de phase de la monooléine en fonction de la teneur en eau et de la température (van Meer et al, 2008).

Le comportement mésomorphe de la monooléine est particulièrement riche. Il est possible de distinguer 9 domaines d'existence de phases dont la topologie et le niveau d'hydratation varient :

- A basse température et faible hydratation : la phase L_c formée de cristaux tridimensionnels.
- La phase lamellaire (L_α), empilement smectique de bicouches fluides (chaînes liquides), est obtenue pour des teneurs massiques en eau comprises entre 5 et 23 % et des températures inférieures à 60°C.
- La phase hexagonale inverse (HII), est un arrangement ordonné et dense de micelles cylindriques dont le cœur aqueux est délimité par les groupes polaires du lipide tandis que les chaînes sont orientées vers l'extérieur des structures. Elle est obtenue à des températures élevées (entre 90 et 100°C) et à une teneur en eau minimale de 15%. Au-delà, cette structure persiste mais l'eau ne s'incorpore plus dans la mésophase et forme une phase séparée.
- Pour des températures inférieures à 50°C et pour des teneurs en eau supérieures à 10%, la monooléine forme des mésophases de type cubiques bicontinues inverses, la mésophase cubique diamant (Pn3m ou D-surface) et la mésophase cubique gyroïde (Ia3d ou G-surface). La particularité de ces structures tient dans l'enchevêtrement régulier de canaux aqueux délimités par une bicouche lipidique. La maille élémentaire de la structure Pn3m comprend quatre canaux d'eau convergeant selon une organisation en tétraèdre. La phase Ia3d présente des jonctions à trois canaux formant des angles de 120°, les canaux formant eux-mêmes deux réseaux distincts. (**Figure 1.14**).

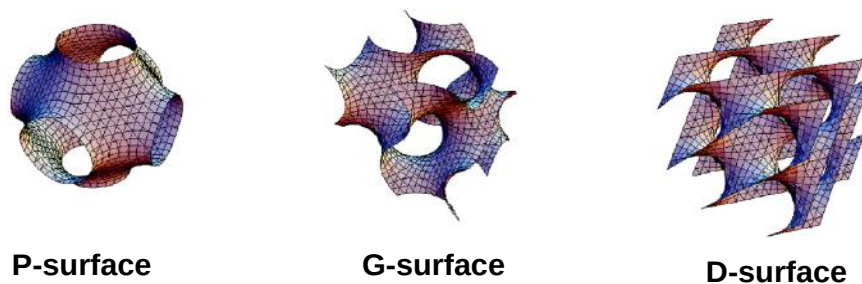


Figure 1.14 - Structure des différentes mésophases bicontinues inverses (Spicer, 2005).

D'après ce qui a été décrit précédemment, le paramètre d'empilement P dépend, entre autres, de l'eau d'hydratation des parties polaires qui, pour un lipide non-ionique tel que la monooléine, augmente peu à peu avec la teneur globale en eau du système jusqu'à saturation de la structure lipidique et diminue lorsqu'on élève la température. Ainsi, l'aire moléculaire à l'interface hydrophile/hydrophobe est variable et module donc le paramètre d'empilement V/aL .

Ceci explique que pour la monooléine on retrouve des phases de différentes topologies avec une séquence complète lamellaire/cubique/hexagonale inverse (**Figure 1.15**).

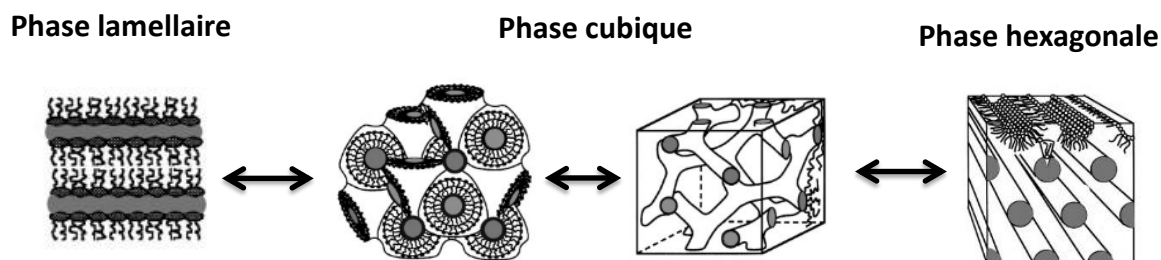


Figure 1.15 - Structure des différentes mésophases formées par la monooléine hydratée (d'après Qiu et Caffrey, 2000).

1.3.2. Les cubosomes

Très avantageusement et comme largement établi, lorsqu'un apport d'énergie mécanique est effectué sur une phase cubique de monooléine hydratée, il est aisément possible de la disperser sous forme de particules individuelles de dimensions colloïdales ou cubosomes (Garg et al, 2007 ; Madhurilatha et al, 2011) (**Figure 1.16**).

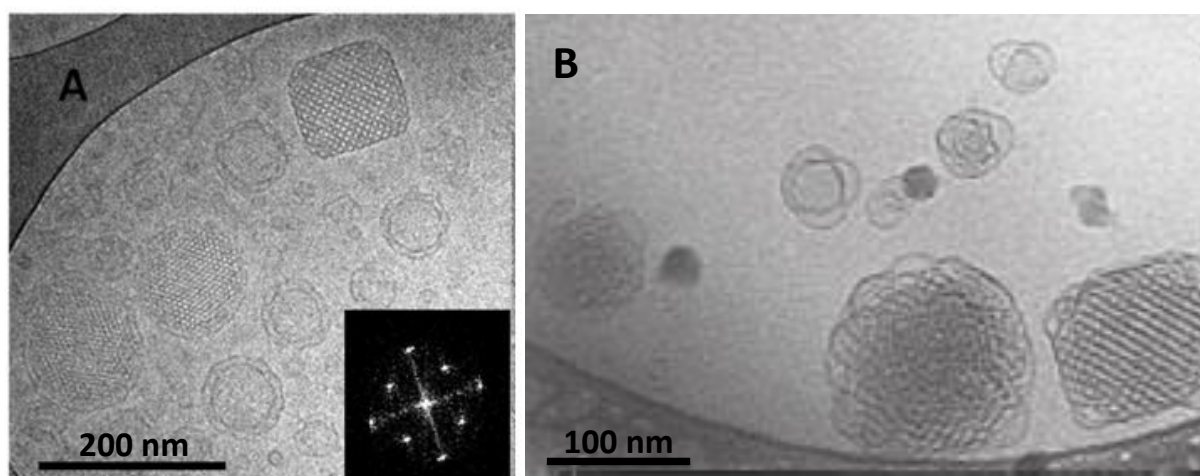


Figure 1.16 - Images obtenues par cryo-MET de cubosomes de phytantriol (A) et B) d'un mélange de glycérol monooléate/Poloxamer 403 (92 /8 m/m) (Zhai et al, 2015 ; Angelova et al, 2011).

Etant donné que les phases cubiques sont formées par le repliement dans l'espace d'une bicouche de lipides délimitant des canaux aqueux interconnectés, les cubosomes sont constitués de structures alvéolées gorgées d'eau bordées par une membrane lipidique dont la surface déployée est importante (Madhurilatha et al, 2011).

La dispersion en cubosomes de la phase cubique de monooléine est généralement facilitée et stabilisée par l'addition de lipides polaires plus hydrophiles, par exemple comportant des chaînes de poly(éthylène glycol) ou PEG (Angelov et al, 2012 ; 2015) ou par la présence de certains agents

dispersants (Yang et al, 2004 ; Angelov et al, 2003; 2007). De plus, il a été montré que les canaux aqueux pouvaient voir leur dimension modulée par l'ajout de substances hôtes au sein de la phase cubique. En effet, Angelov *et al* (2003 ; 2007) ont montré que l'addition d'un détergent non-ionique, l'octyl- β -D-glucopyranoside, avait pour conséquence une augmentation de la taille des canaux par rapport à la monooléine pure dans les mêmes conditions de préparation.

De façon plus générale, les cubosomes sont capables d'incorporer des molécules lipophiles, amphiphiles ou hydrosolubles (**Figure 1.17**). Dans le dernier cas, les taux d'encapsulation sont assez élevés comparativement aux liposomes et la structure bicontinue gouverne la libération des substances hôtes par diffusion dépendante de la tortuosité des canaux. Ajouté à leur biocompatibilité inhérente à leur nature lipidique, les cubosomes sont d'excellent candidat pour des applications en tant que réservoirs de substances d'intérêt thérapeutique, particulièrement des biomolécules telles que protéines et acides nucléiques (Angelova et al, 2011 ; Spicer et al, 2002 ; Esposito et al, 2005 ; Guo et al, 2010).

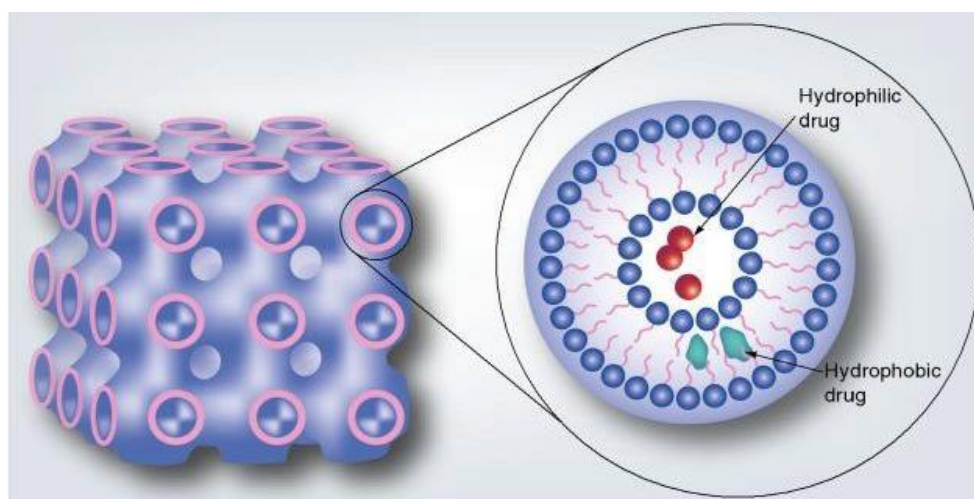


Figure 1.17 - Exemple de cubosomes montrant les compartiments permettant l'encapsulation de principes actifs (source nanomédecine *medscape.com*, 2010).

Les travaux menés par Angelova *et al* (2005a ; 2005b) et Angelov *et al* (2006) ont montré qu'il était possible de créer des nanovecteurs de fragments protéiques appelés « Protéocubosomes ». Angelov *et al* (2007) ont également montré que ces protéocubosomes étaient capables de répondre à un stimulus. En effet, l'ajout d'une molécule sensible au taux d'hydratation environnant au sein de la structure cubique permet par modification de la température de moduler l'hydratation des canaux aqueux des cubosomes et de contrôler par conséquent la diffusion de molécules actives.

1.4. Les lipides solubles non-ioniques de classe IIIA

Les lipides solubles de classe IIIA englobent des composés dont le groupe polaire peut être chargé (anionique ou cationique), zwitterionique ou non-ionique.

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous souhaitons ne pas introduire de tensioactifs chargés afin d'éviter des phénomènes secondaires d'agrégation des cyclodextrines amphiphiles liées à leurs interactions avec des espèces ioniques ce qui engendre un risque notable d'instabilité des assemblages particuliers. Les tensioactifs de classe IIIA non-ioniques présentent une grande variété d'applications qui incluent la perméabilisation et la dissolution des membranes biologiques la solubilisation de corps d'inclusion, la purification et la reconstitution des protéines membranaires ainsi que la solubilisation de substances amphiphiles ou hydrophobes telles que des molécules d'intérêt thérapeutique. Cette dernière propriété a été en particulier mise à contribution pour solubiliser les cyclodextrines amphiphiles et permettre la formation de nanoparticules par élimination contrôlée du tensioactif (Lemos-Senna et al, 1998).

Notre choix a porté d'une part sur deux composés à tête polaire polyoxyéthylénique linéaire ou ramifiée, déjà utilisés pour la formulation de principes actifs, le polysorbate 80 (Karjibana et al, 2012), le Brij 98 (Ribeiro et al, 2012) et sur un dérivé glycosidique, le n-dodécyl- β -D-maltoside (Warr et al, 1986) (**Figure 1.18**).

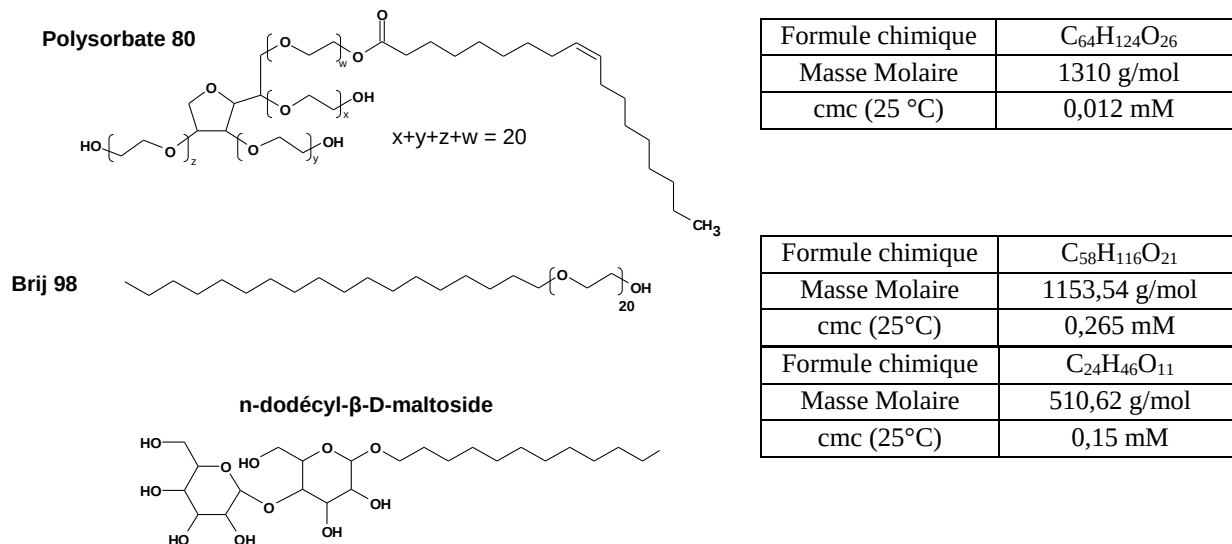


Figure 1.18 - Structure et caractéristiques des tensioactifs non-ioniques utilisés au cours des travaux de thèse.

Le diagramme de phase binaire tensioactifs non-ionique/eau en fonction de la température est montré sur la **Figure 1.19**. On peut observer d'une part, qu'une augmentation de température produit une réduction d'hydratation du groupe hydrophile. Cet effet est celui produisant le point de trouble des tensioactifs non-ioniques, qui correspond à une diminution de la cmc accompagnée d'une séparation des micelles de la phase aqueuse (la cmc diminue). Au-dessus du point de trouble, les domaines sont très concentrés en tensioactifs et la formation de mésophases est favorisée. La solubilité des tensioactifs en milieu aqueux se produit au-dessus d'une certaine température appelée température de Krafft, c'est seulement à partir de cette valeur désormais appelée point de Krafft que la micellisation est amorcée.

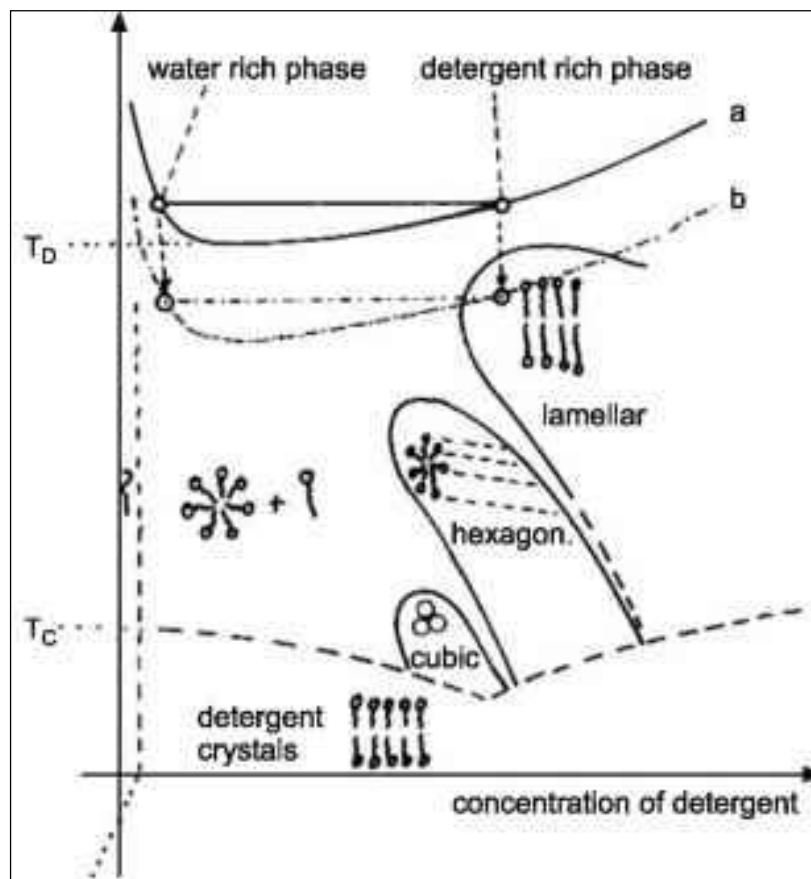


Figure 1.19 - Diagramme de phase schématisé binaire tensioactif non-ionique/eau en fonction de la température. Les limites du domaine micellaires (température de Krafft (T_C), point de trouble (T_D), cmc, et les domaines concentrés avec formation de mésophases (a et b).

Références Bibliographiques

Angelova A., Angelov B., Papahadjopoulos-Sternberg B., Ollivon M., and Bourgaux C., Proteocubosomes: nanoporous vehicles with tertiary organized fluid interfaces. *Langmuir*, 21, **2005a**, 4138-4143.

Angelova A., Angelov B., Papahadjopoulos-Sternberg B., Bourgaux C.,| and Couvreur P. Protein driven patterning of self-assembled cubosomic nanostructures: long oriented nanoridges. *J. Phys. Chem. B*, 109, **2005b**, 3089-3093.

Angelova A., Angelov B., Mutafchieva R., Lesieur S., Couvreur P., Self-assembled multicompartment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic acid drug delivery. *Accounts of Chemical Research*. 44, **2011**, 147-156.

Angelov A., Angelova A., Papahadjopoulos-Sternberg B., Lesieur S., Sadoc J.R., Ollivon M., and Couvreur P., Detailed Structure of diamond-type lipid cubic nanoparticles. *J. AM. CHEM. SOC.* 128, **2006**, 5813-5817.

Angelov B., Angelova A., Ollivon M., Bourgaux C., and Campitelli A., Diamond-type lipid cubic phase with large water channels. *J. AM. CHEM. SOC.* 125, **2003**, 7188-7189.

Angelov B.,|Angelova A., Garamus V.M.,| Lebas G., Lesieur S., Ollivon M., Funari S.S., Willumeit R.,| and Couvreur P., Small-Angle Neutron and X-ray Scattering from amphiphilic stimuli-responsive diamond-type bicontinuous cubic phase. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, **2007**, 13474-13479.

Angelov B., Angelova A., Papahadjopoulos-Sternberg B., V. Hoffmann S.V., Nicolas V., and Lesieur S. Protein-containing PEGylated cubosomic particles: freeze-fracture electron microscopy and synchrotron radiation circular dichroism study. *J. Phys. Chem. B*, 116, **2012**, 7676-7686.

Angelov B., Angelova A., Garamus V.M., Mutafchieva R., and Lesieur S., Identification of large channels in cationic PEGylated cubosome nanoparticles by synchrotron radiation SAXS and Cryo-TEM imaging. *Soft Matter*, 11, **2015**, 3686-3692.

Esposito E., Cortesi R., Drechsler M., Paccamiccio L., Paolo Mariani P., Contado C., Stellin E., Menegatti E., Bonina F. and Puglia C. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of Indomethacin. *Pharmaceutical Research*. 22, **2005**, 2163-2173.

Grabielle-Madellmont C. and Perron R., Calorimetric studies on phospholipid-water systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 95, **1983**, 471-482.

Garg G., Saraf S., Saraf S., Cubosomes: An Overview. *Biol. Pharm. Bull.* 30, **2007**, 350-353.

Guo C., Wang J., Cao F., Lee R.J. and Zhai G., Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 15, **2010**, 1032-1040.

- Israelachvili N.J., Mitchell D.J., Ninham B.W., Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers., *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*. **1975**, 1525-1550.
- Karjibana R.A., Basria M., Rahmana M.B.A., Salleh A.B., Structural properties of nonionic Tween80 micelle in water elucidated by molecular dynamics simulation. *APCBEE Procedia*, 3, **2012**, 287-297.
- Kauscher U., Stuart M.C.A, Drucker P., Galla H.J. and Ravoo B.J., Incorporation of amphiphilic cyclodextrins into liposomes as artificial receptor units. *Langmuir*. 29, **2013**, 7377-7383.
- Kodama M., Kuwabara M. and Seki S., Successive phase-transition phenomena and phase diagram of the phosphatidylcholine-water system as revealed by differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 689, **1982**, 567-570.
- Koynova R., Koumanov A., Tenchov B., Metastable rippled gel phase in saturated phosphatidylcholines: calorimetric and densitometric characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1285, **1996**, 101-108.
- Koynova R. and Caffrey M., Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376, **1998**, 91-145.
- Koynova R., Caffrey M., An index of lipid phase diagrams. *Chemistry and Physics of Lipids*. 115, **2002**, 107-219.
- Koynova R., Tenchov B., Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles. *OA Biochemistry*, 1, **2013**, 1-9.
- Lee A.G., Lipid phase transitions and phase diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta* 472, **1977**, 237-281.
- Leekumjorn S., Sum A.K., Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768, **2007**, 354-365.
- Lopes S., Simeonova M., Gameiro P. Rangel M. and Ivanova G., Interaction of 5- fluorouracil loaded nanoparticles with 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes used as a cellular membrane model. *J.Phys.Chem.B*. 116, **2012**, 667-675.
- Lorin A., Flore C., Thomas A., Brasseur R. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 3, **2004**, 163-176.
- Madhurilatha M., Paruchuri S.K. and Suria Prabha K., Overview of cubosomes: a nanoparticle. *IJRPC*, 1, **2011**, 2231-2781.
- Maherani B., Arab-Tehrany E., Mozafari M.R., Gaiani C. and Linder M., Liposomes: A review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current Nanoscience*, 7, **2011**, 436-452.
- Matsuki H., Goto M., Tada K. and Tamai N., Thermotropic and barotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers. *Int. J. Mol. Sci*. 14, **2013**, 2282-2302.

Qiu H. and Caffrey M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. *Biomaterials*, 21, **2000**, 223-234.

Ribeiro E.N.P.M., De Moura C.L., Vieira M.G.S., Gramosa N.V., Chaibundit C., De Mattos M.C., Attwood D., Yeates S.G., Nixon S.K., Ricardo N.M.P.S., Solubilisation capacity of Brij surfactants.

Serro A.P., Galante R., Kozica A., Paradiso P., Gonçalves da Silva A.M.P.S., Luzyanin K.V., Fernandes A.C., Saramago B., Effect of tetracaine on DMPC and DMPC+cholesterol biomembrane models: Liposomes and monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 116, **2014**, 63-71.

Spicer P.T., Progress in liquid crystalline dispersions: Cubosomes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 10, **2005**, 274-279.

Spicer P.T., Small W.B., Lynch M.L. and Burns J.L., Dry powder precursors of cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). *Journal of Nanoparticle Research*. 4, **2002**, 297-311.

van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews*. 9, **2008**, 112-124.

Warr G.G., Drummond C.J., Grieser F., Ninham B.W., Evans D.F. , Aqueous solution properties of nonionic n-dodecyl beta-D-maltoside micelles. *J. Phys. Chem.*, 90, **1986**, 4581-4586.

Yang D., Armitage B., and Marder S.R., Cubic liquid-crystalline nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, **2004**, 4402-4409.

Zabara A. and Mezzenga R., Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. *Journal of Controlled Release*. 188, **2014**, 31-43.

PARTIE 2 : MATÉRIELS, TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIES

Matériels, techniques et méthodologies

1. Matériels

Les tensioactifs Polysorbate 80 (P80, $M=1310$ g/mol, Brij 98 ($M=1153,54$ g/mol) et *n*-dodécyl- β -D maltoside (DM, $M= 510,62$ g/mol), les lipides 1-Oleoyl-rac-glycerol (Monooléine, $M= 356,55$ g/mol) et le Poly(éthylène glycol) de Monooléine ($M=860$ g/mol), les fluorophores, le Rouge de Nile ($M=318,349$ g/mol), l'Acrifalvine ($M=259,73$ g/mol) et l'Oil Red ($M=408,49$ g/mol) proviennent de chez Sigma Aldrich et le phospholipide 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ($M=677,933$ g/mol) de chez Avanti Polar Lipids.

La cyclodextrine amphiphile β CD-C10 (Lot LCH3-36, $M= 2266$ g/mol, degré de substitution DS=7,3) a été fournie par l'équipe Nanoparticules et Vectorisation (ENANOV) du Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Joseph Fourier à Grenoble.

2. Diffusion quasi-élastique de la lumière

2.1. Principe

La diffusion dynamique de la lumière ou diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) est une technique de spectroscopie de photons non destructive permettant d'accéder à la taille de molécules ou d'objets submicroniques dispersés dans un liquide. On utilise un faisceau laser généralement He-Ne de longueur d'onde 632,8 nm focalisé sur la cellule de mesure qui contient l'échantillon à analyser. Les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par l'échantillon au cours du temps dans une direction donnée de l'espace traduisent le déplacement des molécules ou particules se déplaçant au sein du liquide. L'analyse par un corrélateur des fluctuations d'intensité de la lumière diffusée permet d'établir la fonction d'auto-corrélation caractéristique des molécules ou particules et d'en déduire leur coefficient de diffusion. Lorsque ces dernières sont suffisamment diluées, elles sont animées d'un mouvement aléatoire ou mouvement brownien et en supposant qu'elles ont une géométrie sphérique, le diamètre hydrodynamique des molécules ou particules D_h contenues dans l'échantillon est calculé à partir de la relation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{k_B \times T}{3\pi\eta D_t}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température (K), η la viscosité du liquide et D_t le coefficient de diffusion transversale.

Le diamètre hydrodynamique tient compte du volume de la particule mais aussi de l'épaisseur de la couche de solvation.

2.2. Méthodologie

L'analyse de la distribution en diamètres hydrodynamiques des vésicules ou des agrégats issus des différentes expériences réalisées a été effectuée à l'aide d'un appareil Zetasizer nanoZS 90 (Malvern Instruments, France) collectant l'intensité de la lumière diffusée à un angle de 90° par rapport au faisceau incident.

Les analyses ont été réalisées à 25°C après un temps de mise à l'équilibre thermique des échantillons de 2 minutes et à une concentration adaptée pour assurer des conditions de mouvement brownien des particules. Chaque analyse est le résultat de 3 mesures consécutives, effectuées en plaçant l'échantillon dans une cuvette de 1 cm de chemin optique.

3. Spectroscopie de fluorescence et FRET

3.1. Principe et rappels théoriques

3.1.1 Le phénomène de fluorescence

Les composés fluorescents (fluorophores ou fluorochromes) organiques sont des molécules présentant généralement dans leur structure des noyaux aromatiques ou des hétérocycles avec des doubles liaisons conjuguées. Ces entités sont capables d'absorber l'énergie d'un rayonnement électromagnétique (ou lumière excitatrice) puis de restituer une part de cette énergie sous forme d'un rayonnement d'énergie plus faible (lumière émise). Le délai entre excitation et émission d'un fluorophore est très court, de l'ordre de la nanoseconde. Le phénomène de fluorescence est plus précisément le résultat de trois étapes (**Figure 3.1**) :

(1) L'absorption par le fluorophore de photons d'énergie $h\nu_{\text{abs}}$, où h est la constante de Planck et ν_{abs} la fréquence du rayonnement absorbé. Certains électrons tels les électrons non appariés n ou les électrons de doubles liaisons conjuguées π de la molécule passent ainsi de leur niveau fondamental à un état excité instable, généralement π^* .

(2) La transition électronique entre l'état excité initial et un autre état excité ou relaxation vibrationnelle mais de moindre énergie en raison de l'interaction du fluorophore avec son environnement.

(3) Le retour à l'état électronique fondamental par émission de photons d'énergie $h\nu_{\text{em}}$, ν_{em} étant la fréquence du rayonnement émis. L'énergie du rayonnement émis est plus faible que l'énergie absorbée lors de l'excitation en raison de la dissipation d'énergie causée lors de la deuxième étape.

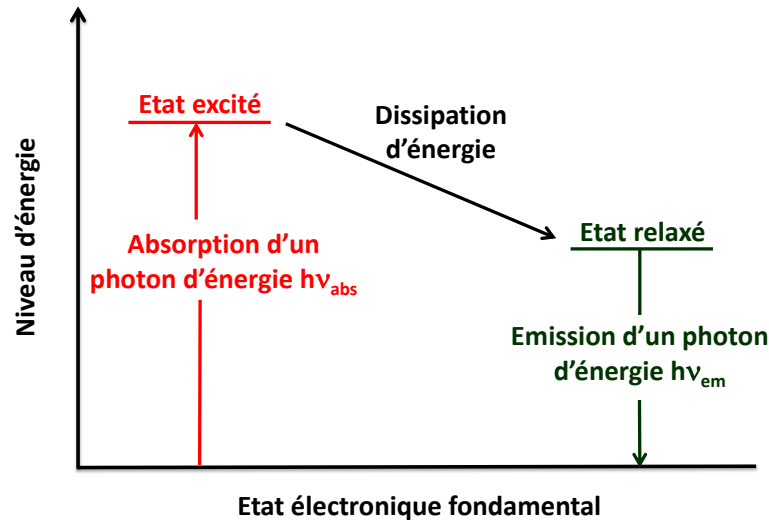


Figure 3.1 - Schéma simplifié du phénomène de fluorescence

En spectroscopie de fluorescence, on mesure la quantité de photons absorbés lors de l'excitation en fonction de leur énergie ou de la longueur d'onde λ_{ex} du rayonnement incident (spectre d'excitation) et l'intensité des photons émis en fonction de leur énergie ou de la longueur d'onde λ_{em} du rayonnement restitué (spectre d'émission).

Pour les solutions de fluorophores, on définit le rendement quantique de fluorescence ϕ_F (compris entre 0 et 1) par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés ou encore le rapport de l'intensité d'émission de fluorescence (I_f) sur l'intensité du rayonnement d'excitation absorbé (I_a) :

$$\phi_F = I_f / I_a \quad [1]$$

Le rendement est affecté à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission précises.

Si I_0 désigne l'intensité de la lumière excitatrice incidente et I_t l'intensité de la lumière excitatrice transmise à l'échantillon après un trajet optique l , l'intensité de la lumière absorbée s'exprime par :

$$I_a = I_0 - I_t$$

C'est-à-dire, en appliquant la loi de Beer-Lambert pour les solutions diluées :

$$I_a = I_0 (1 - I_t / I_0)$$

Soit:

$$I_a = I_0 (1 - 10^{-A}) \quad [2]$$

Où A représente l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'excitation : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ (ϵ , coefficient d'extinction molaire du fluorophore, C sa concentration et l le trajet optique). Les équations [1] et [2] permettent d'établir l'expression de l'intensité d'émission de fluorescence :

$$I_f = \phi_F I_0 (1 - 10^{-A}) \quad [3]$$

Pour des solutions diluées ($A < 0,1$), le facteur 10^{-A} est équivalent à $A \sim 1-2,3 A$ et l'on obtient :

$$I_f = 2,3 \cdot \phi_F I_0 \epsilon \cdot l \cdot C \quad [4]$$

Dans la pratique, il faut tenir compte de la réponse instrumentale k que l'on regroupe avec les caractéristiques intrinsèques du fluorophore, l'équation [4] s'écrit alors :

$$I_f = K \phi_f I_0 C \quad [5]$$

avec $K=2,3.K.\epsilon.l$

En pratique, pour établir les gammes de longueurs d'onde pour lesquelles il y a fluorescence, on réalise d'une part le spectre d'émission qui consistent à fixer une longueur d'onde d'excitation du rayonnement incident et à effectuer un balayage en longueur d'onde d'émission en mesurant l'intensité de fluorescence pour chaque longueur d'onde et, d'autre part, le spectre d'excitation obtenu en fixant une longueur d'onde d'émission et en enregistrant l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Cette procédure est souvent optimisée en choisissant respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui correspondent au maximum d'énergie émise ou absorbée.

Le spectre d'émission de fluorescence correspond toujours à une gamme de longueurs d'onde plus élevées que celle du spectre d'excitation, en raison de la relaxation vibrationnelle qui correspond à une perte d'énergie non radiative de l'état excité. La différence de fréquences entre l'onde émise (ν_f) et l'onde absorbée excitatrice (ν_a) d'un même état électronique et correspondant à leur maximum d'intensité, appelée déplacement de Stokes ($\Delta\nu = \nu_f - \nu_a$), caractérise cette perte d'énergie.

L'allure, la position, l'intervalle de longueurs d'onde et l'intensité des spectres d'émission dépendent de la structure du fluorophore, de la longueur d'onde d'excitation et sont sensibles aux propriétés du milieu environnant. Les niveaux d'énergie électronique du fluorophore varient en effet en fonction de ses interactions avec le solvant ou éventuellement une tierce molécule contenue dans le milieu, interactions essentiellement dipolaires ou électrostatiques. Généralement, l'augmentation de la polarité du solvant déplace les spectres de fluorescence vers les plus grandes longueurs d'onde (rayonnements de plus faible énergie).

3.1.2 Phénomène de FRET

Le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un échange d'énergie de fluorescence par résonance entre un fluorophore donneur dans son état excité et un fluorophore accepteur excitable localisé à proximité du donneur (**Figure 3.2**). L'échange d'énergie entre donneur et accepteur n'est pas radiatif et résulte d'une interaction de type dipôle-dipôle. Une fois excité suite au transfert d'énergie, l'accepteur va émettre un rayonnement lors de sa relaxation vers son état électronique fondamental. Plusieurs conditions doivent être remplies pour qu'il puisse y avoir transfert d'énergie de fluorescence :

- Ce phénomène physique nécessite avant tout une compatibilité énergétique entre donneur et accepteur. Cela signifie qu'il est nécessaire d'avoir un recouvrement spectral suffisant entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur.
- Le donneur et l'accepteur doivent être à une distance typiquement inférieure à 10 nm.

- L'orientation relative du dipôle du donneur dans son état excité par rapport à celui de l'accepteur doit être favorable au transfert, l'orientation idéale correspondant à des dipôles parallèles.

Le degré de recouvrement des spectres du donneur et de l'accepteur est défini par l'intégrale de recouvrement spectral de la paire donneur-accepteur J ayant pour expression:

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [6]$$

Où $f_D(\lambda)$ est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à la longueur d'onde λ et $\epsilon_A(\lambda)$ le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur à cette longueur d'onde.

L'efficacité du transfert d'énergie E , comprise entre 0 et 1, est donnée par la relation :

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad [7]$$

Où r est la distance effective entre le donneur et l'accepteur et R_0 est le rayon de Förster, distance pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. Ainsi, lorsque la distance entre les deux fluorophores est égale au rayon de Förster, la probabilité pour que le donneur retourne à son état fondamental par transfert d'énergie non radiatif vers l'accepteur est de 50%. Cette probabilité de désexcitation augmente en faveur du transfert d'énergie lorsque la distance entre le donneur et l'accepteur diminue.

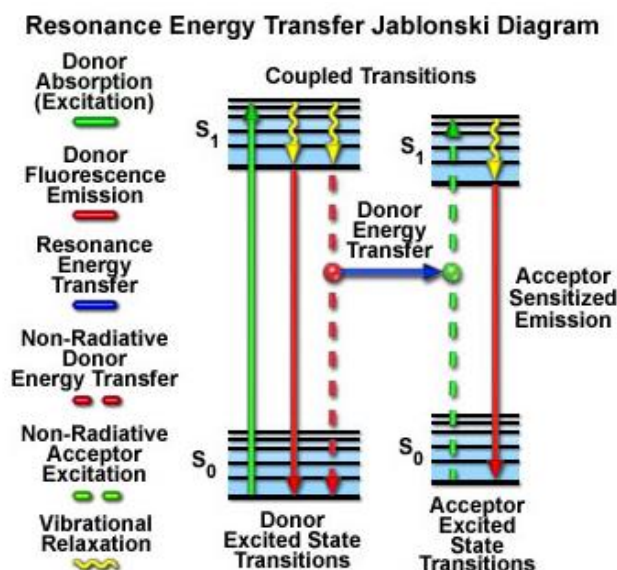


Figure 3.2 - Diagramme simplifié du phénomène de FRET.

[<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>]

Le rayon de Förster R_0 dépend du rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence de l'accepteur Q_D , l'indice de réfraction de la solution n , de l'orientation angulaire des dipôles de chaque fluorophore κ^2 (souvent voisin de 2/3) et de l'intégrale du recouvrement spectral de la paire donneur-accepteur:

$$R_0 (\text{\AA}) = 0,2108 \times [\kappa^2 n^4 Q_D J]^{1/6} \quad [8]$$

Le phénomène de FRET est mis en évidence par l'extinction partielle ou totale de l'émission de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur et l'apparition d'une émission de fluorescence de l'accepteur lorsque la longueur d'onde d'excitation est choisie en dehors du spectre d'absorption de ce dernier. Egalement, la durée de vie de l'état excité du donneur peut être plus courte en présence de l'accepteur.

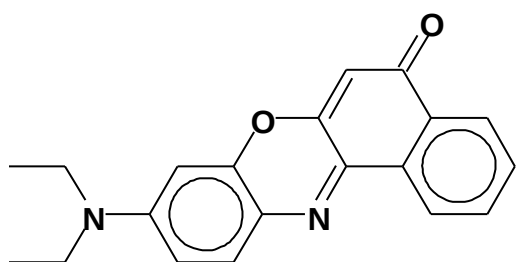
Le phénomène de FRET rend compte d'une proximité suffisante entre les molécules de donneur et d'accepteur pour que l'interaction dipôle-dipôle soit effective. Par contre, l'absence de FRET ne signifie pas forcément que les molécules sont éloignées. En effet, une orientation relative défavorable de leurs dipôles peut empêcher le transfert d'énergie de résonance.

3.2. Fluorophores utilisés

Les études réalisées en spectroscopie de fluorescence et les expériences de FRET ont nécessité l'utilisation de trois fluorophores différents : le Rouge de Nile (RN), l'Hydrochlorure d'Acriflavine (AC) et l'Oil Red (OR), selon le système examiné et l'information recherchée.

3.2.1. Rouge de Nile

Le Rouge de Nile (9-diéthylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) est un composé fluorescent hydrophobe largement utilisé dans l'étude de biosystèmes (Greenspan et Fowler, 1985 ; Kucherak et al, 2010 ; Rakshit et Vasudevan, 2008 ; Okamoto et al, 2006). Ses propriétés de fluorescence sont particulièrement sensibles à la polarité de son microenvironnement, la molécule possédant un fort moment dipolaire qui est modifié de façon importante lors de l'excitation (Jana et al, 2013 ; Hazra et al, 2004). Ceci est dû à la séparation de charge intrinsèque entre le groupement diéthylamine qui agit comme un donneur d'électrons et le reste de la molécule qui agit comme un accepteur d'électrons (**Figure 3.3**).



Formule	C₂₀H₁₈N₂O₂
Masse Molaire	318,37 g/mol
Solubilité dans l'eau	1 µg/mL soit 3,1 µM

Figure 3.3 - Structure chimique et caractéristiques du Rouge de Nile (RN).

Le Rouge de Nile possède une bonne solubilité dans une grande variété de solvants organiques mais est très peu soluble dans l'eau (Kucherak et al, 2010 ; Greenspan et Fowler, 1985). Il présente un fort solvatochromisme, ses bandes d'absorption UV-Visible et d'émission de fluorescence ainsi que leurs intensités respectives varient selon la nature du solvant (Kucherak et al, 2010). Plus la polarité du solvant est forte, plus le maximum d'absorption ou d'émission est déplacé vers les

grandes longueurs d'onde (dans le rouge) et plus le rendement quantique de fluorescence (QY) et l'efficacité de fluorescence du Rouge de Nile sont faibles (**Figure 3.4**).

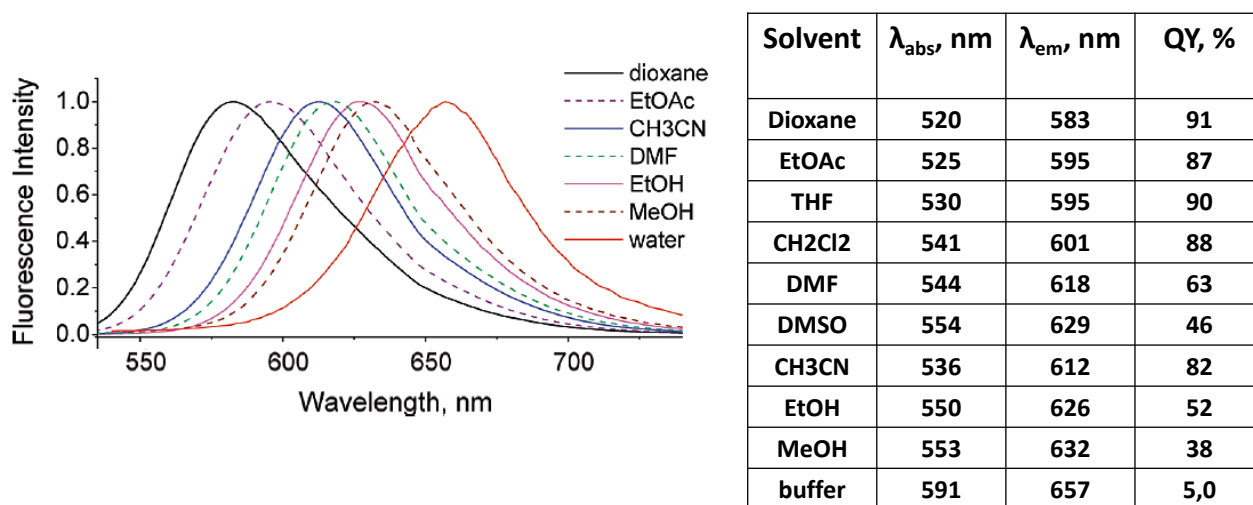


Figure 3.4 - Spectres et propriétés de fluorescence du Rouge de Nile dans divers solvants de polarités différentes (le buffer est un tampon phosphate 20 mM, pH 7,4). Le rendement quantique (QY) correspond à l'intensité effective de fluorescence émise pour une même concentration et une même énergie d'excitation (Kucherak et al, 2010).

Par ailleurs, il a été démontré que le Rouge de Nile forme des complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine (β CD) et la γ -cyclodextrine (γ CD) natives (Jana et al, 2013 ; Hazra et al, 2004 ; Wagner et al, 2003). Alors que le Rouge de Nile est très peu soluble dans l'eau et y présente une très faible absorbance, en présence de β CD ou de γ CD, la solubilité apparente du Rouge de Nile augmente proportionnellement à la quantité de cyclodextrine ajoutée ce qui se traduit par l'augmentation de l'intensité du spectre d'absorbance du Rouge de Nile accompagnée d'un déplacement significatif vers les plus faibles longueurs d'onde. Cette dernière observation correspond au changement d'environnement du fluorophore qui se trouve inclus dans la cavité de la cyclodextrine. Ainsi, la longueur d'onde au maximum du spectre d'absorption du Rouge de Nile passe de 600 nm dans l'eau seule à 580 nm en présence de 13,2 mM de β CD ou 540 nm en présence de 15,4 mM de γ CD (**Figure 3.5 et Figure 3.6**).

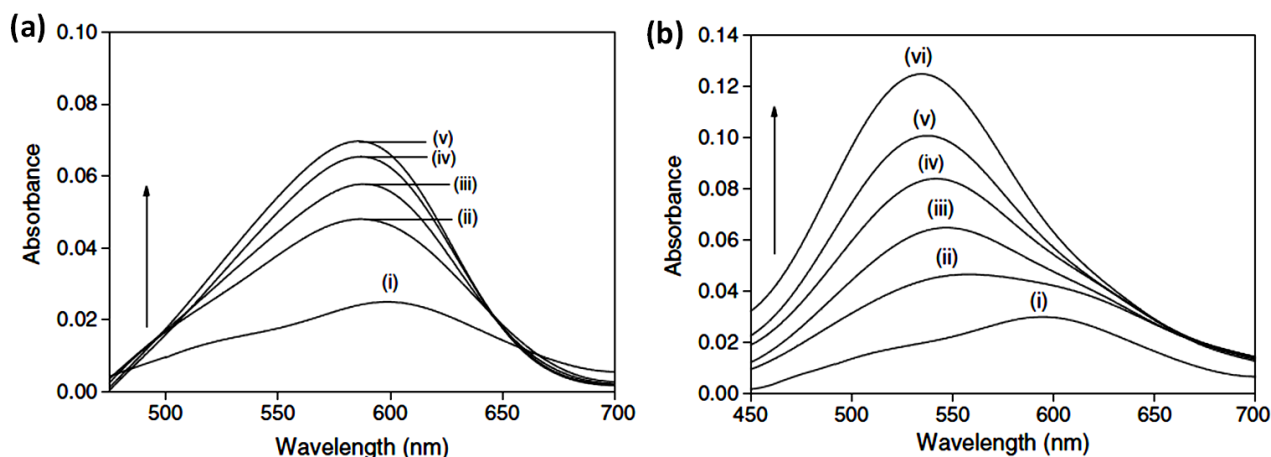


Figure 3.5 - (a) Spectres d'absorption du Rouge de Nile dans l'eau (i) et en présence de β CD (ii-v) contenant (ii) 8 mM, (iii) 10 mM, (iv) 12 mM, (v) 13.2 mM β CD et (b) spectres d'absorption du Rouge de Nile dans l'eau (i) et en présence de γ CD (ii-vi) contenant (ii) 3.85 mM, (iii) 5.77 mM, (iv) 7.7 mM, (v) 11.55 mM and (vi) 15.4 mM γ CD. Le Rouge de Nile est ajouté en excès dans un volume de 10 mL d'eau puis la solution est filtrée (Hazra et al, 2004).

Systems	ϕ_f
β-CD	
NR in water	0.018
NR in water + 4.40 mM β -CD	0.051
NR in water + 8.80 mM β -CD	0.082
NR in water + 13.2 mM β -CD	0.116
NR in water + 13.2 mM β -CD + 7 M urea	0.158
γ-CD	
NR in water	0.018
NR in water + 6.16 mM γ -CD	0.025
NR in water + 15.4 mM γ -CD	0.031
NR in water + 15.4 mM γ -CD + 7 M urea	0.062

Figure 3.6 - Caractéristiques spectrales du Rouge de Nile en milieu aqueux contenant des cyclodextrines. Le Rouge de Nile est ajouté en excès dans un volume de 10 mL d'eau puis la solution est filtrée (d'après Hazra et al, 2004).

Il a été également montré que le Rouge de Nile est capable de s'incorporer au sein de bicouches lipidiques telles que dans des liposomes de dimyristoyl-L- α -phosphatidylglycerol (DMPG), de dimyristoyl-L- α -phosphatidylcholine (DMPC) et ou dans des membranes cellulaires (Jana et al, 2013 ; Kucherak et al, 2010 ; Greenspan et Fowler, 1985).

Jana *et al* ont montré que le Rouge de Nile s'incorpore au sein des vésicules et que l'ajout de β CD dans le milieu entraîne une compétition entre son incorporation dans les bicouches lipidiques et la cavité de la cyclodextrine.

Des études spectroscopiques de fluorescence et notamment les longueurs d'ondes d'émission maximale du fluorophore dans les différentes conditions expérimentales révèlent ce phénomène. Les spectres du Rouge de Nile dans ces milieux sont présentés **Figure 3.7**. On note que l'incorporation du fluorophore dans les bicouches lipidiques ou dans la cavité de la cyclodextrine conduit à des longueurs d'onde au maximum d'émission de fluorescence différentes. En présence des deux systèmes susceptibles d'incorporer le Rouge de Nile, on note un élargissement des spectres d'émission de fluorescence avec un maximum situé à une longueur d'onde intermédiaire.

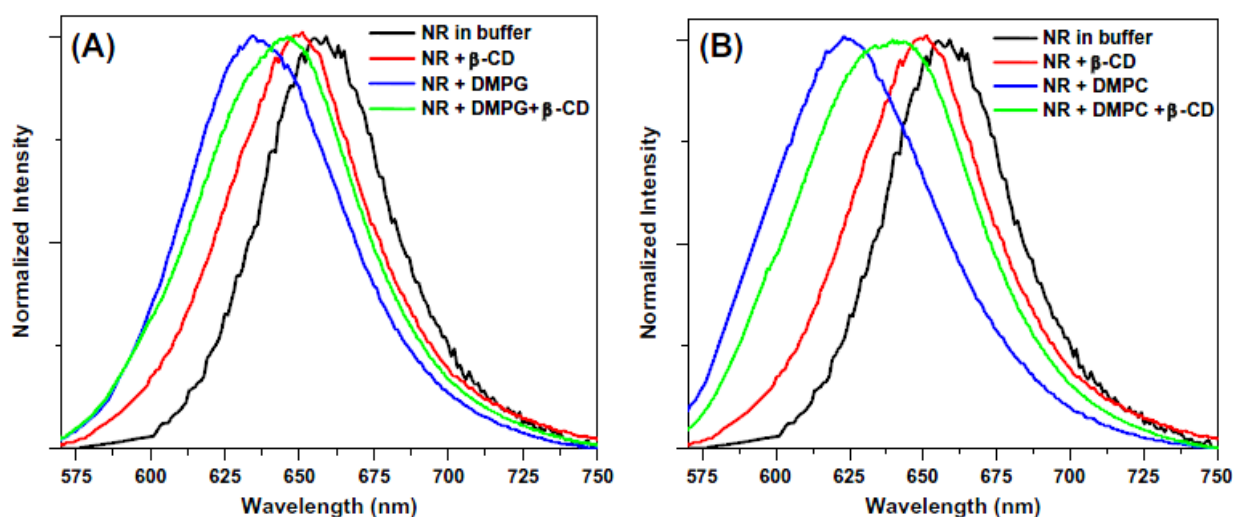


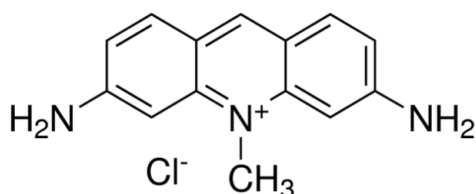
Figure 3.7 - Spectres d'émission de fluorescence normalisés du Rouge de Nile à 2.10^{-6} M dans du tampon Tris-HCl à pH 7,4 incorporé dans vésicules de DMPG ou de DMPC, en présence ou non de β -cyclodextrine. La concentration en DMPC ou en DMPG est de $1.5.10^{-3}$ M. La concentration en β -cyclodextrine est de 12.10^{-3} M. Les spectres ont été obtenus à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{ex} = 560$ nm (Jana et al, 2013).

Ainsi, nous avons choisi le Rouge de Nile pour sa double capacité à former un composé d'inclusion avec la β -cyclodextrine et à s'incorporer au sein d'assemblages lipidiques à laquelle s'ajoute sa grande sensibilité à la polarité de son environnement qui pouvait permettre a priori de tester l'aptitude des molécules de β CD amphiphile à inclure une substance hôte lorsqu'elles sont formulées au sein de nano-objets lipidiques.

3.2.2. Hydrochlorure d'Acriflavine (AC)

L'hydrochlorure d'acriflavine (**Figure 3.8**) possède un large éventail d'applications. Il peut aussi bien servir d'agent antimicrobien bactéricide qu'être utilisé comme sonde fluorescente dans des études de FRET, généralement en tant que donneur d'énergie.

L'hydrochlorure d'acriflavine est une molécule soluble dans l'eau, présentant dans ce milieu une longueur d'onde à son maximum d'intensité d'excitation de 416 nm et une longueur d'onde à son maximum d'intensité d'émission de 514 nm (**Figure 3.9**) (Keyhani et al, 2009 ; Dey et al, 2014 ; Sahare et al, 2008).



Formule chimique	C₁₄H₁₄ClN₃
Masse Molaire	259,5 g/mol
Solubilité dans l'eau	0,33 g/mL soit 1,27 M

Figure 3.8 - Structure chimique et caractéristiques de l'hydrochlorure d'acriflavine.

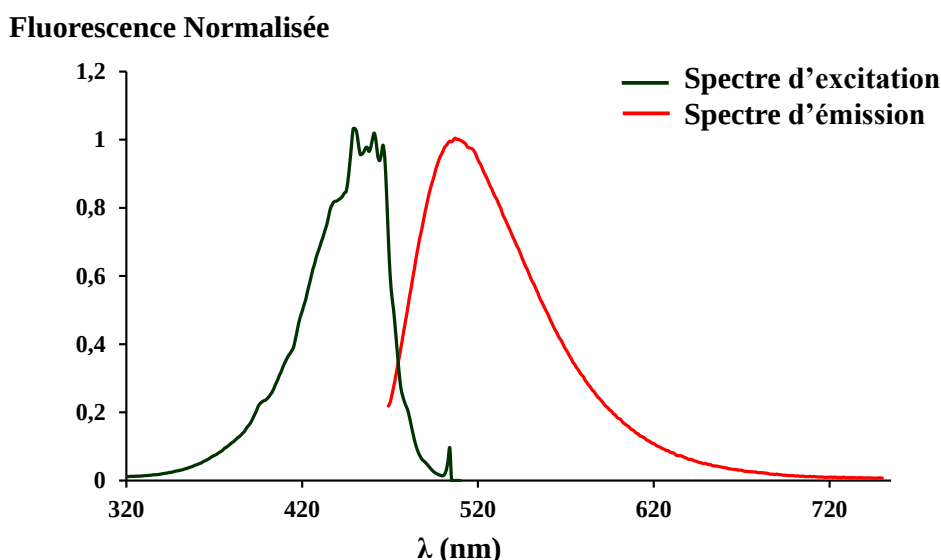


Figure 3.9 - Spectres d'excitation et d'émission de l'hydrochlorure d'acriflavine dans l'eau.

Ce composé a été choisi car son spectre d'émission de fluorescence présente un recouvrement partiel avec le spectre d'excitation du Rouge de Nile, conditions favorables pour réaliser nos expériences de FRET. Son caractère très hydrophile offrait de plus, par mesure de FRET, la possibilité d'évaluer la localisation des molécules de Rouge de Nile associées aux assemblages lipides/cyclodextrine amphiphile, à savoir si ces dernières se positionnent à l'interface eau-assemblage ou non. En effet, les molécules d'AC solubilisées dans la phase continue aqueuse ne peuvent conduire à un phénomène de FRET avec les molécules de Rouge de Nile que si ces dernières sont situées à l'interface hydrophile-hydrophobe des assemblages mixtes pour respecter une distance voisine de la distance de Förster.

3.3. Conditions expérimentales et méthodologies

L'appareil de mesure utilisé est un spectrofluorimètre Fluorolog Spex FLIT11 (Jobin Yvon, France) muni de deux photomultiplicateurs permettant l'acquisition simultanée de deux spectres d'émission indépendants. La source de lumière excitatrice est une lampe à arc Xénon de 450 Watts, émettant un rayonnement polychromatique continu dans l'UV et dans le visible, entre 250 et 800 nm.

Le compartiment échantillon est thermostaté à 25°C. Les échantillons sont placés dans des cuves en quartz de 1 cm de chemin optique. L'émission de fluorescence est observée à un angle de 90° par rapport à la direction de la lumière incidente afin d'éliminer les interférences entre la lumière émise par l'échantillon et la lumière excitatrice incidente.

3.3.1. Préparation des solutions de Rouge de Nile

Deux séries d'échantillons ont été préparées pour cette étude :

- Des solutions de RN à 1 µg/mL (3,1 µM) dans différents solvants organiques (heptane, tétrachlorure de carbone, chloroforme, acétonitrile, éthylène glycol) de polarités différentes (cf **Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 - Constantes diélectriques et moments dipolaires des solvants utilisés.

Solvants	Moment dipolaire (µ)	Constante diélectrique (ε)
Heptane	0,00	1,92
Tétrachlorure de carbone	0,00	2,24
Chloroforme	1,15	4,81
Acétonitrile	3,45	37,5
Ethylène Glycol	2,28	37,70

Pour cela, 5 films de RN sont préparés à partir d'une solution mère de RN dans du chloroforme déposée dans des flacons en verre, chaque volume correspondant à la quantité de fluorophore fixée. Après évaporation du chloroforme, chaque film est repris par un volume défini des 5 solvants organiques afin d'obtenir la concentration souhaitée.

- Des solutions micellaires en milieu aqueux : deux de P80 (cmc=0,012 mM), deux de Brij 98 (cmc=0,265 mM) et deux de DM (0,15 mM) sont préparées pour obtenir des solutions de concentrations égales à 30 et 10 fois la cmc respectivement. Pour cela, les quantités utiles de tensioactif sont pesées à $\pm 10^{-5}$ g dans des flacons en verre muni de bouchons hermétiques et dissoutes dans de l'eau MilliQ en quantité suffisante pour obtenir la concentration finale souhaitée. Pour aider à la dissolution des tensioactifs, chaque solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 10 mn environ, à température ambiante.

Chaque solution micellaire est ajoutée au RN en respectant une proportion de 2 mol% par rapport à la quantité de P80, de Brij 98 et de DM. Les mélanges solution de tensioactif/colorant sont placés

dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour favoriser la dissolution puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Le RN étant sensible à la polarité du milieu, chaque condition de solvant implique des conditions d'excitation/émission différentes (**cf Tableau 3.2**). Les spectres d'excitation et d'émission ont été réalisés à 25°C dans des gammes de longueurs d'onde appropriées entre 400 et 850 nm de façon à déterminer le maximum d'excitation et le maximum d'émission.

Tableau 3.2 - Longueurs d'ondes correspondant aux maxima d'excitation et d'émission du RN à 3,1 μM dans différents solvants.

Solvants	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
Heptane	484	526 / 564
Tétrachlorure de carbone	501	550 / 587
Chloroforme	531	594
Acétonitrile	526	618
Ethylène Glycol	563	650

3.3.2. Préparation des dispersions ternaires Tensioactif/ β CD-C10/RN

Les solutions micellaires ont été préparées selon le protocole décrit dans le **paragraphe 3.3.1**. Des films de β CD-C10 ont été préparés par évaporation de solvant sous courant d'azote (environ 45 mn) à partir de solutions chloroformiques contenant les quantités utiles pour les différents échantillons envisagés. Les films sont lyophilisés 12 h avant de contrôler la masse de cyclodextrine déposée par pesée ($\pm 10^{-5}$ g). Les dispersions ternaires tensioactif/ β CD-C10/RN ont été obtenues par hydratation des films de β CD-C10 à l'aide des solutions micellaires mixtes tensioactif/RN préparées précédemment et ajoutées en quantité suffisante pour respecter des teneurs finales en β CD-C10 de 1, 2, 3 et 4 mol% par rapport aux tensioactifs.

L'hydratation des films de CDs dure une nuit à température ambiante. La dispersion des CDs est facilitée par l'utilisation de vortex et d'un bain à ultrasons.

3.3.3. Expériences de transfert d'Énergie par Résonance de Förster dans les systèmes Tensioactif/ β CD-C10/RN/AC

Les expériences de FRET ont été réalisées en utilisant le couple donneur-accepteur hydrochlorure d'acriflavine (AC) et Rouge de Nile (RN).

Concernant l'étude préliminaire en absence de cyclodextrine amphiphile, 3 séries de systèmes micellaires avec et sans Rouge de Nile ont été préparées (**Tableau 3.3**) en suivant le même protocole que celui décrit précédemment (**paragraphe 3.3.1**). Afin d'obtenir des systèmes micellaires à composition différente en RN, la solution micellaire contenant 2 mol% de RN est diluée à l'aide de la solution micellaire sans RN.

Tableau 3.3 : Concentrations en tensioactifs et en RN présents dans les échantillons analysés.

P80/RN		Brij 98/RN		DM/RN	
[P80] M	[RN] M	[Brij 98] M	[RN] M	[DM] M	[RN] M
$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,24 \cdot 10^{-6}$	$2,65 \cdot 10^{-3}$	$8,80 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$5,08 \cdot 10^{-6}$
	$2,50 \cdot 10^{-6}$		$1,77 \cdot 10^{-6}$		$1,10 \cdot 10^{-5}$
	$3,70 \cdot 10^{-6}$		$2,60 \cdot 10^{-5}$		$1,52 \cdot 10^{-5}$
	$7,60 \cdot 10^{-6}$		$5,40 \cdot 10^{-5}$		$3,10 \cdot 10^{-5}$

L'étude de FRET au sein des systèmes contenant la cyclodextrine amphiphile a été menée à partir d'échantillons préparés comme décrit précédemment (**paragraphe 3.3.2**) et contenant de même 1, 2, 3, 4 mol% en β CD-C10 pour une quantité en RN fixée à 2 mol% (% molaires rapportés à la quantité de tensioactif). Pour chaque mesure de FRET, 50 μ L d'une solution mère d'AC à $4,5 \cdot 10^{-6}$ M dans l'eau MilliQ est ajoutée à 3 mL de chaque échantillon pour obtenir une concentration finale en fluorophore de $7,3 \cdot 10^{-8}$ M. Les spectres d'excitation et d'émission du RN et de l'AC sont enregistrés juste après addition d'AC. Les spectres d'émission du RN ont été obtenus en fixant la longueur d'onde d'excitation d'AC à 435 nm, c'est-à-dire en dehors de la bande d'absorption du RN. Pour ces études, des mesures de fluorescence ont été réalisées sur les échantillons présentés sur la **Figure 3.10**.

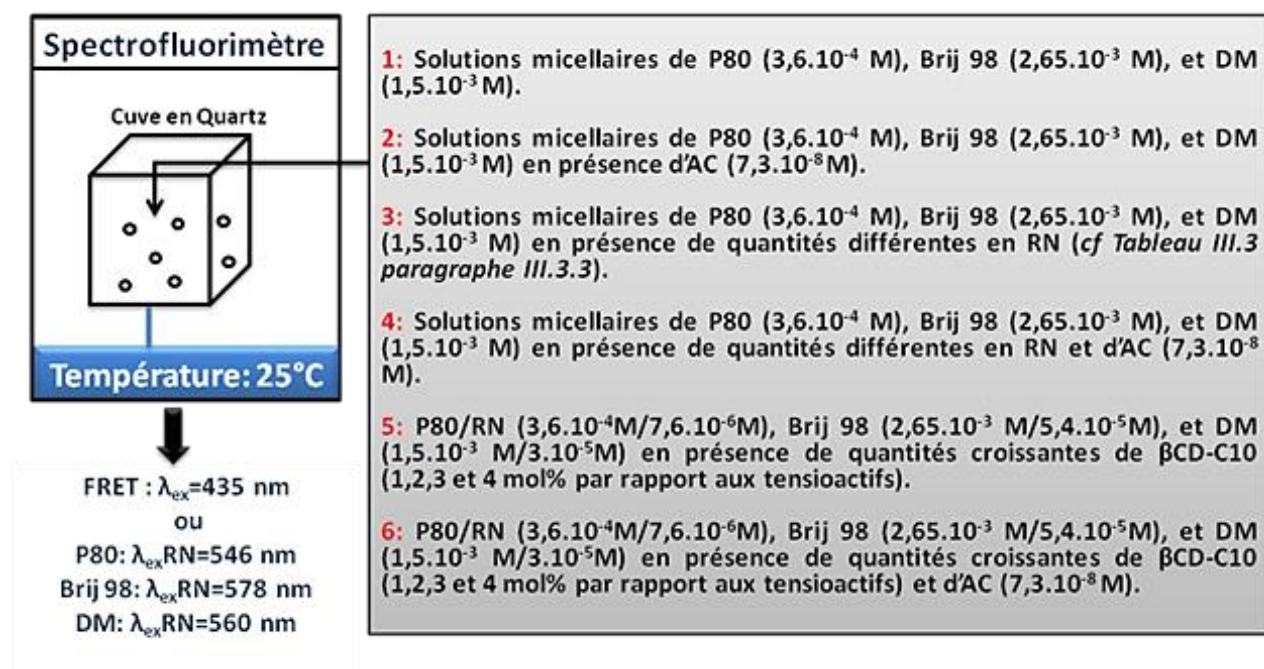


Figure 3.10 - Récapitulatif des compositions des échantillons analysés par spectroscopie de fluorescence.

3.3.4. Préparation des liposomes de DMPC et de DMPC/ β CD-C10

Les liposomes de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), chargés ou non en cyclodextrines amphiphiles, ont été préparés à partir de phases multilamellaires en excès d'eau suivie d'une extrusion séquentielle. La première étape consiste à solubiliser le phospholipide en présence ou non de β CD-C10 en quantités suffisantes pour respecter les proportions des systèmes envisagés, dans un solvant organique binaire chloroforme/méthanol (2:1 v/v), puis à évaporer le solvant sous courant d'azote afin d'obtenir un film mixte. Chaque constituant ajouté implique une évaporation intermédiaire de façon à contrôler les quantités de matière par pesée de précision ($\pm 10^{-5}$ g). Ensuite, le film est hydraté avec de l'eau MilliQ dont le volume correspond à la concentration finale souhaitée (typiquement 1 mM en phospholipide). L'homogénéisation du mélange est assurée par une agitation au vortex.

La dernière étape consiste à extruder les mélanges hydratés au travers de membranes de polycarbonate constituées de pores calibrés de diamètres décroissant de 0.8 ; 0.4 ; 0.2 et 0.1 μm sous pression d'azote (**Figure 3.11**).

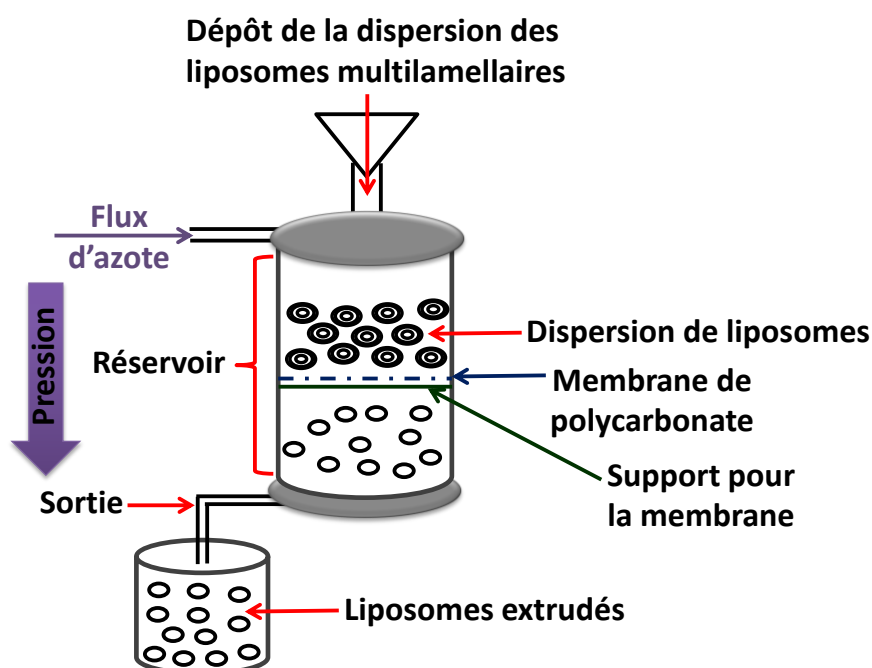


Figure 3.11-Schéma de l'extrudeur utilisé pour préparer des liposomes.

Les liposomes obtenus, destinés aux observations en Cryo-MET, ont été analysés en DQEL après préparation de façon à caractériser la distribution en diamètres hydrodynamiques des populations. Le tableau ci-dessous présente les compositions des différents lots de liposomes préparés ainsi que leurs diamètres moyens respectifs.

Tableaux 3.4 - Compositions du phospholipide DMPC et de la β CD-C10 présents dans les échantillons analysés en Cryo-MET ainsi que les diamètres hydrodynamiques moyens et les indices de polydispersité des agrégats formés par ces deux composés.

Paramètres	DMPC	4 mol% β CD-C10	7 mol% β CD-C10
n (moles)	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$4,14 \cdot 10^{-7}$	$7,5 \cdot 10^{-7}$
Concentration (M)	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$4,14 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$
Dh moyen (nm)	DMPC seul 136 $\pm$ 0,75	DMPC/ 4 mol% βCD-C10 132 $\pm$ 0,75	DMPC/ 7 mol% βCD-C10 134 $\pm$ 1,7
PDI moyen	0,088 $\pm$ 0,009	0,080 $\pm$ 0,015	0,090 $\pm$ 0,038

4. Turbidimétrie et expériences de solubilisation des nanosphères de β CD-C10

4.1. Principe de la mesure de turbidité en continu

Lorsqu'un faisceau de lumière traverse une dispersion colloïdale, les photons incidents sont déviés de leur trajectoire sans perte d'énergie, de sorte qu'une partie de la lumière incidente est diffusée dans toutes les directions de l'espace. Ceci se traduit par l'atténuation de l'intensité de la lumière transmise par l'échantillon dans la direction du faisceau incident. Cet effet dit de turbidité reflète donc le phénomène de diffusion de la lumière et dépend entre autres paramètres, du nombre et de la dimension des particules, de leurs interactions et de leur contraste c'est-à-dire de leur différence d'indice de réfraction avec le milieu continu dans lequel elles se trouvent. En régime dilué, l'atténuation de la lumière transmise obéit à une loi très simple de type Beer-Lambert selon laquelle la densité optique $DO = \log(I_0/I_t)$ est proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution ou dispersée C , de la longueur du chemin optique du faisceau l et d'un coefficient de turbidité spécifique τ rendant compte du pouvoir diffusant des particules : $DO = \tau \cdot l \cdot C$. Ainsi, toute modification de l'état physique des particules telle leur solubilisation par un tensioactif détergent, va modifier leur pouvoir diffusant donc leur turbidité spécifique et par conséquent la valeur de la densité optique. C'est ce phénomène que nous avons exploité pour suivre la solubilisation de nanoparticules de cyclodextrine amphiphile par les tensioactifs étudiés au cours de la thèse (Polysorbate 80 (P80), Brij 98 et n-dodécyl β -D maltoside (DM)).

Le processus de solubilisation des nanosphères a été suivi en continu par mesure de densité optique à 400nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible double faisceau (Lambda 35, Perkin Elmer), équipé d'un système de contrôle de la température ($25,0 \pm 0^\circ\text{C}$) des échantillons et de la référence, placés dans des cuves en quartz de chemin optique 1 cm et munies pour l'échantillon d'un petit barreau aimanté pour assurer une agitation.

Typiquement, après avoir établi la ligne de base à partir du milieu aqueux dans lequel sont préparées les nanosphères et les solutions de tensioactifs, un volume initial voisin de 1,5 mL de la

préparation de nanosphères (déterminé précisément par pesée à $\pm 10^{-5}$ g) est placé dans la cuve échantillon.

L'addition de la solution de tensioactif dans la cuve se fait à l'aide d'un cathéter fixé à une seringue de précision (Hamilton) elle-même placée dans un pousse-seringue (thermorégulé à $25,0 \pm 0^\circ\text{C}$) contrôlant la vitesse d'avancement du piston (**Figure 4.1**). Au début et à la fin des expériences, une analyse par DQEL du diamètre hydrodynamique des agrégats présents dans les échantillons est réalisée.

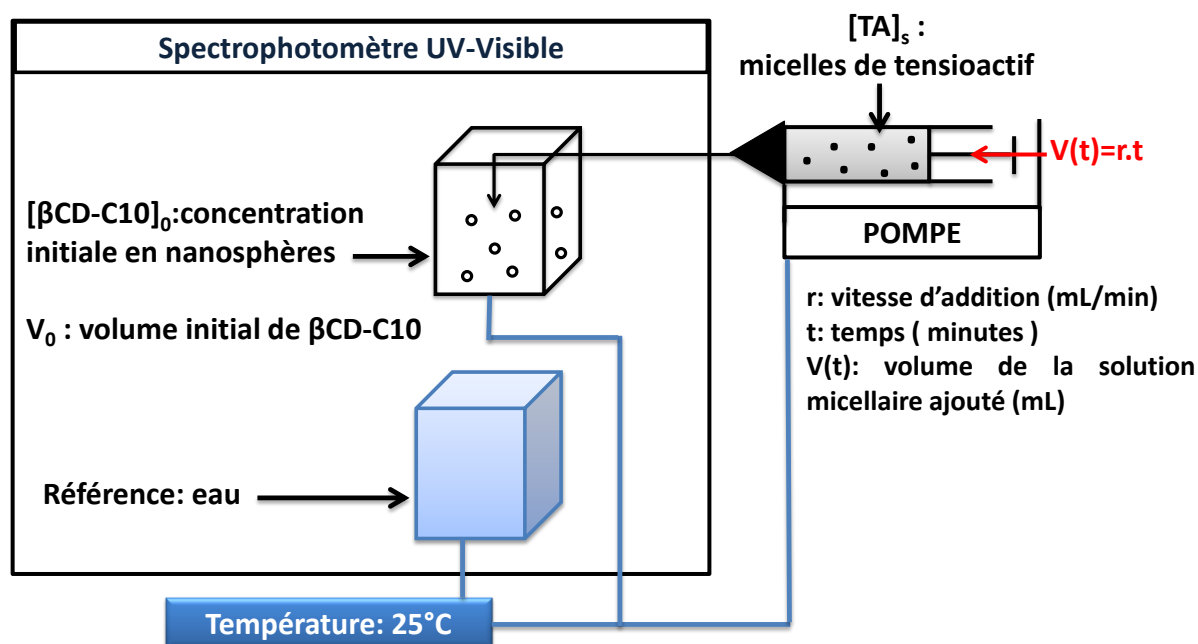


Figure 4.1 - Dispositif expérimental de mesure de turbidité en continu.

Ainsi, à chaque instant t , les concentrations actuelles en nanosphères, exprimée en concentration de cyclodextrine amphiphile $[\beta\text{CD-C10}](t)$ et en tensioactif $[\text{TA}](t)$ dans la cuve échantillon sont données par :

$$[\beta\text{CD-C10}](t) = [\beta\text{CD-C10}]_0 \times [V_0 / (V_0 + V(t))] \quad [1]$$

$$[\text{TA}](t) = [\text{TA}]_s \cdot [V(t) / (V_0 + V(t))] \quad [2]$$

Avec $V(t)$, le volume de solution de tensioactif ajouté au temps t , soit $V(t) = r.t$ (r étant la vitesse d'addition de la solution contenue dans la seringue en mL/mn), $[\beta\text{CD-C10}]_0$ la concentration initiale de nanosphères dans la cuve et $[\text{TA}]_s$, la concentration de la solution de tensioactif contenue dans la seringue d'addition.

4.2. Construction du diagramme d'état

On peut rappeler qu'au cours du processus de solubilisation de nanosphères de cyclodextrines amphiphiles par un tensioactif soluble doté de propriétés de détergence, ce dernier est amené à se partager entre les nanosphères et le milieu aqueux. Ceci provient du caractère amphiphile du tensioactif qui présente une double affinité d'une part pour les milieux hydrophobes et d'autre part pour les milieux hydrophiles.

L'augmentation de la quantité de tensioactif conduit à l'enrichissement progressif des objets, jusqu'à atteindre un seuil de saturation, au-delà duquel la matrice se transforme en agrégats mixtes de topologie évolutive jusqu'à obtention de micelles mixtes cyclodextrines amphiphiles-détergent (Lemos-Senna et al, 1998). Le passage de nanoparticules à micelles mixtes fait intervenir différents états intermédiaires qui correspondent à des assemblages supramoléculaires des deux entités dont les transitions structurales se traduisent par des changements relativement drastiques de la densité optique du système étudié. Ces changements indiquent les limites d'existence des différents états transitoires.

Par analogie avec le mécanisme de transition vésicule-micelle (Ollivon et al, 2000; Seras et al, 1993), on s'attend à distinguer au moins trois états principaux :

- **Le premier état** correspond à l'incorporation du tensioactif au sein de la structure hôte sans modifier la nature de la phase ou de la mésophase constituant les nanoparticules. Seuls des changements morphologiques ou d'interactions entre particules sont observés (agrégation/désagrégation, fusion, déformation, rupture/reconstitution...). Ces modifications structurales peuvent conduire à des évolutions drastiques du pouvoir diffusant des objets et provoquer des variations de densité optique marquées, les valeurs de DO restant élevées et souvent du même ordre de grandeur que la DO initiale.

- **L'état intermédiaire** est atteint lorsque la matrice des nanoparticules est saturée en tensioactif. Il y a alors apparition des premiers assemblages gouvernés par le tensioactif, des agrégats plurimoléculaires mixtes ou, si la solubilisation est atteinte, des micelles mixtes. Ceci correspond à un domaine de coexistence entre des assemblages de cyclodextrine amphiphile saturés en molécules de tensioactif et des micelles mixtes ou agrégats similaires saturés en tensioactif.

- **Le dernier état** est lorsque le système n'est plus composé que de micelles mixtes ou, à défaut, d'agrégats mixtes riches en tensioactif, généralement caractérisé par des valeurs de densité optique nettement plus faibles que celles associées aux états précédents, les agrégats micellaires présentant souvent de très petites dimensions. Néanmoins, la dimension effective des micelles mixtes et leur géométrie dépendent du rapport tensioactif /cyclodextrine amphiphile au sein des assemblages.

L'évolution de la turbidité (ici la valeur de la DO), en fonction de la proportion tensioactif/cyclodextrine incrémentée en continu et sensible à l'état d'agrégation des molécules (nombre, taille, forme, interactions, ségrégation de phases) permet de déterminer **(i)** les limites

entre les états physique du système en fonction des concentrations respectives des constituants, **(ii)** la composition des structures en présence et **(iii)** la loi de partage du tensioactif entre le milieu aqueux et les assemblages mixtes. En reproduisant les acquisitions à différentes concentrations initiales en cyclodextrine, on peut reconstituer le diagramme d'état décrivant la transition.

Dans le cadre de notre étude, nous sommes partis d'un état de nanoparticules de β CD-C10 obtenues par nanoprécipitation (diamètre hydrodynamique moyen voisin de 200 nm, cf **paragraphe 4.3.1**). Les expériences de solubilisation par les différents tensioactifs étudiés (P80, Brij 98 et DM) ont été réalisées à 25°C pour des concentrations initiales en cyclodextrine amphiphile comprises entre 0,065 mM et 0,575 mM.

La variation de la DO a été enregistrée à 400 nm en fonction du temps lors de l'addition continue des solutions de tensioactifs. La variation de la DO en fonction du temps permet d'obtenir la courbe dite de solubilisation. Le temps peut être converti à l'aide des équations [1] et [2] ci-dessus en concentration de tensioactif ajouté aux nanoparticules et en cyclodextrine amphiphile à chaque instant t .

La **Figure 4.2** illustre les résultats dans le cas du tensioactif DM. On observe une série de courbes homothétiques présentant plusieurs ruptures de variation de DO ou évènement structural.

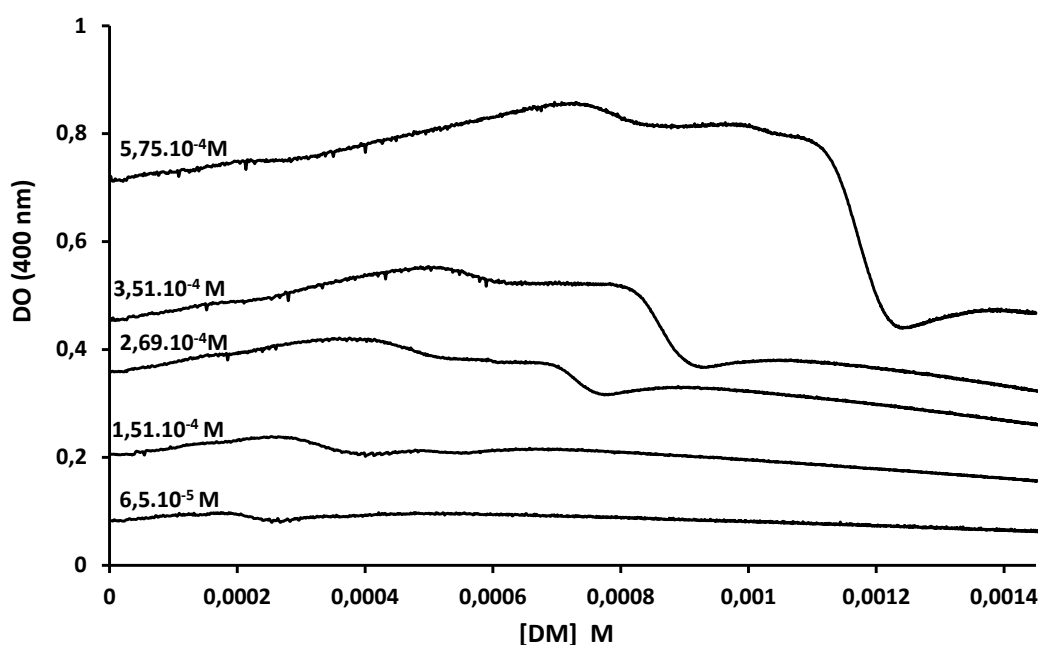


Figure 4.2 - Evolution de la turbidité des nanoparticules de β CD-C10 en fonction du temps. La DO a été mesurée à 400 nm suite à l'ajout d'une solution micellaire de DM à 3 mM. La concentration initiale en cyclodextrine pour chaque courbe est indiquée sur la figure.

Pour établir le diagramme d'état décrivant la transition nanoparticule-micelle à partir de ces courbes de solubilisation, il est nécessaire dans un premier temps de repérer chacun des évènements attribuables à un changement d'état des objets. D'après une méthodologie bien établie (Ménager et al, 2010), l'intersection des tangentes locales aux courbes encadrant ces évènements permet de

déterminer les concentrations critiques en tensioactif et cyclodextrine amphiphile délimitant deux états distincts du système.

Chaque intersection permet en effet de déterminer les concentrations de chaque entité dans le système au moment de l'évènement, c'est-à-dire au passage d'un état à l'autre du système, ceci à l'aide des équations [1] et [2] données ci-dessus (**Figure 4.3**).

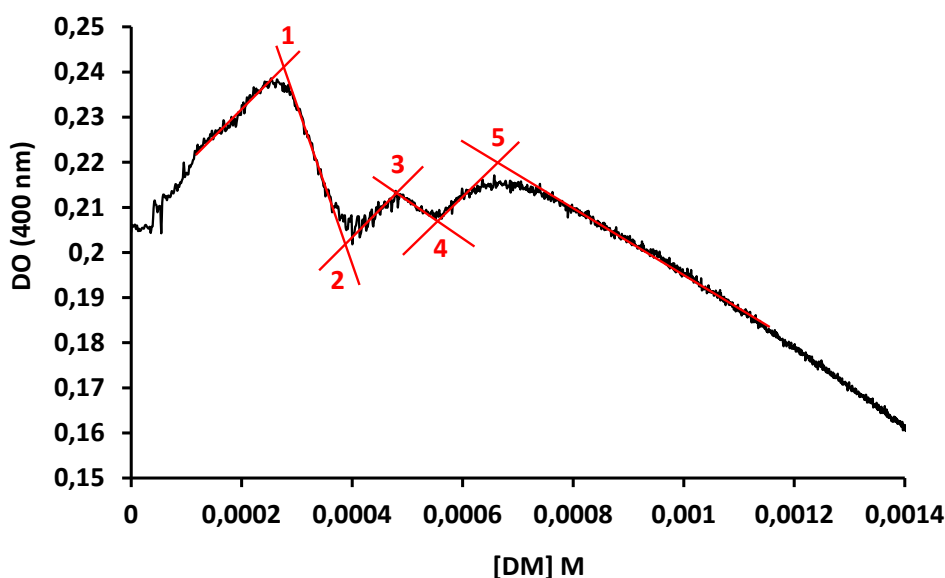


Figure 4.3 - Détermination des évènements et des tangentes locales encadrant les ruptures de courbes de turbidité. La courbe de solubilisation obtenue pour une concentration en DM de $3,0 \cdot 10^{-3}$ M et une concentration en β CD-C10 de $1,5 \cdot 10^{-4}$ M a été « zoomée » pour pouvoir déterminer de manière plus précise les tangentes des droites.

Pour chaque évènement, la variation de la concentration totale en tensioactif est tracée en fonction de la concentration totale en cyclodextrine. On obtient alors des droites décrivant la loi de partage du tensioactif entre le milieu aqueux et les agrégats mixtes. Chacune de ces droites représente une limite d'existence d'un état structural donné et l'ensemble des droites constitue une représentation du diagramme d'état du système dans le domaine de concentrations étudiées (**Figure 4.4**).

Si on établit un bilan de matière sur le tensioactif, ce dernier se partage entre la phase aqueuse continue et les agrégats mixtes tensioactif/cyclodextrine ce qui se traduit par l'équation suivante :

$$[\text{TA}]_{\text{tot}} = [\text{TA}]_{\text{aq}} + R_{\text{ag}} [\beta\text{CD-C10}]_{\text{tot}} \quad [3]$$

Où $[\text{TA}]_{\text{aq}}$ correspond à la concentration du tensioactif dans la phase aqueuse et R_{ag} est la composition des agrégats mixtes en tensioactif exprimée comme le rapport du nombre de moles de tensioactif par mole de cyclodextrine dans les agrégats. La cyclodextrine amphiphile présente une solubilité propre en milieu aqueux très faible ce qui permet de considérer que toutes les molécules de β CD-C10 sont incluses dans les agrégats.

Ainsi d'après l'équation [3], la régression linéaire entre $[TA]_{\text{tot}}$ et $[\beta\text{CD-C10}]$ permet d'évaluer $[TA]_{\text{aq}}$ et R_{ag} à partir respectivement de l'ordonnée à l'origine et du coefficient directeur des droites obtenues.

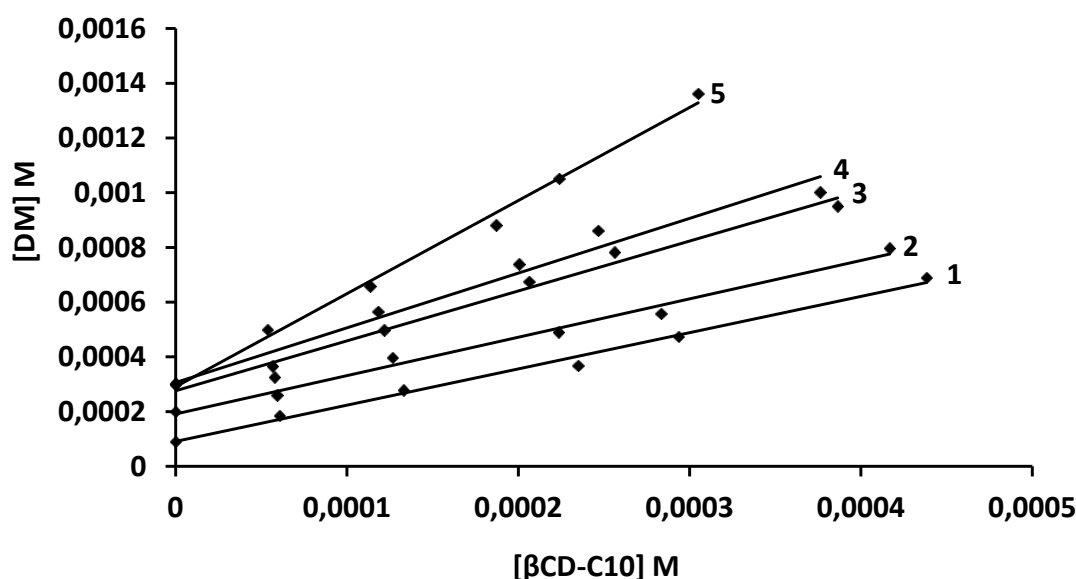


Figure 4.4 - Diagramme d'état DM/ β CD-C10 en excès d'eau établi à l'aide des courbes présentées sur la Figure 4.2.

Loi de partage des tensioactifs

D'un point de vue fondamental, la solubilisation d'assemblages supramoléculaires de composés amphiphiles très peu solubles dans l'eau par un composé amphiphile soluble possédant la propriété de détergence (ici appelé tensioactif), c'est-à-dire formant des micelles en milieu aqueux capables de solubiliser des substances hydrophobes, résulte de processus complexes. Les mécanismes moléculaires et supramoléculaires impliqués sont souvent difficiles à élucider et impliquent des transitions structurales directement reliées à la composition des phases en présence, autrement dit à la loi de partage des molécules de tensioactif entre les assemblages mixtes composé amphiphile/tensioactif et la phase aqueuse. Ce comportement a été largement étudié et validé à partir de systèmes impliquant des vésicules lipidiques et leur solubilisation sous forme de micelles mixtes lipides/tensioactif ou transition vésicule-micelle (Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et Barenholz, 1988; Ollivon et al, 1988,2000; Andelman et al, 1994; Paternostre et al, 1995; Ueno, 1989 ; Ménager et al, 2010).

Dans le cas qui nous intéresse ici, à savoir la formation d'objets colloïdaux ou agrégats mixtes $\beta\text{CD-C10}$ /tensioactif, la loi de partage du tensioactif repose sur le bilan de matière en tensioactif qui peut s'écrire:

$$[TA]_{\text{tot}} = [TA]_{\text{aq}} + [TA]_{\text{ag}} \quad [4]$$

Où $[TA]_{\text{aq}}$ est la concentration de tensioactif dans le milieu aqueux et $[TA]_{\text{ag}}$ est la concentration de tensioactif dans les agrégats mixtes.

En introduisant dans l'équation précédente le rapport molaire $R_{ag} = [TA]_{ag}/[\beta CD-C10]_{ag}$ toutes les concentrations étant exprimées par rapport au volume total de l'échantillon, on obtient alors:

$$[TA]_{tot} = [TA]_{aq} + R_{ag} [\beta CD-C10]_{ag} \quad [5]$$

La solubilité aqueuse de la cyclodextrine amphiphile étant très faible, elle est négligeable et l'approximation $[\beta CD-C10]_{ag} = [\beta CD-C10]_{tot}$ peut être appliquée. De cette façon, l'équation [5] devient:

$$[TA]_{tot} = [TA]_{aq} + R_{ag} [\beta CD-C10]_{tot} \quad [6]$$

Le coefficient de partage du tensioactif entre les agrégats mixtes et la phase aqueuse dispersante est défini par le rapport des fractions molaires du tensioactif dans chacune des phases :

$$K = X_{TAag}/X_{TAaq} \quad [7]$$

Où : $X_{TAag} = [TA]_{ag}/([TA]_{ag} + [\beta CD-C10]_{ag}) = R_{ag}/(R_{ag} + 1)$

$$X_{TAaq} = [TA]_{aq}/([TA]_{aq} + [H_2O]_{aq})$$

En considérant que la concentration des molécules d'eau dans la phase aqueuse est largement plus grande que celle du tensioactif ; $[TA]_{aq} \ll [H_2O]_{aq}$, l'équation [7] peut s'écrire :

$$K = \{R_{ag}/(R_{ag} + 1)\} / \{[TA]_{aq}/[H_2O]_{aq}\} \quad [8]$$

En supposant que la teneur totale en composés est petite devant la quantité d'eau du système, la concentration d'eau peut être considérée comme constante, ce qui permet d'introduire le coefficient de partage apparent $K' = K/[H_2O]_{aq}$, soit :

$$K' = \{R_{ag}/(R_{ag} + 1)\} / [TA]_{aq} \quad [9]$$

Ainsi, en se rapportant aux différentes limites d'état déterminées à partir des courbes de turbidité (**Figures 4.2 et 4.4**), il est possible de calculer un coefficient de partage apparent K' pour chacune de ces limites et de représenter la loi de partage des trois tensioactifs étudiés. La **Figure 4.5** montre les lois de variation de $R_{ag}/(R_{ag} + 1)$ en fonction de $[TA]_{aq}$ obtenues.

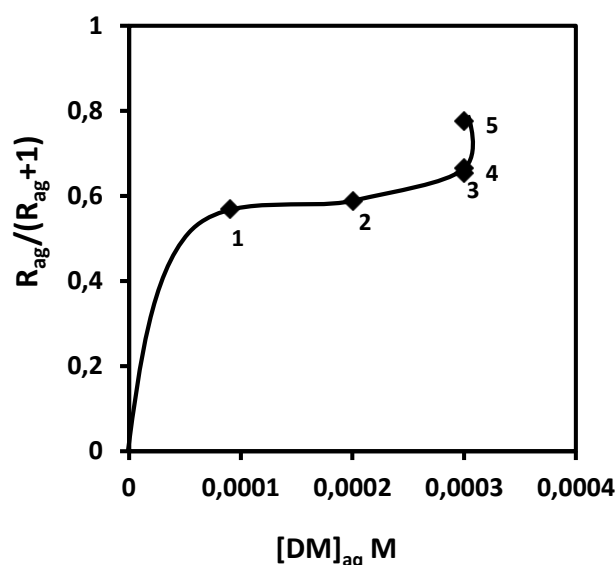


Figure 4.5 - Représentation des lois de variation du DM au sein des assemblages mixtes DM/ β CD-C10 en fonction de la fraction molaire du DM dans la phase aqueuse.

4.3. Préparation des échantillons et méthodologie

4.3.1. Nanosphères de β CD-C10

La technique de nanoprécipitation permet d'obtenir des nanoparticules de taille typiquement de quelques centaines de nm, par déplacement de solvant (Fessi et al, 1988). Pour préparer une dispersion/suspension de particules d'un composé hydrophobe dans un milieu aqueux, on le dissout dans un solvant organique miscible à l'eau puis on injecte la solution dans la phase aqueuse. Le solvant choisi est généralement un solvant semi-polaire volatile tel que l'acétone ou l'éthanol. L'injection se fait sous agitation et température contrôlées. Les nanoparticules se forment instantanément sous l'effet de la diffusion rapide du solvant vers la phase aqueuse. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation.

Afin d'obtenir des nanoparticules de β CD-C10 par nanoprécipitation, une masse de 24 mg de β CD-C10 est dissoute dans 24 mL d'acétone pour obtenir une concentration massique de 1 mg par mL ($4,41 \cdot 10^{-4}$ M). La solution organique de β CD-C10 est ajoutée progressivement dans 24 mL d'eau MilliQ contenue dans un ballon de 50 mL sous agitation modérée. L'acétone est ensuite évaporée à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le procédé est schématiquement décrit sur la **Figure 4.6**.

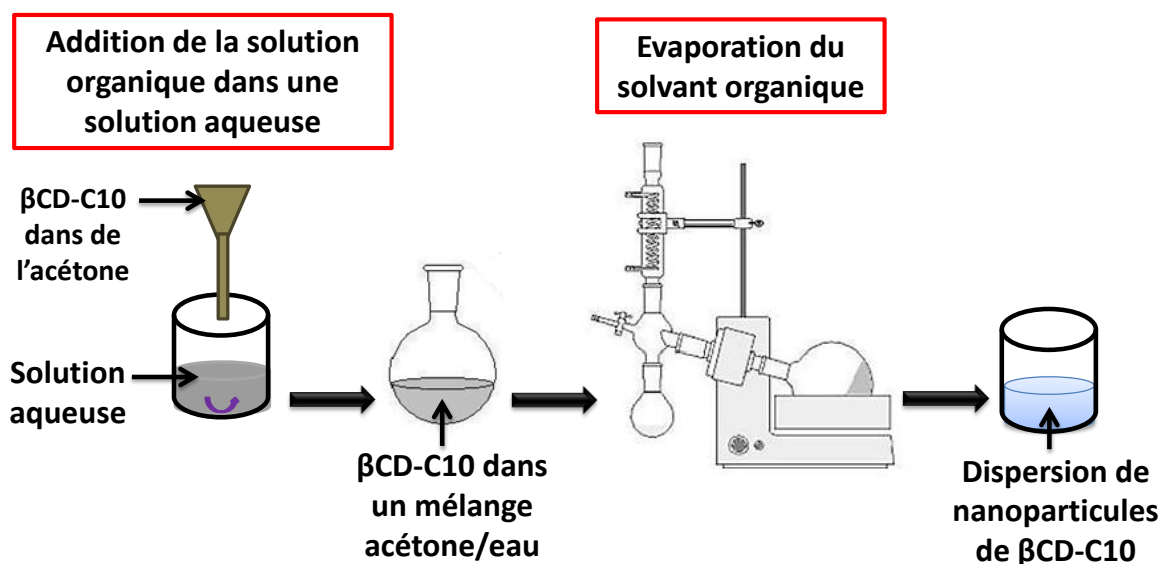


Figure 4.6 - Schéma du procédé de préparation des nanoparticules de βCD-C10 par nanopréciptation.

La **Figure 4.7** montre le profil de distribution du diamètre hydrodynamique (D_h) des nanoparticules obtenues par le procédé de nanopréciptation. Les nanoparticules formées par cette technique ont un D_h moyen de $162 \pm 1,4$ nm.

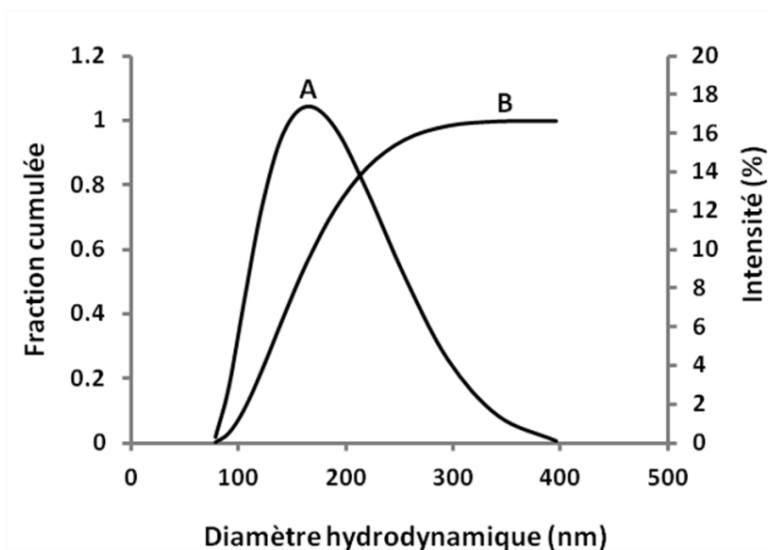


Figure 4.7 - Représentation de la distribution du diamètre hydrodynamique (A, axe de droite) et de la fraction cumulée (B, axe de gauche) des nanoparticules de βCD-C10 par DQEL. La concentration des nanoparticules de βCD-C10 est de $4,41 \cdot 10^{-4}$ M.

4.3.2- Expérience de solubilisation des nanosphères de β CD-C10

Les solubilisations des nanosphères de β CD-C10 par des micelles de tensioactifs ont été réalisées selon le mode opératoire décrit ci-dessus. Les expériences consistaient à faire varier la concentration initiale en nanosphères de β CD-C10 contenue dans la cuve en quartz et à placer dans la seringue d'addition, la solution de tensioactif. Ainsi, 1,5 mL de micelles de tensioactifs sont ajoutés progressivement à 1,5 mL de nanosphères. L'ajout de la solution micellaire se fait à 25°C et le mélange contenu dans la cuve est maintenu sous agitation magnétique.

Pour réaliser les expériences de solubilisation, plusieurs solutions de chacun des tensioactifs ont été utilisées et préparées selon le protocole décrit plus haut dans ce chapitre pour les autres études. Le **Tableau 4.1** rassemble les différentes conditions mises en œuvre. A la fin de chaque expérience de solubilisation, une analyse par DQEL du diamètre hydrodynamique des agrégats présents dans les échantillons a été réalisée (**Figure 4.8**).

Tableau 4.1 : Conditions expérimentales utilisées pour réaliser les expériences de solubilisation des nanoparticules de β CD-C10 par des tensioactifs.

Paramètres fixes	25°C ; $V_{\text{seringue}}=5 \text{ mL}$; $r=0,013 \text{ mL/min}$	
Tensioactifs	$[\text{TA}]_{\text{seringue}}$	$[\beta\text{CD-C10}]_{\text{initiale}}$
P80	10 mM*	$9,76 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $3,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $4,41 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
	80 mM	$1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Brij 98	26,5 mM	$8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $4,41 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
DM	3mM	$6,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $1,51 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $2,69 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $3,51 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

*La vitesse d'addition r de la solution de P80 à 10 mM est de 0,027 mL/min et le volume de la seringue utilisé est de 10 mL.

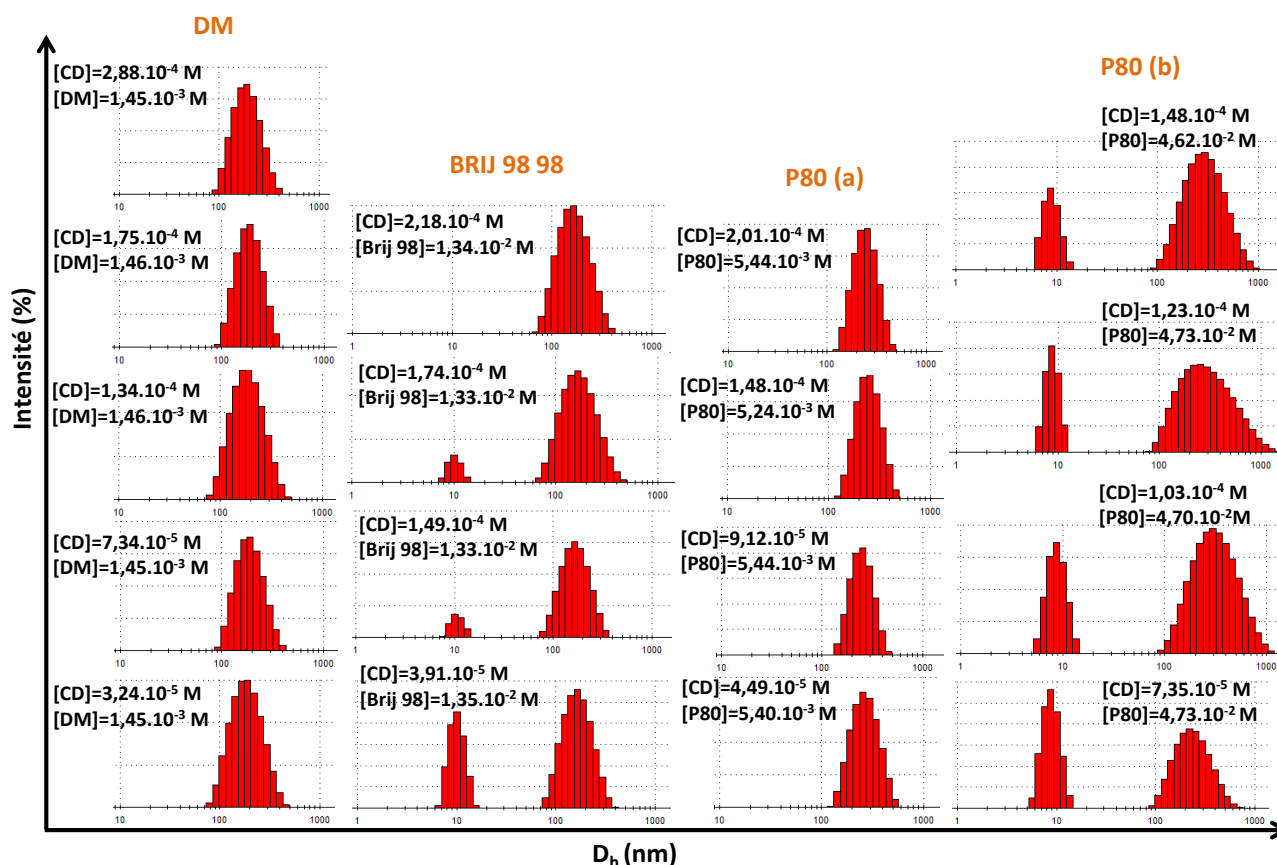


Figure 4.8 - Diamètres hydrodynamiques des agrégats formés à la fin de chaque expérience de solubilisation. Les concentrations en tensioactifs et cyclodextrines finales sont indiquées sur la figure. P80(a) : D_h des agrégats obtenus en fin d'addition de tensioactif pour une concentration en P80 initiale de 10 mM et P80(b): D_h des agrégats obtenus en fin de solubilisations pour une concentration en P80 initiale de 80 mM.

5. Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET)

5.1. Principe

La microscopie électronique en transmission (MET) permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique. C'est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons sous haute tension, émis par un canon à électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau sur l'échantillon. Les électrons sont absorbés par les éléments riches en électrons. Les électrons transmis sont analysés par le détecteur qui traduit le signal en donnant naissance à une image contrastée. Plus l'objet est dense en électrons plus il apparaît sombre. L'émission des électrons est produite par chauffage d'un filament de tungstène ou d'un cristal d'hexaborure de lanthane. Un vide poussé est effectué dans le tube du microscope. La tension accélératrice est de l'ordre de 200 kV pour les appareils les moins onéreux et 1000 kV pour les plus perfectionnés.

La variation de la distance focale permet de faire varier le grandissement (jusqu'à 1000000 x). La Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (Cryo-MET) consiste à congeler très rapidement à très basse température (éthane liquide) un film mince de la solution de molécules ou de la dispersion de particules et à observer les objets d'intérêt figés dans leur état initial au sein de la matrice solide vitrifiée donc généralement transparente aux électrons (technique introduite par Dubochet et al, 1988). C'est notamment le cas de l'eau.

5.2. Méthodologie

Nous avons réalisé les observations de cryo-MET avec Jean-Luc Puteaux au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV, Grenoble). En pratique, une goutte de suspension (5-10 g/L) est déposée sur une membrane de carbone perforée (NetMesh, Pelco) supportée par une grille de cuivre et préalablement effluée dans un plasma (easiGlow, Pelco) pour la rendre hydrophile. La grille, tenue par une pince, est placée dans la chambre d'une station de congélation Leica EM-GP, dans laquelle l'humidité est maintenue à 85%. Le liquide en excès est absorbé automatiquement à l'aide d'un papier filtre et la grille est immédiatement plongée dans l'éthane liquide (-182°C). Elle est ensuite montée sur un porte-échantillon Gatan 626, refroidi au préalable par de l'azote liquide, puis transférée dans le microscope. Les échantillons ont été observés sous faible illumination à -176°C au moyen d'un microscope Philips CM200 'Cryo' fonctionnant à une tension de 80 kV. Les images ont été enregistrées sur des plans-films Kodak SO163 en utilisant la procédure "Low Dose" de Philips permettant de limiter les dégâts d'irradiation dans la zone d'intérêt avant l'enregistrement des clichés. Les négatifs ont ensuite été scannés hors-ligne avec un scanner plat et, pour les particules présentant une structure périodique, les spectres de puissance (diffractogrammes) ont été calculés au moyen du logiciel Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

5.3. Echantillons pour les observations en Cryo-MET

5.3.1. Systèmes DMPC et DMPC/ β CD-C10

Les liposomes de DMPC seul et les assemblages mixtes DMPC/cyclodextrine amphiphile ont été préparés comme décrit précédemment (**paragraphe 3.3.4**), de façon à obtenir une concentration finale en phospholipide de 1 mM. Pour les assemblages mixtes deux ratios molaires de β CD-C10 de 4 et 7 mol% ont été considérés.

5.3.2. Systèmes tensioactifs/ β CD-C10

Les solutions micellaires en présence ou non de cyclodextrine amphiphile ont été préparées selon la même procédure que celle décrite dans les **paragraphes 3.3.1 et 3.3.2**.

Les concentrations finales et le nombre de moles en tensioactifs et en β CD-C10 sont indiqués dans le **Tableau 5.1** ci-dessous :

Tableau 5.1 : Concentrations et nombres de moles des différents composants constituant les échantillons analysés par Cryo-MET.

Brij 98/ β CD-C10			
β CD-C10	Brij 98	β CD-C10	Brij 98
$8,65 \cdot 10^{-7}$ mole	$2,08 \cdot 10^{-5}$ mole	$5,9 \cdot 10^{-6}$ mole	$6,6 \cdot 10^{-6}$ mole
$1,1 \cdot 10^{-4}$ M	$2,65 \cdot 10^{-3}$ M	$1,98 \cdot 10^{-3}$ M	$1,99 \cdot 10^{-3}$ M
P80/ β CD-C10*		DM/ β CD-C10	
β CD-C10	P80	β CD-C10	DM
$5,9 \cdot 10^{-6}$ mole	$3,0 \cdot 10^{-6}$ mole	$3,0 \cdot 10^{-6}$ mole	$1,35 \cdot 10^{-5}$ mole
$1,98 \cdot 10^{-3}$ M	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M	$4,5 \cdot 10^{-3}$ M

*Malheureusement, l'échantillon n'a pas pu être passé en cryo-MET car il présentait une très forte proportion de microparticules.

5.3.3. Systèmes MO/P80/ β CD-C10

Afin d'obtenir des assemblages mixtes hydratés ternaires de monooléine (MO), Polysorbate 80 (P80) et de cyclodextrine amphiphile, nous avons procédé par formation de films mixtes obtenus à partir de solutions organiques dont le solvant a été évaporé ensuite sous courant d'azote avant lyophilisation (12h). Chaque échantillon a été obtenu à partir de solutions mères de P80, de MO et de β CD-C10 préparées dans du chloroforme. La formation du film mixte se fait en une seule étape. Ainsi, un volume de solution de chacun des constituants est déposé dans un flacon en verre afin d'obtenir les ratios molaires souhaités.

Chaque film est ensuite hydraté par un volume de 2 mL d'eau MilliQ et le mélange homogénéisé à l'aide d'un bain à ultrasons. Pour éviter le phénomène de chauffe dû aux ultrasons, les flacons contenant les échantillons sont placés dans un cristallisateur rempli de glace et d'eau.

Plusieurs cycles sont nécessaires pour obtenir des cubosomes. Les échantillons sont conservés à température ambiante.

A la fin de chaque préparation et juste avant étude des échantillons, une analyse par DQEL du diamètre hydrodynamique des agrégats présents dans les échantillons est réalisée après une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ avec de l'eau MilliQ. La **Figure 5.1** illustre les résultats de mesures par DQEL des distributions de taille des agrégats formés à partir des échantillons MO/P80 et MO/P80/ β CD-C10.

Les concentrations finales et le nombre de moles des composés contenus dans chaque échantillon sont indiqués dans le **Tableau 5.2** (ratios calculés par rapport à la MO).

Tableau 5.2 : Concentrations et nombres de moles des différents composants constituant les échantillons analysés par cryo-TEM.

Système 5 mol% P80/MO		Système 5 mol% P80/MO/ β CD-C10		
P80	MO	P80	MO	β CD-C10
1,45 mM	28 mM	1,45 mM	28 mM	1,16 mM
$1,45 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$1,45 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$1,16 \cdot 10^{-6}$ moles
Système 10 mol% P80/MO		Système 10 mol% P80/MO/ β CD-C10		
P80	MO	P80	MO	β CD-C10
3,11 mM	28 mM	3,11 mM	28 mM	1,16 mM
$3,11 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$3,11 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$1,16 \cdot 10^{-6}$ moles
Système 15 mol% P80/MO		Système 15 mol% P80/MO/ β CD-C10		
P80	MO	P80	MO	β CD-C10
5 mM	28 mM	5 mM	28 mM	1,16 mM
$5,0 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$5,0 \cdot 10^{-6}$ moles	$2,8 \cdot 10^{-5}$ moles	$1,16 \cdot 10^{-6}$ moles

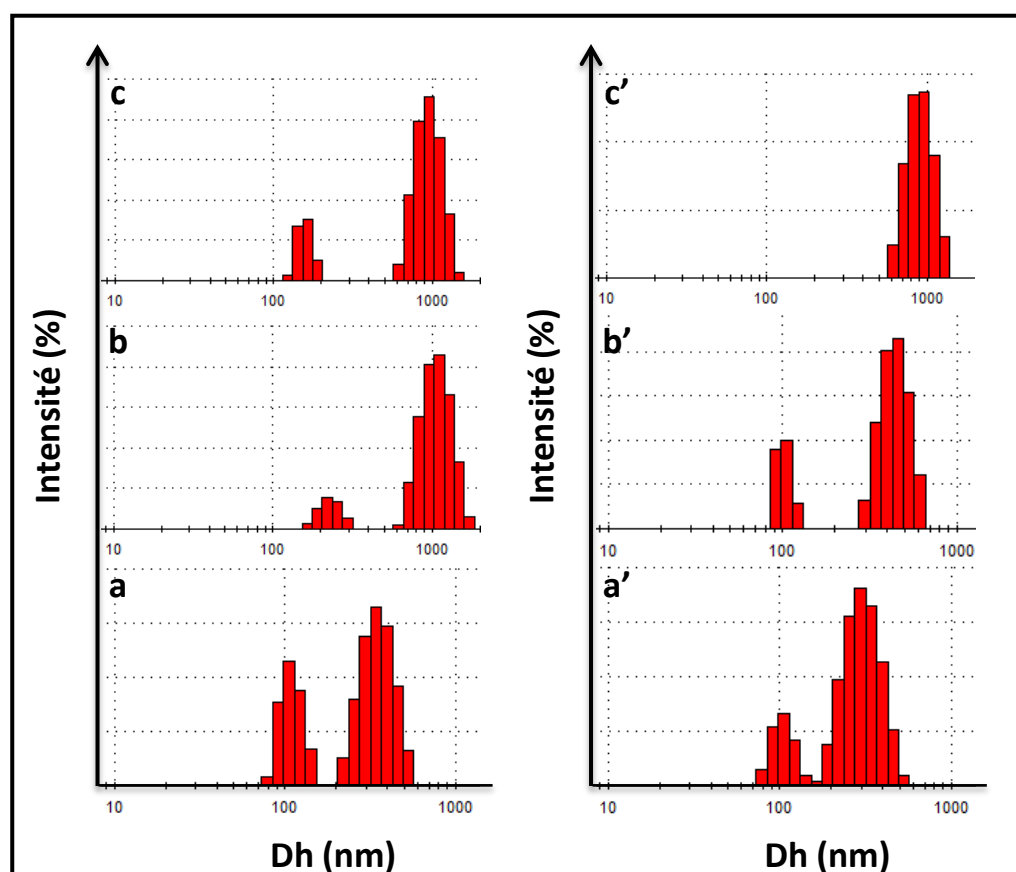


Figure 5.1 - Profils de DQEL des objets contenus dans les échantillons analysés par cryo-MET à 25°C. a) MO/ 5 mol% P80 et a') MO/ 5 mol% P80/ β CD-C10, b) MO/ 10 mol% P80 et b') MO/ 10 mol% P80/ β CD-C10 et MO/ 15 mol% P80 et a') MO/ 15 mol% P80/ β CD-C10.

On note sur la **Figure 5.1** que seuls les échantillons à une teneur de 5 mol% en P80 sans cyclodextrine conduisent à des populations d'agrégats de dimensions nanométriques. L'ajout de cyclodextrine permet de stabiliser l'état de nanodispersions à une teneur de 10 mol% en P80.

6. Microscopie confocale de fluorescence

6.1. Principe

La microscopie confocale de fluorescence permet une observation, de haute résolution, d'un échantillon marqué par un ou plusieurs fluorochromes. Suite à une excitation par une source lumineuse émettant généralement dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet, la fluorescence est excitée sur la quasi-totalité du trajet du faisceau dans l'échantillon. Ainsi, la fluorescence émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation constitue un signal indésirable. Afin d'éliminer la majorité de cette fluorescence parasite, un diaphragme, le pinhole, est placé avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif de microscope. Ce pinhole permet ainsi d'obtenir une très bonne résolution axiale mais aussi d'améliorer les résolutions latérales. Le microscope confocal de fluorescence est ainsi caractérisé par des capacités de résolutions tridimensionnelles qui autorisent l'imagerie détaillée d'échantillons avec peu de bruit de fond (**Figure 6.1**).

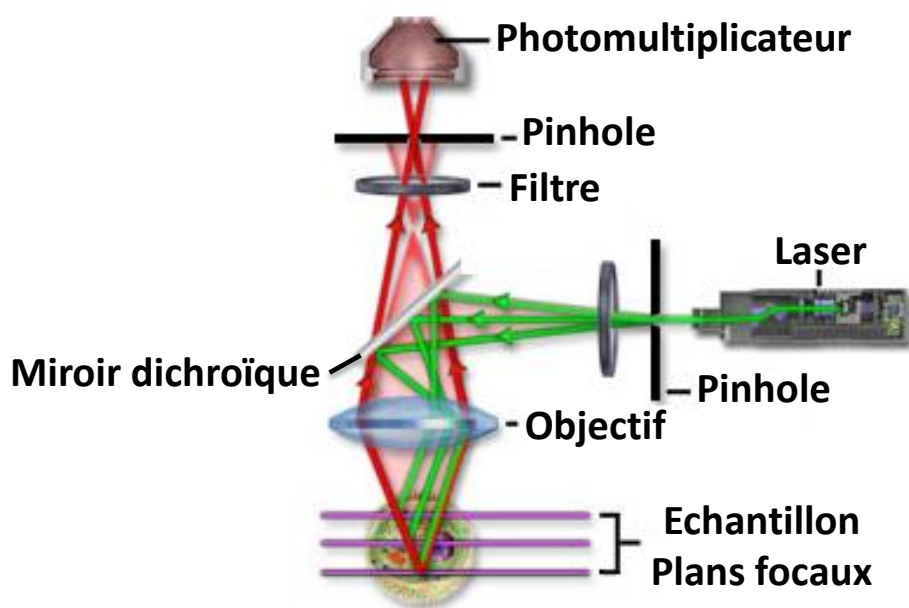


Figure 6.1 - Schéma d'un microscope confocal de fluorescence.
(<http://www.olympusconfocal.com/theory/>)

6.2. Méthodologie

Les différents échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope CLSM 510 Zeiss associé au logiciel LSM 5 Image Brother Zeiss. La longueur d'onde d'excitation (543 nm) a été utilisée pour visualiser des spots individuels correspondant aux nanoparticules composés de tensioactif/ β CD-C10/RN.

Pour une longueur d'onde d'excitation donnée, correspond un filtre pour l'émission (563-640 nm). Un objectif Plan-Apochromat® Zeiss d'un grossissement x20 a été utilisé. Chaque signal reçu par le photomultiplicateur est traduit par le logiciel en une valeur numérique entière ou « niveau de gris ». Ainsi, il est possible de reconstituer des images numériques par plan de coupe dont chaque point, appelé pixel, a une intensité proportionnelle à l'intensité de fluorescence émise par la sonde.

6.3. Echantillons pour les observations en Microscopie confocale de fluorescence

6.3.1. Systèmes Tensioactifs/ β CD-C10

Les systèmes mixtes tensioactifs/ β CD-C10 contenant du Rouge de Nile comme sonde fluorescente ont été observés au microscope confocal. Les échantillons ont été préparés selon le protocole précédemment décrit (**cf paragraphe 3.3.2**). Le **Tableau 6.1** indique leurs compositions respectives.

Tableau 6.1: Compositions en mol% et concentrations des échantillons TA/ β CD-C10 observés par microscopie confocale de fluorescence.

Constituants	P80	β CD-C10	RN
Composition molaire	94,13 mol%	3.91 mol%	1,96 mol%
Concentration	$3,6 \cdot 10^{-4}$ M	$1,5 \cdot 10^{-5}$ M	$3,8 \cdot 10^{-6}$ M

Constituants	DM	β CD-C10	RN
Composition molaire	94,15 mol%	3.88 mol%	1,98 mol%
Concentration	$1,48 \cdot 10^{-3}$ M	$6,1 \cdot 10^{-5}$ M	$3,14 \cdot 10^{-5}$ M

7. Microscopie optique à contraste de phase

7.1. Principe

La microscopie optique à contraste de phase révèle les structures des échantillons grâce aux différences d'indices de réfraction entre le milieu continu et les organisations moléculaires d'intérêt. Ces variations d'indice induisent un changement de phase de la lumière qui les traverse. Pour obtenir une image de la structure, on crée une interférence entre le rayonnement renvoyé par l'échantillon et un rayonnement de référence.

Ceci est réalisé à l'aide de deux dispositifs, appelés anneaux de phase, placés l'un dans le condenseur (le système optique qui focalise la lumière sur l'objet) et l'autre dans l'objectif. Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.

7.2. Méthodologie

Les expériences de microscopie ont été réalisées avec le microscope Nikon modèle Eclipse E600. L'échantillon est placé entre deux lamelles rondes en verre de 12 mm de diamètre. Les photographies ont été prises avec des objectifs de grandissement x10, à l'aide d'une caméra Mightex CMOS.

Nous avons essentiellement examiné les systèmes mixtes DM/ β CD-C10/RN dont les compositions sont reportées dans le **Tableau 7.1**. Le protocole de préparation est identique à celui décrit dans le **paragraphe 3.3.2**. Les observations ont été réalisées à température ambiante (**Figure 7.1**).

Tableau 7.1: Ratios molaires des différents composants constituant les échantillons analysés par microscopie optique à contraste de phase.

DM (mol%)	Rouge de Nile (mol%)	β CD-C10 (mol%)
98,50	0,50	1
97,47	0,49	2,03
95,44	0,48	4,07

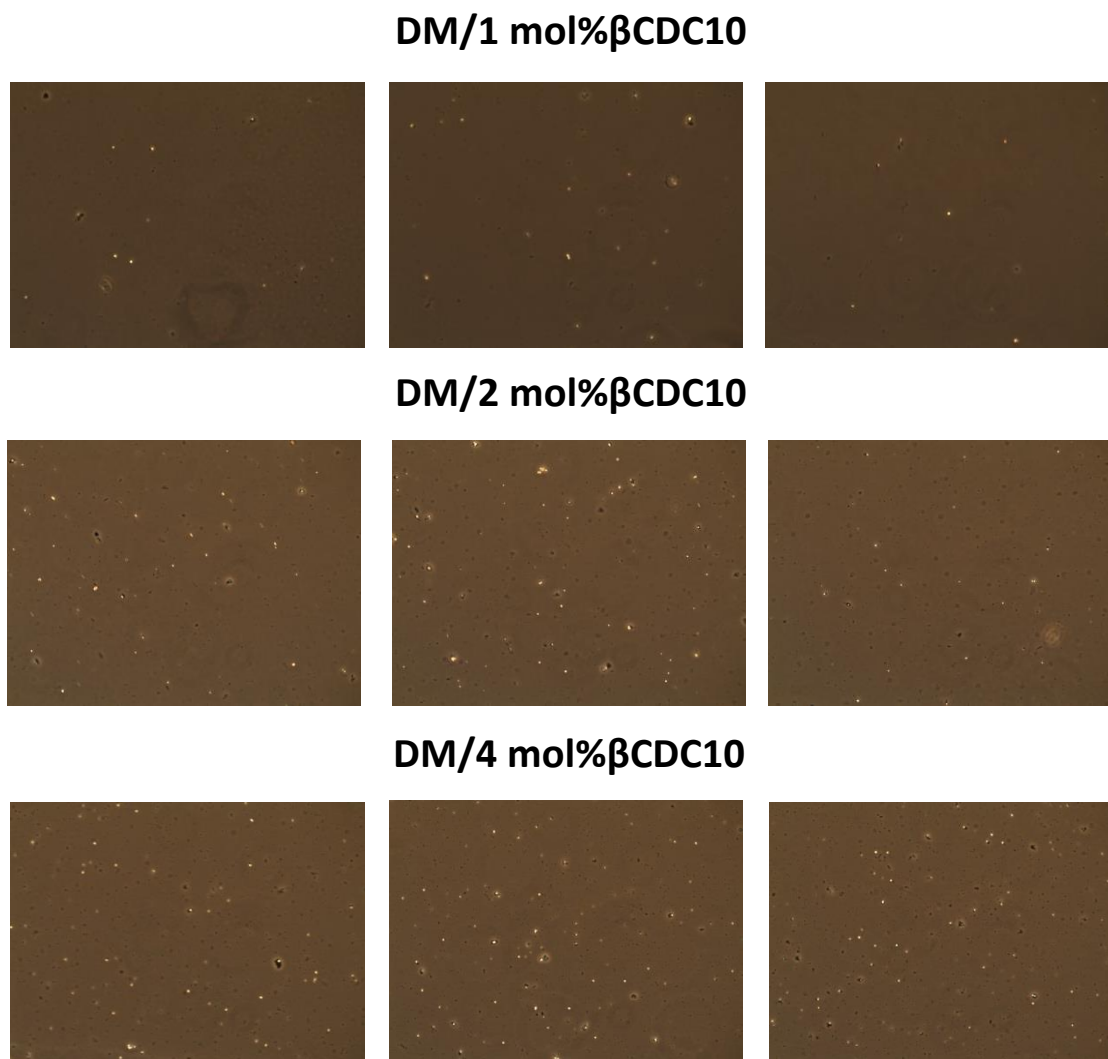


Figure 7.1 - Images de microscopie optique à contraste de phase des échantillons dont les compositions sont répertoriées dans le tableau 7.1. Les quantités en β CD-C10 présents dans chaque échantillon sont indiquées sur la figure. Grossissement 10.

8. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

8.1. Principe

La calorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) ou encore enthalpimétrie différentielle, est une technique permettant de mesurer les échanges d'énergie sous forme de chaleur lors de transformations d'un système telles que des transitions de phase (fusion, cristallisation) ou des réactions chimiques et de déterminer les températures critiques auxquelles ont lieu ces événements.

Le principe consiste à enregistrer la différence d'énergie (différence de flux de chaleur) fournie à un échantillon et à une référence pour les maintenir à la même température au cours d'un chauffage ou d'un refroidissement à une vitesse parfaitement contrôlée.

C'est donc une méthode dynamique où l'on chauffe simultanément une référence (ex : une capsule porte-échantillon en aluminium vide) dans un four et une capsule en aluminium contenant l'échantillon à étudier dans l'autre four. Les fours contenant la référence et l'échantillon sont pourvus d'éléments chauffants individuels et les températures de ceux-ci sont mesurées par des résistances de platine proches des coupelles.

En l'absence d'événement endothermique ou exothermique l'énergie supplémentaire à fournir à l'échantillon est proportionnelle à sa capacité calorifique C_p et les températures de la référence et de l'échantillon évoluent toutes deux linéairement en fonction du temps. Lorsqu'un événement thermique survient, l'appareil doit fournir plus ou moins de chaleur à l'échantillon pour le maintenir à la même température que la référence. Cette différence entre les flux de chaleur est enregistrée en fonction du temps converti en température à partir de la rampe de balayage thermique imposée. C'est le principe du calorimètre à compensation de puissance. Les résultats, sous forme de thermogrammes, représentent le flux de chaleur (mW) en fonction de la température (°C). Dans le cas de transformations dites de premier ordre, l'enregistrement de l'excès de quantité de chaleur en fonction de la température se traduit par un pic dont l'aire est proportionnelle à la variation d'enthalpie de transition ΔH . Une aire positive correspond à un phénomène endothermique (fusion d'une variété cristalline, par exemple), une aire négative indique un événement exothermique (cristallisation ou transition polymorphe).

La DSC permet donc de déterminer les températures de fusion et de cristallisation, la chaleur spécifique et l'enthalpie d'une transition dans un échantillon. De plus, la variation de ces paramètres permet de détecter des changements de structure lors de l'ajout de différents composants qui vont perturber les interactions entre les molécules et modifier ainsi l'énergie engagée dans les événements thermiques.

8.2. Méthodologie

Nos études ont été réalisées sur un dispositif DSC Pyris Diamond comportant un double four indépendant contenant des capteurs en platine et équipé d'un intracooler 2P de Perkin Elmer. L'acquisition et le traitement des données ont été effectués à l'aide du logiciel Diamond DSC Start Pyris. La calibration du DSC est réalisée à l'aide d'un échantillon d'acide laurique (pureté 99.9% déterminée par chromatographie en phase gazeuse) dont la température de fusion est égale à 43,7°C et la variation d'enthalpie correspondante ΔH_f est égale à 151,15 J/g.

Pour chaque mesure, une masse connue d'échantillon (1 à 10 mg pesés précisément à $\pm 0,01$ mg) est introduite dans une capsule en aluminium (Perkin Elmer) d'une contenance de 50 μ L. Ces capsules sont ensuite scellées hermétiquement et introduites dans la tête de mesure. Une capsule vide est utilisée comme référence. Le comportement thermique des échantillons a été étudié à la vitesse de refroidissement et de chauffage de 5°C/min, aux températures extrêmes des intervalles

parcours de -5°C à 55 °C, sous un balayage constant d'azote sec. A la fin du cycle réalisé à 5°C/min, un chauffage est effectué à la vitesse de 2°C/min (**Figure 8.1**).

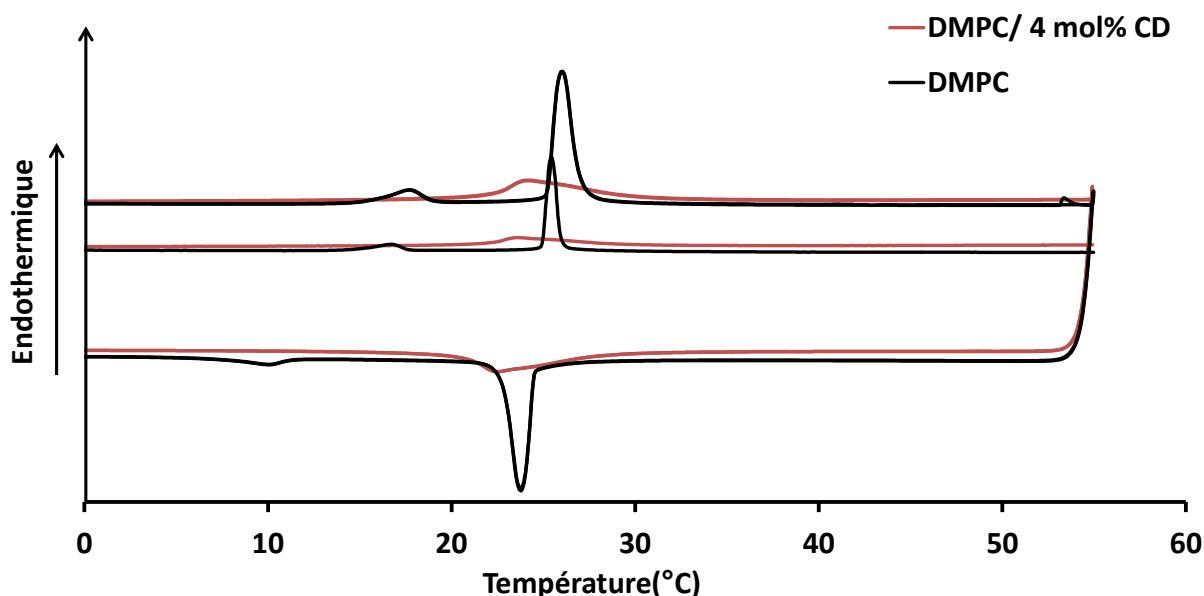


Figure 8.1 - Thermogrammes de DMPC et d'un mélange DMPC/ β CD-C10 (96/4 mol%) hydratés à 80 % en masse.

La température de début de transition (T_{onset} exprimée en °C) correspond à l'intersection entre la tangente à gauche de la plus forte pente du pic et la ligne de base. Les aires des pics des thermogrammes sont normalisées en les exprimant en J par gramme de l'entité dont la transition est observée.

L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage a été utilisée pour étudier le comportement thermique au cours de cycles de chauffage-refroidissement de phases lamellaires en excès d'eau (80% en masse) de DMPC seule ou en présence de quantités croissantes de cyclodextrine amphiphile (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 mol%). Les échantillons ont été préparés par hydratation de films obtenus selon le protocole décrit **paragraphe 3.3.4** et homogénéisés par vortex.

9. Diffraction des rayons X

9.1. Principe

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde λ est de l'ordre de l'Angström. Lorsque les photons X rencontrent les électrons des atomes constituant le matériau qu'ils traversent, ils sont déviés de leur trajectoire incidente dans toutes les directions de l'espace produisant un rayonnement diffusé de faible intensité.

Toutefois, lorsque les atomes ou molécules possèdent une organisation dans l'espace, si la condition de Bragg est satisfaite, la diffusion à un angle égal à l'angle d'incidence s'effectue sous forme d'interférences constructives, donc avec une intensité beaucoup plus importante.

Pour que la condition de Bragg soit remplie, il faut que la différence entre les chemins optiques parcourus par deux ondes réfléchies par des atomes ou molécules situés sur des plans parallèles et équidistants (distance entre plan réticulaire d), soit égale à un nombre entier (n) de fois la longueur d'onde du rayonnement (**Figure 9.1**): $2d \sin \theta = n \lambda$ (**Loi de Bragg**).

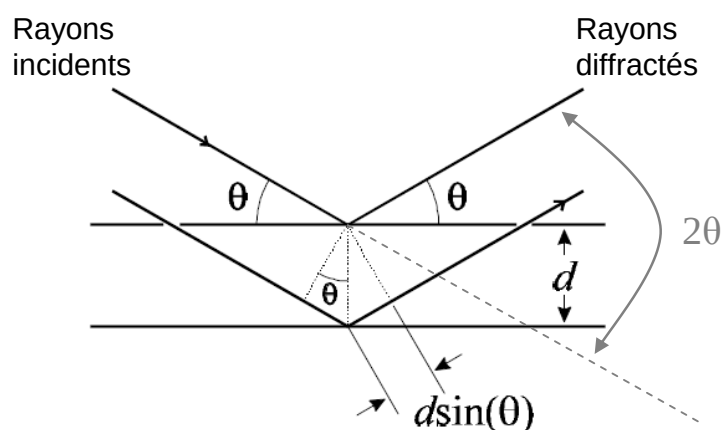


Figure 9.1- Principe de la diffraction de rayons X selon la loi de Bragg représentant le chemin optique des rayons X se diffractant sur un échantillon cristallin avec l'angle θ correspondant à l'angle d'incidence du rayonnement sur les plans atomiques de l'échantillon. L'angle de diffraction entre la direction du faisceau incident et celle du faisceau réfléchi est égal à 2θ .

La relation de Bragg permet de relier, la distance réticulaire d (en Å) d'une famille de plans et la longueur d'onde λ des rayons X, à l'angle de réflexion θ (en degré) du faisceau sur ces plans ; n est un nombre entier représentant l'ordre de la réflexion. Dans le cas d'une organisation smectique de bicouches lipidiques, l'ordre 1 ($n = 1$) détermine la distance réticulaire entre deux bicouches consécutives et renseigne sur l'épaisseur de la strate considérée. Dans le cas général, plusieurs réflexions correspondant à des ordres différents et/ou à différents plans atomiques/moléculaires sont observées et permettent de préciser les distances interatomiques ou intermoléculaires du même ordre de grandeur que la longueur d'onde du rayonnement X, classiquement entre 1 et 100 Å.

9.2. Appareil de mesure

Les analyses par diffraction des rayons X (DRX) ont été réalisées sur le montage du laboratoire (Equipe PCSP, UMR CNRS 8612) permettant l'acquisition simultanée du signal de diffraction aux petits (*small angle light scattering*, SAXS) et grands angles (*wide angle light scattering*, WAXS) sur un échantillon placé dans une cellule de mesure régulée par effet Peltier et permettant de faire varier la température de l'échantillon de façon contrôlée entre -30 et +230 °C à des vitesses de

balayage comprises entre 0,01 et 20 °C/min. Ce même dispositif, référencé MICROCALIX, peut être utilisé comme calorimètre différentiel.

La **Figure 9.2** montre un schéma du montage. Le générateur de rayons X (Enraf Nonius) à anode de cuivre émet un faisceau à la longueur d'onde d'émission du Cu K α ($\lambda=1,542 \text{ \AA}$). Il a été utilisé à une tension de 40 kV et une intensité de 10 mA à 20 mA selon les échantillons. Le faisceau incident est focalisé par un miroir multicouche (courbure elliptique en W/ Si, Osmic) et la collimation est réalisée par des systèmes de fentes placées avant l'échantillon.

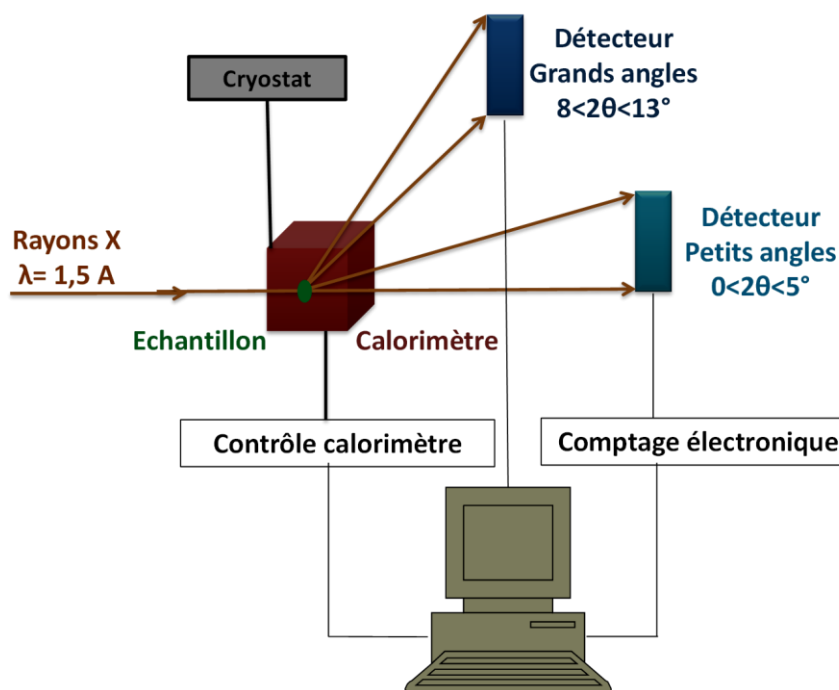


Figure 9.2 - Représentation schématique du montage de diffraction de rayons X du laboratoire.

La diffusion de l'échantillon aux petits (SAXS) et grands angles (WAXS) est mesurée simultanément par deux détecteurs linéaires placés horizontalement et de façon perpendiculaire à la direction du faisceau. Ce sont des compteurs proportionnels à gaz à localisation (1024 canaux de 0,0542 mm). La détection repose sur l'ionisation d'atomes de gaz (Argon) par effet photoélectrique et sur la localisation de l'avalanche électronique. Ces détecteurs ont une efficacité de 50%, un taux de comptage total maximum de 50 000 coups par seconde et une résolution spatiale voisine de 80 μm .

Pour l'analyse, la direction de propagation du faisceau de rayons X est fixe par rapport à l'échantillon et l'on mesure l'angle entre cette direction et celle du faisceau diffracté, égale à 2θ . Les angles de diffraction peuvent être exprimés en degré ou par le vecteur de diffusion q ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$ avec $d=2\pi/q$).

A une longueur d'onde donnée λ , les angles de diffraction du faisceau, par rapport au plan d'atomes ou de molécules, sont donc inversement proportionnels aux distances réticulaires d . Pour cette raison, les grandes distances longitudinales, par exemple les phases lamellaires des formes liquides-cristallines des lipides, sont observées à de petits angles tandis que les petites distances, par

exemple l'arrangement transversal des lipides au sein de chaque bicouche, seront détectées aux grands angles.

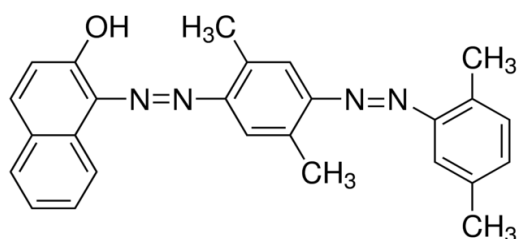
9.3. Echantillons et Méthodologie

Nous avons réalisé des mesures de diffraction de rayons X sur les mêmes échantillons que ceux analysés en DSC (cf **paragraphe 8.2**). Les échantillons ont été introduits dans des capillaires en verre possédant un diamètre externe de 1,5 mm et une épaisseur de 0,01 mm (Hilgenberg GmbH, Allemagne). L'acquisition donne l'intensité diffusée (en nombre total de coups) enregistrée sur chaque canal du détecteur. La conversion des numéros de canaux en vecteur de diffusion q ($\text{\AA}^{-1}$) est réalisée à l'aide de deux corps cristallins étalons : la tristéarine (SSS) cristallisée sous forme β et le b  n  ate d'argent (AgBe). La forme β de la trist  arine présente des réflexions correspondant aux distances caractéristiques suivantes : 3,7   , 3,85    et 4,59 à $\pm 0,01$    pour les grands angles et 44,95 à pour les petits angles (Ollivon et Perron, 1992). Le b  n  ate d'argent présente trois réflexions aux petits angles qui sont les trois ordres de sa structure smectique correspondant à la distance caractéristique 58,38 à (Huang et al, 1993). La mesure de l'intensité diffractée est reportée en fonction du vecteur de diffusion $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$. Les distances de répétition, d , caractéristiques des arrangements structuraux, sont données par la relation q ($\text{\AA}^{-1}$) = $2\pi/d$ (  ).

10. Spectrophotométrie d'absorption UV-Visible

L'ensemble des mesures a été réalisé sur le même spectrophotomètre UV-Visible double faisceau que celui utilisé pour les mesures de turbidité (Lambda 35, Perkin Elmer, France). Cette technique a permis de caractériser *in fine* l'incorporation du colorant Oil Red (OR), pris comme molécule hydrophobe modèle, dans les assemblages mixtes monooléine (MO)/ Polysorbate 80 (P80)/  CD-C10.

L'Oil Red (**Figure 10.1**) est un colorant hydrophobe, utilisé en biologie et en histologie pour révéler en microscopie optique les structures cellulaires ou tissus contenant des lipides. Au cours de la thèse, nous avons choisi de l'employer en tant que molécule modèle très peu soluble dans l'eau susceptible d'être incorporée dans les systèmes lyotropes de type cubosomes. Son spectre d'absorption UV-Visible est sensible aux changements de polarité du milieu dans lequel il se trouve (**Figure 10.2**) et présente deux bandes caractéristiques à 359 nm et à 518 nm.



Formule chimique	C₂₆H₂₄N₄O
Masse Molaire	408,49 g/mol
Solubilité dans le Chloroforme/ Méthanol (1 :1) Insoluble dans l'eau	1 mg/mL soit 2,4 mM

Figure 10.1- Structure chimique et caractéristiques de l'Oil Red.

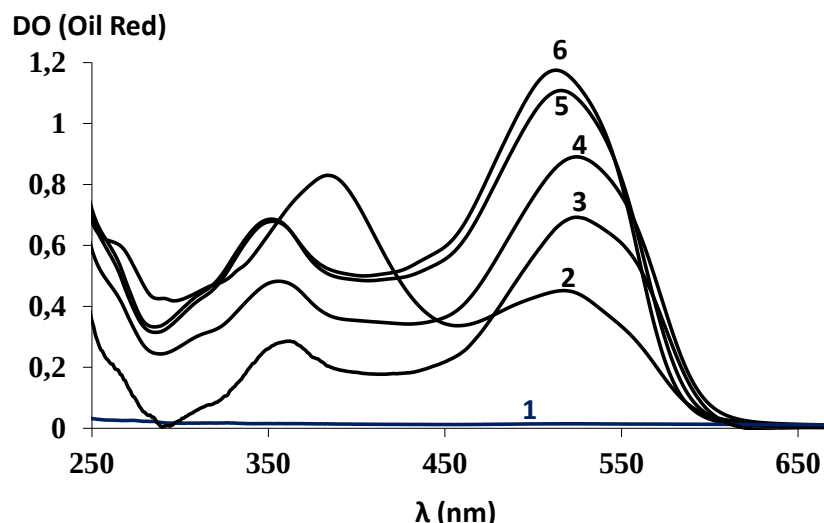


Figure 10.2 - Caractéristiques spectrales du colorant Oil Red (OR) dans différents milieux. 1 : Eau, 2 : Chloroforme, 3 : Cubosomes de Monooléine/P80/ β CD-C10 (67,6 : 3,47 : 2,8 : 1,37 mol%), 4 : Ethylène Glycol, 5 : Ethanol et 6 : Acétonitrile. La concentration en OR est de 0,04 mM dans les solvants et de $5,72 \cdot 10^{-4}$ M dans les cubosomes. Spectres réalisés dans le cadre de la thèse.

10.1. Caractérisation du colorant OR en milieu micellaire

Les échantillons et la référence sont placés dans des cuves en quartz de chemin optique 1 cm et munies d'un petit barreau aimanté pour assurer une agitation magnétique. Chaque solvant utilisé comme solvant de référence afin d'établir la ligne de base. Puis, on procède à la mesure des spectres d'absorbance des différents échantillons. Les mesures de densité optique sont réalisées à 25°C.

Plusieurs films du colorant OR de différentes quantités sont préparés. Ils sont ensuite hydratés par une solution micellaire de P80 à 0,12 mM (10 fois la cmc) pour obtenir des concentrations égales à $1 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$ et $6 \cdot 10^{-3}$ mM. L'hydratation des films est réalisée à l'aide d'un vortex et d'un bain à ultrasons. Les solutions et la référence sont placées dans des cuves en quartz de chemin optique 1 cm. On mesure tout d'abord le spectre d'absorbance d'une solution de P80 sans colorant qui sera utilisé comme référence. Puis, on procède à la mesure des spectres d'absorbance des différentes solutions de colorant. Les mesures de densité optique sont réalisées à 25°C entre 200 et 800 nm.

Chaque spectre d'absorbance obtenu pour les solutions d'OR a été soustrait du spectre des micelles de P80 référence pour déterminer le spectre d'absorbance de l'OR au sein des micelles en s'affranchissant de leur turbidité (**cf Figure 10.3**). Puis, la variation de la densité optique prise au maximum des deux bandes d'absorption caractéristiques du colorant ($\lambda_{\max}=358$ nm et 520 nm, respectivement) a été tracée en fonction de la concentration en OR ou du rapport [OR]/[P80].

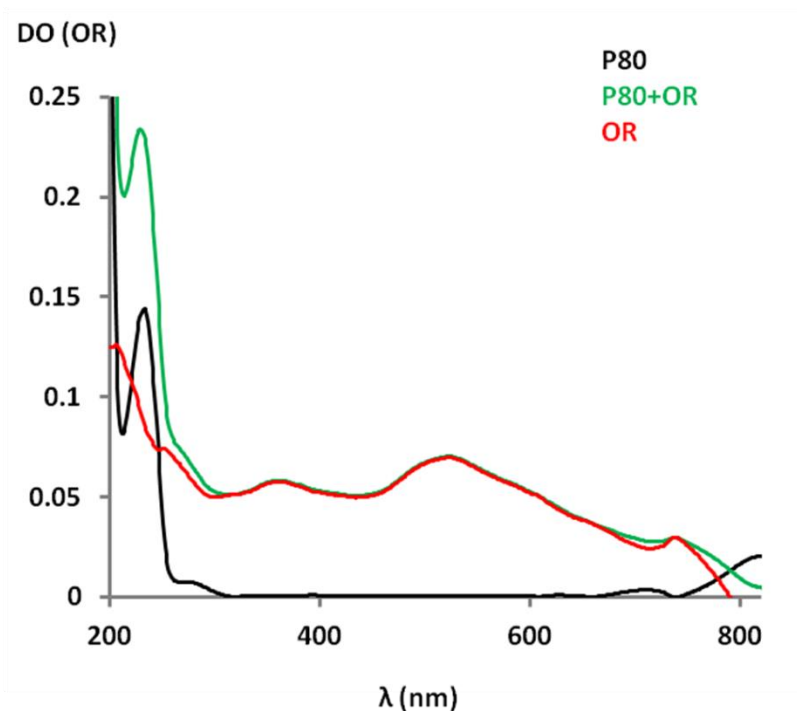


Figure 10.3 - Spectres d'absorbance des micelles de P80 à 0,12 mM avec (courbe verte) et sans (courbe noire) Oil Red (OR) à 6.10^{-3} mM et de l'OR après soustraction du spectre d'absorbance référence des micelles de P80 seules (courbe rouge).

A partir de l'ensemble de ces données, le coefficient d'extinction molaire de l'OR au sein d'une solution micellaire de P80 a été trouvé égal à $\epsilon=1,17.10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et la concentration en OR correspondant à **une valeur de DO de 0,5 a été évaluée à 0,04 mM** pour une concentration en P80 de 0,12 mM.

La seconde série de mesures a consisté à établir les spectres d'absorption UV-Visible du colorant OR à 0,04 mM dans différents solvants de polarités distinctes: heptane, chloroforme, acétonitrile, éthanol, éthylène glycol et eau, de façon à caractériser son solvatochromisme (**Figure 10.2**).

10.2. Etude des systèmes MO/P80/OR/ β CD-C10

Les assemblages MO/P80/OR en présence ou non de β CD-C10 dans l'eau MilliQ ont été obtenus selon la procédure décrite précédemment (**paragraphe 5.3.3**). Le **Tableau 10.1** présente les compositions des échantillons étudiés dans la suite de ce paragraphe et le **Tableau 10.2** présente les différents paramètres obtenus suite aux mesures par DQEL des échantillons étudiés par spectroscopie UV-Visible et observés par Cryo-MET. Les mesures de DQEL des échantillons sont réalisées à 25°C et sont présentées sur la **Figure 10.4**.

Tableau 10.1: Ratios molaires des différents composants constituant les échantillons analysés par spectrophotométrie UV-Visible. La concentration totale en constituants est de $3,04 \cdot 10^{-2}$ M.

MO (mol%)	P80 (mol%)	OR (mol%)
94,62	4,90	0,48
94,17	4,88	0,95
93,72	4,85	1,43
93,26	4,83	1,90

MO (mol%)	P80 (mol%)	β CD-C10 (mol%)	OR (mol%)
91,03	4,72	3,80	0,46
90,61	4,69	3,78	0,91
90,19	4,67	3,77	1,37
89,77	4,65	3,75	1,83

Tableau 10.2 : Diamètre hydrodynamique (Dh), intensité et largeur des différentes populations obtenus par DQEL. A) Echantillons analysés par spectroscopie UV-Visible et B) échantillons observés par Cryo-MET.

A)

- β CD-C10	D(h) nm	Intensité (%)	Largeur
MO/P80	130,4	51,1	21,82
	461,4	48,9	95,79
MO/P80/0,5 mol% OR	103,7	26,3	16,42
	320,3	73,7	72,47
MO/P80/1 mol% OR	146,69	57,6	25,85
	519,6	42,4	109,5
MO/P80/1,5 mol% OR	125,3	41,5	20,26
	381,8	58,5	79,47
MO/P80/2 mol% OR	153,5	43,1	31,54
	396,9	56,9	104,8

+ β CD-C10	D(h) nm	Intensité (%)	Largeur
MO/P80	117,8	31,7	20,01
	301,8	68,3	69,01
MO/P80/0,5 mol% OR	104,0	26,6	12,24
	334,5	73,4	62,55
MO/P80/1 mol% OR	115,6	35,8	17,11
	445,3	64,2	99,69
MO/P80/1,5 mol% OR	104,2	24,3	21,03
	307,3	75,7	76,27
MO/P80/2 mol% OR	115,7	31,7	15,36
	369,9	68,3	71,67

B)

Constituants	D(h) nm	Intensité (%)	Ecart-type
MO/ 5 mol% P80	110,0	32,1	16,20
	354,5	67,9	76,98
MO/ 5 mol % P80/βCD-C10	106,1	19,0	13,43
	309,5	81,0	74,21
MO/ 10 mol% P80	229,0	11,8	35,87
	1078,0	88,2	232,6
MO/ 10 mol % P80/βCD-C10	102,1	21,8	10,47
	444,7	78,2	83,20
MO/ 15 mol% P80	157,8	17,7	17,69
	955,8	82,3	183,8
MO/ 15 mol% P80/βCD-C10	909,4	100	169,3

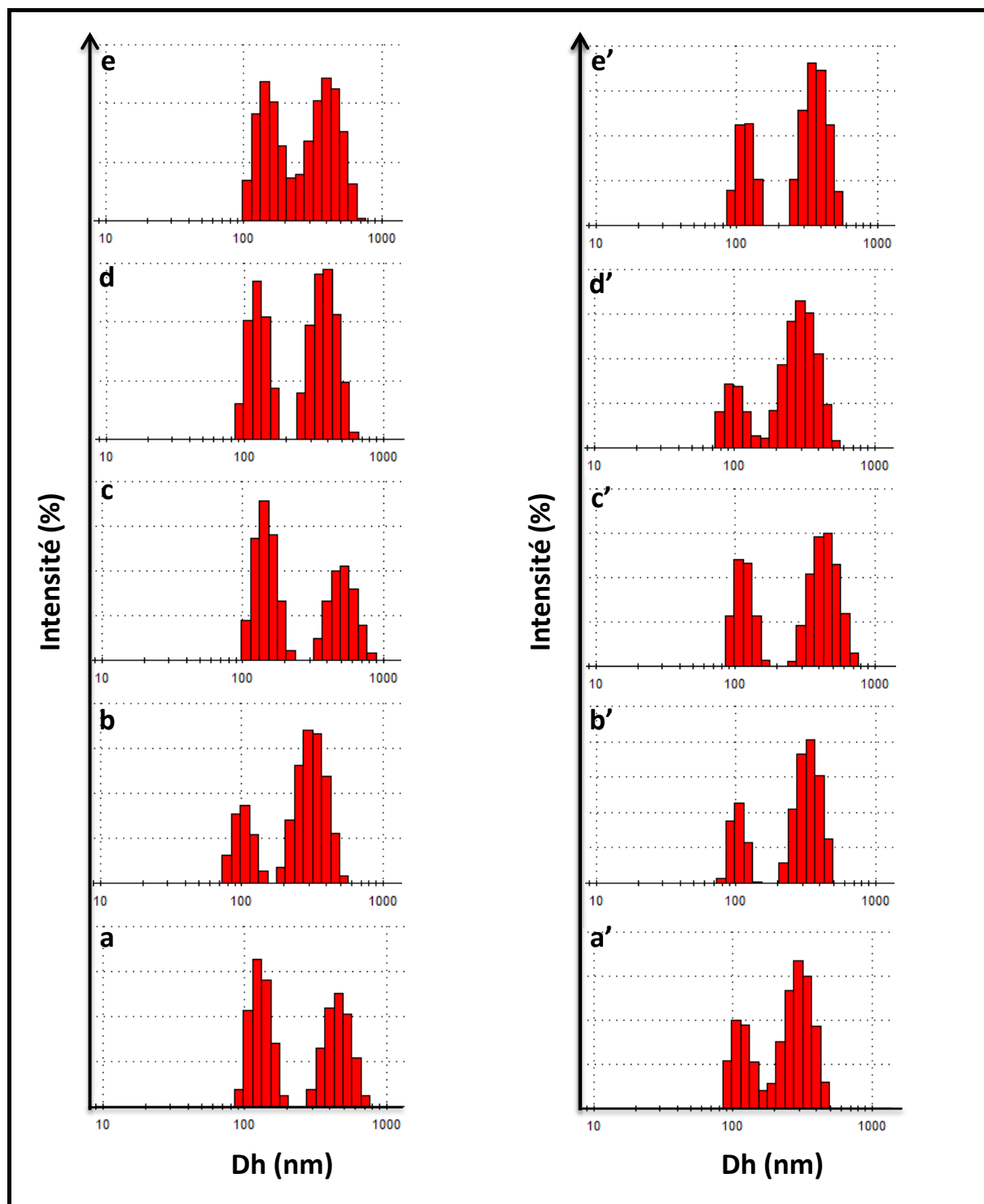


Figure 10.4 - Profils de DQEL des objets contenus dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C. a) MO/ 5 mol% P80 et a') MO/ 5 mol% P80/ β CD-C10, b) MO/ 10 mol% P80 et b') MO/ 10 mol% P80/ β CD-C10 et MO/ 15 mol% P80 et a') MO/ 15 mol% P80/ β CD-C10.

La **Figure 10.4** révèle la présence de deux populations d'agrégats de tailles nanométriques en absence ou en présence de cyclodextrines. On note sur la **Figure 10.5** que la présence de cyclodextrines dans la préparation des nano-agrégats à tendance à favoriser la formation de nanoparticules avec des diamètres hydrodynamiques inférieurs aux nanoparticules obtenues sans cyclodextrines. Ce phénomène est observable pour les deux populations.

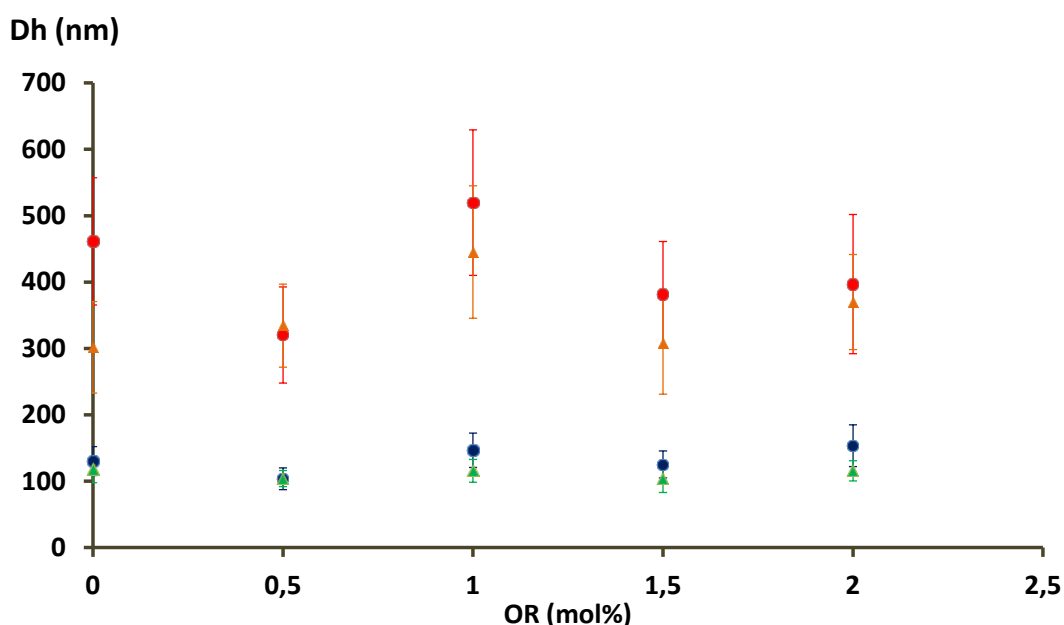


Figure 10.5 - Diamètres hydrodynamiques moyens (Dh) des nanoagrégats de MO/P80 à 5 mol% et de MO/P80 5 mol%/βCD-C10 mol% en présence de quantités croissantes d'OR (0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mol%). Les Dh des populations obtenus en absence de βCD-C10 sont représentés par des ronds (bleus : population 1 et rouges : population 2) et ceux des populations obtenus en présence de βCD-C10 par des triangles (verts : population 1 et oranges : population 2)

Traitement des spectres d'absorption UV-visible de l'OR dans les nanoagrégats.

Dans un premier temps, les échantillons MO/P80/OR, MO/P80/OR/βCD-C10 et la référence (eau MilliQ) sont placés dans des cuves en quartz de chemin optique 1 cm. Les spectres d'absorption sont enregistrés (**Figure 10.6**).

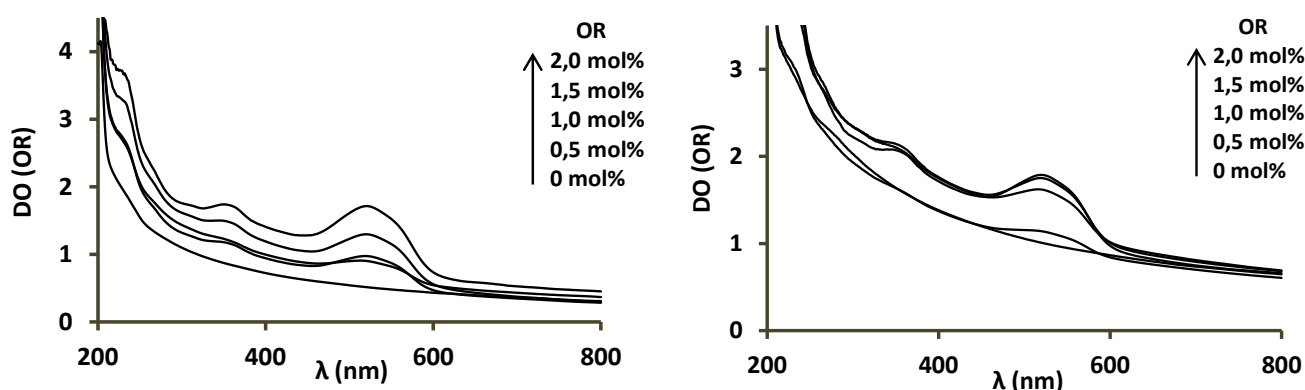


Figure 10.6 - Spectres UV-Visible de l'OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C. (à gauche) Spectres obtenus en absence de β CD-C10 et (à droite) spectres obtenus en présence de β CD-C10. Les quantités d'OR sont présentées sur les figures. L'ensemble des échantillons contiennent 95 mol% de MO et 5 mol% de P80. La quantité de β CD-C10 est de 4 mol%.

La présence d'OR non dissous dans les échantillons et les spectres de turbidité obtenus, nous a poussés à rechercher la quantité réellement extraite par les nanoagrégats. La quantité d'OR associée à chaque lot de cubosomes a donc été déterminée par dosage des échantillons solubilisé dans l'éthanol. L'étude est effectuée en deux étapes :

(1) Un volume de 100 μ L de chaque échantillon MO/P80/OR, MO/P80/OR/ β CD-C10 est déposé dans une cuve contenant 2 mL d'éthanol. L'éthanol est utilisé comme solvant de référence pour enregistrer la ligne de base. Puis, on procède à la mesure des spectres d'absorbance des différents échantillons (**Figure 10.7**).

(2) Ensuite, la gamme étalon de référence a été établie à partir de solutions témoins de colorant dans l'éthanol à différentes concentrations : $4 \cdot 10^{-6}$ M, $7 \cdot 10^{-6}$ M, $0,5 \cdot 10^{-5}$ M, $1,5 \cdot 10^{-5}$ M, $3 \cdot 10^{-5}$ M, $4,5 \cdot 10^{-5}$ M et $6 \cdot 10^{-5}$ M. L'éthanol est utilisé comme solvant de référence pour enregistrer la ligne de base. Puis, on procède à la mesure des spectres d'absorbance des différents échantillons (**Figure 10.8**).

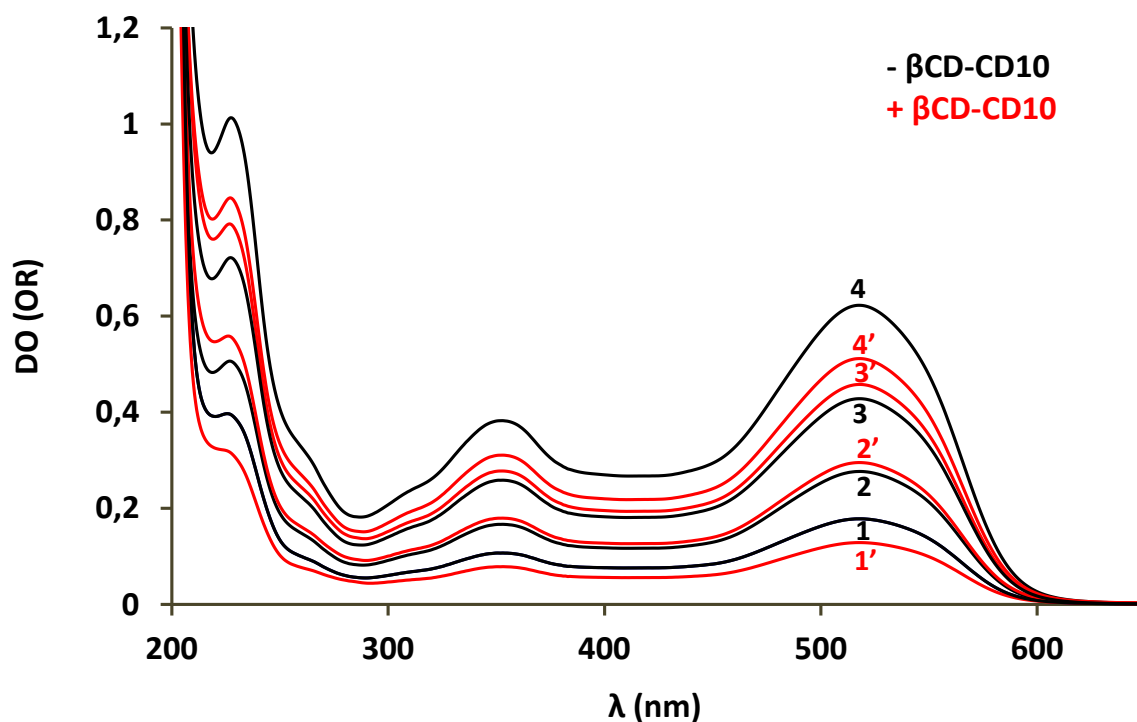


Figure 10.7 - Spectres UV-Visible de l'OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible à 25°C. Les quantités d'OR initialement introduites sont de : 0,5 mol% (1 et 1') ; 1 mol% (2 et 2') ; 1,5 mol% (3 et 3') et 2 mol% (4 et 4'). Les échantillons contiennent : MO/ 5 mol% P80 (courbes noires) et MO/P80/βCD-C10 (courbes rouges).

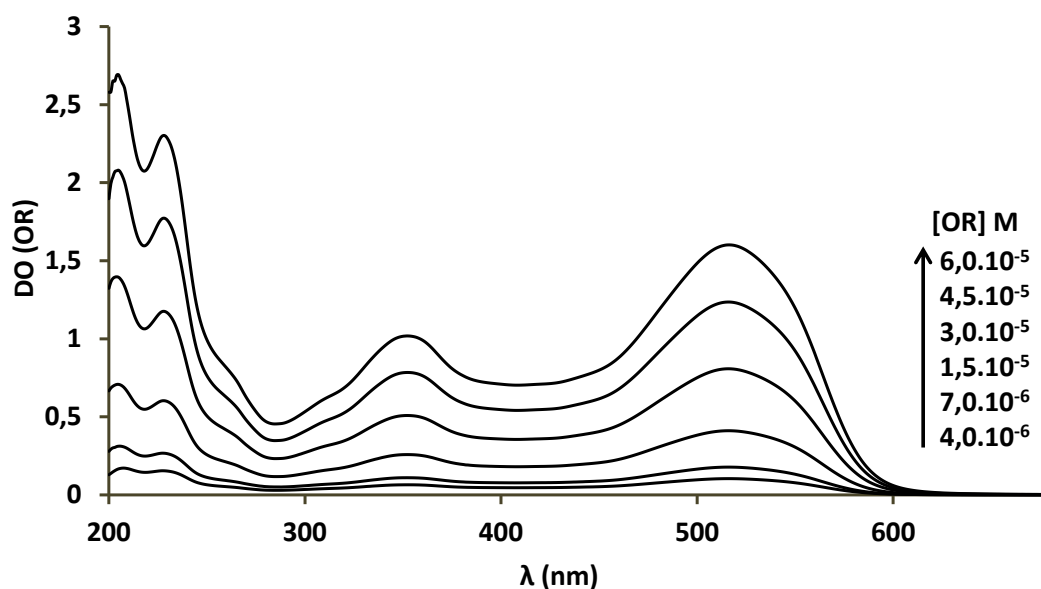


Figure 10.8 - Spectres UV-Visible de l'Oil Red (OR) à différentes concentrations dans de l'éthanol à 25°C.

Cette étape permet de doser la quantité d'OR effectivement associée aux nanoagrégats par l'établissement de la courbe étalon correspondante. La densité optique pour le pic maximum d'absorption de l'OR à 516 nm est relevée. Le coefficient d'extinction molaire de l'OR dans l'éthanol a été déterminé égal à $\epsilon=26994 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Figure 10.9).

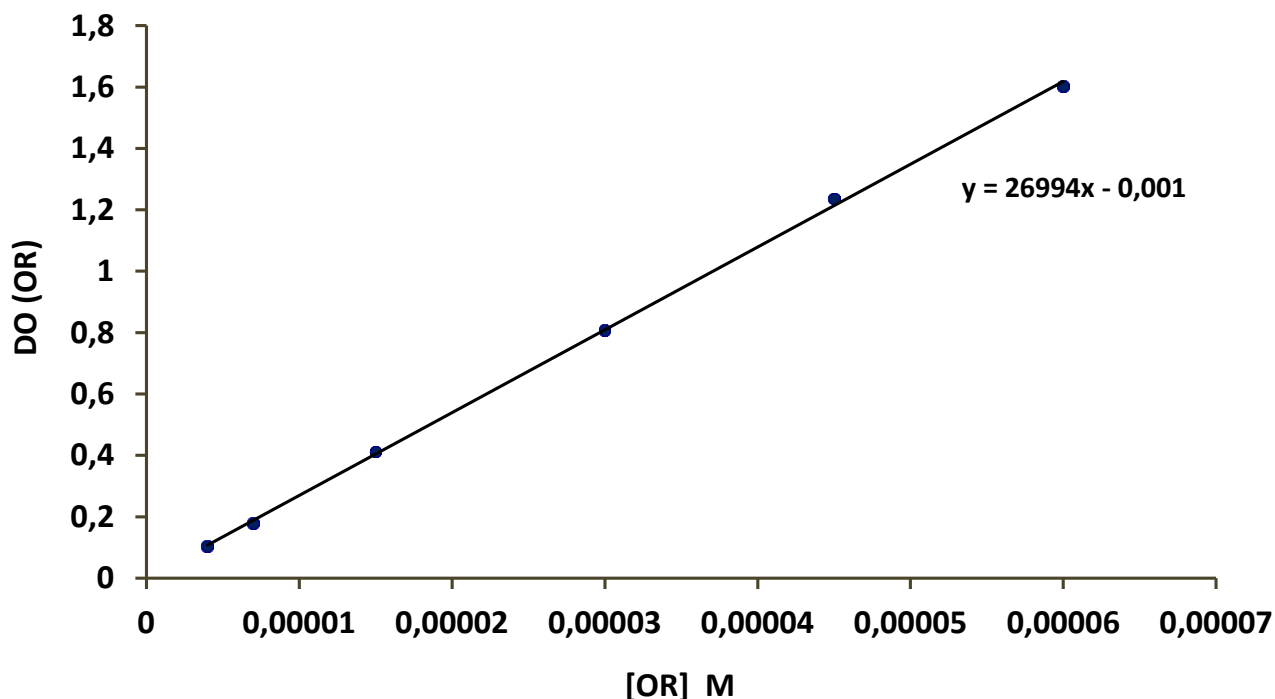


Figure 10.9 - Courbe étalon de l'OR dans l'éthanol. Les densités optiques sont celles relevées à 516 nm.

La concentration en OR extraite par les nanoagrégats dans les échantillons initiaux est présentée dans le **tableau 10.3**.

Tableau 10.3 : Concentrations en OR extraite par les nanoagrégats et concentrations initiales totales en OR dans les échantillons analysés par spectroscopie UV-Visible.

[OR]nanoagrégats (M)		[OR] initiales totales (M)
-βCD-C10	+βCD-C10	
$1,39.10^{-5}$	$1,0. 10^{-5}$	$1,41. 10^{-4}$
$2,15.10^{-5}$	$2,3. 10^{-5}$	$2,83. 10^{-4}$
$3,33.10^{-5}$	$3,56. 10^{-5}$	$4,26. 10^{-4}$
$4,84.10^{-5}$	$3,98. 10^{-5}$	$5,72. 10^{-4}$

La composition molaire réelle et la composition molaire théorique en OR ont été calculées et sont présentées dans le **Tableau 10.4**. La **Figure 10.10** est la représentation graphique de la composition molaire réelle en fonction de la composition molaire théorique en OR pour chaque condition expérimentale.

Tableau 10.4 : Compositions molaires réelles et théoriques de l'OR dans les échantillons MO/ 5 mol% P80 et MO/ 5 mol% 80/ 4 mol% β CD-C10.

Compositions molaires réelles (%)		Compositions molaires théoriques (%)	
$-\beta$ CD-C10	$+\beta$ CD-C10	$-\beta$ CD-C10	$+\beta$ CD-C10
0,47	0,33	0,48	0,46
0,73	0,76	0,95	0,91
1,13	1,17	1,43	1,37
1,64	1,30	1,90	1,83

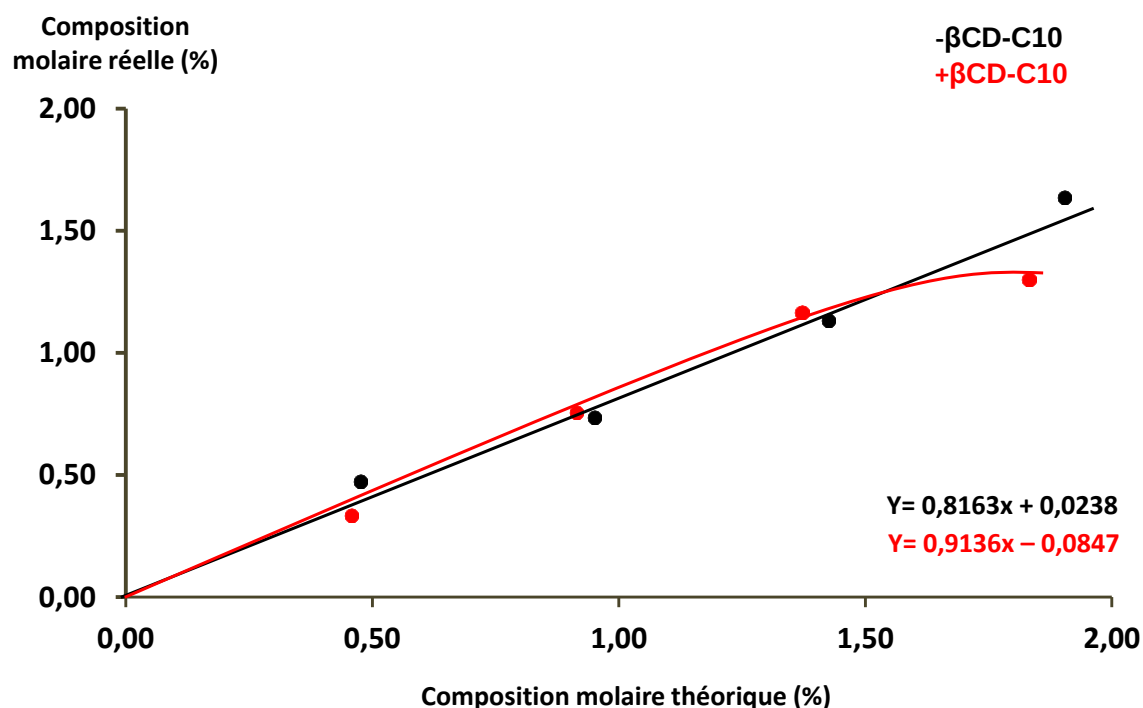


Figure 10.10 - Représentation de la composition molaire réelle en OR dans les échantillons en fonction de la composition molaire théorique en OR. Les échantillons MO/P80 et MO/P80/ β CD-C10 contiennent 5 mol% de P80 et 4 mol% de β CD-C10. La régression linéaire correspondant aux échantillons contenant la cyclodextrine amphiphile a été effectuée sur les 3 premières valeurs. La courbe rouge est une courbe de tendance englobant tous les points.

On note sur la **Figure 10.10** que jusqu'à une composition molaire de 1,50% en OR dans les échantillons, l'efficacité d'encapsulation de l'OR par les nanoagrégats de MO/P80/ β CD-C10 est de 91% alors que celle des nanoagrégats de MO/P80 est de 81%. Ainsi, la présence de cyclodextrines dans les nanoagrégats favoriserait l'encapsulation du colorant.

Sur la **Figure 10.6**, on remarque clairement que les nanoagrégats présentent une turbidité non négligeable devant l'absorbance de l'OR qu'ils contiennent. De manière à soustraire la contribution provenant de la turbidité des objets présents dans les échantillons MO/P80 et MO/P80/ β CD-10 à

différentes quantités d'OR, sur chaque spectre on se place sur une région qui ne recouvre pas les bandes d'absorption du colorant. Ainsi, l'OR dans l'éthanol ne présente pas d'absorption entre 600 et 800 (cf **Figure 10.2**). La **Figure 10.11** montre la zone sélectionnée sur chacun des spectres.

A partir de cette région spectrale qui ne correspond qu'à la turbidité liée aux agrégats, une courbe théorique est établie par fit numérique à l'aide d'une fonction puissance. La **Figure 10.12** illustre le résultat du fit et la **Figure 10.13** montre la courbe recalculée qui se superpose parfaitement à la courbe expérimentale dans la région sélectionnée et jusqu'à une longueur d'onde de 400 nm dans le cas de agrégats sans OR, sans cyclodextrines et jusqu'à 500 nm dans le cas des agrégats sans OR en contenant, démontrant la validité du fit dans la zone d'absorbance du colorant.

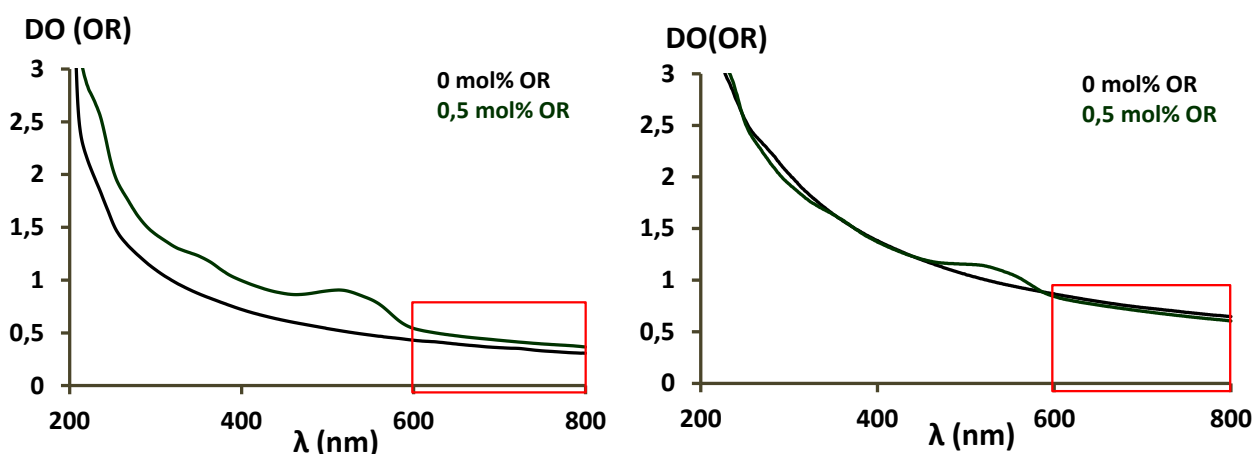


Figure 10.11 - (à gauche) Spectre d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et (à droite) spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/βCD-C10 et MO/5 mol% P80/βCD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol%.

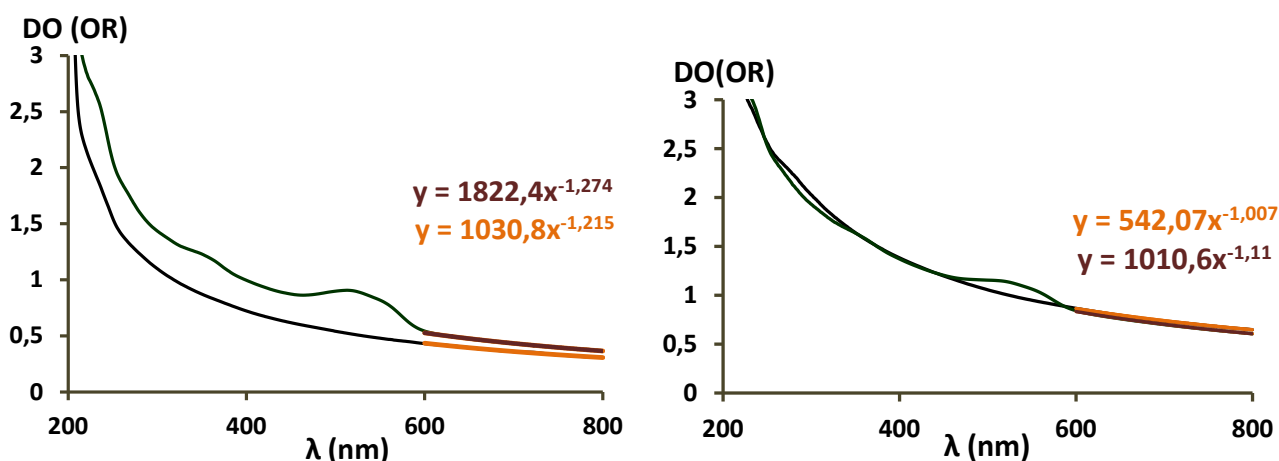


Figure 10.12 - (à gauche) Spectre d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et (à droite) spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/βCD-C10 et MO/5 mol% P80/βCD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol%. Les équations des fits réalisés dans la zone 600-800 nm sélectionnée sont indiquées sur les graphiques.

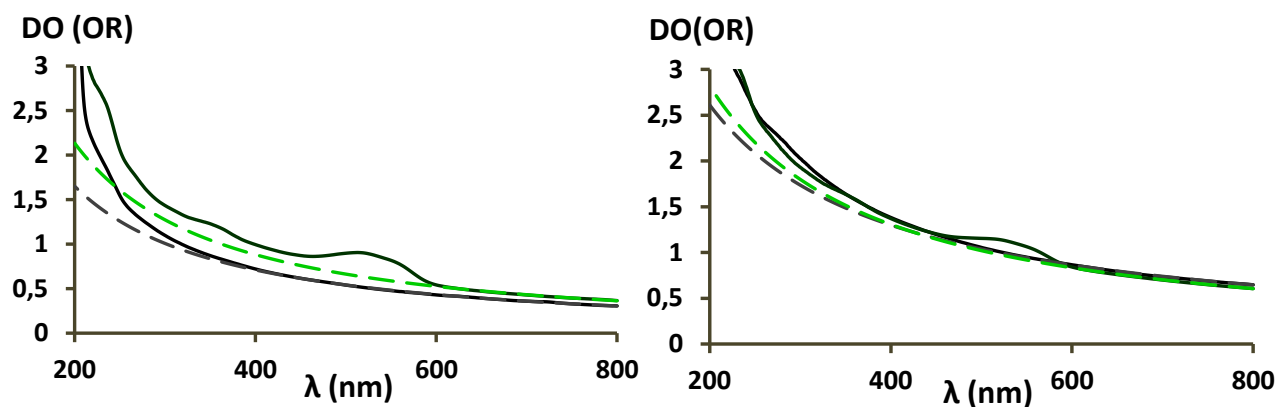


Figure 10.13 - (à gauche) Spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et (à droite) spectres d'absorbance des échantillons MO/5 mol% P80/βCD-C10 et MO/5 mol% P80/βCD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol%. Les courbes en pointillé représentent les fits des courbes mesurées (gris : en absence d'OR et vert : en présence d'OR).

Ce spectre de turbidité calculé est finalement soustrait du spectre expérimental afin de révéler le spectre d'absorption du colorant au sein de l'assemblage (**Figure 10.14**). Ce traitement mathématique est réalisé pour chaque condition expérimentale.

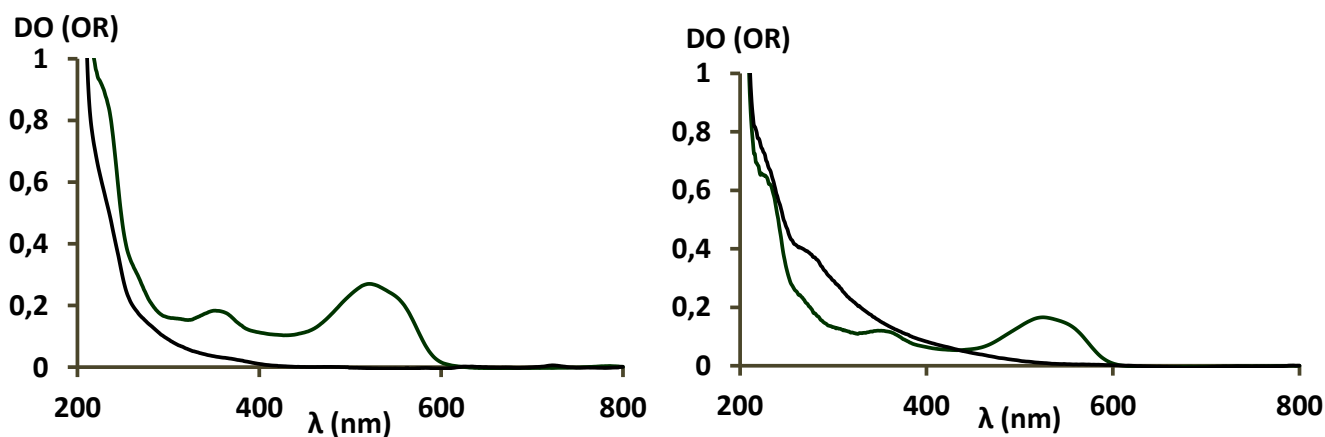


Figure 10.14 - (à gauche) Spectres d'absorbance corrigés des échantillons MO/5 mol% P80 et MO/5 mol% P80 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol% et (à droite) spectres d'absorbance corrigés des échantillons MO/5 mol% P80/βCD-C10 et MO/5 mol% P80/βCD-C10 contenant de l'Oil Red à 0,5 mol%.

Sur chaque spectre corrigé, la DO de l'OR est relevée au maximum d'absorption situé à 524 nm afin de construire la représentation de la **Figure 10.15**.

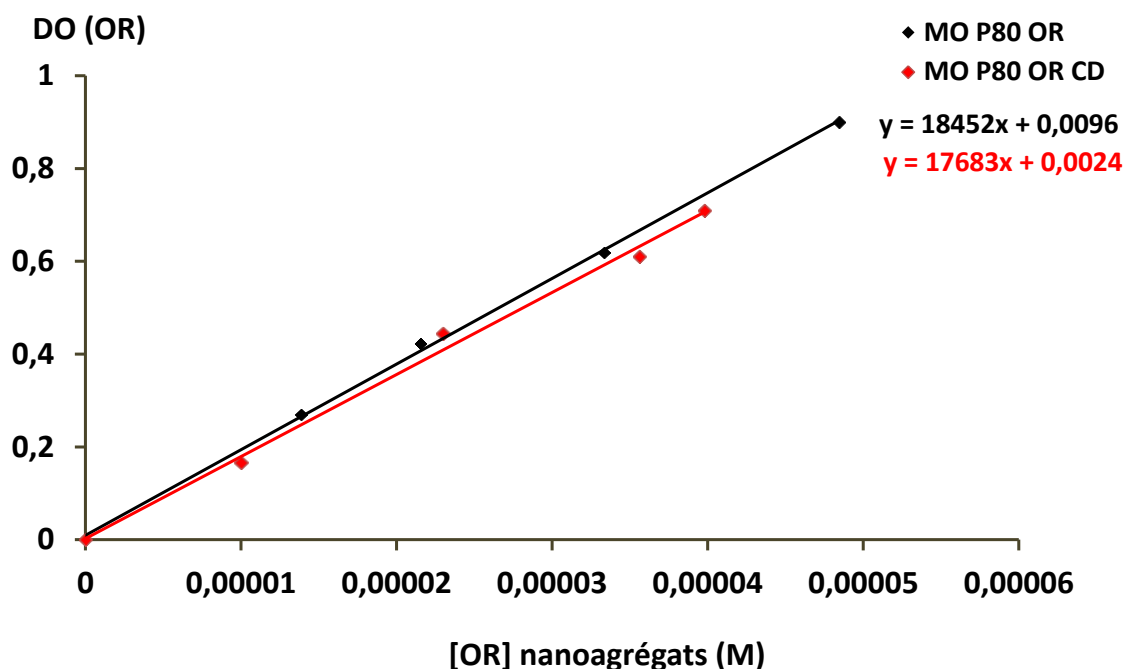


Figure 10.15 - Densités optiques de l'OR au maximum d'absorption relevé à 524 nm sur les spectres corrigés en fonction de la concentration en OR réellement extraite dans les nanoagrégats. Les régressions linéaires permettent d'évaluer le coefficient d'extinction molaire du colorant au sein des agrégats, en présence ou non de cyclodextrine.

La **Figure 10.15** a permis de déterminer le coefficient d'extinction molaire du colorant (pentes des droites) au sein des nanoagrégats, en présence ou non de cyclodextrines. On note que les valeurs de ces coefficients sont proches. Ceci signifie que l'OR est localisé préférentiellement au sein de la bicouche lipidique formée par la Monooléine.

Références Bibliographiques

Andelman D., Kozlov M.M., and Helfrich W., Phases transitions between vesicles and micelles driven by competing curvatures. *Europhys. Lett.* 25, **1994**, 231.

Dey D., Saha J., Roy A.D., Bhattacharjee D., Hussain S.A., Development of an ion-sensor using fluorescence resonance energy transfer. *Sensors and Actuators B.* 195, **2014**, 382-388.

Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P., Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys.* 21, **1988**, 129-228.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *Eur. Pat. Appl.*, 0274961 A1, **1988**.

Greenspan P. and Fowler D.S., Spectrofluorometric studies of the lipid probe Nile red. *Journal of lipid Research.* 26, **1985**, 781-789.

Hazra P., Chakrabarty D., Chakraborty A., Sarkar N., Intramolecular charge transfer and solvation dynamics of Nile Red in the nanocavity of cyclodextrins. *Chemical Physics Letters.* 388, **2004**, 150-157.

Huang T.C., Toraya H., Blanton T.N., and Wu Y., X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *J. Appl. Cryst.*, 26, **1993**, 180-184.

Jana B., Ghosh S., Chattopadhyay N., Competitive binding of Nile red between lipids and β -cyclodextrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 126, **2013**, 1-10.

Lemos-Senna E., Wouessidjewe D., Duchêne D., Lesieur S., Amphiphilic cyclodextrin nanospheres: particle solubilization and reconstitution by the action of a non-ionic detergent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 10, 5, **1998**, 291-301.

Lichtenberg D. and Barenholz J., Methods Biochemical Analysis. Wiley, 33, **1998**, 337-462.

Lichtenberg D., Characterisation of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 821, **1985**, 470-478.

Keyhani E., Khavari-Nejad S., Keyhani J., Farnoosh Attar F., Acriflavine-mediated apoptosis and necrosis in yeast *Candida utilis*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1171, **2009**, 284-291.

Kucherak A.O., Oncul S., Darwich Z., Yushchenko D.A., Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* 132, **2010**, 4907-4916.

Ménager C., Guemghar D., Cabuil V., and Lesieur S., Interaction of n-Octyl β ,D-Glucopyranoside with giant magnetic-fluid-loaded phosphatidylcholine vesicles: direct visualization of membrane curvature fluctuations as a function of surfactant partitioning between water and lipid bilayer. *Langmuir*. 26 (19), **2010**, 15453-15463.

Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y., Nile Red Nucleoside: Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA. *J. Org. Chem.*, 71, **2006**, 3592-3598.

Ollivon M., Eidelman O., Blumenthal R., Walter A., Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry*, 27, **1988**, 1695-1703.

Ollivon M. and Perron R., Propriétés physiques des corps gras. In Manuel des corps gras. Karleskind A., Wolff J.P., Guttman J.F., editors. Lavoisier éditions: Paris. 1. **1992**, 433-442.

Ollivon M., Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre M., Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*.1508, (1-2), **2000**, 34-50.

Paternostre M., Meyer O., Grabielle-Madelmont C., Lesieur S., Ghanam M. and Ollivon M., Partition coefficient of a surfactant between aggregates and solution: application to the micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl-D-glucopyranoside. *Biophys. J.*, 69, **1995**, 2476-2488.

Rakshit S. and Vasudevan S., Resonance Energy Transfer from β -Cyclodextrin-capped ZnO:MgO nanocrystals to included Nile Red guest molecules in aqueous media. *American Chemical Society* 2, **2008**, 1473-1479.

Sahare P.D., Sharma V.K., Mohan D., Rupasov A.A., Energy transfer studies in binary dye solution mixtures: Acriflavine + Rhodamine 6G and Acriflavine + Rhodamine B. *Spectrochimica Acta Part A*. 69, **2008**, 1257-1264.

Seras M., Ollivon M., Edwards K., Lesieur S., Reconstitution of non-ionic monoalkyl amphiphile-cholesterol vesicles by dilution of lipids-octylglucoside mixed micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*. 66, **1993**, 93-109.

Wagner B.D., Stojanovic N., Leclair G., Jankowski C.K., A spectroscopic and molecular modelling study of the nature of the association complexes of Nile Red with cyclodextrines. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 45, **2003**, 275-283.

Ueno M., Partition behavior of non-ionic detergent octyl glucoside, between membrane and water phases, and its effect on membrane permeability. *Biochemistry*, 28, **1989**, 5631-5634.

PARTIE 3: RÉSULTATS

PUBLICATIONS

- **Publication n° 1 :**

Etudes des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées et de tensioactifs.

- **Publication n°2 :**

Etudes des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées, de monooléine et de polysorbate 80.

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées et de tensioactifs

Les cyclodextrines amphiphiles issues de l'estérification de leurs groupes hydroxyles par des acides gras à longue chaîne hydrocarbonée ont été principalement développées pour produire des entités agissant comme de super-réservoirs moléculaires de substances hydrophobes cumulant la possibilité de former des complexes d'inclusion au sein de la cavité oligosaccharidique et la capacité des résidus hydrocarbonés à solubiliser des composés lipophiles. Du point de vue de la chimie supramoléculaire, de tels dérivés représentent également des briques élémentaires qui, grâce à leur caractère amphiphile, sont potentiellement capables de s'auto-assembler ou de s'assembler avec d'autres amphiphiles pour constituer de nouveaux édifices de dimensions colloïdales, permettant de concentrer en une seule particule un grand nombre de réservoirs unitaires.

Dans le cas précis du dérivé bio-estérifié β CD-C10, objet de la thèse, porteur de chaînes hydrocarbonées à 10 atomes de carbone positionnées uniquement sur la face secondaire de la β -cyclodextrine avec un degré de substitution moyen de 7,3 chaînes par molécule, nous avons réalisé une première étude portant sur son association avec des tensioactifs non-ioniques dotés de la propriété de détergence. Ainsi, l'objectif était initialement d'évaluer le pouvoir solubilisant de ces lipides solubles vis-à-vis de la cyclodextrine amphiphile et d'évaluer la faisabilité de préparer des micelles mixtes tensioactif/ β CD-C10. Notre intérêt étant essentiellement tourné vers la mise au point de systèmes vecteurs de molécules thérapeutiques, deux tensioactifs admis par la pharmacopée, le polysorbate P80 et le Brij 98, avantageusement PEGylés, ainsi qu'un tensioactif dérivé de sucre, le n-dodécyl- β -D-maltoside, démontré efficace pour solubiliser les membranes biologiques mais non dénaturant vis-à-vis des protéines membranaires, ont été choisis.

Le challenge était à la fois de trouver des conditions de solubilisation de la cyclodextrine amphiphile au sein des assemblages micellaires des trois tensioactifs et d'examiner les qualités de réservoir des édifices mixtes pour des tierces substances hôtes à même de s'insérer sélectivement au sein de la cavité de la β CD-C10 et/ou au niveau de ses chaînes hydrocarbonées ou encore pouvant être co-solubiliser de façon non spécifique par la matrice mixte tensioactif/cyclodextrine. Pour ce faire, nous avons utilisé comme marqueur modèle de localisation une molécule fluorescente sensible à la polarité de son environnement, le rouge de Nile. Des expériences de spectrophotométrie de fluorescence ont été menées, notamment utilisant la technique de transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET) avec l'acriflavine utilisée ici comme donneur hydrophile.

Afin d'établir les conditions de solubilisation de la cyclodextrine amphiphile par chacun des trois tensioactifs, des mesures de turbidité en continu ont été mises en place. Cette méthodologie permet en effet de rendre compte de l'évolution structurale des assemblages plurimoléculaires

en fonction de leur composition. Nous avons procédé en partant de nanodispersions de cyclodextrine amphiphile, compatibles avec une réponse exploitable en turbidité, et avons déterminé la loi de partage des tensioactifs entre la phase aqueuse et la phase constituée par les agrégats. Parallèlement le diagramme d'état du système tensioactif/cyclodextrine en large excès d'eau a pu être établi.

La troisième approche a consisté à rendre compte de la dimension et de la nature des assemblages mixtes formés, soit par mesure de diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) soit par microscopie électronique par cryo-transmission, les systèmes étant cette fois obtenus par hydratation de films mixtes et donc obtenus spontanément.

**Article en préparation pour soumission à
*Physical Chemistry Chemical Physics***

Multicompartment PEGylated Vehicles Involving Amphiphilic Biotransesterified Cyclodextrins: A Transition from Micelles to Supramolecular Deep Cavitand Assemblies

Leïla Zerkoune¹, Sylviane Lesieur¹, Jean-Luc Putaux², Luc Choisnard³, Annabelle Gèze³, Denis Wouessidjewe³, Valérie Nicolas⁴, Angelina Angelova^{1,*}

¹CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, Labex LERMIT, Univ Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France;

²CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, 38041 Grenoble, France;

³DPM, CNRS UMR 5063, ICMG FR 2607, UFR of Pharmacy, University of Grenoble, 38041 Grenoble, France;

⁴MIPSIT, UMS-IPSIT Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique, Univ Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France.

**Corresponding Author:* Angelina.Angelova@u-psud.fr

Abstract

Biotransesterified amphiphilic cyclodextrins (CDs) with multiple anchored alkyl chains are vase-like molecules, in which a nanocavity is bound to a large open hydrophobic volume that generate a deep cavitand for inclusion of water-insoluble bulky moieties and drugs. The present physico-chemical study demonstrates that the continuing incorporation of a deep-cavitand cyclodextrin amphiphile in nanostructured environment of PEGylated surfactant micelles triggers a transformation of the latter into multicompartiment vesicle-derived particles. The latter may serve as reservoirs for upload of hydrophobic guest molecules. The investigated here systems included the amphiphilic cyclodextrin compound β -CD- n C₁₀ (obtained through enzymatic biotransesterification of the β -CD secondary face by decanoyl (C₁₀) chains and degree of substitution $n=7.3$), the PEGylated surfactants Brij®98 and polysorbate 80, the sugar-based n -dodecyl- β -D-maltoside amphiphile, and Nile red (NR) as a solvatochromic marker of the microenvironmental polarity. Fluorescence spectroscopy and microscopy, Förster resonance energy transfer (FRET) technique, quasi-elastic light scattering (QELS), and cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) imaging were employed to investigate the formation of PEGylated supramolecular nanoassemblies of β -CD- n C₁₀ through multicomponent mixing, self-assembly, and host-guest interactions. Solubilization state diagrams of amphiphilic cyclodextrin nanospheres by surfactant (DDM, Brij®98 or P80) micelles established the concentration regions of formation and boundaries for coexistence of mixed vesicular and tubular membranes or mixed types of nanoaggregates, which differ from the initial large β -CD- n C₁₀ nanospheres and small detergent micelles. The presence of a hydrophilic shell of PEGylated moieties favoured the multimaterial nanoparticle stability. The obtained results on induction of multicompartiment nanocarriers by amphiphilic cyclodextrins, using the thin film hydration method, indicate new possibilities for nanoencapsulation and delivery of hydrophobic drugs, which cannot be simply solubilized by common surfactant or lipid systems.

Key words: amphiphilic biotransesterified cyclodextrins, self-assembly, multicompartiment nanoparticles, morphological transition, fluorescence spectra, cryo-TEM

Introduction

Cyclodextrin-based amphiphilic structures exist with different topologies and may form a variety of supramolecular aggregates upon self-assembly in aqueous medium.¹⁻¹⁴ Some of them show a remarkable similarity with lipid-based self-assembled nanostructures.¹⁵⁻³⁰ Functionalized cyclodextrin (CD) assemblies offer diverse applications in drug delivery, photothermal therapy, nanomaterials synthesis, microreactors, nanoporous scaffolds, hierarchical and hybrid nanoarchitectonic devices, *etc.*³¹⁻⁵¹ The nanocavity of the cyclodextrin macrocycle permits host-guest inclusion complexation with hydrophobic moieties and drugs, which may generate novel kinds of supra-amphiphiles.⁵²⁻⁵⁷ Supra-amphiphiles are building blocks for self-assembly at different levels of complexity and can be created either on the basis of noncovalent interactions or by dynamic covalent bonds.⁵⁵

Complexes of substituted or native cyclodextrins with surfactant-type molecules, yielding noncovalent supra-amphiphiles, have enabled the formation of vesicular and tubular aggregates as well as bilayer membranes with a channel-type crystalline structure.⁵⁸ Hydrophobic tails of low-molecular-weight surfactants have been included in the cyclodextrin cavities in 1:1 or 2:1 stoichiometries.^{59,60} Supramolecular amphiphiles with double hydrophobic chains have easily self-assembled into vesicles as well.⁵² Stimuli-responsive vesicles have been obtained upon host-guest inclusion complexation between cyclodextrin and functionalized (*e.g.* azobenzene, ferrocenyl, amino-anthracene) surfactants as well as through the help of enzymes.⁶¹⁻⁶⁴ An important advantage of this kind of membrane-type nanoarchitectures is that they may interact more easily with cellular barriers and deliver drugs more efficiently to living cells as compared to nanocrystals obtained by solvent precipitation.^{44,65-70}

Amphiphilic cyclodextrins, representing deep-cavitand and vase-like molecules, have been produced by chemical or enzymatic modifications of the macrocyclic faces.^{3,6,7,31,43,48,49,69-78} A few derivatives, for instance the polysubstituted amphiphilic hydroxyethylated cyclodextrins, may spontaneously assemble into bilayer vesicles in aqueous solution.⁷⁵⁻⁷⁷ Biotransesterified amphiphilic cyclodextrin derivatives have displayed very low aqueous solubility owing to the multiple grafted alkyl chains.⁶⁻⁸ Despite of their interesting properties as building blocks of novel supramolecular architectures, these substances are rather difficult to solubilize from a synthetic powder state into mixed amphiphilic systems. Under these conditions, phase separation readily occurs. Fortunately, adaptive soft nanotechnology enables new ways for fabrication of sophisticated self-assembled nanoarchitectures with functional properties.^{15,79} For instance, it may be expected that solubilization of the vase-like cyclodextrin compounds into micelles of single-chain surfactants may generate supra-amphiphiles by host-guest interactions, and hence, self-assembly of smart structures for upload of active compounds. Nanoparticles consisting of polysubstituted γ -cyclodextrins and surfactant components have been obtained by multilevel self-assembly.⁴⁵ Mixing of water-insoluble deep-cavitand molecules with surfactant micelles may yield various liquid crystalline phases, scaffolds, and nano-objects, the generation of which will depend on the critical aggregation concentrations of the multicomponent amphiphilic systems.⁸⁰

Towards improvement of the stability of the nanocarrier assemblies and preparation of injectable nanoparticles with Stealth properties, PEGylation presents considerable interest.^{8,9} Whereas the chemical synthesis of PEGylated amphiphilic cyclodextrins and deep cavitands might be hampered by a low yield and requires considerable investment, the inclusion complexation^{8,31,33,47,52,55-57} and the interfacial engineering approaches⁸¹⁻⁹² represent quite versatile strategies. Conceptually, PEGylated supramolecular amphiphiles may be created by inclusion complexation of cyclodextrin-based deep cavitands possessing multiple grafted hydrophobic chains and single-chain PEGylated surfactants. Moreover, functional PEGylated deep-cavitand assemblies can be prepared with mixed amphiphilic systems incorporating hydrophobic active molecules in either the nonpolar micellar core or in the hydrophobic bilayer compartments of eventually formed supramolecular vesicles.

Here we report supramolecular self-assembly evidencing the role of the cyclodextrin deep-cavitand β -CD- n C₁₀ (presenting enzymatic-anchored decanoyl chains on the secondary face of β -CD) in the formation of amphiphilic scaffolds and nano-objects as reservoirs of hydrophobic guest molecules. Our results reveal that amphiphilic cyclodextrin deep cavitands (comprising a large open hydrophobic volume adjacent to a β -CD nanocavity), when embedded in surfactant micelles, drive a structural transformation of the PEGylated surfactant aggregates into supramolecular vesicles or into multicompartment nanocarriers. Various morphological transitions are triggered depending on the solubilization capacity of the studied surfactant micelles for the β -CD- n C₁₀ macromolecules. The chemical structures of the investigated amphiphilic and model hydrophobic guest molecules are shown in **Figure 1**.

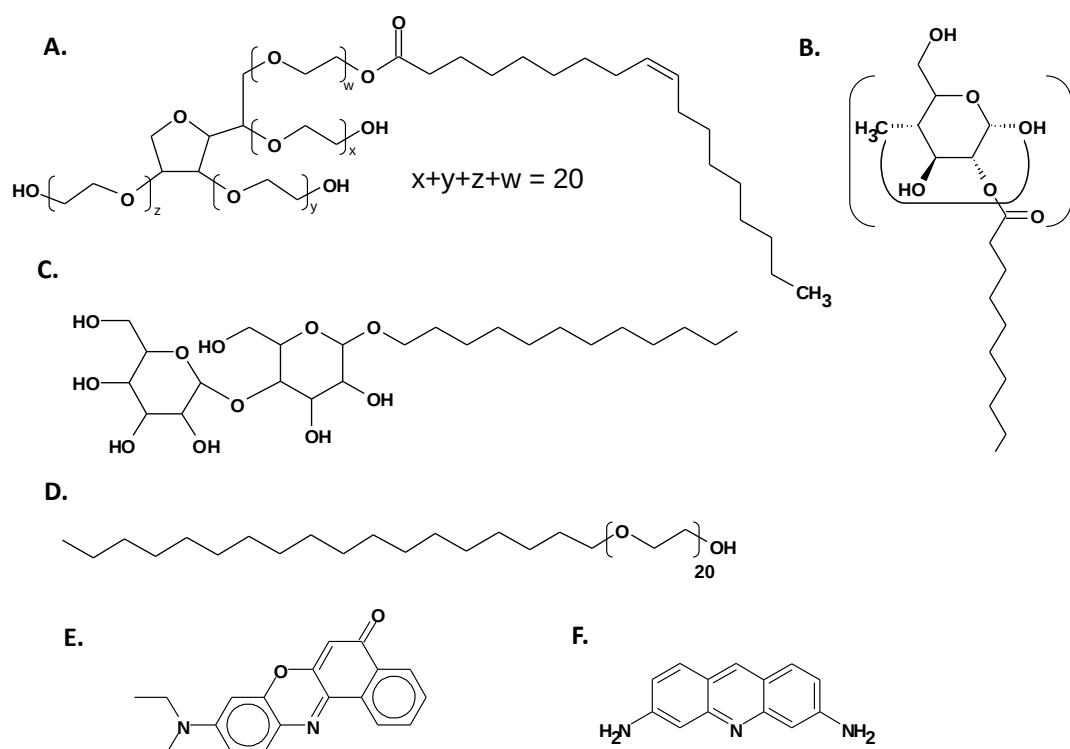


Figure 1. Chemical structures of the studied amphiphilic building blocks and fluorescent molecules. (A) Polysorbate 80 (P80), (B) β CD- n C₁₀ biotransesterified amphiphilic cyclodextrin derivative ($n=7.3$), (C) n -dodecyl- β -D maltoside (DDM), (D) Brij[®]98, (E) Nile red (NR), and (F) acriflavine (**Table S1**).

We have chosen the solvatochromic dye Nile red (NR) as a hydrophobic model molecule that may participate in host-guest interactions with the β -CD- n C₁₀ amphiphilic cyclodextrin. Nile red has a negligibly small aqueous solubility. It may be entrapped in either the cyclodextrin nanocavity or in the hydrophobic volume of the deep cavitand that is created by the multiple-anchored long alkyl chains (**Figure 2**). Nile red may be incorporated also between the alkyl chains of the investigated amphiphiles without the formation of inclusion complexes. The strong spectral response of this fluorescent probe to the microenvironmental changes (see **Fig. S6 and the spectral data in ESI**) contributed to assess the nanopolarity distribution inside the mixed supramolecular assemblies as well as to detect the created self-assembled nanoparticles by means of fluorescence microscopy. Here acriflavine fluorophore with anticancer properties, as the donor, and Nile red as an acceptor⁹³⁻⁹⁷ were employed for the purposes of the performed Förster resonance energy transfer (FRET) experiments. Interpretation of the obtained fluorescence intensity data was done with the help of solubilization state diagrams of the β -CD- n C₁₀ particles, quasi-elastic light scattering (QELS), and cryo-TEM imaging.

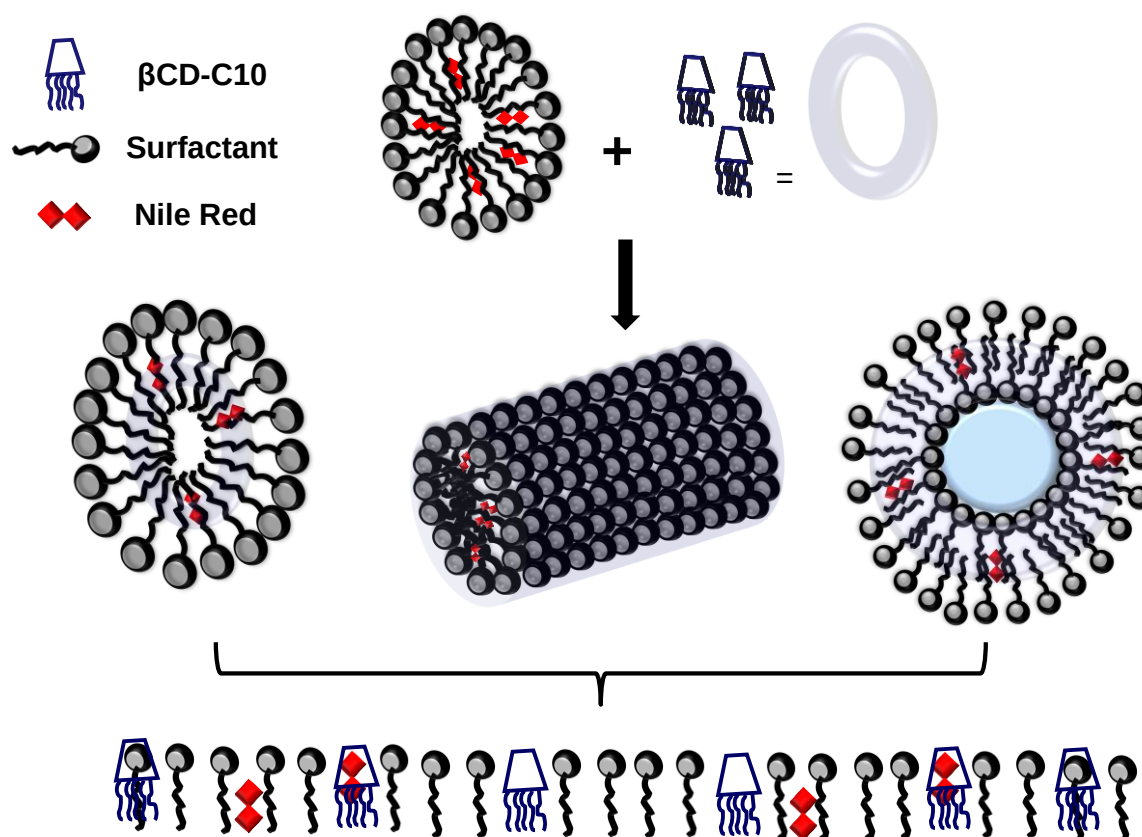


Figure 2. Possible topologies of mixed nano-objects formed by self-assembly of surfactant and amphiphilic cyclodextrin β CD- n C₁₀ molecules with indicated probable locations of the lipophilic probe Nile red in the interfacial region of the supramolecular nanoassemblies. Nile red may be entrapped between the hydrophobic alkyl chains in the amphiphilic mixtures and *via* inclusion complexes with the cyclodextrin nanocavity and deep cavitand volume of β CD- n C₁₀.

Experimental Section

Materials and Sample Preparation

The cyclodextrin compound β -CD- n C₁₀ (average molecular weight MW 2266, Lot LCH3-36) had a degree of substitution by decanoate (C₁₀) chains of $n=7.3$ (determined by MALDI-TOF analysis). It was obtained by enzymatic transesterification of β -CD with vinyl decanoate using thermolysin as a catalyzer as previously described.⁶ The nonionic surfactants polysorbate 80 (P80) (MW 1310; CMC 0.012 mM, respectively 0.0016% w/v), polyoxyethylene (20) oleyl ether (Brij® 98) (MW 1150; CMC 0.029% w/v) and n -dodecyl β -D-maltoside (DDM) (MW 510.6; CMC 0.15 mM) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin). Acriflavine and Nile Red were standards for fluorescence and microscopy, respectively (Sigma-Aldrich). The organic solvents were used as received. Milli-Q water of resistivity 18.2 M Ω .cm (Millipore Co.) was used as the aqueous phase.

Sample preparations were performed using the thin film hydration^{17,23,29} or the nanoprecipitation methods⁶⁻⁸ (**see the scheme in ESI**). The nanoprecipitation, employed for production of β CD- n C₁₀ nanospheres, consisted in dropwise injection of an acetone solution (1 mg/ml) of β CD- n C₁₀ (10 ml total volume) into an aqueous phase (10 ml) under agitation. Subsequently, the water-miscible solvent was removed under reduced pressure using a rotary evaporator. For β CD- n C₁₀/NR/surfactant nanoparticle preparation, the amphiphilic components and the dye NR were first dissolved in chloroform. The organic solution was subjected to continuous flow of nitrogen gas towards solvent evaporation and removal. The resulting homogeneous thin film was lyophilized and hydrated in solution of surfactant micelles yielding the formation of mixed nanoassemblies. The quantity of β CD- n C₁₀ varied as 1, 2, 3 or 4 mol% in the assemblies. Vortexing and sonication were applied to ensure the homogeneity of the nanosystems after dispersion in the excess aqueous phase.

Methods

Quasi-elastic light scattering

Quasi-elastic light scattering (QELS) was employed for determination of the particles sizes and distributions. The measurements were performed by a Zetasizer Nano ZS-90 instrument (light source: a He-Ne laser 633 nm, maximum power 5 mW) (MALVERN). The scattering angle was fixed at 90° and the temperature was 25°C. Every sample was measured three times. The mean hydrodynamic diameter was determined under the approximation for a spherical shape of the β CD-C₁₀ nanospheres or the β CD- n C₁₀/NR/surfactant nano-objects.

Turbidity measurements upon nanospheres solubilization by surfactant micelles

Nanospheres solubilization experiments were performed by measuring the optical density (OD) of the β CD-C₁₀ particle suspensions at a wavelength 400 nm on a Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis double beam spectrophotometer. The suspensions were diluted with Milli-Q water in order to obtain series of samples with different initial β CD- n C₁₀ concentrations. The suspensions were placed in 1 cm optical quartz cuvettes thermostated at 25°C. A concentrated surfactant (S) solution (P80, Brij®98 or DDM) was progressively added to the nanospheres dispersion using a thin tubing

device connected to a glass syringe operated by a precision pump (Braun Perfusor VI, Roucaire, France). The addition rate of the surfactant solution was 2×10^{-2} ml/min. The suspensions were maintained under stirring by a paddle stirrer, which did not interfere with the optical measurement path.

The total surfactant ($[S]_{\text{tot}}$) and $\beta\text{CD-C}_{10}$ ($[CD]_{\text{tot}}$) concentrations at time t were calculated, from the experimental turbidity *versus* time curves, according to the following equations:⁹⁹

$$[S]_{\text{tot}} = [S]_0 \times r \times t / (V_0 + r \times t) \quad (1)$$

$$[CD]_{\text{tot}} = [CD]_0 \times V_0 / (V_0 + r \times t) \quad (2)$$

where $[S]_0$ is the concentration of the surfactant solution added to the nanospheres (M/l), $[CD]_0$ is the initial concentration of $\beta\text{CD-nC}_{10}$ in the cuvette (M/l), V_0 is the initial volume of the nanospheres suspension (ml), r is the rate of addition of the surfactant solution (ml/min), and $r \times t = V_t$ is the added volume (ml) from the syringe device at time t .

Fluorescence spectroscopy and FRET experiments

Steady-state fluorescence and FRET measurements were performed on a SPEX Fluorolog spectrofluorimeter (model 1681 0.22 m). The spectroscopic properties of Nile Red were studied in different organic solvents and in micellar media (P80, DDM and BRIJ®98). The excitation wavelengths of NR were $\lambda_{\text{ex}}(\text{P80})=546$ nm, $\lambda_{\text{ex}}(\text{Brij}^{\text{®}}98)=578$ nm, or $\lambda_{\text{ex}}(\text{DDM})=562$ nm depending on the nature of the micellar solution used for the nanoparticles fabrication. Emission spectra were collected from 550 and 800 nm at 25 °C. The quantity of NR was 2 mol% with respect to the total quantity of surfactant in the nanostructured system. In the FRET experiments, the excitation wavelength was $\lambda_{\text{ex}}=435$ nm for acriflavine. FRET was realized between acriflavine as a donor and Nile Red as an acceptor. Emission spectra were collected from 450 and 800 nm. A volume of 50 μl of an acriflavine solution at 4.5×10^{-6} M was mixed with 3 ml of the $\beta\text{CD-C}_{10}/\text{NR}/\text{surfactant}$ nanoparticles. In this example, the resulting concentrations of the donor and acceptor dyes were 3.3×10^{-8} M and 5.0×10^{-6} M, respectively. FRET was followed at 25°C.

Laser scanning confocal fluorescence microscopy

Self-assembled nano-objects loaded with Nile red ($\beta\text{CD-C}_{10}/\text{NR}/\text{P80}$) were imaged by confocal fluorescence microscopy by means of LSM 510 Zeiss Meta microscope (Axiovert 100 M) equipped with a helium-neon (543 nm) laser of 1mW power. An oil plan-apochromat 63X/1.40 objective was used. The total concentration of the NR probe in the formulation was 7.6×10^{-6} M.

Cryo-transmission electron microscopy

For Cryo-TEM imaging, a drop of nano-objects suspension (5-10 mg/mL) was deposited on a lacy carbon film (NetMesh, Pelco). It was supported by a copper grid, which was glow-discharged before hand in plasma (easiGlow, Pelco) in order to turn it hydrophilic. The grid, held by tweezers, was placed in the chamber of the fast-freezing Leica EM-GP workstation, where the humidity was kept at 85%. The excess liquid was absorbed with filter paper and the grid was immediately plunged

into liquid ethane (-185 °C). Subsequently, it was mounted on a Gatan 626 specimen holder pre-cooled with liquid nitrogen, and transferred into the microscope. The samples were examined at -176°C, under low illumination, using a Philips CM200 cryo-transmission electron microscope operating at 80 kV. The images were recorded on Kodak SO163 films using the "Low Dose" Philips procedure, which limits the radiation damage in the region of interest prior to actual image recording. The negatives were subsequently scanned by a planar scanner and analyzed by the *Image J* software.

Results and Discussion

The amphiphilic cyclodextrin derivative β -CD- n C₁₀, possessing multiple grafted decanoyl chains (degree of substitution $n=7.3$) on the secondary face of the β -CD macrocycle, was embedded through spontaneous self-assembly in confined medium of single-chain (P80, DDM or Brij®98) surfactant aggregates (**Figure 2**). Mixed amphiphilic nanoassemblies were prepared by hydration of thin organic films of β -CD- n C₁₀ in aqueous solutions of PEGylated (P80 or Brij®98) or sugar-based (DDM) micelles (**Figure S1**). Lyophilized mixtures of β -CD- n C₁₀ and the guest molecule Nile red (NR) were also hydrated by surfactant micelles towards the preparation of functionalized nanosystems loaded by a hydrophobic dye compound with interesting photophysical properties. Initially, the self-assembly process was supposed to yield mixed micellar aggregates at low molar fractions of guest additives. In mixed assemblies, the lipophilic dye NR may partition between (i) interfacial locations, (ii) inner sites among the hydrophobic surfactant chains, or (iii) in the CD nanocavities *via* passage inside the hydrophobic deep cavitand volume of the β -CD- n C₁₀ amphiphile (**Figure 2**). Thus, additional liquid crystalline phases and supramolecular nanoarchitectures, other than micelles, may be expected to evolve depending on the molar ratio between the deep cavitand β -CD- n C₁₀ and the surfactant components in the self-assembled mixtures. In parallel, nanospheres of β -CD- n C₁₀ were prepared by the nanoprecipitation (solvent displacement)⁷² method (**Figure S2**).

Fluorescence spectroscopy, quasi-elastic light scattering (QELS) size distribution measurements and cryo-transmission electron microscopy imaging were performed to access the self-assembly properties of the studied amphiphilic mixtures. The hypothesis about the possible interfacial or deep-buried positions of the Nile red probe in the generated mixed amphiphilic nano-objects of β -CD- n C₁₀ (**Figure 2**), with a certain probability for inclusion complexation events, was studied by the FRET technique.

1. Fluorescence steady state spectra of Nile red in surfactant micelles and in supramolecular nanoassemblies involving amphiphilic cyclodextrin β CD- n C₁₀

Figures 3A and **S5** present excitation and emission spectra of NR in nanostructured environments created by self-assembly of NR with either the PEGylated surfactants (P80 or Brij®98) or the sugar-based surfactant DDM. The corresponding nano-objects size distributions (**Fig. 3B** and **Fig. S3**) revealed mean particle dimensions between 7 nm and 10 nm, which suggested that NR is totally solubilized in the micellar assemblies of every detergent type. Both the excitation and emission wavelength maxima of the dye varied with the investigated single chain surfactant type (**Figure S5**).

The variation of the NR fluorescence emission wavelength maximum was considerable as a function of the polarity of the environment (**Figure S6, Table S2**). Moreover, the fluorescence spectra of NR incorporated in self-assembled amphiphilic nano-objects (**Figures 3A and S5**) markedly reflected the nanopolarity changes (**Fig. S7**), thus manifesting the sensitivity of the NR spectral response to the solvent polarity (**Fig. S6**). The obtained results suggested that the NR probe occupied interfacial locations in the studied micellar aggregates. They quantitatively revealed that these locations are characterized by interfacial dielectric constant (ϵ) of around 31.

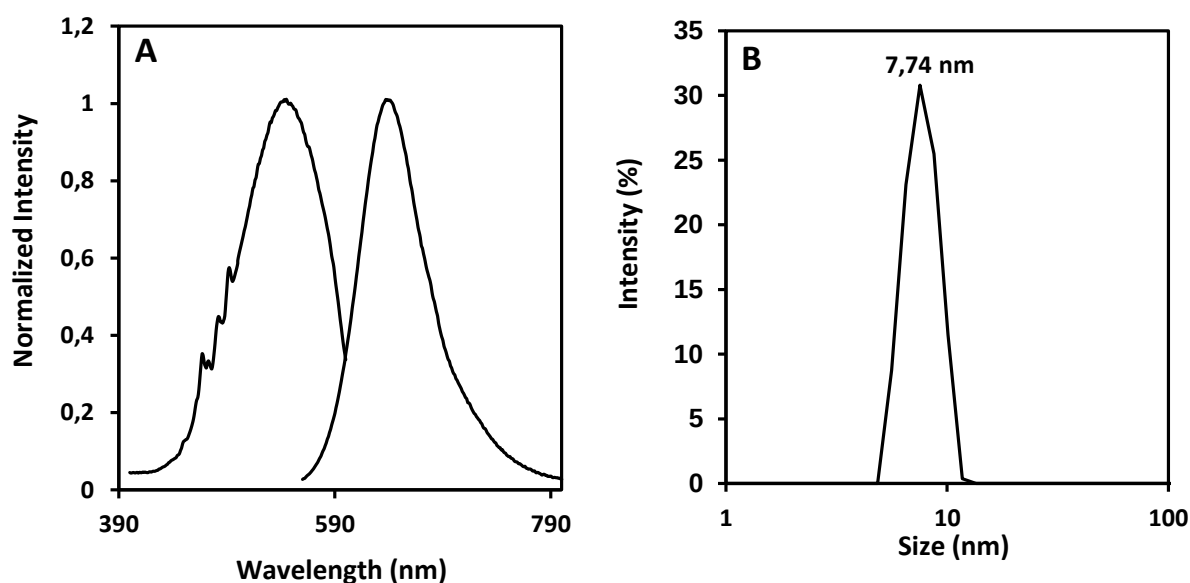


Figure 3. (A) Fluorescence excitation and emission spectra of Nile red in polysorbate 80 (P80) micellar solutions with concentration equal to $\text{CMC} \times 10$. The spectroscopic results for NR in n-dodecyl- β -D maltoside (DDM) and Brij[®]98 micellar solutions are comparatively presented in **Figure S5 of ESI**. The NR concentration was 2 mol% with respect to the surfactant component. The measurements were performed with excitation wavelengths of $\lambda_{\text{ex}}=546$ nm for NR in P80 micelles, $\lambda_{\text{ex}}=562$ nm for NR in DDM micelles, and $\lambda_{\text{ex}}=578$ nm for NR in Brij[®]98 micelles. For the CMC values of the surfactants see **Table S2 in ESI**. (B) Size distribution plotted from intensity measurements by quasi-elastic light scattering of the amphiphilic nano-objects formed in the self-assembled mixture of Nile red (NR) and micelles of P80 at concentration equal to $\text{CMC} \times 10$. The comparison with the results for the NR/DDM and NR/Brij 98 micelles is presented in **Figure S3 of ESI**.

The water-insoluble NR probe showed negligibly small fluorescence in solution of native β -CD. This correlates with the low affinity constant of the NR chromophore for the nanocavity of the native β -CD ($K < 600 \text{ M}^{-1}$),⁹⁸ which exposes free hydroxyl groups on its secondary face. In contrast, the replacement of the hydroxyl groups of β -CD by long hydrocarbon chains (C_{10}), and the incorporation of the deep-cavitand β -CD- nC_{10} molecules in self-assembled nanostructures, had a considerable effect on the fluorescent emission intensity of NR. The acquired fluorescence spectra were used to trace the intermolecular interactions in the studied multicomponent nanoassemblies. A synergistic effect between the hydrophobic deep cavitand volume and the nanocavity of the modified cyclodextrin β -CD- nC_{10} should enhance the environmental impact on the NR spectral response (**Figures 4 and S8**). The position of the NR fluorescence emission maximum

corroborated with the fact that the dye is localized at the hydrophobic/hydrophilic interfaces of the micellar nanoassemblies. Indeed, it matches to a mean dielectric constant $\varepsilon \sim 31$ (interfacial polarity) rather than to $\varepsilon \sim 2$ (hydrophobic core of the micelles). The established interfacial location of NR implies that the dye may participate in energy transfer (FRET) events with neighbour donor dye molecules, which are dissolved in the surrounding aqueous phase of the nanoparticles (see the FRET section below).

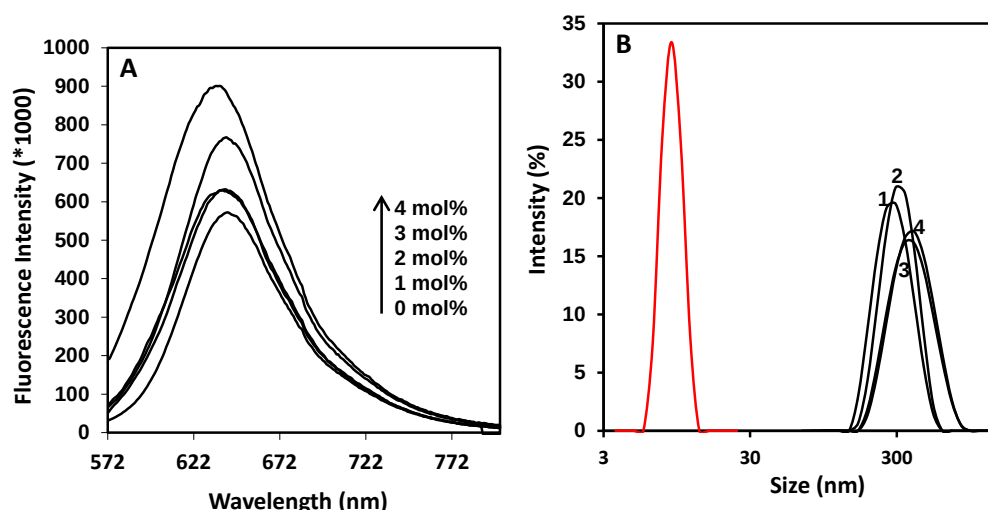


Figure 4. (A) Fluorescence emission spectra of Nile red in mixed nano-objects formed in the NR/ β CD- n C₁₀/DDM self-assembled mixture in excess aqueous phase. The quantity of the amphiphilic cyclodextrins varied from 0 to 4 mol%, with regard to the surfactant constituents, at a constant NR content (2 mol%). The excitation wavelength of NR was 562 nm. (B) NR/ β CD- n C₁₀/DDM nanoassembly size distribution plotted from intensity measurements by the QELS method. The red plot indicates the size distribution of the surfactants aggregates in the absence of β CD- n C₁₀. The numbers 1, 2, 3 and 4 indicate the β CD- n C₁₀ quantity (mol%) in the NR/ β CD- n C₁₀/DDM nanoassemblies. The spectroscopic results for the NR/ β CD- n C₁₀/P80 and (C) NR/ β CD- n C₁₀/Brij®98 multicomponent assemblies are presented in **Figure S8 (ESI)** and the corresponding size distribution plots are given in **Figure S4 of the ESI**.

Figures 4A and S8 present the emission spectra of Nile red incorporated in mixed nano-objects of amphiphilic cyclodextrins and surfactants molecules. Indeed, a notable increase in the fluorescence intensity was observed with the increase of the molar percentage of the deep cavitand β -CD- n C₁₀ amphiphile in the self-assembled mixtures. On one hand, the enhancement of the fluorescence emission of OR can be due to the restricted dynamics of motion of the chromophore embedded in the new environment created by the mixed β -CD- n C₁₀/surfactant supramolecular architectures. It seems that the β -CD- n C₁₀/surfactant mixtures generate nanostructures of a membrane type rather than of micellar topologies. On the other hand, the inclusion complexation of NR with the host β -CD- n C₁₀ cavity cannot be excluded. The wavelength of the NR maximum emission ($\lambda_{\text{max}} \sim 640$ nm) corresponds to that of NR included in the nanocavity of a native β -cyclodextrin.⁹⁸ A contribution of the hydrophobic deep cavitand space to changes in the environmental polarity would cause a blue shift of λ_{max} toward lower fluorescence emission wavelengths. Such an effect may be suggested at the highest β -CD- n C₁₀ content studied. The

restricted motion of the OR fluorophore embedded in an amphiphilic bilayer membrane phase also should cause a decrease in the fluorescence emission λ_{max} wavelength value.

The corresponding size distribution plots of the self-assembled P80/NR/ β CD-nC₁₀, DDM/NR/ β CD-nC₁₀, and Brij®98/NR/ β CD-nC₁₀ particles are shown in **Figures 4B** and **S4**. For all mixtures, the determined average nano-object sizes (100-400 nm) considerably exceeded those of the pure surfactant micelles (7-10 nm) (**Fig. S3**). Based on these experimental data and also on theoretical considerations,⁸⁰ additional investigations by microscopy imaging and solubilization state diagrams appeared to be necessary in order to reveal the nature of the obtained self-assembled scaffolds that adopt submicrometer dimensions. The experimentally determined hydrodynamic diameters of the self-assembled objects in the dispersion (**Figs. 4B and S4**) indicated the occurrence of morphological phase transitions, which might be of a micelle-to-vesicle or a micelle-to-tubule type as well as of other membrane-type topologies that may explain the restricted dynamics of motion of the incorporated NR fluorophores and the corresponding enhancement of the fluorescence intensities in the presence of β CD-nC₁₀.

The examination of the NR-embedding self-assembled particles by confocal fluorescence microscopy confirmed that the incorporation of the β CD-nC₁₀ deep cavitand in NR/surfactant micelles provokes a morphological transformation of the micellar aggregates (of sizes between 7 nm and 10 nm) into bigger spherical objects that reach up to submicrometer dimensions depending on the deep cavitand content. An example of NR/P80/ β CD-nC₁₀ particles coexisting with excess micelles in the dispersion is given in **Figure 5**.

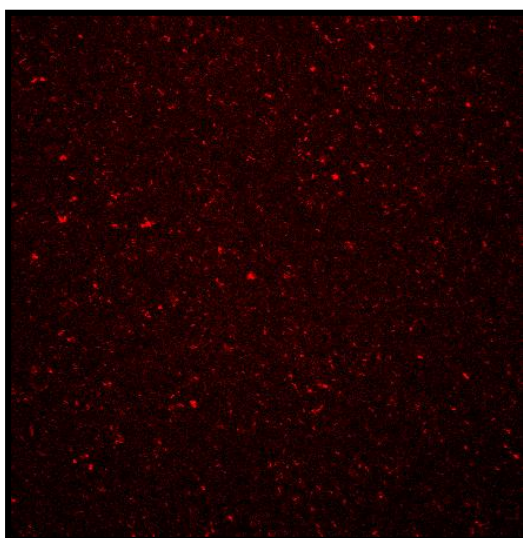


Figure 5. Image of NR/ β CD-nC₁₀/P80 mixed self-assembled objects acquired by confocal fluorescence microscopy. The image suggests a coexistence of submicron spherical objects with micellar aggregates in the dispersion.

The possible location of the fluorescent Nile red probe in the created multicomponent nanoassemblies was investigated by Förster resonance energy transfer (FRET) experiments.

2. Förster resonance energy transfer (FRET) study of supramolecular nanoassemblies incorporating Nile red and amphiphilic cyclodextrin β CD-nC₁₀

An interesting question about the properties of the amphiphilic cyclodextrin β -CD- nC_{10} is whether the inclusion complexation capacity of the β -CD nanocavity (corresponding to binding constants with hydrophobic dyes of $K \sim 200\text{--}600\text{ M}^{-1}$) is preserved or modified upon grafting of multiple hydrophobic (C_{10}) chains on its secondary face. We hypothesized that FRET experiments, which are sensitive to the proximity between donor and acceptor dye molecules incorporated in the studied supramolecular system, may elucidate the relative location of the guest NR molecule with regard to the deep cavitand β CD- nC_{10} . The location of the Nile red probe (acceptor dye) might be in the interfacial regions of the generated self-assembled nano-objects of β CD- nC_{10} or it may get a deep-buried position in the hydrophobic core of the supramolecular aggregates. The two situations should be distinguished by FRET measurements exploiting, as an acceptor, a charged water-soluble donor dye (acriflavine), which cannot partition in the interior of the created self-assembled β CD- nC_{10} nano-objects. Interfacial locations of NR associated with the β CD- nC_{10} amphiphile exposed at the surface of the studied nanoparticles, would generate greater FRET signals as a result of the nearness of the donor and acceptor dye molecules. In contrast, a deep-buried location of NR in the interior of the 400 nm-sized particles will not allow for a FRET to be produced between the distant donor and acceptor chromophores. Thus, the planned FRET experiment was expected to help validating the supposition about the preferential interfacial location of NR in the studied supramolecular assemblies, which was drawn above based on fluorescence emission spectroscopy results (**Figures 4, S6, S7, and S8**).

The methodology of the performed FRET experiments is presented in more detail in the *ESI*. First, the fluorescence spectra of the donor (acriflavine) and acceptor (Nile red) dyes were studied in nanostructured micellar media (**Figs. S9**). The overlap of the donor (acriflavine) and acceptor (Nile red) spectra, forming a donor-acceptor pair for FRET experiments was determined (**Figs. S10**). Examples of FRET data collection at varying acceptor dye concentrations in the micellar assemblies are shown in **Fig. 6** and **Fig. S11**. The spectroscopic data analysis, *via* the construction of FRET efficiency plots, is given in **Figures S12, S13, and S14**. It confirmed the concentration dependence of FRET and the quantitative character of the studied photophysical processes.

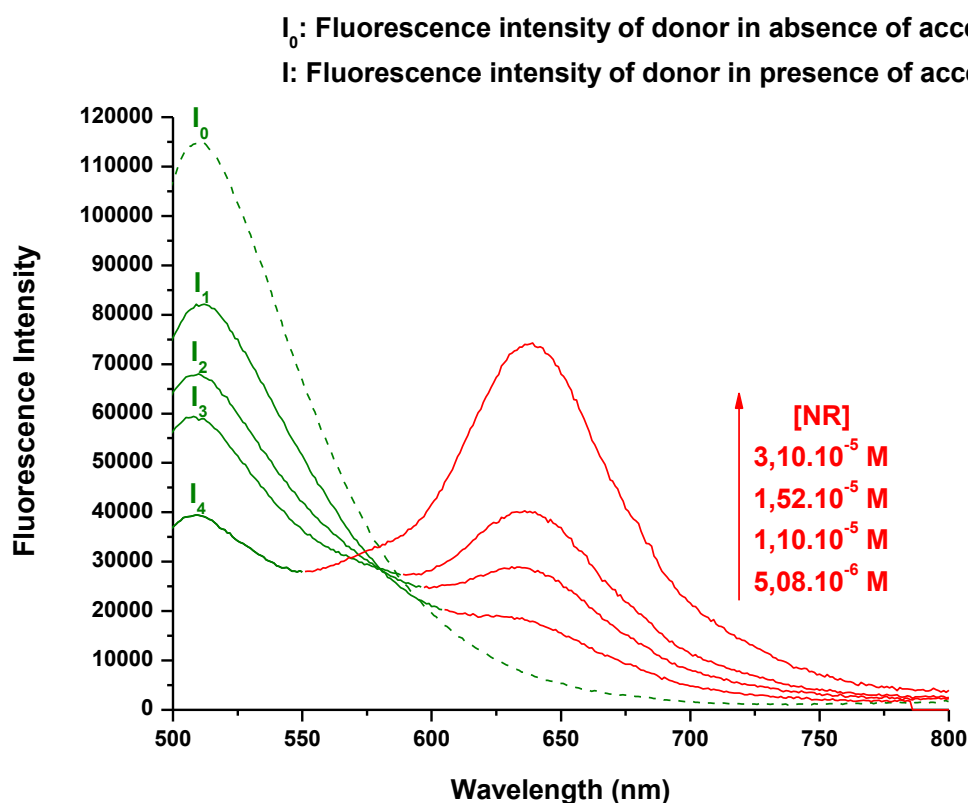


Figure 6. FRET experiments in nanostructured medium of NR/DDM micellar assemblies. The fluorescence intensity I_0/I_i ratios are determined at progressively increasing concentrations of the acceptor dye Nile red, [NR], at a constant donor dye (acriflavine) concentration in the aqueous phase. I_0 is the fluorescence intensity of the acriflavine donor dye in the absence of the acceptor dye, *i.e.* before the FRET event (see the dotted line). I_i is the fluorescence intensity of the donor dye in the presence of the acceptor NR. A maximal FRET effect, *i.e.* maximal decrease of the fluorescence intensity of the donor dye (I_4), is observed at maximal acceptor dye concentration [NR].

FRET experiments were performed in nanostructured media generated with surfactant micelles (NR/P80, NR/DDM, or NR/Brij®98 assemblies) as well as with multimaterial self-assembled nano-objects involving NR and β -CD- nC_{10} deep cavitands (NR/ β CD- nC_{10} /P80, NR/ β CD- nC_{10} /DDM, and NR/ β CD- nC_{10} /Brij®98). The obtained FRET plots (**Figs. 6, 7, and S11**) demonstrated the relationship between (i) the progressive increase of the acceptor fluorescence emission with the increase of the molar percentage of the incorporated hydrophobic β -CD- nC_{10} deep cavitands, and (ii) the corresponding decrease of the intensity of the donor fluorescence emission. Altogether, these results indicated that the FRET events occurred as a result of the proximity of the acriflavine and NR chromophores in the studied nanostructured systems.

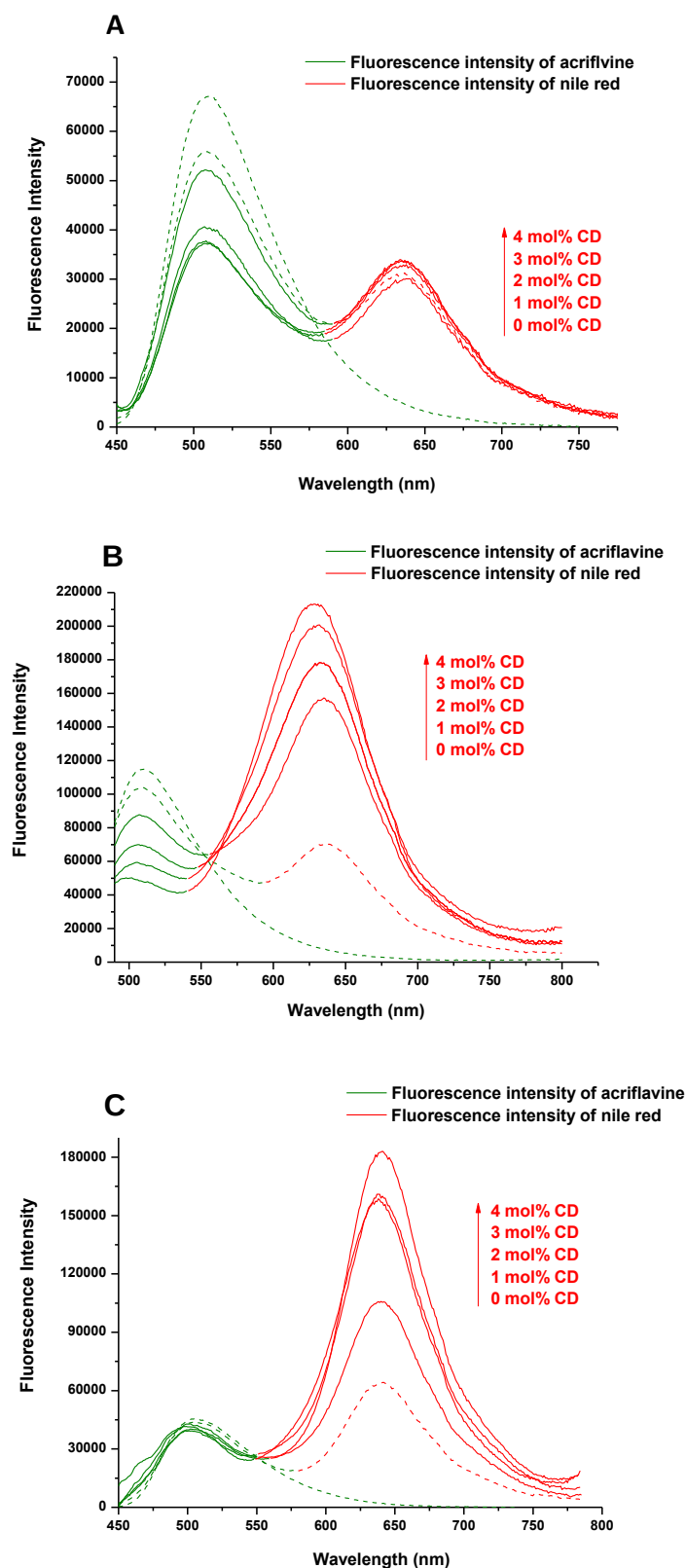


Figure 7. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) from acriflavine (donor) to Nile red (acceptor) in (A) NR/ β CD- n C₁₀/P80, (B) NR/ β CD- n C₁₀/DDM, and (C) NR/ β CD- n C₁₀/Brij®98 self-assembled nano-objects dispersed in excess aqueous phase. The quantity of the amphiphilic cyclodextrins (CD) in the nanostructured systems varied from 0 to 4 mol%.

Figure 7 shows that the produced FRET was essential in the NR/ β CD-nC₁₀/DDM and NR/ β CD-nC₁₀/Brij®98 organized amphiphilic scaffolds. This implied that the incorporated quantity (from 1 to 4 mol%) of amphiphilic cyclodextrins in the self-assembled nano-objects appeared to be sufficient to organize the supramolecular structure in a way to position the NR chromophore close to the nano-object interfaces. Over again, this confirms the affinity of NR for proximity to β -CD-nC₁₀ deep cavitands and indicated that the nano-objects peripheries are built-up by NR/ β -CD-nC₁₀ supramolecular assemblies. The inclusion complexation between the molecules is probable as well. Thus, the energy transfer phenomenon may occur with the acriflavine dissolved in the surrounding aqueous phase and NR embedded at the interfaces of the NR/ β CD-nC₁₀/surfactant nanoassemblies.

Whereas the fluorescence emission of the donor (acriflavine) added to the NR/ β CD-nC₁₀/P80 system decreased progressively with the increase of incorporated deep cavitands, the FRET signal (associated with the NR emission) was weakly dependent on the β CD-nC₁₀ quantity. It may be suggested that this is due to the supramolecular organization of the system, in which P80 does not seem to solubilize a large number of molecules of the high-molecular weight amphiphile β CD-nC₁₀. In the lack of knowledge about the solubilization state diagram [P80] *versus* [β CD-nC₁₀], the attraction of NR to the nano-object interfaces cannot be enhanced by simply augmenting the β CD-nC₁₀ molar fraction. At this stage, the FRET data indicated that the interfacial concentration of the NR/ β CD-nC₁₀ assemblies is low.

The FRET effect was best pronounced in the NR/ β CD-nC₁₀/DDM system. This suggests that the NR chromophores, respectively the NR/ β CD-nC₁₀ supramolecular structures or inclusion complexes, are partitioned with higher concentrations at the interfaces of the self-assembled nano-objects. Therefore, they may more easily probe the presence of the donor acriflavine dye in the surrounding through FRET. In fact, the obtained FRET results may be directly interpreted based on the supramolecular structures and nano-object morphologies established by cryo-TEM (**see Figure 10 below**). The induction of unilamellar tubular and vesicular membranes by β CD-nC₁₀, as well as the formation of multilamellar shells at the nano-objects periphery, may explain the increased concentration of NR/ β CD-nC₁₀ assemblies, supra-amphiphiles or inclusion complexes at the peripheries of the nano-objects. The proximity between the donor and acceptor dyes in the interfacially nanostructured system correlates with the observation of a FRET outcome with the donor-acceptor pair.

3. Solubilization state diagrams determined from turbidity measurements

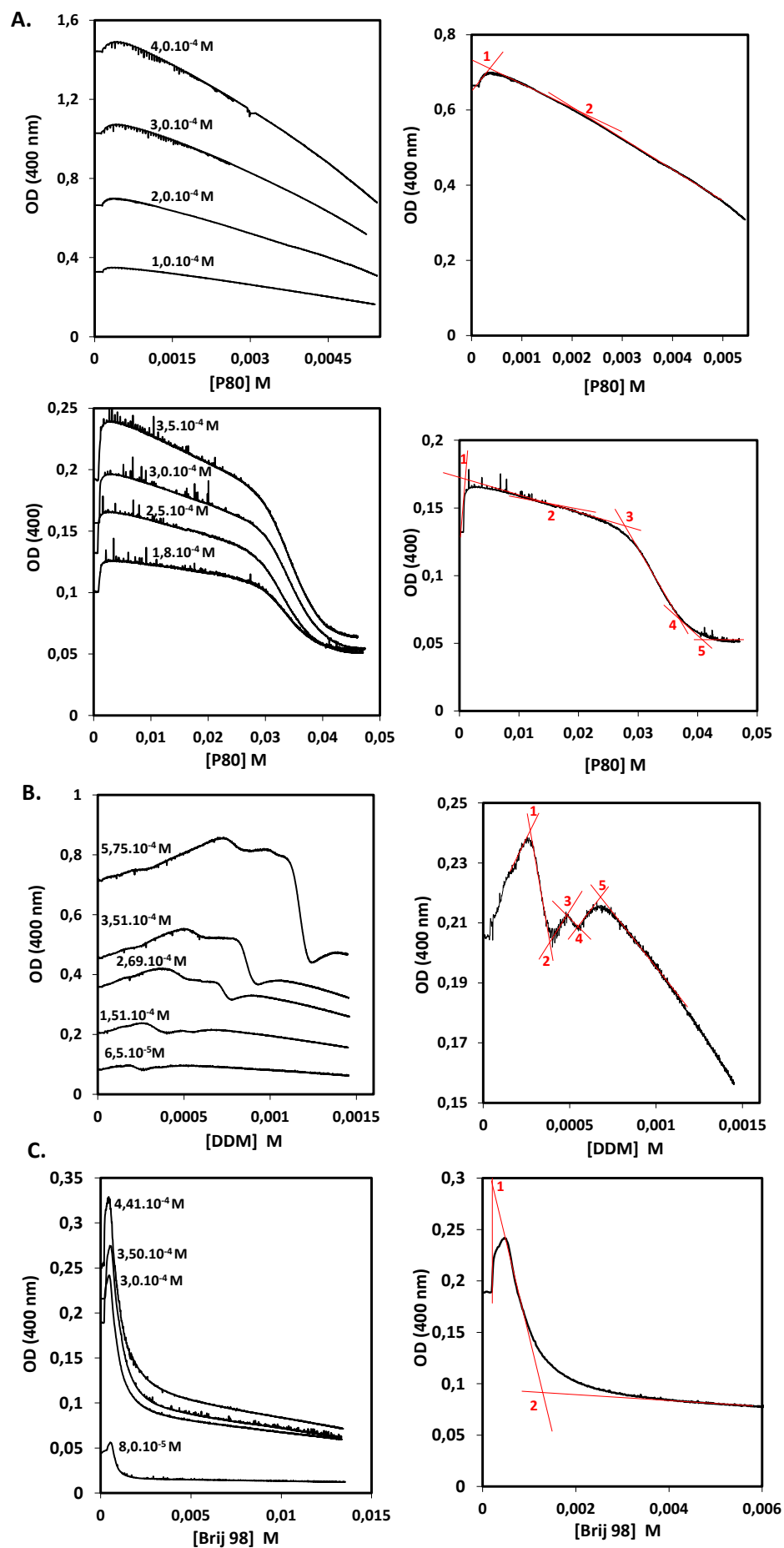
Solubilization experiments with amphiphilic cyclodextrin nanospheres upon addition of surfactant micelles were performed with an initial aim to obtain pseudo-solutions of individual deep cavitands β -CD-nC₁₀ in polar media created by P80, Brij®98, and DDM micellar nanoassemblies. This would allow studying, at the molecular level, the events of inclusion of guest NR molecules in the deep cavitand volumes and/or nanocavities of β -CD-nC₁₀. Evidently, inclusion complexation requires individual molecular contacts and cannot be assessed for the aggregated state of β -CD-nC₁₀ in submicron nanospheres.

Solubilization state diagrams were obtained from turbidity measurements for every surfactant type studied (**Figure 8**). For this purpose, nanospheres of β -CD-nC₁₀ were prepared by

nanoprecipitation (**Figure S2**). Nanospheres of varying concentrations were subjected to subsequent progressive addition of micellar surfactant solutions under stirring, during which the turbidity of the dispersion was followed. Full solubilization of the nanospheres by surfactant micelles would lead to a transparent solution of small amphiphilic (mixed micellar) aggregates characterized by a minimal turbidity. At variance, formation of larger supramolecular scaffolds and binary β -CD- n C₁₀/surfactant nano-objects of submicrometer dimensions would result in a considerable turbidity of the dispersed system.

The solubilization curves presented in **Figure 8** for all surfactant types (P80 (A), DDM (B) and Brij®98 (C)) comprise the sequences of the events corresponding to every distinct state of aggregation of the β -CD- n C₁₀/surfactant mixtures. They result from the partitioning of the surfactant molecules between the aqueous phase and the mixed β -CD- n C₁₀/surfactant objects during the dynamic assembly/disassembly process. The dissolution of the β -CD- n C₁₀ nanospheres in micellar medium is accompanied by “bottom-up” assembly of new β -CD- n C₁₀/surfactant nano-aggregates. The presented turbidity plots permit distinguishing the regions of phase separation and the intermediate states of the assembly process such as the coexistence of mixed micelles with vesicular structures, bilayer tubules, or other types of self-assembled nano-objects (**Figure 9**). Moreover, the diagrams presented in **Figure 9 (left panels)** and the associated partitioning behaviour (**Figure 9 right panels**) allow for a quantitative assessment of the compositions (*i.e.* β -CD- n C₁₀ and surfactant concentrations), which determine the spontaneous curvatures associated with vesicular membrane or mixed aggregate formations.

Figure 8: Variations of the optical density (OD) determined at $\lambda=400$ nm during continuous addition of surfactant micellar solutions to β CD- n C₁₀ nanospheres. (A) P80 micellar phase; (B) DDM micellar phase, and (C) Brij®98 micellar phase. Left panels: Turbidity curves measured at different initial concentrations of β CD- n C₁₀ nanospheres. The right panels indicate the determination of the break points in the solubilization plots by the intercept of the tangents to the curves. The initial β CD- n C₁₀ particles concentrations are presented on the graphs. The detergent concentrations in the syringe were (A) 10 mM P80 (top part) and 80 mM P80 (bottom part), (B) 2.9 mM DDM (B), and 26.5 mM Brij®98 (C).



The obtained results (**Figure 9**) indicated that the studied cyclodextrin/surfactant systems do not form ideal mixed solutions. True solubilization of the β -CD- nC_{10} macromolecules turn out to be impossible. The solubilisation curves of the amphiphilic cyclodextrin nanospheres suggested that the surfactant micelles may not incorporate the deep cavitands into mixed micellar aggregates only under the investigated conditions (**Figure 8**). At variance, the established partial solubility of the β -CD- nC_{10} macrocycles in the nanostructured surfactant media led to the formation of additional nano-aggregates, which differed from small-size micelles (**Figs. 4B and S4**), and hence are associated with significant turbidity (**Figure 8**).

The solubilization state diagrams confirmed the non-ideal behaviour, identified above by nano-object size distribution measurements. For ideal mixtures, the CMC value of the mixed aggregates is usually lower than that of the individual type amphiphilic micelles. Here, the relatively low solubility of β -CD- nC_{10} in the DDM micelles led to the observation of a CMC value of the multicomponent system that is higher than that of the pure DDM micelles (**Figure 9**). This is an indication of a partial phase separation of the amphiphilic nanoassemblies. The domains of phase coexistence and the presence of self-assembled intermediate object types were revealed from the characteristic break points determined from the solubilization plots (**Figure 8, Tables 3 to 5**). The separate regions, outlined by numbered lines in **Figure 9**, indicate the concentration ranges allowing for the formation of mixed types of aggregates and nano-objects with different topologies in the dispersed medium. Segregation of distinct phases from micelles (*e.g.* vesicular or tubular objects with sizes bigger than 100 nm) can be deduced for every investigated surfactant type in **Figure 9** with the help of the break points (**Tables S3, S4 and S5**) and the particle size measurements. This implies that the excess detergent, which can not be included in the β -CD- nC_{10} -based mixed nano-objects, will abide as a coexisting micellar phase in the dispersion. The precise topologies of nano-objects of selected compositions present in the various regions of the solubilisation state diagrams were studied by cryo-TEM (**see Fig. 10 below**).

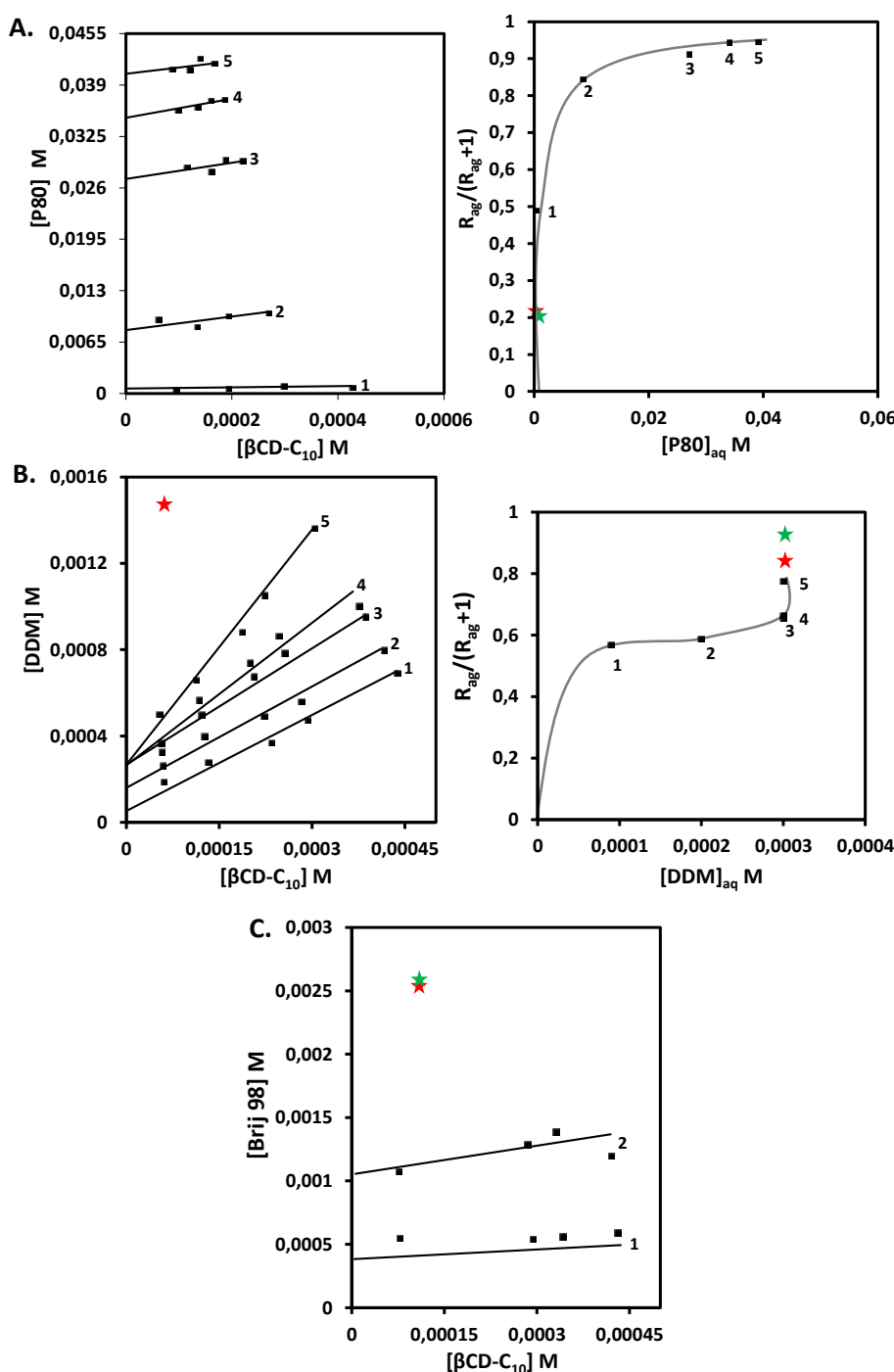


Figure 9: Solubilization state diagrams of $[CD]$ versus $[P80]$ (A), $[DDM]$ (B), or $[Brij^{\circ}98]$ (C) constructed from the break points of the solubilization curves of the $\beta CD-nC_{10}$ nanospheres presented in **Figures 8A, 8B or 8C**, respectively (**Left panels**). The lines indicate the concentration regions, in which different kinds of nano-objects form in the mixed dispersed amphiphilic systems starting from $\beta CD-nC_{10}$ nanospheres and added surfactant micelles. (**Right panels**) Partitioning behaviours of the surfactants P80 (A), DDM (B), and Brij[®]98 between the excess aqueous phase and the generated mixed nano-aggregates with $\beta CD-nC_{10}$. R_{ag} is the surfactant-to- $\beta CD-nC_{10}$ ratio in the mixed aggregates, and $[P80]$ (A), $[DDM]$ (B), and $[Brij^{\circ}98]$ are the surfactant concentrations in the aqueous phase (see also **Tables S3, S4 and S5**). The colour symbols indicate the compositions of the nano-object systems for which fluorescence (maximal FRET outcome) and cryo-TEM microscopy results are shown for the generated nano-objects.

The results in **Figure 8 and 9** indicated the rich variety of mixed nano-aggregates, which the deep cavitand β -CD- n C₁₀ may induce in self-assembled mixtures with surfactant molecules. For instance, 4 mo% β -CD- n C₁₀ in the β -CD- n C₁₀/DDM dispersion leads to the formation of vesicle membranes at a molecular fraction $R_{ag}/(1+R_{ag}) = 1$ (see **Figure 9B, left panel**). The high molecular weight amphiphile dominates the behaviour of the system and the formation of bilayers. The vesicular nano-aggregates get saturated by surfactant molecules and further addition of DDM does not dissolve them into mixed micelles. Thus, β -CD- n C₁₀/DDM mixed bilayers stably exist in coexistence with DDM micelles from the excess aqueous phase. This is just one example of the various new types of nano-objects, which may generate for all β -CD- n C₁₀ molar contents shown in the obtained diagrams (**Figure 9**).

4. Cryo-TEM investigation of the nanostructures induced by the β -CD- n C₁₀ deep cavitands

In agreement with the nanoparticle size determinations by QELS (**Figs. 4B and S4**), the performed cryo-electron microscopy investigation established notably augmented dimensions of the β -CD- n C₁₀-containing nanoassemblies with regard to the pure surfactant micelles. The morphological transformations were found to be dependent on the quantity of the β -CD- n C₁₀ amphiphile that can be solubilized in the mixed nanostructures. The incorporation of the deep cavitand β -CD- n C₁₀ macromolecules in self-assembled nano-objects induced the formation of stable bilayer-membrane-based particles at concentrations around 4 mol% (**Fig. 10**). Above this molar percentage, a phase separation took place as typical for hydrophobically substituted cyclodextrins.^{5,10}

For the β -CD- n C₁₀/Brij®98 system, **Figure 10 top (panel A)** presents cryo-TEM images of tubular and vesicular bilayer assemblies obtained at two amphiphilic contents. These morphologies suggested that the cyclodextrin nano-object PEGylation favoured unilamellar spherical vesicles and elongated tubular membranes. Multilamellar onion formation was not typical for the β -CD- n C₁₀/Brij®98 system. This should be due to the affinity of the PEG chain of the Brij®98 surfactant for interfacial locations at the nano-object peripheries. At low number of PEGylated surfactant micelles with regard to the total β -CD- n C₁₀ concentration (**Fig. 9C**), the generated tubular nano-object state reflected the resistance of the multicomponent amphiphilic scaffold to solubilization by Brij®98 (**Fig. 10, top left panel A**). A dispersed state of spherical vesicles was achieved at a higher ratio between the PEGylated surfactant micelles and the β -CD- n C₁₀ deep cavitands (**Fig. 10, top right panel A**). The observed trend fully corroborated with the solubilisation state diagram shown in **Figure 9C**.

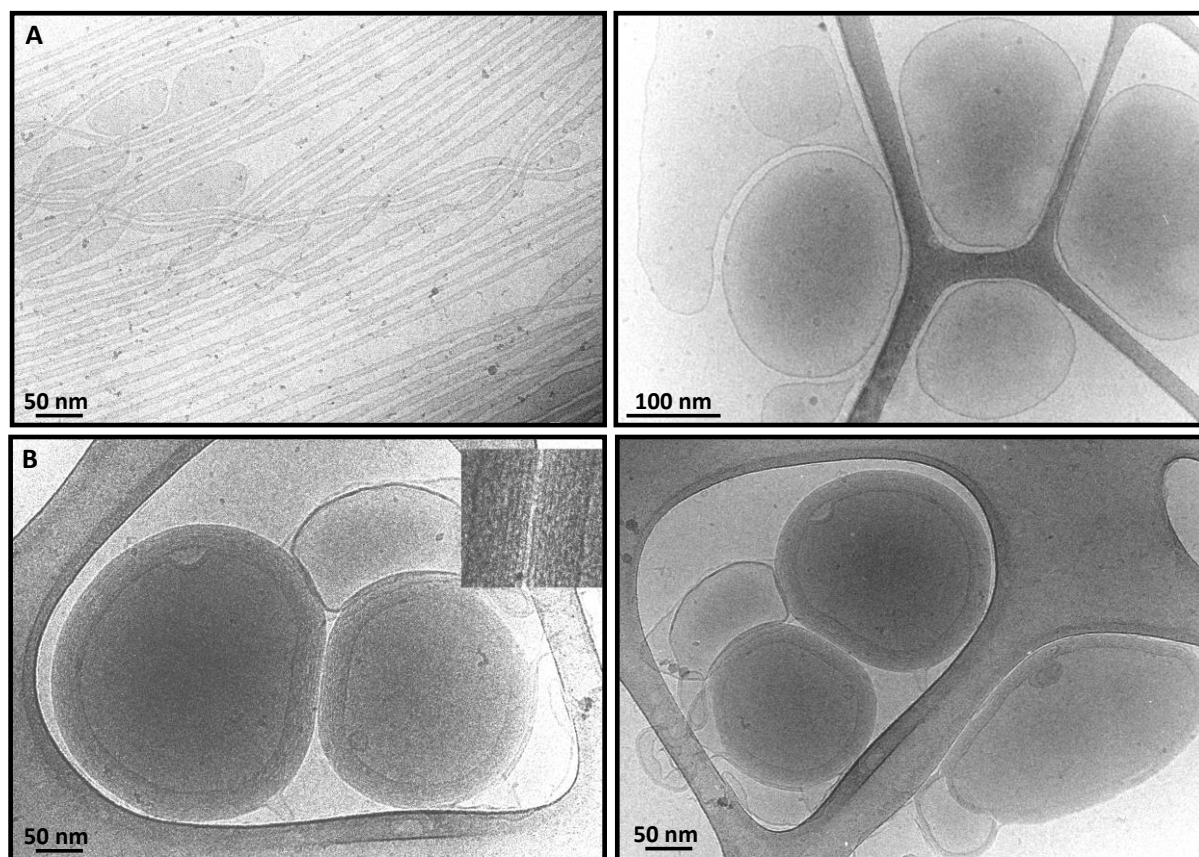


Figure 10. Cryo-TEM images of self-assembled nano-objects (namely tubular and vesicular bilayer assemblies or multicompartiment objects with nanoporous multilamellar shells) formed in mixed NR/ β CD- n C₁₀/Brij®98 (**top panels A**) and NR/ β CD- n C₁₀/DDM (**bottom panels B**) systems. The investigated amphiphile concentrations are (A) Brij®98: $2,65 \cdot 10^{-3}$ M and CDs: $1,1 \cdot 10^{-4}$ M (spherical unilamellar vesicles) or Brij®98: $1,99 \cdot 10^{-3}$ M CDs and $1,98 \cdot 10^{-3}$ M (elongated unilamellar tubular membranes); and (B) DDM: $4,5 \cdot 10^{-3}$ M and CDs: $1,0 \cdot 10^{-3}$ M (spherical vesicles with multilamellar shells).

The cryo-TEM study of the β -CD- n C₁₀/DDM assemblies revealed a preference for the formation of spherical multicompartiment nano-objects built-up by multilamellar shells of four bilayers (**Figure 10, bottom panel B**). The performed imaging established a compact nature of the β -CD- n C₁₀/DDM nano-object shells. Interestingly, multicompartiment assemblies with nanoporous multilamellar shells may be created by ordering of the deep cavitand macromolecules into columnar structures across the adjacent bilayers. This event might involve both transbilayer dimer and columnar arrangement of the CD macrocycles, which additionally organize the supramolecular assemblies.⁶⁰ The interaction between the cyclodextrin faces, through hydrogen bonds (at the primary faces) and hydrophobic attraction (at the secondary faces), evidently contributed to the stability of the multibilayer shells of the β -CD- n C₁₀/DDM vesicles (**Fig. 10B**). The enhanced FRET effect in this system is consistent with the NR/ β -CD- n C₁₀ interfacial exposure within the generated vesicular shells.

Figure S15 shows the compositions of the dispersed systems determined from the solubilization state diagrams and partitioning behaviours (**Figure 9**) for the systems investigated by cryo-TEM. They indicate that the β -CD- n C₁₀ nanospheres could not be transformed by P80 into nano-aggregates of appropriate concentration and sizes suitable for the cryo-TEM study. The

solubilization capacity of P80 for the β -CD-nC₁₀ nanospheres is insufficient owing to the low CMC. The surfactant forms a separated micellar phase and cannot be inserted in mixed nano-aggregates with β -CD-nC₁₀ even at very high concentration (**see the partitioning behaviour of P80 in Figure 9A**).

Both the cryo-TEM investigation and the physico-chemical solubilisation study, in addition to the fluorescence spectroscopy results, evidenced the structural transition of the initial micellar surfactant assemblies into new supramolecular nanoarchitectures induced upon the incorporation of the biotransesterified cyclodextrin β -CD-nC₁₀. Moreover, the performed FRET investigation revealed that the guest molecule of interest (NR) is localized in the interfacial regions of the generated vesicular and tubular membrane nanoassemblies thanks to the interaction with the deep cavitand macrocycles. Some of the studied functionalized amphiphilic membranes, involving multi-material building blocks, appear to be nanoporous and may serve for potential delivery of active hydrophobic guest molecules, which are sterically compatible with the deep cavitand and the nanocavity of the β -CD-nC₁₀ derivative.

Conclusion

A thin film methodology is proposed for preparation of multicompartment supramolecular cyclodextrin-based nano-objects with a deep-cavitand space for protection of hydrophobic guest molecules. The porous β -CD-nC₁₀ nano-objects forming PEGylated supramolecular scaffolds displayed stability against aggregation, which reveals Stealth properties. The deep cavitand cyclodextrin compound β -CD-nC₁₀, incorporated through self-assembly into PEGylated or sugar-based surfactant micellar systems triggered morphological transitions of the multicomponent amphiphilic nanoarchitectures. These structural transitions were suggested to result from packing ordering favoring bilayer membrane formation, host-guest interactions, and the propensity of the deep-cavitand cyclodextrin molecules towards dimerization into columnar assemblies. Depending on the surfactant type and its solubilization capacity for the polysubstituted cyclodextrin macrocycles (β -CD-nC₁₀), transitions from mixed micelles to mixed membrane tubules, spherical mixed membrane vesicles or multicompartment nano-objects with multilamellar shells were observed. The excess surfactant molecules, which could not be incorporated in the vesicular bilayer membranes, embedding the β -CD-nC₁₀ deep cavitands, remained in a micellar form as the coexisting nanostructured phase. In addition to the interaction with surfactants, the investigated amphiphilic cyclodextrin derivative β -CD-nC₁₀ showed a propensity for interaction with hydrophobic guest molecules, *e.g.* Nile red studied as a model insoluble compound with functional properties. Therefore, the proposed self-assembly strategy may be employed for encapsulation and protection of instable active molecules in hydrophobic nanostructured environment of β -CD-nC₁₀ nano-objects with nanoporous shells and Stealth properties.

Acknowledgement

The financial support from ANR SIMI10 Nanosciences to the project CYDEXCAR (ANR-11-BS10-0007) is gratefully acknowledged. L.Z. thanks for the Ph.D. scholarship granted by the ANR project CYDEXCAR. The fluorescence confocal microscopy imaging facilities at the “Cellular Imaging” platform MIPSIT of SFR-UMS Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique, Châtenay-Malabry, are acknowledged.

Electronic Supplementary Information (ESI) available:

Additional schemes and results (**Figures S1 to S15**) and tables with experimental details (**Tables S1 to S5**) are included in ESI.

References

1. M. Roux, B. Perly, and F. Djedaïni-Pilard, *European Biophysical Journal*, 2007, **36**, 861-867.
2. L. Jiang, Y. Yan, and J. Huang, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **169**, 13–25.
3. F. Sallas, and R. Darcy R., *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, **6**, 957-969.
4. A. Gulik, H. Delacroix, D. Wouessidjewe and M. Skiba., *Langmuir*, 1998, **14**, 1050-1057.
5. L. Zerkoune, A. Angelova, and S. Lesieur, *Nanomaterials*, 2014, **4**, 741-765.
6. L. Choïnard, A. Gèze, C. Vanhaverbeke, J. B. G. Yaméogo, J.-L. Putaux, B. Brasme, L. Jullien, S. Boullanger, C. Elfakir and D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3031–3038.
7. L. Choïnard, A. Gèze, J.-L. Putaux, Y.-S. Wong, and D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 515–520.
8. J. B. G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choïnard, J.-L. Putaux, A. Gansané, S. B. Sirima, R. Semdé, and D. Wouessidjewe, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, **80**, 508–517.
9. B. M. D. C. Godinho, J. R. Ogier, A. Quinlan, R. Darcy, B. T. Griffin, J. F. Cryan, and C. M. Driscoll, *Int J. Pharmaceutics*, 2014, **473**, 105-112.
10. A. Angelova, C. Fajolles, C. Hocquelet, F. Djedaïni-Pilard, S. Lesieur, V. Bonnet, B. Perly, G. Le Bas, and L. Mauclair, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **322**, 304–314.
11. T. Wang, C. Chipot, X. Shao, and W. Cai, *Langmuir*, 2011, **27**, 91-97.
12. A. Klaus, C. Fajolles, M. Bauer, M. Collot, J.-M. Mallet, and J. Daillant, *Langmuir*, 2011, **27**, 7580–7586.
13. Y. Chen, and Y. Liu, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 495-505.
14. T. Sun, H. Zhang, L. Kong, H. Qiao, Y. Li, F. Xin, and A. Hao, *Carbohydrate Research*, 2011, **346**, 285–293.

15. M. Ramanathan, L. K. Shrestha, T. Mori, Q. Ji, J. P. Hill, and K. Ariga, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 10580–10611.
16. B. Angelov, A. Angelova, S.K. Filippov, T. Narayanan, M. Drechsler, P. Štěpánek, P. Couvreur, and S. Lesieur, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 1959–1964.
17. B. Angelov, A. Angelova, V. M. Garamus, M. Drechsler, R. Willumeit, R., Mutaftchieva, P. Štěpánek, and S. Lesieur, *Langmuir*, 2012, **28**, 16647–16655.
18. B. Angelov, A. Angelova, S.K. Filippov, G. Karlsson, N. Terrill, S. Lesieur, and P. Štěpánek, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9714–9720.
19. Y.-D. Dong, A. J. Tilley, I. Larson, M. Jayne Lawrence, H. Amenitsch, M. Rappolt T. Hanley, and B. J. Boyd, *Langmuir*, 2010, **26**, 9000-9010.
20. A. Yaghmur, B. Sartori, and M. Rappolt, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, **13**, 3115-3125.
21. B. Angelov, A. Angelova, S. K. Filippov, M. Drechsler, P. Štěpánek, and S. Lesieur, *ACS Nano*, 2014, **8**, 5216-5226.
22. B. Angelov, A. Angelova, R. Mutaftchieva, S. Lesieur, U. Vainio, V.M. Garamus, G. Jensen, and J.S. Pedersen, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 3073–3081.
23. A. Angelova, B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, M. Ollivon, and C. Bourgaux, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2005, **15**, 108-112.
24. B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. Lesieur, J.-F. Sadoc, M. Ollivon, and P. Couvreur, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 5813 - 5817.
25. B. Angelov, M. Ollivon, and A. Angelova, *Langmuir*, 1999, **15**, 8225.
26. A. Angelova, B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, C. Bourgaux and P. Couvreur, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3089-3093.
27. B. Angelov, A. Angelova, U. Vainio, V.M. Garamus, S. Lesieur, R. Willumeit, and P. Couvreur, *Langmuir*, 2009, **25**, 3734-3742.
28. A. Yaghmur, and M. Rappolt, *European Biophysics Journal*, 2012, **41**, 831-840.
29. A. Angelova, B. Angelov, M. Drechsler, V. M. Garamus, S. Lesieur, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **454**, 625–632.
30. B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. V. Hoffmann, V. Nicolas, and S. Lesieur, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 7676-7686.
31. J. B. G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choisnard, J.-L. Putaux, R. Semdé, and D. Wouessidjewe, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, **14**, 526–541.
32. Q.-D. Hu, G.-P. Tang, and P. K. Chu, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **7**, 2017–2025.
33. U. Kauscher, A. Samanta, and B. J. Ravoo, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2014, **12**, 600-606.
34. R.V. Vico, J. Voskuhl and B. J. Ravoo, *Langmuir*, 2011, **27**, 1391–1397.

35. F. Perret, C. Marminon, W. Zeinyeh, P. Nebois, A. Bollacke, J. Jose, H. Parrot-Lopez, and M. Le Borgne, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **441**, 491–498.
36. A. Mazzaglia, M. L. Bondi, A. Scala, F. Zito, G. Barbieri, F. Crea, G. Vianelli, P. Mineo, T. Fiore, G. Pellerito, L. Pellerito, and M. A. Costa, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3820–3829.
37. A. M. O’Mahony, D. Doyle, R. Darcy, J.-F. Cryan, and C. M. O’Driscoll, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, **47**, 896–903.
38. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, and A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.* 1999, **212**, 275-279.
39. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, and A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.* 1999, **212**, 280-285.
40. E. Bilensoy, O. Gürkaynak, A. L. Doğan, and A. A. Hıncal, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **347**, 163–170.
41. B. M. D. C. Godinho, J.-R. Ogier, R. Darcy, C. M. O’Driscoll, J. F. and Cryan, *Molecular Pharmaceutics*, 2013, **10**, 640–649.
42. J. Guo, K. A. Fisher, R. Darcy, J. F. Cryan and C. M. O’Driscoll, *Mol. BioSyst.*, 2010, **6**, 1143-1161.
43. M. Messner, S. V. Kurkov, P. Jansook, and T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* 2010, **387**, 199–208.
44. J. Zhang, and P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1215–1233.
45. L. Zerkoune, A. Angelova, L. Choisnard, A. Gèze, D. Wouessidjewe, and S. Lesieur, *ICOMF14 Proceedings*, MATEC Web of Conferences, EDP Sciences publisher, 2013, **4**, 05001.
46. L. Boulmedarat, G. Piel, A. Bochot, S. Lesieur, L. Delattre, E. Fattal, *Pharm. Research*, 2005, **22**, 962-971.
47. G. Chen, and M. Jiang, *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**, 2254-2266.
48. A. Gèze, S. Aous, I. Baussanne, J.-L. Putaux, J. Defaye, D. Wouessidjewe, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, **242**, 301-305.
49. A. Gèze, L. Choisnard, J. L. Putaux, D. Wouessidjewe, *Materials Science and Engineering C*, 2009, **29**, 458-462.
50. C. Zhou, X. Cheng, Q. Zhao, Y. Yan, J. Wang and J. Huang, *Langmuir*, 2013, **29**, 13175-13182.
51. C. Zhou, X. Cheng, Y. Yan, J. Wang, and J. Huang, *Langmuir*, 2014, **30**, 3381-3386.
52. T. Sun, J. Shen, H. Yan, J. Hao and A. Hao, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **414**, 41–49.
53. T. Sun, M. Ma, H. Yan, J. Shen, J. Su and A. Hao, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2013, **424**, 105– 112.

54. W. An, H. Zhang , L. Sun, A. Hao, J. Hao and F. Xin, *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 914–921.
55. C. Wang, Z. Wang and X. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 608–618.
56. P. Xing, T. Sun and A. Hao, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 24776-24793.
57. Y. Kang, K. Liu, and X. Zhang, *Langmuir*, 2014, **30**, 5989–6001.
58. L. Jiang, Y. Peng, Y. Yan and J. Huang, *Soft Matter*, 2011, **7**, 1726-1731.
59. V. Bernat, C. Ringard-Lefebvre, G. Le Bas, B. Perly, F. Djedaini-Pilard, and S. Lesieur, *Langmuir*, 2008, **24**, 3140-3149.
60. D. Gallois-Montbrun, G. Le Bas, S. Mason, A. Sax, T. Prange, and S. Lesieur, *Acta Crystallographica Section B*, 2013, **69**, 214-227.
61. Y. Wang, N. Ma, Z. Wang and X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 2823 –2826.
62. H. Zhang, Z. Liu, F. Xin, W. An, A. Hao, J. Li, Y. Li, L. Sun, T. Sun, W. Zhao, Y. Li, and L. Kong, *Carbohydrate Research*, 2011, **346**, 294–304.
63. T. Sun, Y. Li, H. Zhang, J. Li, F. Xin, L. Kong and A. Hao, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2011, **375**, 87–96.
64. L. Jiang, Y. Yan, M. Drechsler and J. Huang. *Chem. Commun.*, 2012, 48, 7347–7349.
65. C. Machut-Binkowski, F. Hapiot, R. Cecchelli, P. Martin, and E. A. Monflier, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2007, **57**, 567-572.
66. A. Rasheed, A. Kumar, and V. V. N. S. S. Sravanthi, *Sci Pharm.*, 2008, **76**; 567–598.
67. H. Agashe, P. Lagisetty, K. Sahoo, D. Bourne, B. Grady, and V. Awasthi, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 2609–2623.
68. Y. He, P. Fu, X. Shen, and H. Gao, *Micron*, 2008, **39**, 495–516.
69. F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria, and M. T. Sciortino, *Biomaterials*, 2009, **30**, 374–382.
70. M. Massaro, S. Piana, C. G. Colletti, R. Noto, S. Riela, C. Baiamonte, C. Giordano, G. Pizzolanti, G. Cavallaro, S. Milioto and G. Lazzara, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 4074-4081.
71. D. Duchene, G. Ponchel, and D. Wouessidjewe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, **36**, 29–40.
72. E. Lemos-Senna, D. Wouessidjewe, D. Duchêne, and S. Lesieur, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1998, **10**, 291-301.
73. S. Lesieur, D. Charon, P. Lesieur, C. Ringard-Lefebvre, V. Muguet, D. Duchêne, and D. Wouessidjewe, *Chem. Phys. Lipids*, 2000, **106**, 127-144.
74. C. Gervaise, V. Bonnet, O. Wattraint, F. Aubry, C. Sarazin, P.A. Jaffrès, and F. Djedaïni-Pilard, *Biochimie*, 2012, **94**, 66–74.
75. B. J. Ravoo, and R. Darcy, *Angew Chemie, International Edition*, 2000, **39**, 4324-4326.
76. P. Falvey, C. W. Lim, R. Darcy, T. Revermann, U. Karst, M. Giesbers, A. Marcelis, A. Lazar, A. W. Coleman, D. N. Reinhoudt, and B. J. Ravoo, *Chemistry-A European Journal*, 2005, **11**, 1171-1180.

77. S. Himmelein, N. Sporenberg, M. Schönhoff and B.J. Ravoo, *Langmuir*, 2014, **30**, 3988–3995.
78. D. Yong, Y. Luo, F. Du, J. Huang, W. Lu, Z. Dai, J. Yu, and S. Liu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, **105**, 31– 36.
79. A. Angelova, B. Angelov, R. Mutafchieva, and S. Lesieur, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2015, **25**, 214-232.
80. J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*. 1975, **72**, 1525-1550.
81. B. Angelov, A. Angelova, M. Drechsler, V. M. Garamus, R. Mutafchieva, and S. Lesieur, *Soft Matter*, 2015, **11**, 3686-3692.
82. M. Roux, E. Sternin, V. Bonnet, C. Fajolles, and F. Djedaïni-Pilard, *Langmuir*, 2013, **29**, 3677-3687.
83. P. J. Salústio, P. Pontes, C. Conduto, I. Sanches, C. Carvalho, J. Arrais, M. Cabral and M. H. Marques, *Pharm SciTech.*, 2011, **12**, 1276-1292.
84. J.G. Petrov, D. Mobius, and A. Angelova, *Langmuir*, 1992, **8**, 201.
85. J.G. Petrov, A. Angelova, and D. Mobius, *Langmuir*, 1992, **8**, 206.
86. J.G. Petrov, and A. Angelova, *Langmuir*, 1992, **8**, 3109.
87. A. Angelova, F. Penacorada, B. Stiller, T. Zetzsche, R. Ionov, H. Kamusewitz, and L. Brehmer, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 6790.
88. A. Angelova, J.G. Petrov, T. Dudev, and B. Galabov, *Colloids and Surfaces*, 1991, **60**, 351.
89. M. Cano-Sarabia, A. Angelova, N. Ventosa, and S. Lesieur, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **350**, 10.
90. L. Ferrer-Tasies, E. Moreno-Calvo, M. Cano-Sarabia, M. Aguilera-Arzo, A. Angelova, S. Lesieur, S. Ricart, J. Faraudo, N. Ventosa, and J. Veciana, *Langmuir*, 2013, **29**, 6519.
91. A. Angelova, B. Angelov, M. Drechsler, and S. Lesieur, *Drug Discovery Today*, 2013, **18**, 1263–1271.
92. A. Angelova, B. Angelov, S. Lesieur, R. Mutafchieva, M. Ollivon, C. Bourgaux, R. Willumeit, and P. Couvreur, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2008, **18**, 41-45.
93. G. Hungerford and J.A. Ferreira. *J. Lumin.*, 2001, **93**, 155–165.
94. R. A. Velapoldi, and H. H. Tonnesen, *J. Fluoresc.*, 2004, **14**, 465–472.
95. S. Rakshit, and S. Vasudevan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **7**, 1473-1479.
96. A. Okamoto, K. Tainaka, and Y. Fujiwara, *J. Organ. Chem.*, 2006, **71**, 3592-3598.
97. E. Iglesias, *Photochem.Photobiol.Sci.*, 2011, **10**, 531.
98. B. Jana, S. Ghosh and N. Chattopadhyay, *J. Photochem. Photobiol.*, 2013, **126**, 1-10.
99. C. Menager, D. Guemghar, V. Cabuil and S. Lesieur, *Langmuir* 2010, **26**, 15453–15463.

Electronic Supplementary Information

Multicompartment PEGylated Vehicles Involving Biotransesterified Amphiphilic Cyclodextrins: A Transition from Micelles to Supramolecular Deep Cavitand Assemblies

Leïla Zerkoune¹, Sylviane Lesieur¹, Jean-Luc Putaux², Luc Choisnard³, Annabelle Gèze³,
Denis Wouessidjewe³, Valérie Nicolas⁴, Angelina Angelova^{1,*}

¹CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, Univ Paris-Sud 11, Labex LERMIT,
92296 Châtenay-Malabry, France;

²CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, 38041 Grenoble, France;

³DPM, CNRS UMR 5063, ICMG FR 2607, UFR of Pharmacy, University of Grenoble,
38041 Grenoble, France;

⁴MIPSIT, UMS-IPSIT, Univ Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France.

*Corresponding Author: Angelina.Angelova@u-psud.fr

I. Additional experimental details on β CD- n C₁₀ nanoparticles fabrication

Figure S1. Schematic presentation of the thin film method for β CD- n C₁₀/surfactant and NR/surfactant/ β CD- n C₁₀ nanoparticles synthesis through hydration of β CD- n C₁₀ or β CD- n C₁₀/NR films by micellar surfactant solutions (degree of β -CD substitution $n=7.3$).

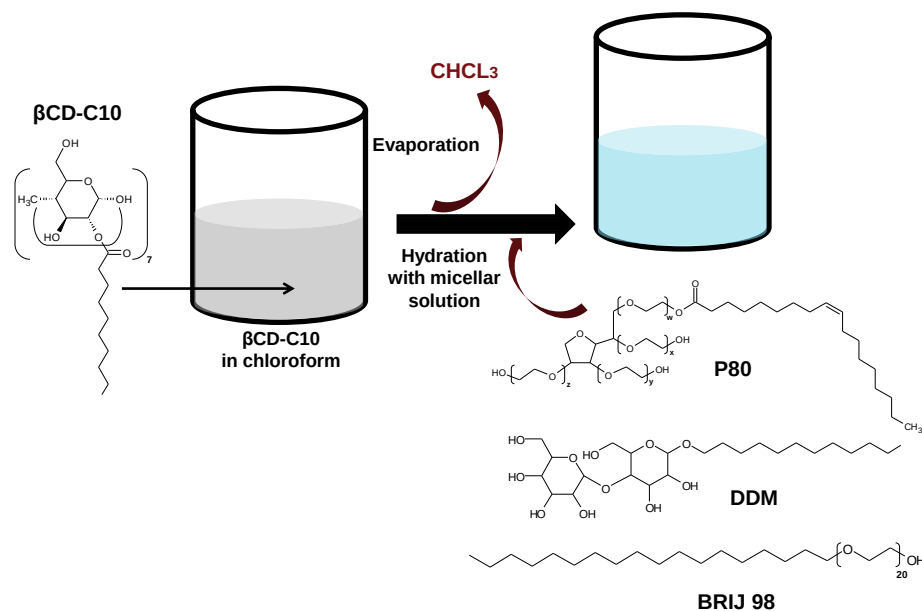
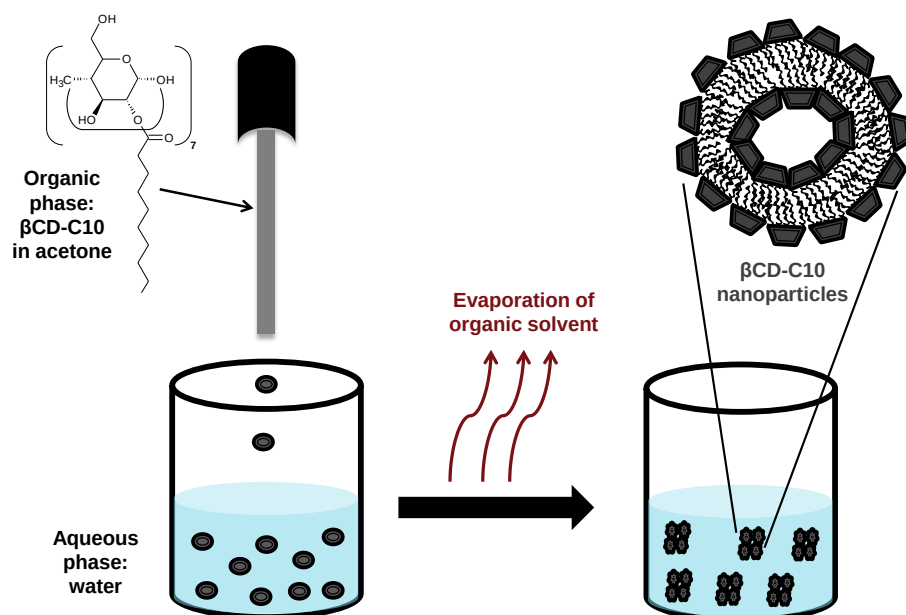


Figure S2. Principle of the nanoprecipitation method for β CD- n C₁₀ ($n=7.3$) nanosphere synthesis.



II. General physico-chemical characteristics

Table S1. Critical micellar concentrations (CMC) of the investigated surfactants.

Detergents	Critical Micellar Concentration (CMC)
P80	0,012 mM
DDM	0, 15mM
BRIJ 98	0,265 mM

III. Additional results from quasi-elastic light scattering

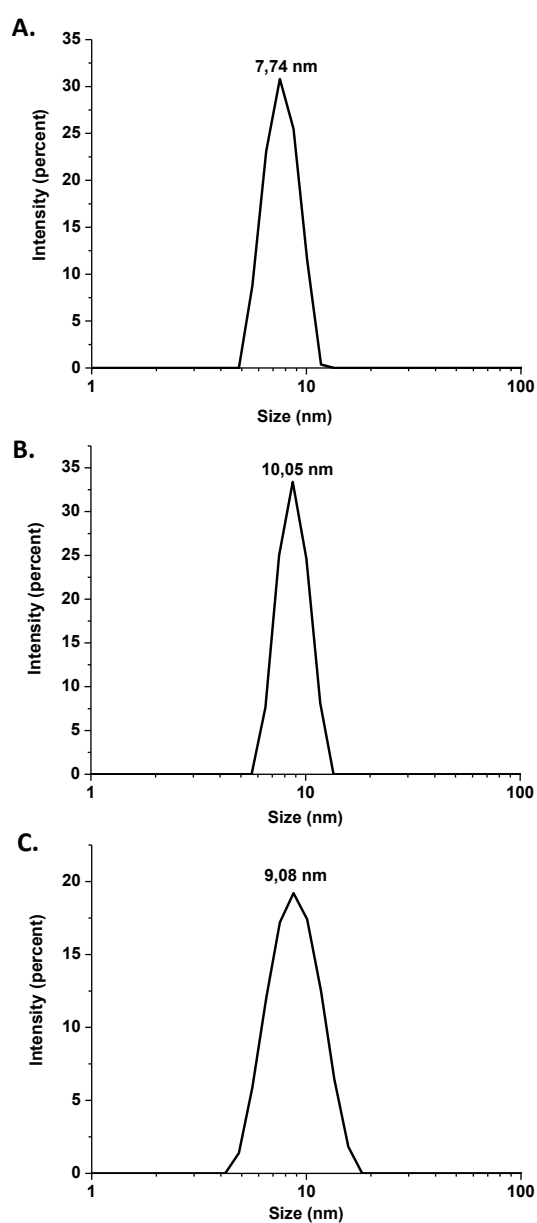
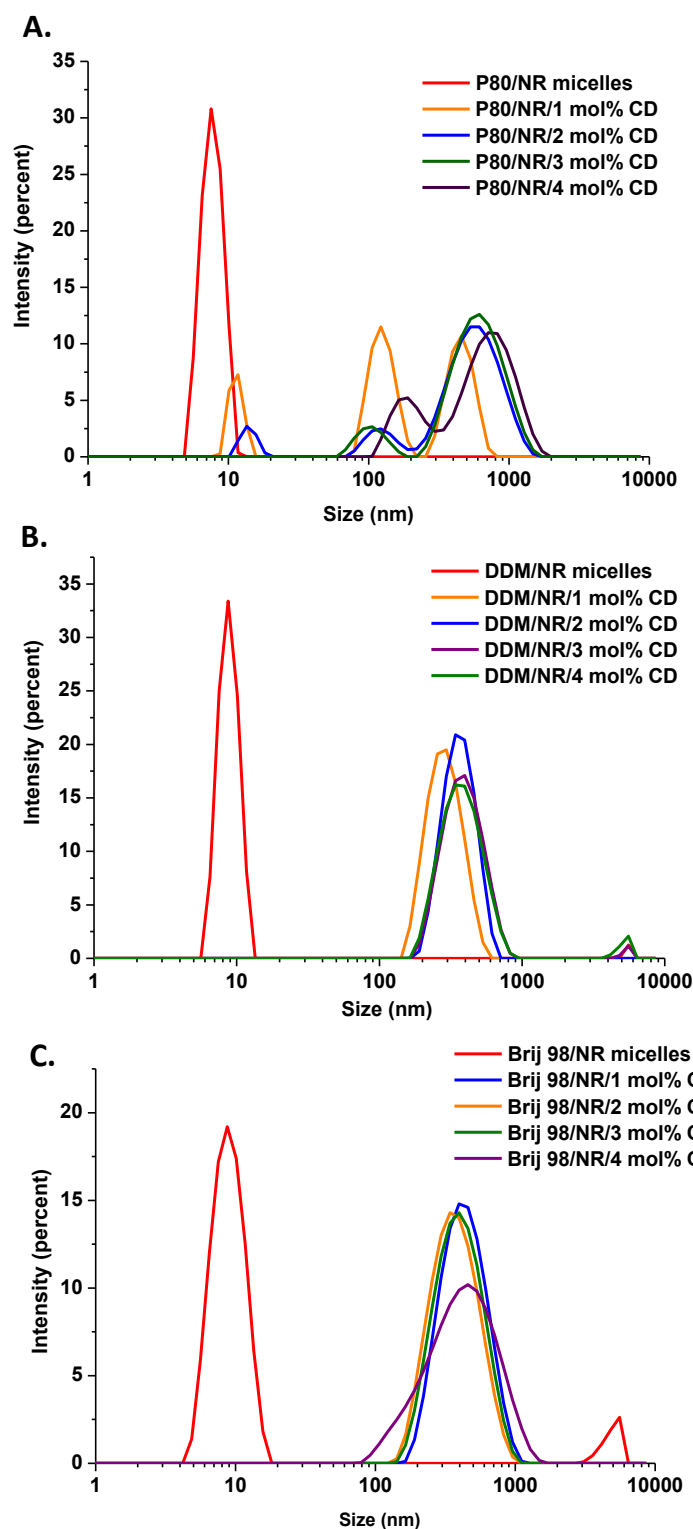


Figure S3. Comparison of size distributions plots (determined from intensity measurements by quasi-elastic light-scattering) of amphiphilic nano-objects formed in self-assembled mixtures of Nile red (NR) and micelles of polysorbate 80 (P80), n-dodecyl-β-D maltoside (DDM), and Brij®98: (A) NR/P80, (B) NR/DDM, and (C) NR/Brij®98. The solution concentrations of the surfactant micelles are equal to CMC×10 (see **Table S1 for the CMC values of the surfactants**).

Figure S4. Comparison of size distributions plotted from intensity measurements of multicomponent (A) NR/ β CD-nC₁₀/P80, (B) NR/ β CD-nC₁₀/DDM, and (C) NR/ β CD-nC₁₀/Brij®98 nano-objects obtained by self-assembly. The quantity of the amphiphilic cyclodextrins varied from 0 to 4 mol% for a constant NR content (2 mol%) with regard to the surfactant constituents. The red plots indicate the mean size of the surfactants aggregates in the absence of β CD-nC₁₀ (CD).



IV. Additional results from fluorescence spectroscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments

Figure S5. Comparison of fluorescence excitation and emission spectra of Nile red in (A) polysorbate 80 (P80), (B) n-dodecyl- β -D maltoside (DDM), and (C) Brij®98 micellar solutions with concentrations equal to CMC $\times$ 10 (see Table S1 for the CMC values of the surfactants). The NR concentration is 2 mol% with respect to the surfactant components. The measurements were performed with excitation wavelengths of λ_{ex} =546 nm for NR in P80 micelles, λ_{ex} =562 nm for NR in DDM micelles, and λ_{ex} =578 nm for NR in Brij®98 micelles.

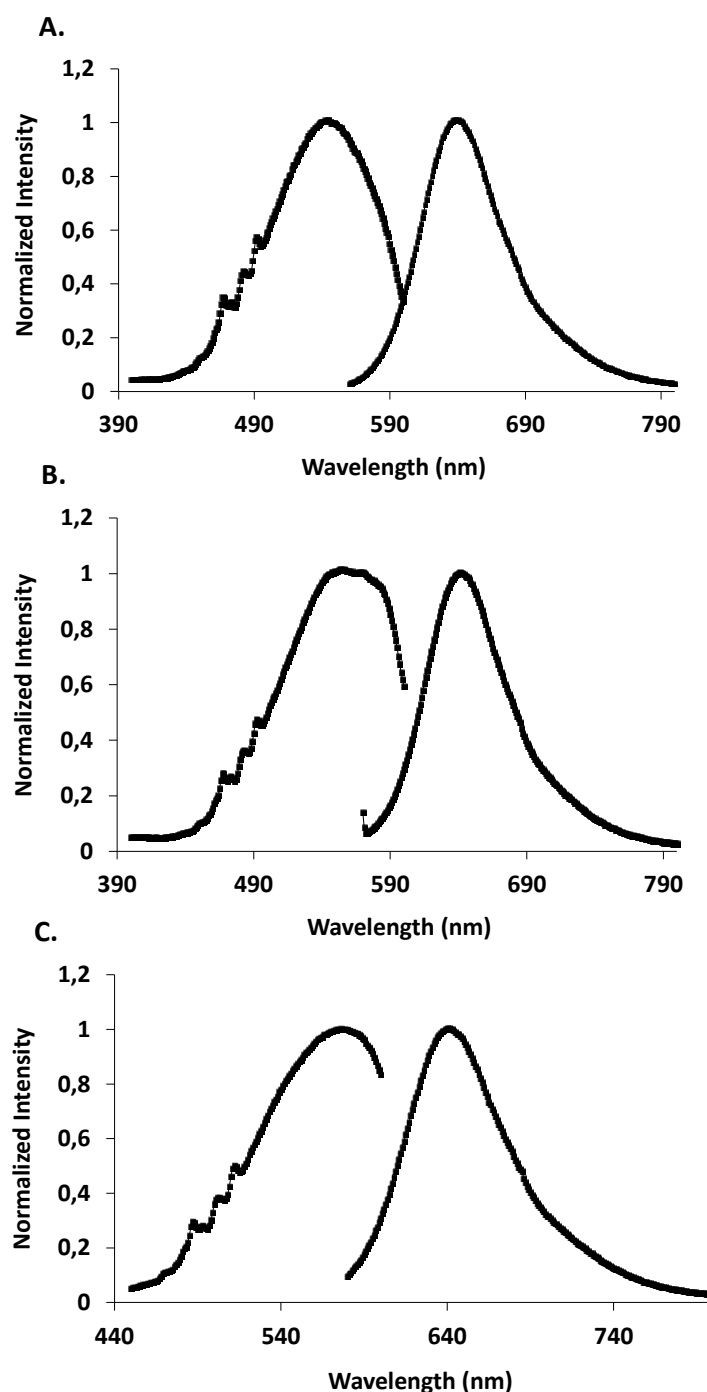


Figure S6. Fluorescence spectra of Nile red (normalized plots) in solvents with different polarities showing the solvatochromic response of the dye and the displacement of its fluorescence emission maximum as a function of the dielectric constant (ϵ) of the solvent (**Table S2**).

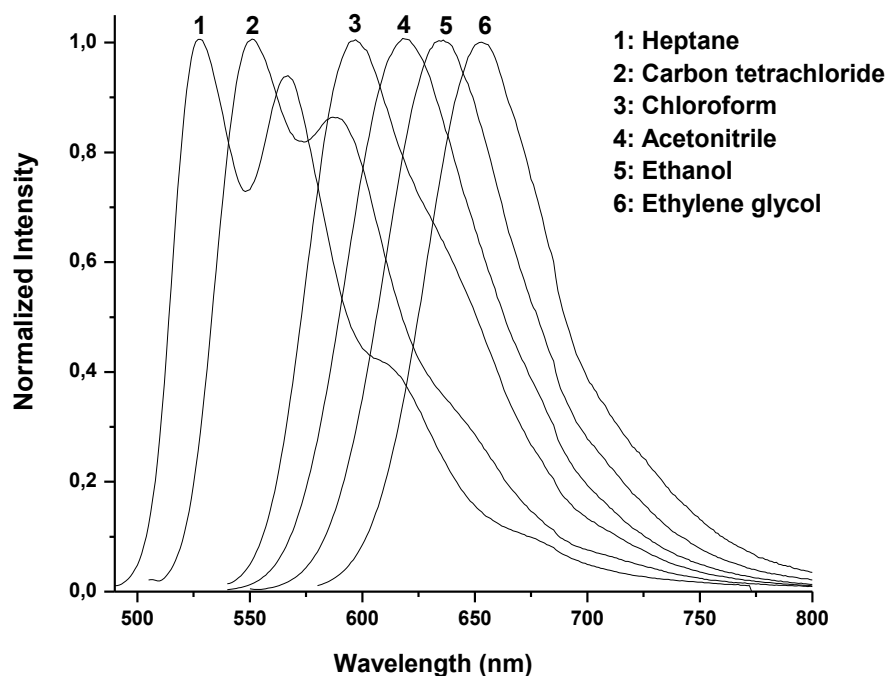


Table S2. Dielectric constants (ϵ) of the investigated solvents.

Organic solvents	Dielectric constant (ϵ)
Heptane	1.92
Carbon tetrachloride	2.24
Chloroform	4.81
Acetonitrile	37.5
Ethanol	24.5
Ethylene glycol	37

Figure S7. Comparison of the normalized spectra of Nile red fluorescence emission in solvents (see Fig. S6 and Table S2) with different polarities (black plots) and the corresponding spectra in three types of micellar solutions (red plots).

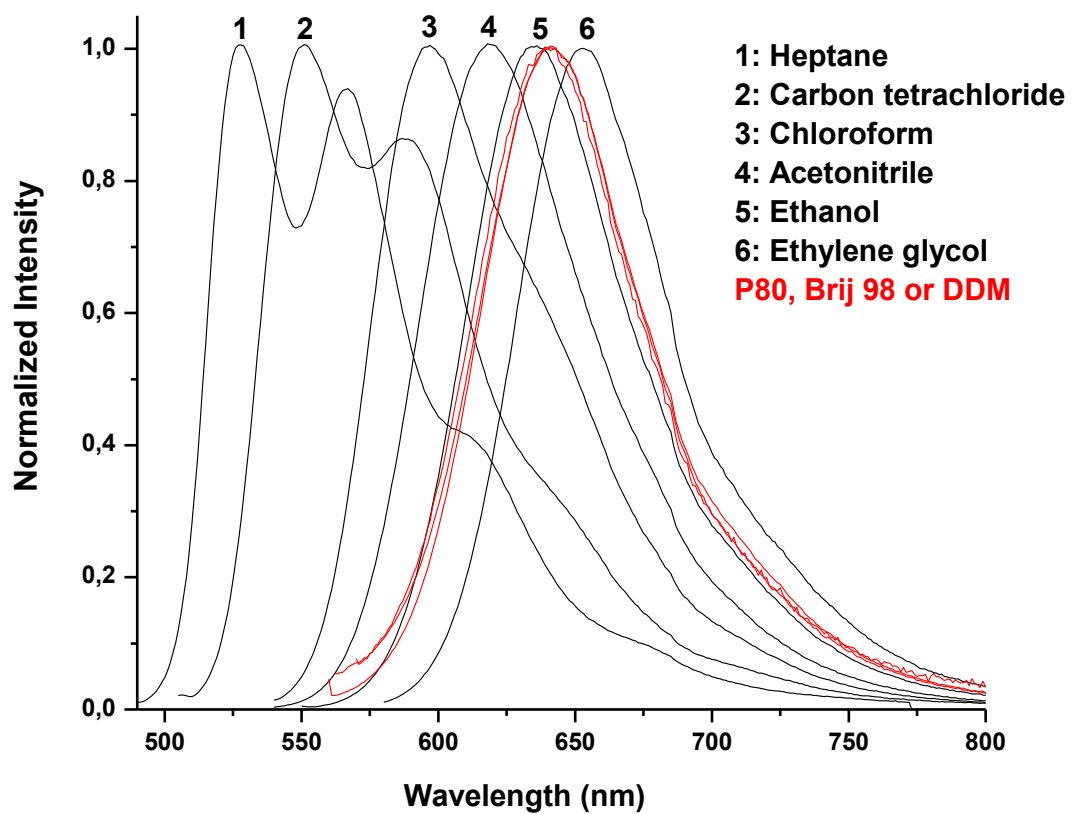


Figure S8. Comparison of fluorescence emission spectra of Nile red in mixed nano-objects formed by (A) NR/ β CD-nC₁₀/P80, (B) NR/ β CD-nC₁₀/DDM, and (C) NR/ β CD-nC₁₀/Brij®98 self-assembled mixtures in excess aqueous phase. The quantity of the amphiphilic cyclodextrins varied from 0 to 4 mol% at a constant NR content (2 mol%) with regard to the surfactant constituents. The excitation wavelengths of NR were 546 nm (A), 562 nm (B), and 578 nm (C), respectively.

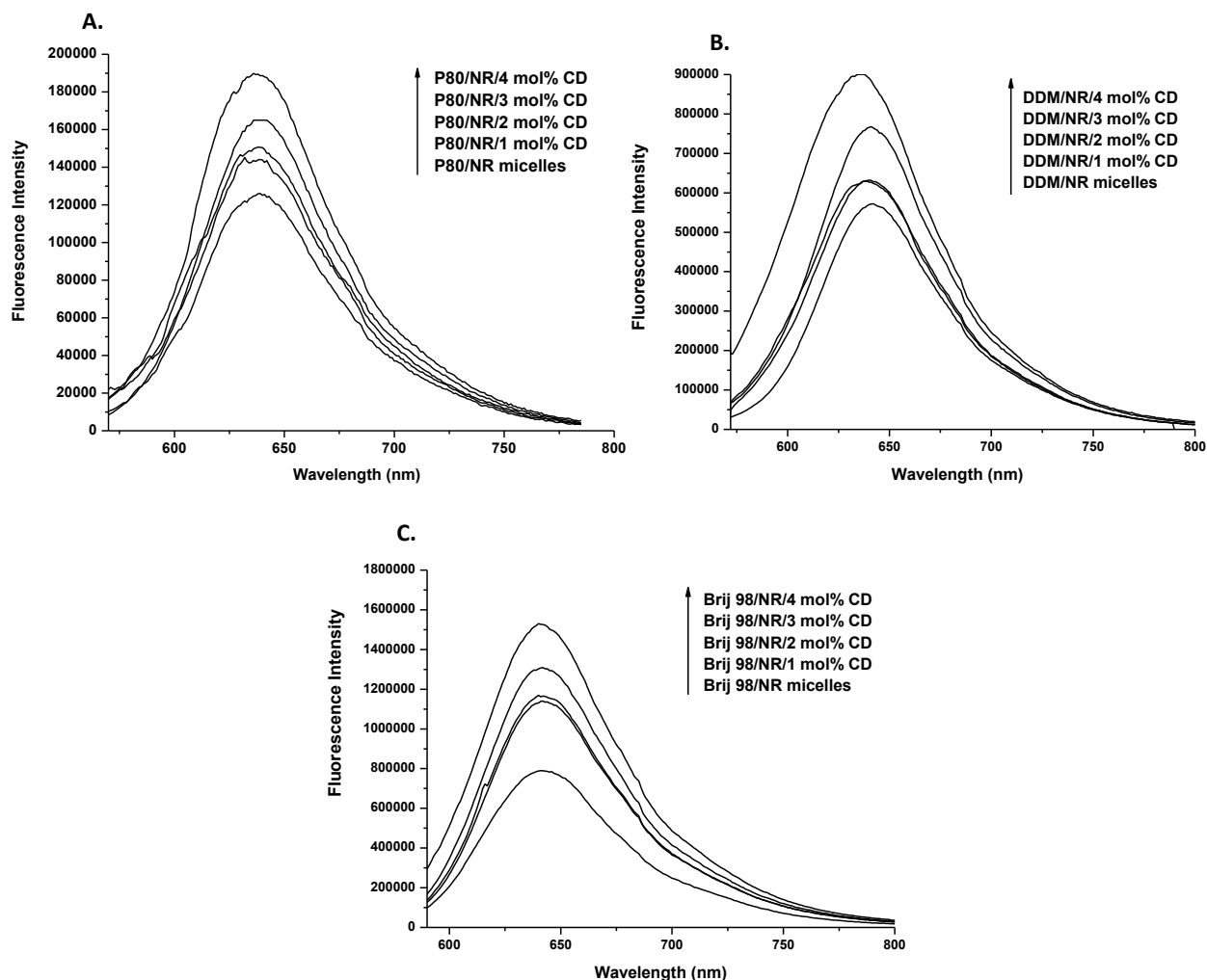


Figure S9. Comparison of the normalized emission and excitation spectra of Nile red (red curves) and acriflavine (green curves) in nanostructured micellar environment (polysorbate 80).

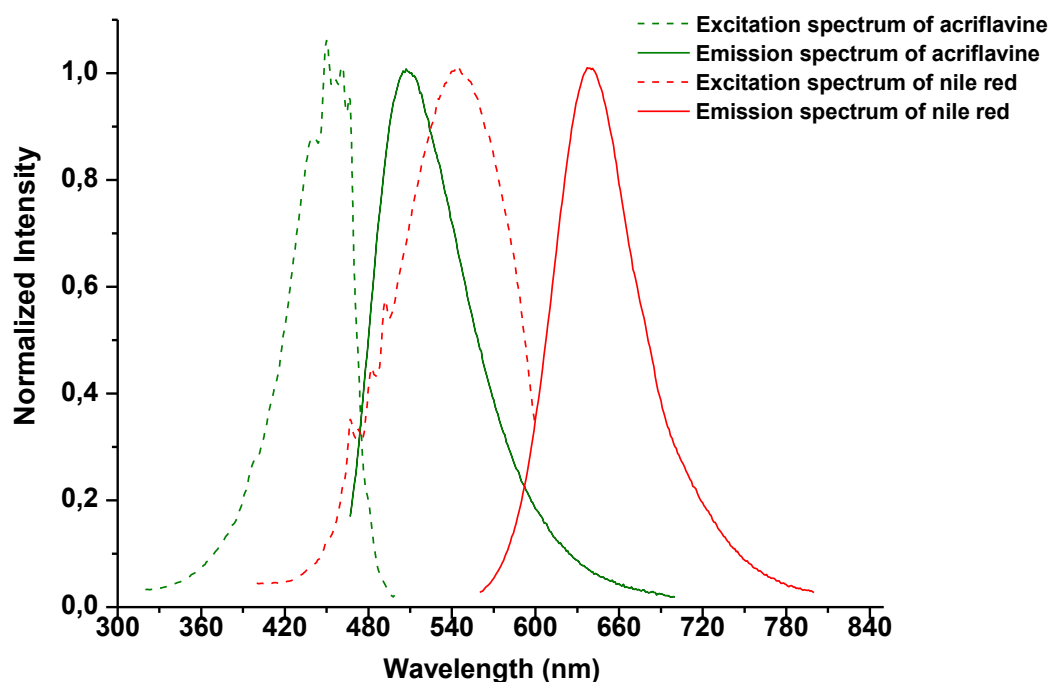


Figure S10. Methodological rationale of the FRET experiments with a plot demonstrating the overlapping spectra of the fluorescence emission of acriflavine (donor dye, green plots) and the absorption of Nile red (acceptor dye, red plots) in nanostructured micellar environment (polysorbate 80).

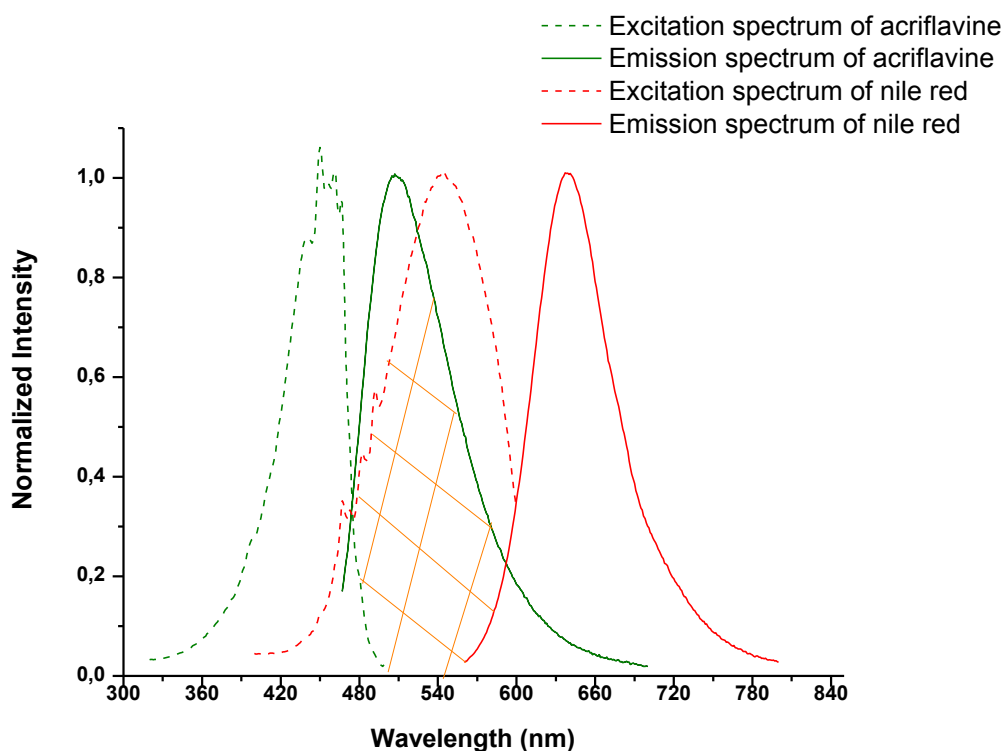


Figure S11. Further details of the methodology of the FRET experiments, in which the intensity I_0/I ratios are determined from fluorescence intensities measurements at progressively increasing concentrations of the acceptor dye Nile red, [NR], at a constant donor dye (acriflavine) concentration. I_0 is the fluorescence emission intensity of the donor dye in the absence of the acceptor dye (dotted lines), and I is the fluorescence emission intensity of the donor dye in the presence of the acceptor dye. A maximal decrease of the fluorescence intensity of the donor dye (I_4), *i.e.* maximal FRET, is observed at maximal acceptor dye concentration [NR]. The fluorescence resonance energy transfer (FRET) from acriflavine to Nile red is studied in nanostructured media of (A) NR/P80, (B) NR/DDM, and (C) NR/ Brij®98 micellar assemblies.

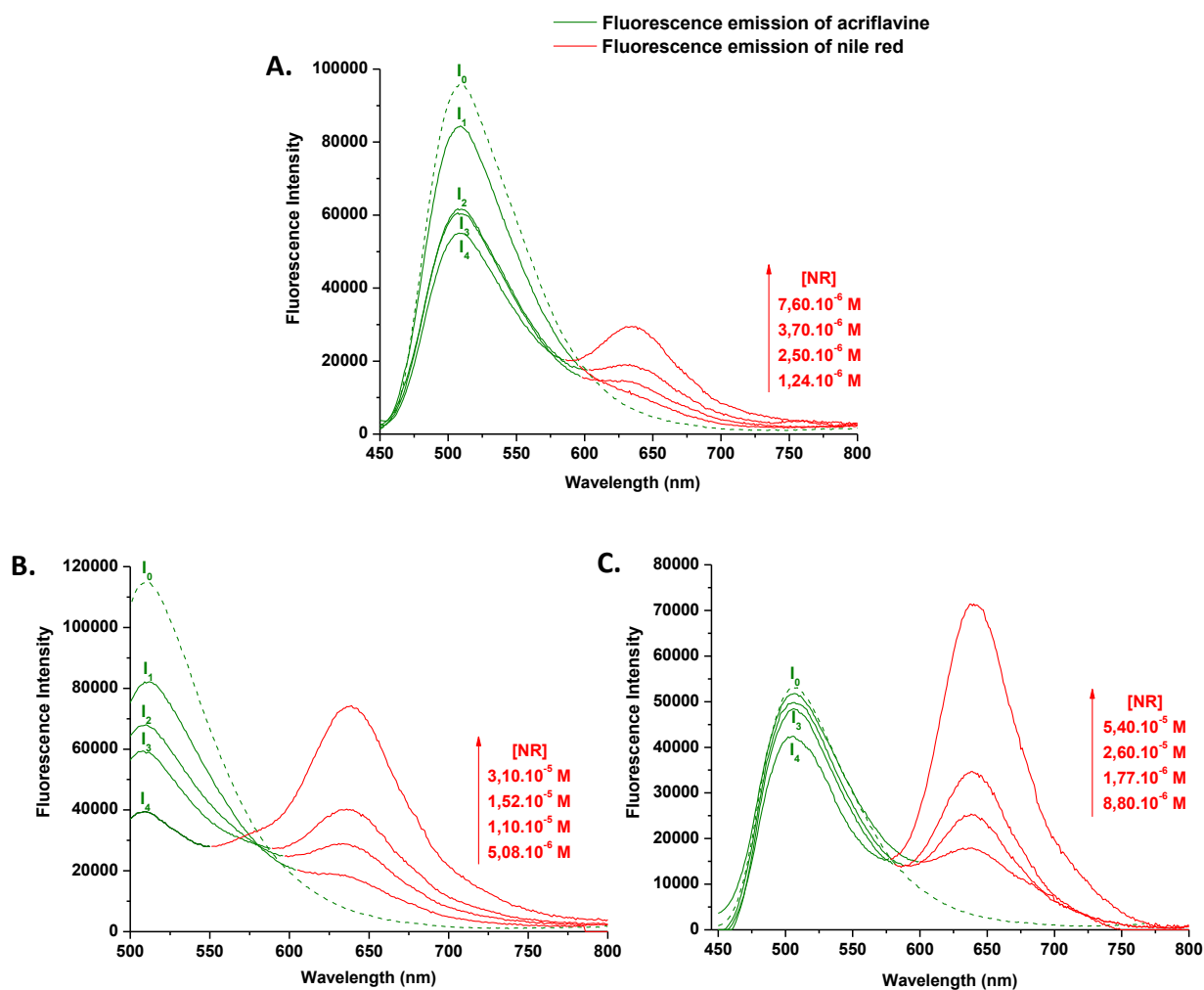


Figure S12. FRET efficiency plots showing the intensity I_0/I ratios *versus* the Nile red (RN) molar percent quantity (mol%) in micellar solutions of P80, DDM and Brij®98.

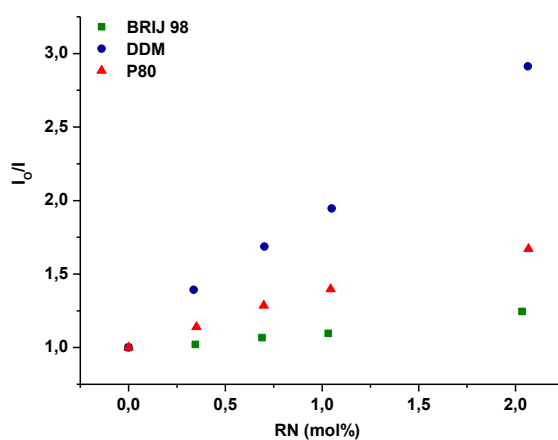


Figure S13. FRET efficiency plots showing the intensity I_0/I ratios *versus* the β CD- nC_{10} (CD) molar percent quantity (mol%) in micellar solutions of P80, DDM and Brij®98 at a constant content of Nile red (2 mol%).

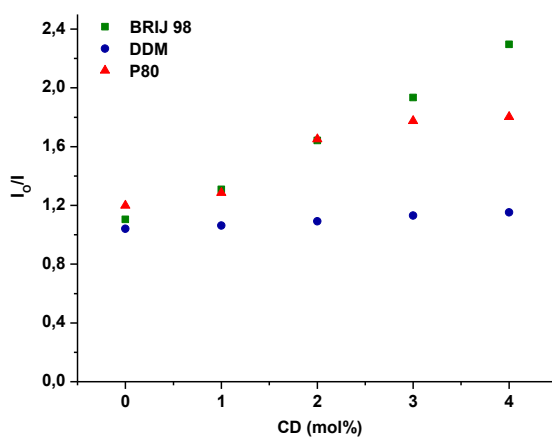
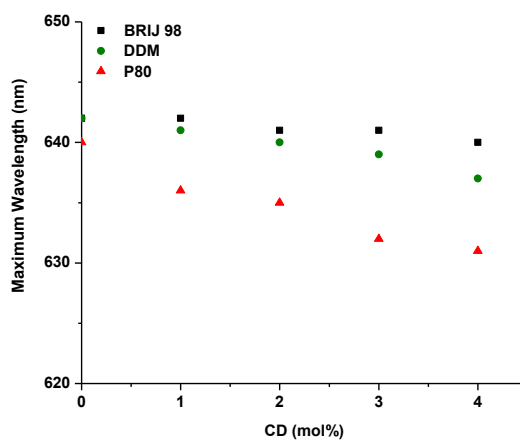


Figure S14. Dependence of the wavelength of the maximal fluorescence emission (λ_{max}) on the β CD- nC_{10} (CD) content in the nano-objects.



V. Additional results from β CD- n C₁₀ nanosphere solubilization studies

Figure S15. Determination of the compositions of the mixed nano-aggregates studied by cryo-TEM imaging from the solubilization state diagrams of $[\beta$ CD- n C₁₀] versus [P80] (A), [DDM] (B), or [Brij®98] (C) measured from optical density (OD) data at $\lambda=400$ nm during continuous addition of surfactant micellar phases to β CD- n C₁₀ nanospheres.

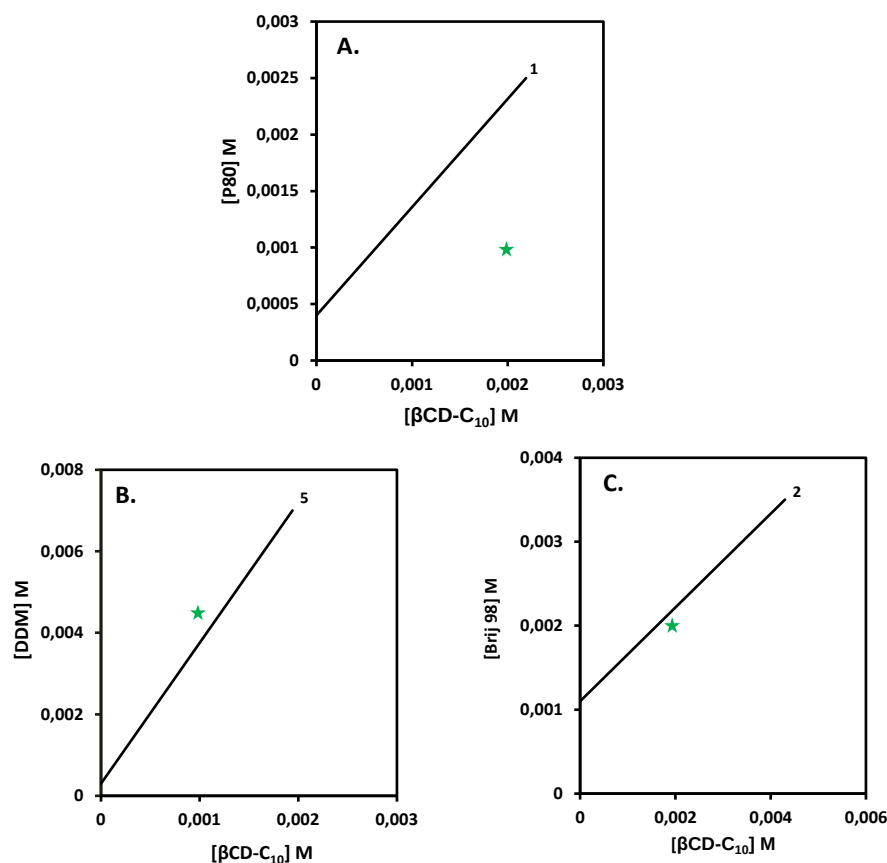


Table S3. Molecular ratios (R_{ag}) in mixed β CD- n C₁₀/P80 surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[P80]_{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates.

Break point	R_{ag}	$[P80]_{aq}$ M
1	0,9579	0,0004
2	5,4276	0,0085
3	10,453	0,0271
4	16,886	0,0341
5	17,257	0,0391

Table S4. Molecular ratios (R_{ag}) in mixed β CD- nC_{10} /DDM surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[DDM]_{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates.

Break point	R_{ag}	$[DDM]_{aq}$ M
1	1,3209	0,00009
2	1,4274	0,0002
3	1,8999	0,0003
4	1,9812	0,0003
5	3,4488	0,0003

Table S5. Molecular ratios (R_{ag}) in mixed β CD- nC_{10} /Brij 98 surfactant supramolecular aggregates corresponding to the characteristic break points during the solubilization of cyclodextrin nanospheres and the partitioning of the surfactant molecules ($[Brij\ 98]_{aq}$) between the aqueous phase and the generated mixed nanoaggregates.

Break point	R_{ag}	$[Brij\ 98]_{aq}$ M
1	0,1008	0,0005
2	0,5581	0,0011

VI. References

1. Gulik, A., Delacroix, H., Wouessidjewe, D., and Skiba, M., Structural properties of several amphiphile cyclodextrins and some related nanospheres. An X-ray scattering and freeze-fracture electron microscopy study. *Langmuir* 1998, 14, 1050-1057.
2. Angelov, B., Ollivon, M., and Angelova, A., X-ray diffraction study of the effect of the detergent octyl glucoside on the structure of lamellar and nonlamellar lipid/water phases of use for membrane protein reconstitution. *Langmuir*, 1999, 15, 8225-8234.
3. Israelachvili, N.J., Mitchell D.J., Ninham B.W., Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1975, 72, 1525-1550.
4. Salústio, P.J., Pontes P., Conduto C., Sanches I., Carvalho C., Arrais J., Cabral M. H. Marques., Advanced technologies for oral controlled release: Cyclodextrins for oral controlled release. *Pharm Sci Tech.* 2011, 12, 1276-1292.
5. Karjibana, R.A., Basria M., Rahmana M.B.A., Salleh A.B., Structural properties of nonionic Tween80 micelle in water elucidated by molecular dynamics simulation. *APCBEE Procedia*, 2012, 3, 287-297.
6. Ribeiro, E.N.P.M., De Moura C.L., Vieira M.G.S., Gramosa N.V., Chaibundit C., De Mattos M.C., Attwood D., Yeates S.G., Nixon S.K., Ricardo N.M.P.S., Solubilisation capacity of Brij surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 436, 631–635.
7. Warr, G.G., Drummond C.J., Grieser F., Ninham B.W., Evans D.F., Aqueous solution properties of nonionic n-dodecyl beta-D-maltoside micelles. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 4581-4586.
8. Seras, M., Edwards, K., Almgren, M., Carlson, G., Ollivon, M., Lesieur, S. Solubilization of nonionic monoalkyl amphiphile–cholesterol vesicles by octyl glucoside: Cryo-transmission electron microscopy of the intermediate structures. *Langmuir*, 1996, 12, 330–336.
9. Menager, C., Guemghar, D., Cabuil, V., Lesieur, S. Interaction of n-octyl β -D-glucopyranoside with giant magnetic-fluid-loaded phosphatidylcholine vesicles: direct visualization of membrane curvature fluctuations as a function of surfactant partitioning between water and lipid bilayer. *Langmuir* 2010, 26, 15453–15463.
10. Lichtenberg, D., Barenholz, J. *Methods Biochem. Anal.*, 1988, 33, 337.
11. Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre, M. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1508, 34.
12. Ollivon, M., Eidelman, O., Blumenthal, R., Walter, A. Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry*, 1988, 27, 1695.
13. Lichtenberg, D. Characterisation of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 821, 470.
14. Paternostre, M., Meyer, O., Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S. Ghanam, M. and Ollivon, M. Partition coefficient of a surfactant between aggregates and solution : application to the

- micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl-D-glucopyranoside. *Biophys. J.*, 1995, 69, 2488.
15. Andelman, D., Kozlov, M.M., and Helfrich, W. Phases transitions between vesicles and micelles driven by competing curvatures. *Europhys. Lett.* 1994, 25, 231.
 16. Ueno, M. Partition behavior of non-ionic detergent octyl glucoside, between membrane and water phases, and its effect on membrane permeability. *Biochemistry*, 1989, 28, 5631.

Études des nano-assemblages mixtes constitués de cyclodextrines amphiphiles bioestérifiées, de monooléine et de polysorbate 80

Certains lipides lyotropes tels que typiquement la monooléine s'organisent spontanément dans l'eau pour former des structures bicontinues fortement hydratées, résultat du repliement régulier d'une membrane emprisonnant un réseau de canaux aqueux dont la topologie est parfaitement ordonnée. Ces architectures particulières de symétrie généralement cubique, présentent une très grande surface spécifique et un fort pouvoir d'encapsulation vis-à-vis de substances hydrosolubles, notamment des biomolécules telles que protéines, peptides ou acides nucléiques. Ces phases peuvent être avantageusement dispersées sous forme de particules individuelles submicroniques, les cubosomes qui, une fois PEGylés par addition d'un co-lipide porteur de chaînes de poly(éthylène glycol), présentent une excellente stabilité.

L'idée directrice de cette seconde étude était de faire évoluer ces systèmes déjà bi-compartimentés par nature (canaux aqueux enchevêtrés au sein d'une membrane lipidique) en leur ajoutant un autre compartiment par introduction, au sein de leur structure, du dérivé β CD-C10 doté d'une cavité hydrophobe a priori propice à l'inclusion de substances peu polaires. Il s'agissait donc de trouver des conditions (composition des systèmes, procédé de mélange des constituants) offrant la possibilité d'obtenir des mésophases mixtes monooléine/co-lipide PEGylé/ β CD-C10 de structure cubique bicontinue et conduisant aisément à des nano-objets stables.

Une première démarche exploratoire non décrite dans le manuscrit nous a permis de sélectionner le polysorbate P80 comme co-lipide PEGylé. L'insertion de cyclodextrine amphiphile dans la matrice mixte monooléine/P80 en excès d'eau, compatible avec la formation d'une phase lamellaire mixte en coexistence avec une phase cubique bicontinue mixte, a été caractérisée par microscopie électronique par cryo-transmission (cryo-MET) et diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). En particulier l'observation directe des systèmes par cryo-MET a révélé la formation quasi-spontanée (faible apport d'énergie mécanique) de vésicules en équilibre avec des cubosomes. Des analyses en diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) ont parallèlement mis en évidence une bonne reproductibilité des préparations et un enrichissement en cubosomes de ces dernières lorsque la cyclodextrine était incorporée.

Sur la base de ces résultats et dans le but d'explorer la disponibilité des différents compartiments de ces nouveaux édifices supramoléculaires pour inclure une substance hôte hydrophobe, nous avons examiné le cas d'un chromophore modèle sensible à la polarité de son environnement et apte à s'inclure dans la cavité de la β -cyclodextrine, l'Oil Red. Des expériences de spectrophotométrie d'absorption UV-visible ont ainsi été effectuées pour caractériser la nano-encapsulation de ce chromophore.

Article soumis pour publication à *Soft Matter*

Mesoporous self-assembled nanoparticles of biotransesterified cyclodextrins and nonlamellar lipids as carriers of water-insoluble substances

Leïla Zerkoune¹, Sylviane Lesieur¹, Jean-Luc Putaux², Luc Choisnard³, Annabelle Gèze³, Denis Wouessidjewe³, Borislav Angelov⁴, Corinne Nardin⁵, James Douth⁶, and Angelina Angelova^{1,*}

¹CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, Labex LERMIT, Univ Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France,

²CERMAV, UPR CNRS 5301, ICMG FR 2607, 38041 Grenoble, France,

³DPM, CNRS UMR 5063, ICMG FR 2607, UFR of Pharmacy, University of Grenoble, 38041 Grenoble, France,

⁴Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 16206 Prague, Czech Republic,

⁵Laboratory of Macromolecular Self-Assembly, Université de Genève, CH-1211 Genève 4, Switzerland,

⁶Diamond Light Source Ltd., Didcot, Oxfordshire, OX11 0DE, UK.

**Corresponding Author: Angelina.Angelova@u-psud.fr*

Abstract

Soft mesoporous hierarchically structured particles are created by self-assembly of an amphiphilic deep cavitand cyclodextrin β -CD- n C₁₀ (degree of substitution $n=7.3$), with a nanocavity grafted by multiple alkyl (C₁₀) chains on the secondary face of the β -CD macrocycle through enzymatic biotransesterification, and the nonlamellar lipid monoolein (MO). The effect of the dispersing agent polysorbate 80 (P80) on the liquid crystalline organization of the nanocarriers and their stability is studied in the context of the vesicle-to-cubosome transition. The coexistence of small vesicular and nanosponge membrane objects with bigger nanoparticles of inner cubic lattice multicompartiment structure is established as a typical feature. The performed cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) and small-angle X-ray scattering (SAXS) structural investigations reveal the dependence of the internal organization of the self-assembled nanoparticles on the presence of embedding β -CD- n C₁₀ deep cavitands in the lipid bilayers. UV-Vis spectroscopy is employed to characterize the nanoencapsulation of a model hydrophobic dimethylphenylazo-naphthol guest compound (Oil red) in the created dual porosity nanocarriers. The obtained results indicate that the incorporated amphiphilic β -CD- n C₁₀ building blocks stabilize the cubic lattice packing of the lipid membrane particles characterized by nanochannel diameters of around 4 nm, whereas the β -CD nanocavities impart nanoporosity of 0.8 nm in the hierarchical structure. Thus, cyclodextrin-driven nonlamellar amphiphile nanoarchitectonics may create dual porosity carriers that display structural features beyond the traditional cyclodextrin nanosponges. In perspective, these dual porosity carriers should be suitable for co-encapsulation and sustained delivery of peptide or protein biopharmaceuticals together with small molecular weight drug compounds or imaging agents.

Key words: liquid crystalline nanoparticles, dual porosity multicompartiment nanocarriers, amphiphilic biotransesterified cyclodextrins, self-assembly, nanodrugs, Oil red, cryo-TEM, SAXS

Introduction

Biocompatible mesoporous hierarchically ordered nanoarchitectures are highly desirable for modern applications involving multi-material building blocks.¹⁻⁵ Among them, liquid crystalline phases and nanocarriers display considerable advantages for transport and delivery of diverse kinds of active molecules and pharmaceuticals.⁶⁻¹¹ Soft porous nanoarchitectures with tunable properties may be easily fabricated by self-assembly of lipids and amphiphiles of appropriate chemical structures and functionalities.¹²⁻¹⁵ The nanoporous organization of the carriers may be particularly efficient for encapsulation and protection of fragile hydrophobic guest molecules of various dimensions.¹⁶

PEGylated cubosome, hexosome and spongosome liquid crystalline particles formed upon hydration of nonlamellar lipid mixtures have demonstrated high capacity for entrapment of protein, DNA and siRNA therapeutics as well as of small molecular weight compounds.^{3-9,11} Depending on the lipid type, the cubic lattice parameters of the mesostructures have determined nanopore sizes in the range between 2 and 7 nm.^{4,11-13} Thus, the aqueous channel networks in the cubosome carriers govern the molecular uptake and diffusion of hydrosoluble guest entities.^{4,11-13} The release of the encapsulated molecules may occur in a controlled manner as a function of the internal structural organization of the nanovehicles.^{1,3,10,15} Lipid-membrane based nanochannelled carriers (*e.g.* cubosomes and spongosomes) have been used for solubilization of hydrophobic guest compounds as well. Entrapment efficiencies as high as 85% have been reported for bioactives of low aqueous solubilities.^{1,5-8}

Besides nanochannelled lipid-based vehicles, nanoporous materials shaped as nanosponges have been fabricated from β -cyclodextrins (CD).¹⁷ Cyclodextrin nanosponges and cyclodextrin-based hybrid assemblies have shown interesting properties for multi-drug delivery, which may combine bioactives exerting additive therapeutic effects.¹⁸⁻²⁴ In these studies, the affinity of the drugs for the CD nanocavity has been of crucial importance for the inclusion complexation in nanostructured environment.^{18,19} On the other hand, the encapsulation capacity of the carriers for hydrophobic drugs might be limited by the size of the β -CD nanocavity, which is around 0.8 nm (**see Table S1 in ESI**).

Towards fabrication of novel kinds of amphiphilic cyclodextrin nanostructures, engineering of the primary and the secondary faces of native cyclodextrin macrocycles has been performed through enzymatic biotransesterification or by chemical modifications.²⁵⁻³² It has been shown that cyclodextrin deep cavitands of amphiphilic nature may self-assemble into nanoparticles alone or in combinations with other amphiphiles.^{18,25-30} Deep cavitand building blocks have easily formed mixed nanoassemblies with lipids.^{16,29} Nanostructured supramolecular cyclodextrin scaffolds have been studied in diverse nanomedical applications aiming at targeting of the blood brain barrier (BBB), healing of neurodiseases, gene transfection, gene silencing, phototherapy, and transport of anti-cancer drugs.^{18-24,32}

Recently, nanocarriers of a dual porosity type have been designed through encapsulation of membrane barrel proteins, such as the porin OmpF, in an inverted hexagonal liquid crystalline lipid

phase.² The latter involves hexagonally packed aqueous tubes surrounded by lipid monolayers. The water-filled pores, engineered *via* the OmpF barrels in the lipid phase, are characterized by a diameter of around 1.1 nm. Low OmpF amounts of 0.24 wt% and 0.5 wt% have been sufficient to induce the formation of perforated mesophases in the monolinolein-tetradecane-OmpF system and to essentially modify its transport properties.²

An alternative possibility to augment the nanoporosity of the lipid carriers is to employ deep cavitand vase-like molecules¹⁶ and nanoarchitectonics and interfacial engineering principles.^{33,34} Embedded deep cavitands may control the entrapment of large hydrophobic molecules in the generated multicompartiment host lipid reservoirs. Thus, the inclusion of deep-cavitand building blocks in amphiphilic nanocarriers may enhance the stability of encapsulated fragile hydrophobic molecules, and in some cases, their photophysical properties.^{29a} It may be suggested that nanoporous lipid/cyclodextrin assemblies will be excellent systems for solubilization and protection of instable drugs. As a matter of fact, controlled drug delivery systems, used for co-delivery or multi-drug delivery, can strongly improve the therapeutic outcomes through synergistic effects.³⁵⁻³⁸

The present work employs cyclodextrin-driven amphiphile nanoarchitectonics to design dual-porosity type nanocarriers of soft nature through self-assembly of the nonlamellar monoglyceride lipid monoolein (MO) with the vase-like deep cavitand derivative β CD-nC₁₀ (**Figure 1**). Deep-cavitand amphiphilic cyclodextrin building blocks β CD-nC₁₀ (n=7.3), produced by enzymatic biotransesterification,^{25b} are incorporated in self-assembled membrane-type particles of MO. The lyotropic lipid MO displays rich liquid crystalline phase behaviour upon swelling in aqueous phase.³⁹ Its dispersed state involves multi-compartment nanoparticles, in which guest compounds may be entrapped in the lipid bilayers or in the aqueous channels of the self-assembled cubosomes. The incorporation of a polysubstituted vase-like cyclodextrin β CD-nC₁₀ (with a hydrophobic deep cavitand space serving as an entry compartment in front of the cyclodextrin nanocavity) may be expected to contribute to additional compartmentalization of these nanocarriers. Polysorbate 80 (P80) was chosen as a dispersion agent and a stabilizer of the novel self-assembled nanocarriers because it may impart them both Stealth and non-haemolytic properties.^{25a} Dual loaded nanoparticles were prepared through solubilization of Oil red (a model water-insoluble drug) in β CD-nC₁₀-functionalized lipid membrane nanoassemblies (**see the chemical structure of Oil red in Fig. S1 of ESI**). The obtained blank and nanodrug-loaded multi-material aqueous dispersions were investigated by cryo-TEM imaging, small-angle X-ray scattering (SAXS), quasi-elastic light scattering (QELS), optical density (OD) measurements and UV-Visible spectroscopy.

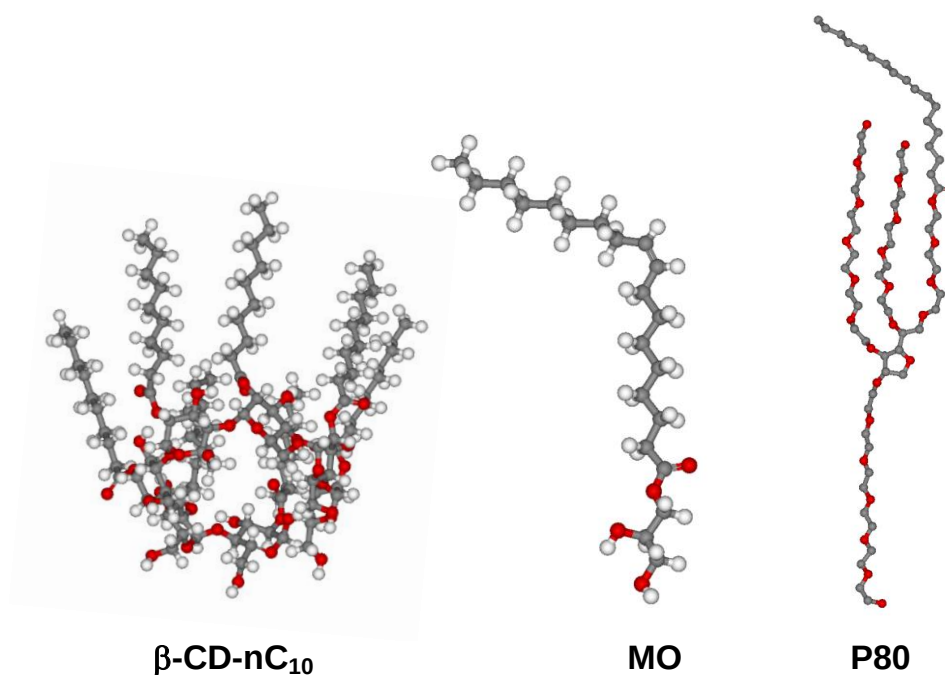


Figure 1. Chemical structures of the amphiphilic biotransesterified cyclodextrin derivative β CD- n C₁₀ (degree of substitution by decanoate chains $n=7.3$), the lyotropic nonlamellar monoglyceride lipid monoolein (MO), and the detergent polysorbate 80 (P80).

Experimental Section

Materials and Sample Preparation

Polysorbate 80 (P80) (MW 1310, CMC 0.012 mM) and monoolein (MO) ($\geq 99\%$, MW 356.54) were products of Sigma-Aldrich (St. Quentin). The amphiphilic cyclodextrin β -CD- n C₁₀ with a degree of substitution by decanoate (C₁₀) chains of $n=7.3$ (determined by MALDI-TOF analysis)⁶ had an average molecular weight MW 2266 (batch LCH3-36). The compound was produced through enzymatic transesterification of β -CD with vinyl decanoate using thermolysin as a catalyzer as previously reported.⁶ The model hydrophobic compound 1-[2,5-Dimethyl-4-(2,5-dimethylphenylazo)phenylazo]-2-naphthol certified as a fat stain for microscopy of biological samples under the name Oil red O (OR) (MW 408.49) was purchased by Sigma-Aldrich (St. Quentin). Milli-Q water of resistivity 18.2 M Ω .cm (Millipore Co.) was used as the aqueous phase.

The organic thin film hydration method^{5b,6} was used for preparation of MO/P80, MO/P80/OR, MO/P80/ β CD- n C₁₀ and MO/P80/ β CD- n C₁₀/OR nanoparticles. In a preliminary study, the content of the amphiphilic deep cavitant was varied from 1 to 10 mol% β CD- n C₁₀ and subsequently fixed to 4 mol% in this work. The amphiphilic components and the Oil red dye were dissolved in chloroform. Liquid mixtures were obtained by precise aliquoting of calculated volumes of stock solutions of every constituent. After mixing, the organic solvent was evaporated under flow of nitrogen gas and the obtained multicomponent organic thin films were lyophilized overnight. The hydration of the films was performed in excess of Milli-Q water phase. For preparation of nanoparticle dispersions (2 mL samples), the lipid concentration was around 10 mg/mL. The mixed films contained in this case the surfactant P80 exerting the role of a dispersing agent of the bulk

liquid crystalline phase. Multiple cycles of vortexing and ice bath sonication (Branson 2510) were applied to ensure the homogeneity of the dispersed assemblies. The samples were conserved at room temperature and investigated at 25 °C after 10x dilution prior to optical measurements. For bulk mesophase studies by POM, the thin film hydration was done at 50 wt% lipid phase in Milli-Q water (50/50 w/w).

Methods

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) setup

For Cryo-TEM imaging, a drop of nano-objects suspension (5-10 mg/mL) was deposited on a lacy carbon film (NetMesh, Pelco). It was supported by a copper grid, which was glow-discharged before hand in plasma (easiGlow, Pelco) in order to turn it hydrophilic. The grid, held by tweezers, was placed in the chamber of the fast-freezing Leica EM-GP workstation, where the humidity was kept at 85%. The excess liquid was absorbed with filter paper and the grid was immediately plunged into liquid ethane (-185 °C). Subsequently, it was mounted on a Gatan 626 specimen holder precooled with liquid nitrogen, and transferred into the microscope. The samples were examined at -176°C, under low electron beam illumination, using a Philips CM200 cryo-transmission electron microscope operating at 80 kV. The images were recorded on Kodak SO163 films using the "Low Dose" Philips procedure, which limits the radiation damage in the region of interest prior to actual image recording. The negatives were subsequently scanned by a planar scanner and analyzed by the *Image J* software.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) setup

Small-angle X-ray scattering experiments were performed at the bending magnet beamline B21 at the Diamond Light Source synchrotron (Didcot, U.K.). The X-ray wavelength and the sample-to-detector distance were 0.1 nm and 3.9 m, respectively, corresponding to an accessible q -range of 0.07 to 3.2 nm⁻¹. The 2D SAXS patterns were recorded using a high-sensitivity zero noise Pilatus 2M detector having an active area of 254 mm x 289 mm, which was divided into 1679 x 1475 pixels. The data acquisition sequence was hardware triggered by the robotized injection device. Each SAXS pattern was measured over 1 s. The incident and transmitted beam intensities were recorded simultaneously with every SAXS frame. After each data acquisition sequence, the obtained 2D images were corrected for detector spatial response function, and normalized by transmission. Normalized 2D patterns were subsequently azimuthally averaged to obtain the 1D scattering curves. Multiple patterns of the scattering background from the quartz sample holder (1.6 mm capillary in-vacuo) and the solvent were measured and processed in the same way, averaged, and subtracted from the acquired data using the SAXS BL21 software.

Polarized Optical Microscopy (POM)

The experimental setup included a microscope Nikon Eclipse E600 equipped with a polarizer and a Mightex Buffer USB camera (Mightex Systems). Objectives with magnifications of $\times 20$ and $\times 10$ were employed. Liquid crystalline samples were studied in the form of hydrated thin organic films situated between two cover glass slides. The cell, protecting the samples from dehydration, was inserted in a temperature-controlled stage and examined under cross polarizers by POM.

Particle size measurements by quasi-elastic light scattering

Hydrodynamic particle diameters were determined by quasi-elastic light scattering. The measurements were performed by a Zetasizer Nano ZS-90 instrument (MALVERN) equipped with a He-Ne laser (633 nm) with a power 5 mW. A fixed scattering angle of 90° was employed. The measurements were performed in triplicate for every sample after $10\times$ dilution in MilliQ water of the stock nanoparticles dispersion (2 mL). The temperature was 25°C . The mean hydrodynamic diameters were determined under approximation of the dispersed objects by equivalent spherical shapes. The nanoparticles populations were analyzed in the multimodal mode provided by the software of the MALVERN apparatus. Reproducible results were obtained with all kinds of investigated amphiphilic mixtures.

UV-Visible spectroscopy and optical density measurements

Optical density (OD) and UV-Visible spectroscopy measurements were performed by a double beam UV-Visible spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 35 (Perkin Elmer, France). The UV-Visible spectra of the dye Oil red (OR) were studied in organic solvents, micellar solutions of P80, and in aqueous dispersions of self-assembled nanocarriers. For optical density measurements, the dispersions encapsulating OR were diluted 10 times in MilliQ water. The studied wavelength region was 200-800 nm. Optical density curves were acquired in the presence and absence of OR dye in the systems. Nanoassemblies MO/P80/OR/ $\beta\text{CD-C}_{10}$ of variable encapsulated quantities of OR were examined at constant lipid and amphiphile contents. The nanoparticle sizes were determined in parallel by QELS. The MO/P80/OR/ $\beta\text{CD-C}_{10}$ dispersed systems of various compositions were placed in 1 cm optical quartz cuvettes thermostated at 25°C . The molar extinction coefficients of OR were determined either in ethanol solvent at a wavelength 516 nm or in nanoparticulate systems at a wavelength of 524 nm. The encapsulation efficiency of OR was determined based on an established protocol⁴⁰ based on spectral data recorded at different OR contents.

Results and Discussion

To our knowledge, the organization of nonlamellar lipid membrane particles embedding amphiphilic deep cavitand compounds such as enzymatically-produced polysubstituted vase-like cyclodextrins has not been previously studied. In a first step toward that aim, we prepared self-assembled mixtures of the amphiphilic deep cavitand $\beta\text{CD-nC}_{10}$ (degree of substitution $n=7.3$) and the monoglyceride lipid MO at different molar proportions in order to establish the compositions

corresponding to optically isotropic cubic phase assemblies (**Figure 2A**) with yet flexible lipid membrane interfaces. Selected interesting amphiphilic compositions are only presented in this work, which focuses on the fabrication of dual porosity self-assembled nanocarriers for hydrophobic guest molecules as model nanodrug formulations.

Taking into account the hydrophobic nature of the investigated vase-like deep cavitant (**Figure 1**) and its ability to rigidify the lipid bilayers with a tendency for phase separation above a threshold concentration, we moderately functionalized the bicontinuous cubic membrane of MO by 4 mol% of β CD-nC₁₀. This approach aimed at avoiding the phase separation of the amphiphilic cyclodextrin. Moreover, it supposes that the resulting binary membrane nanoassemblies may still be flexible and able to interact with cellular membranes. A cross-polarized optical microscopy (POM) image of the non-dispersed MO/ β CD-nC₁₀ mixed membrane is presented in **Figure 2A**. The micrograph shows the homogeneous and optically isotropic texture of the bulk phase sample studied in the form of a thin liquid crystalline film under cross-polarized light. It follows that the incorporation of the high molecular weight deep cavitant β CD-nC₁₀ amphiphile (MW 2266) with a diameter of the nanocavity of 0.8 nm, is compatible with the cubic nanochannel network of the bicontinuous cubic MO membrane.

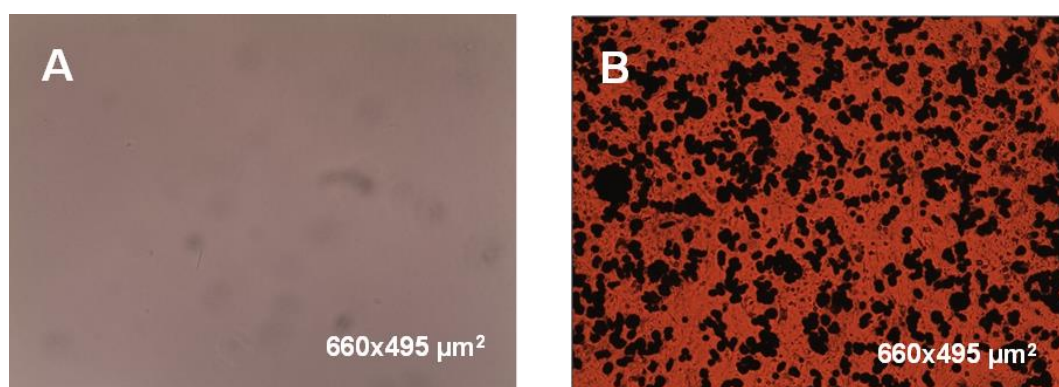


Figure 2. Cross-polarised optical microscopy (POM) images of liquid crystalline lipid membranes of monoolein (MO) containing 4 mol% β CD-nC₁₀ (A). The sample was hydrated at 25 °C in 50 wt% aqueous phase without dispersion. The isotropic texture is typical for a cubic lattice organization of a MO-based assembly. (B) Nondispersed MO/P80/ β CD-nC₁₀ membranes (4 mol% β CD-nC₁₀) with added 15 mol% guest hydrophobic substance Oil red (OR) with regard to the lipid constituent MO. The dye OR partitions between its solubilized state in the bicontinuous cubic membrane and in domains of phase separated OR clusters. Image sizes: 660x495 μm^2 . The magnification is $\times 10$.

For nanoparticles preparation, the quantity of added polysorbate 80 stabilizer was varied in the amphiphilic system in the sequence of 5, 10 or 15 mol% P80 at a fixed MO/ β CD-nC₁₀ content (4 mol% β CD-nC₁₀ deep cavitants with regard to the nonlamellar lipid MO). At this stage, the conditions for optimal dispersion of the bulk liquid crystalline phase into nano-objects stabilized by a PEGylated corona of P80 were studied with the help of quasi-elastic light scattering (QELS). Selected data from particle size measurements by QELS are shown in **Figures S2 to S7 (ESI)** and considered in **Figure 7** below.

The performed Cryo-TEM investigation (**Figures 3 to 5**) contributed to straight distinguish the chemical compositions and molar ratios between the amphiphilic components, which effectively generate nanocarriers of inner cubic lattice organization (3D nanochannel topology of aqueous pores) from the nano-objects displaying other liquid crystalline morphologies. Starting from the studied highest surfactant content of 15 mol% P80 in the self-assembled mixtures, we established that the three-dimensional bicontinuous cubic MO membrane is destabilized by the included P80 due to a decrease of the curvature of the lipid/water interfaces. At this relatively high surfactant content (15 mol% P80), one expects fragmentation of the cubic nanostructure (under physical agitation) into bilayer membrane building blocks, some of which may close into spherical vesicles or objects of other topologies. Generally, the incorporation of large quantity of P80 in the 3D cubic membrane causes its transformation into vesicular assemblies and intermediate nanosponge type structures with no densely packed inner membrane organization (**Figure 3**).

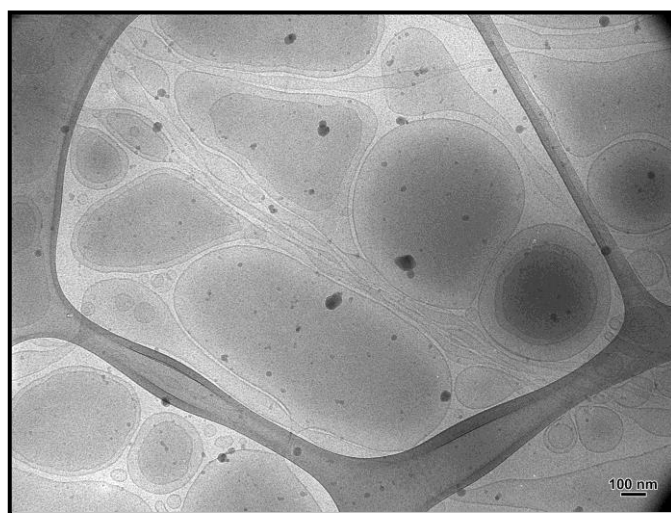


Figure 3. Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) image of self-assembled MO/P80/ β -CD- n C₁₀ nanocarriers, involving 4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitant content, obtained upon dispersion of the lyotropic amphiphilic mixture in the presence of 15 mol% P80 surfactant agent with regard to the nonlamellar lipid MO. The excess aqueous phase is Milli-Q water.

The cryo-TEM image obtained with the MO/15% P80/ β CD-C₁₀ system shows spherical, ellipsoidal and elongated-shape membranes of single bilayer or double bilayer peripheries (**Figure 3**). Their coexistence with some quantity of tubular-shape membranes demonstrates the variation of the lipid bilayer curvature upon the transformation of the highly curved 3D cubic lipid assembly into lamellar membrane structures of several intermediate shapes. The observed vesicular morphologies and elongated aggregates represent the stages of the solubilization of the periodic bicontinuous cubic membrane by the surfactant P80. The corresponding nano-object size determinations by QELS are given in **Figure S2** as raw data. They reveal a broad distribution function of nanoparticle hydrodynamic diameters during the cubic-to-lamellar bilayer transition induced by P80 at the studied concentration. Treatment of the data by a multimodal fitting of the particles populations yielded a bimodal distribution presented in **Figure S4c**.

It is noteworthy that the β CD- n C₁₀ deep cavitand stabilizes the formation of bimembrane and multilamellar onion-type vesicles with peripheries containing two or three lipid bilayers. The generation of such onion membrane shells is favoured by the propensity of the deep cavitand β CD- n C₁₀ nanocavities to form dimers and columnar structures.^{30a} This structural effect results in additional layering and structuring of the β CD-cyclodextrin-functionalized vesicular walls, which adopt nanoporous organization.

At 10 mol% P80 surfactant added to the lipid phase, the blank MO/P80 assemblies displayed fluid membrane morphologies (**Figure 4A**). The Cryo-TEM imaging established that the dispersion of the bicontinuous cubic lipid membrane in Milli Q water in the presence of 10 mol% P80 results in vesicular and elongated tubular membrane structures. The observed undulations of the tubular aggregates manifest the dynamic character of the system and the inhomogeneous distribution of the interfacial curvature along the amphiphilic assembly, which further may break into spherical vesicular particles (**Figure 4A, inset**). In QELS determinations, the corresponding mean hydrodynamic nano-object sizes appeared to be larger with regard to traditional small unilamellar vesicles. Two populations of nanoparticles were identified. They apparently reflect the longitudinal features of the tubular membrane aggregates and the approximation of their shapes by equivalent spheres in the fitting algorithm of the QELS instrument (Malvern).

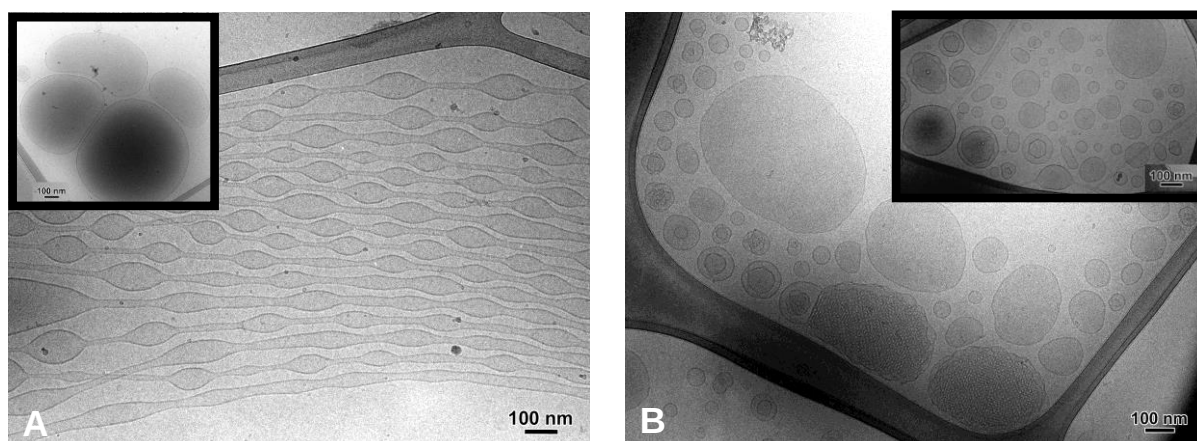


Figure 4. Cryo-TEM images of self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β -CD- n C₁₀ nanocarriers (4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitand content) produced through dispersion using 10 mol% P80 surfactant additive with regard to the nonlamellar lipid MO. (A) MO/10 mol% P80 assemblies; (B) MO/10 mol% P80/4 mol% β CD- n C₁₀ assemblies. Aqueous phase: Milli Q water.

A quite dynamic nature of the membrane topologies was found also for the MO/P80/ β CD- n C₁₀ system containing 4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitands and 10 mol% P80 dispersing agent (**Figure 4B**). Vesicular membranes of single bilayer and double membrane topologies (**inset**) were observed to coexist with small and medium size cubosome particles. The incorporation of 4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitands in the nanostructured MO membrane seems to compensate the effect of lowering of the interfacial curvature provoked by the added surfactant (10 mol% P80). Notably, β CD- n C₁₀ exerts a structuring effect on the lipid bilayers and shifts the phase equilibrium of the membrane assemblies toward packing of lipid bilayers that induces the nucleation and growth of a channel

network system within the functionalized particles. The mechanisms of generation and growth of cubosome nanoparticles from membrane building blocks and vesicles have been addressed in detail elsewhere.^{3b,8c,10c} The obtained here result evidences that the studied vase-like β CD- n C₁₀ amphiphile favours the cubic packing and ordering of the MO bilayers and the formation of nanoporous type carriers.

The dispersion and assembly of the monoolein membranes in the presence of 5 mol% P80 surfactant agent yielded a bimodal size distribution in the QELS measurements (see **Figure S3a in ESI**). The latter corresponds to a dynamic coexistence of nanocarriers of two major populations. In accordance with the mechanisms of the vesicle-to-cubosome transition,^{3b,4d,6e,8c,10c} the moderate QELS signal at $D_h \sim 80$ -150 nm should be associated with the presence of small bilayer vesicles, whereas the enhanced QELS signal may be attributed to larger nanoparticles ($D_h \sim 250$ -500 nm) with dense inner organization (**Figure S4**).

The cryo-TEM data (**Figure 5**) confirmed the presence of two main nanocarrier populations in the dispersed system (**Figures S3 and S4**). The image in **Figure 5A** shows that the dispersion of blank nanocarriers MO/P80 (5 mol% P80) comprises small vesicles and nanosponge particles, which coexist with small cubosomal intermediates. The cubosomes fraction considerably increases upon the inclusion of 4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitands in the lipid phase (**Figure 5B**). In the dispersion system MO/5% P80/ β CD- n C₁₀, the MO/ β CD- n C₁₀ bicontinuous cubic membranes become highly ordered with no evidence for phase separation of the deep cavitand molecules into detectable clusters within the particles.

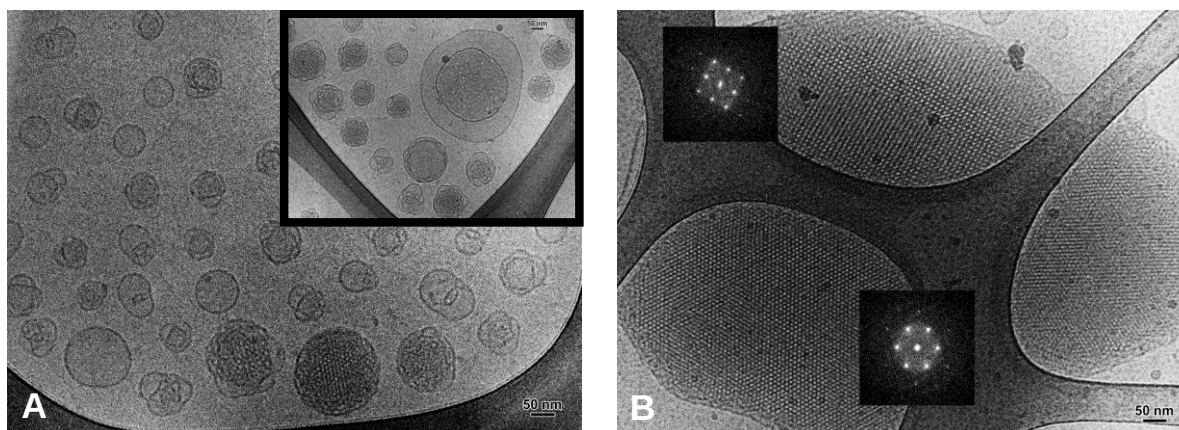


Figure 5. Cryo-TEM images of self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β -CD- n C₁₀ nanocarriers obtained upon amphiphile dispersion in the presence of 5 mol% P80 surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO. (A) MO/5 mol% P80 assemblies; (B) MO/5 mol% P80/4 mol% β CD- n C₁₀ assemblies. Aqueous phase: Milli Q water.

The performed Fast Fourier transforms (FFT) of the projected planes of the cubosomes in the cryo-TEM images (**Figure 5B**) revealed well defined cubic packing and two kinds of periodic structures within the cubosome particles. FFT patterns characteristic of double diamond and primitive cubic lattice symmetries were identified. The coexistence of two cubic lattices evidences the mixing events of the deep cavitand amphiphile with the host nonlamellar lipid in the bicontinuous cubic membrane at the studied composition (4 mol% β CD- n C₁₀). In fact, the critical

packing parameter of the poly-substituted cyclodextrin with anchored decanoate chains is around 0.9, which defines a propensity for a lamellar phase formation.^{25c} Therefore, homogeneous mixing of β CD-nC₁₀ with the nonlamellar lipid MO should decrease the overall curvature of the amphiphilic cubic membrane. The cryo-TEM data reveal that the inclusion of the deep cavitand β CD-nC₁₀ in the mixed lipid membrane leads to the formation of a primitive type *Im3m* cubic structure, which is of a lower curvature as compared to that of the double diamond type *Pn3m* cubic lattice (typical for the pure MO nanocarriers). Therefore, the excess MO, which does not accommodate deep cavitand β CD-nC₁₀ molecules, will preserve liquid crystalline domains of a double diamond (*Pn3m*) inner cubic packing in the particles.

In a next step of the structural analysis, synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) investigation was performed with homogeneously dispersed blank and OR-loaded MO/P80 or MO/P80/ β CD-nC₁₀ nanocarrier systems. **Figure 6A** present the SAXS patterns for the MO/P80 nanocarriers containing 5 mol% P80 surfactant (the two colours in the figure indicate the blank and the model drug OR-loaded nanoparticles). The obtained plots demonstrate that the SAXS patterns recorded in the absence of deep cavitands in the self-assembled nanocarriers are associated with the form factors of the dispersed particles. They show a characteristic bump at $q = 0.051 \text{ \AA}^{-1}$ rather than Bragg reflections of a periodically ordered cubic lattice of densely packed lipid bilayers. The acquired SAXS patterns in **Figure 6A** correspond to precursors of cubosomes, small nanosponge particles and vesicular type membranes, which do not have long-range inner periodic organization justifying the appearance of intensive Bragg peaks. Such kinds of SAXS patterns have previously been reported for small-size cubosomes and cubosomal intermediates of D_h below 100 nm^{8c} They are typical for PEGylated nonlamellar assemblies dispersed by sonication in an ice bath.^{3b,6d,8c}

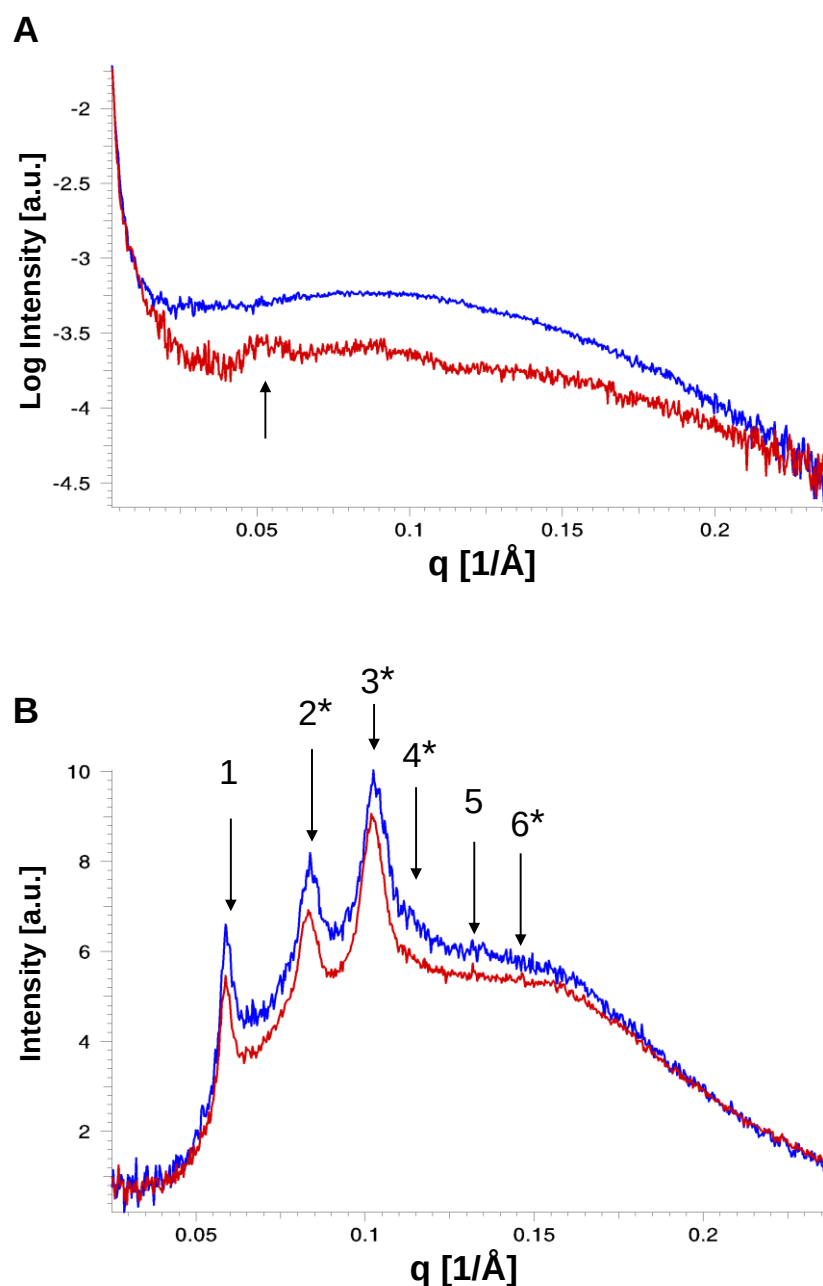


Figure 6. Synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) patterns of (A) MO/P80 (5 mol% P80) and (B) MO/P80/ β CD- n C₁₀ (5 mol% P80; 4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitand) nanocarriers in the presence (red curves) and absence (blue curves) of loaded hydrophobic guest substance Oil red (OR) at 25 °C. For the purposes of the parallel quantitative spectroscopic determination of nanodrug loading in MO/P80 and MO/P80/ β CD- n C₁₀ nanocarriers, the content of OR was set at 1 mol% with regard to the nonlamellar lipid MO. The arrow in (A) indicates the bump in the scattering curve associated with the form factor of the dispersed nanoparticles. The arrows in (B) denote the positions of the Bragg peaks resulting from the coexisting cubic lattice $Im3m$ and $Pn3m$ structures in the nanocarriers. The stars indicate the Bragg peaks, which belong to both cubic lattices (see the main text).

The addition of 4 mol% β CD-nC₁₀ deep cavitands to these assemblies transforms their nano-organization into more ordered structures of cubic lattice lipid membrane packing. **Figure 6B** shows that the long-range order in the nanoparticles functionalized by amphiphilic cyclodextrin is characterized by two sets of Bragg peaks. A primitive cubic lattice *Im3m* (Q^{229}) was identified from the sequence of peak positions spaced in the ratio $\sqrt{2}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{12}$: $\sqrt{14}$: $\sqrt{16}$... and having a first Bragg peak centred at $q = 0.058 \text{ \AA}^{-1}$. The lattice parameter of the *Im3m* cubic structure was determined from the first six reflections and was equal to $a(\text{Im3m})=15.3 \text{ nm}$. The second sequence of Bragg diffraction peaks had an onset at $q = 0.088 \text{ \AA}^{-1}$ and peak position maxima spaced in the ratio $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{9}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{12}$: ... The peak indexing identified a double diamond cubic lattice *Pn3m* (Q^{224}) with a cubic lattice parameter $a(\text{Pn3m})=10.1 \text{ nm}$. Therefore, the structural data in **Figure 6B** reveal that the β CD-nC₁₀ deep cavitands induce order in the MO/P80 liquid crystalline assemblies. They seem to influence the hydration of the large channels existing in the cubosome and nanosponge intermediates (**Figure 6A**) and contribute to ordering and packing of the vesicular bilayers into cubic membranes of a normal channel size (4 nm). The involved mechanism^{3b} is likely related to hydrogen bonding interactions at the lipid/water interfaces and the capacity of the CD nanocavities for form interlayer dimers, which may favour the lipid membrane fusion into nonlamellar supramolecular structures of a nanochannel type.^{8c}

In agreement with the cryo-TEM results in **Figure 5B**, the SAXS patterns established the coexistence of two types of cubic inner structures within the MO/P80/ β CD-nC₁₀ nanocarriers in both the blank and OR-loaded dispersed systems (**Figure 6B**). Therefore, both structural methods confirmed that the incorporation of the deep cavitand β CD-nC₁₀ into the nonlamellar lipid membrane induces the formation of a cubic lattice *Im3m* structure of a mixed amphiphilic composition. Owing to the fact that the amphiphilic β CD-nC₁₀ component is in a deficiency in the nanoassembly, it cannot entirely transform the diamond type cubic lattice, typical for the MO nanocarriers, into the lower curvature *Im3m* periodic cubic structure. The MO host membrane, characterized by *Pn3m* diamond type liquid crystalline structure, seems to saturate by deep cavitand β CD-nC₁₀ in the generated nanoparticles.

The above structural results permitted to find out novel amphiphilic compositions for which the created cubosomal nanocarriers involve (i) deep cavitands of 0.8 nm pore diameters that are embedded in the lipid bilayer compartments, and (ii) intrinsic aqueous channel compartments characterized by mean water pore diameters of 4 nm. This feature determines the dual porosity topology of the MO/P80/ β CD-nC₁₀ nanocarriers, in which the aqueous channel compartments are appropriate for the entrapment of hydrophilic guest molecules, while the nanocavities and deep cavitand spaces of the β CD-nC₁₀ molecules may include hydrophobic guest compounds. The lipophilic model drug OR encapsulated in the apolar compartments of either MO/P80 or MO/P80/ β CD-nC₁₀ carriers did not influence the overall structural organization of the particles. Non-loaded and OR-loaded nanocarriers showed similar structural characteristics in the SAXS patterns (**Figure 6**). It may be suggested that the small lipophilic OR molecules are homogeneously distributed within the lipid membranes of the liquid crystalline nano-objects.

In subsequent experiments on model drug nanoencapsulation, the amphiphilic MO/P80/ β CD-nC₁₀ mixtures were loaded with varying quantities of Oil red (a model hydrophobic compound with

interesting photophysical properties) up to the saturation limit, where phase separation into microscopic clusters occurred. **Figure 2B** presents a POM image of a dye-overloaded MO/P80/ β -CD-nC₁₀ system (15 mol% OR), in which the excess nonsolubilized hydrophobic guest compound OR is segregated into visibly large areas of microscopic sizes. This preliminary optical microscopy as well as the optical density (OD) investigations permitted to determine the concentration range of the components, which would be of interest for the fabrication of homogeneous aqueous dispersions of MO/OR/P80/ β -CD-nC₁₀ nano-objects (model nanodrug formulations).

For the investigated here dispersed systems, interesting quantitative results on nanodrug encapsulation (directly measurable by UV-Visible spectroscopy) were obtained for concentrations of the model compound in the range from 0.5 to 2 mol% OR with regard to the nonlamellar lipid MO. Under these conditions, no dye aggregation was detected. UV-Visible spectra of Oil red at variable dye concentrations were acquired for the MO/P80 and MO/P80/ β -CD-nC₁₀ nanoparticulate systems characterized above by SAXS and cryo-TEM. The same systems were studied also by QELS. The analysis of the mean hydrodynamic particle sizes of the blank and OR-loaded nanocarrier populations (**Figure 7 and Figures S6 and S7**) demonstrated consistent behaviour with the presented structural data.

The QELS results evidenced bimodal hydrodynamic size distributions in the MO/P80/OR and MO/P80/ β -CD-nC₁₀/OR systems corresponding to coexisting populations of small and large nanoparticles of vesicular membrane and cubosomal types, respectively (**Figure 7**). Based on the nanoparticles scattering intensities, these data revealed that the inclusion of β -CD-nC₁₀ deep cavitands in the lipid membranes increases the fraction of the cubosome assemblies, at the expense of the small vesicular membranes, independently of the loaded small molecular weight substance OR. The encapsulation of OR occurred in the nanocarriers both in the presence and absence of deep cavitands. It may be suggested that the loading of OR is supported by all types of nano-objects (vesicles, nanosponges and cubosomes) as they are built-up by lipid bilayers embedding the guest hydrophobic substance. However, the sizes of the OR-loaded β -CD-nC₁₀-containing particles ($D_h \sim 250\text{--}500$ nm) appear to be bigger as compared to the OR-loaded vesicles (a population detected as small particles of $D_h \sim 80\text{--}150$ nm in QELS measurements).

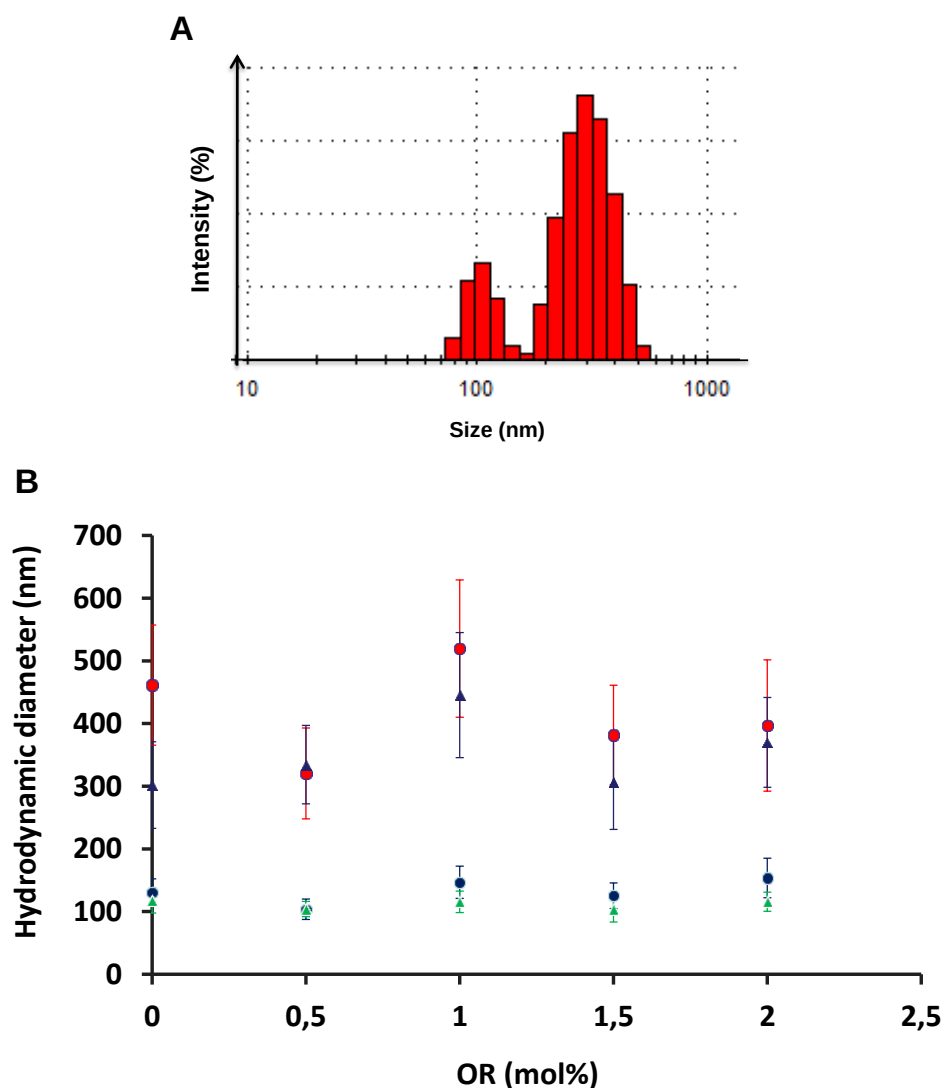


Figure 7. (A) Quasi-elastic light scattering (QELS) results showing an exemplary bimodal distribution of hydrodynamic particle diameters in MO/P80 or MO/P80/ β -CD-nC₁₀ dispersed systems loaded with Oil red (OR). (B) Dependence of the hydrodynamic diameter on the molar content of OR. The OR content in the mixed amphiphilic films used for nanocarrier preparation is 0.5, 1, 1.5 and 2 mol% with regard to MO. The triangles indicate the systems containing β -CD-nC₁₀, whereas the circle those lacking β -CD-nC₁₀. The two populations of nanoparticles may be attributed to small cubosomal intermediates and vesicular membranes ($D_h \sim 80$ -120 nm) (blue and green symbols), which coexist with well developed cubic lattice structures (cubosomes) of $D_h \sim 250$ -500 nm (red symbols). Aqueous phase: Milli Q water.

Here, the cyclodextrin amphiphile favours the structuring of the bilayer membrane nanocarriers into cubic type assemblies, which might form through fusion of small vesicles into larger liquid crystalline nano-aggregates.^{3b,8c,10c} Under these circumstances, it may be expected that the aqueous dispersions containing a bigger number of cubosomes of larger sizes might encapsulate more OR guest molecules in the formulation. Generally, the internal cubic membrane, accommodating the hydrophobic model drug, will be more elaborated in large cubosome particles in comparison to the one of the single bilayer vesicles. The optical density curves of the blank MO/P80/ β -CD-nC₁₀ and

MO/P80 nanocarriers, yet unloaded by OR, demonstrated that the turbidity of the MO/P80/ β -CD- n C₁₀ particle dispersion is higher than that of the initial MO/P80 dispersion (**Figure 8**). This also confirms the more densely packed inner organization of the particles and/or bigger nanoparticle sizes in the case of the β -CD- n C₁₀ functionalized nanoassemblies.

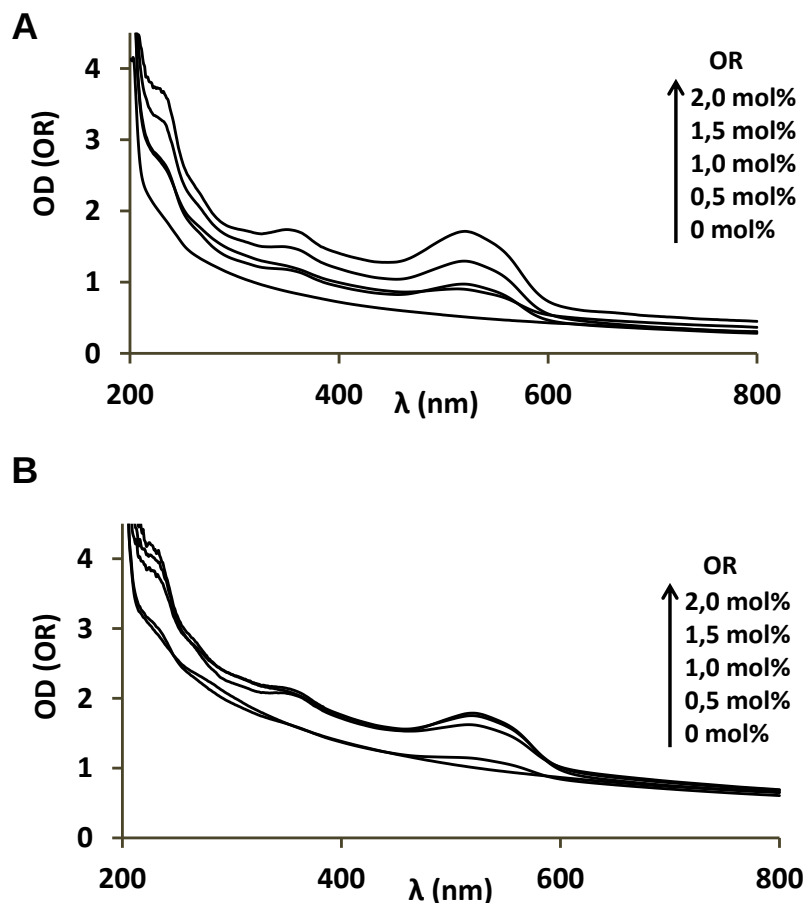


Figure 8. Optical density (OD) plots derived from recording of UV-Vis spectra of Oil red (OR) solubilized in aqueous dispersions of MO/P80 and MO/P80/ β CD- n C₁₀ nanostructured carriers. The dispersed systems are prepared from mixed films containing 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mol% OR with regard to the nonlamellar lipid MO. Temperature is 25 °C. Aqueous phase: Milli Q water.

The nanoencapsulation of the model hydrophobic dimethylphenylazo-naphthol guest compound Oil red (OR) was studied in self-assembled MO/P80/ β -CD- n C₁₀ and MO/P80 nanocarriers by optical density (OD) measurements and UV-Visible spectroscopy (**Figure 8**). The lipophilic Oil red compound is completely insoluble in aqueous phase as confirmed by the OD measurements. Its UV-Vis spectra were recorded in MO/P80/ β -CD- n C₁₀ nanoaggregates and in different organic solvents (**Figure 9**). They revealed two major absorption bands with wavelength maxima (λ_{max}) at 359 nm and 516 nm and a notable absorbance at 280 nm. The dye was characterized by high molar extinction coefficients in organic solvent. A molar extinction coefficient $\epsilon_{\text{OR}}=26994 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ was determined for OR in ethanol solution at $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$ (**Figure S8**).

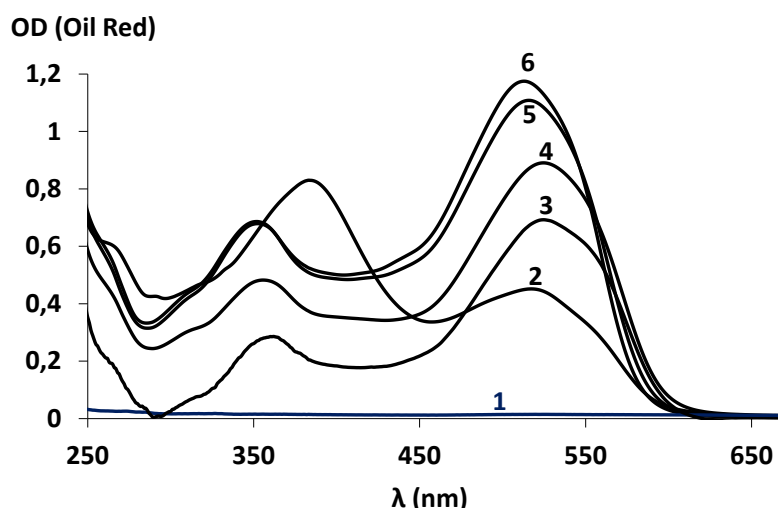


Figure 9. Comparison of the UV-Vis spectra of Oil red in an environment constituted of monoolein (MO), polysorbate 80 (P80) and β -CD- nC_{10} with those of OR in organic solvents of variable polarities. 1: water, 2: chloroform; 3: MO/P80/ β -CD- nC_{10} nanoaggregates; 4: ethylene glycol, 5: ethanol, 6: acetonitrile. The concentration of Oil red in the organic solutions is 0.04 mM. Temperature is 25 °C.

The OD plots and UV-Vis spectra of OR in MO/P80 and MO/P80/ β -CD- nC_{10} nano-objects presented in **Figure 8**, together with the results in **Figures 9** and **10**, were used for quantification of the encapsulation efficiency in the cubosome nanocarriers with the help of an established protocol.⁴⁰ OR-loaded nanoparticles were dissolved in organic ethanol medium and the solution concentration was quantified using a standard curve. Towards treatment of the OD data of the MO/P80 and MO/P80/ β -CD- nC_{10} dispersions, the scattering background of the nano-objects was subtracted from the OD values through fitting by a power function in the wavelength region where OR does not have an absorption band (600-800 nm). Thus, the OR loading was evaluated from the fitted curves derived from **Figure 8** at the wavelength of maximal absorption and minimal turbidity. This excludes the scattering of the nano-objects from the optical signal.

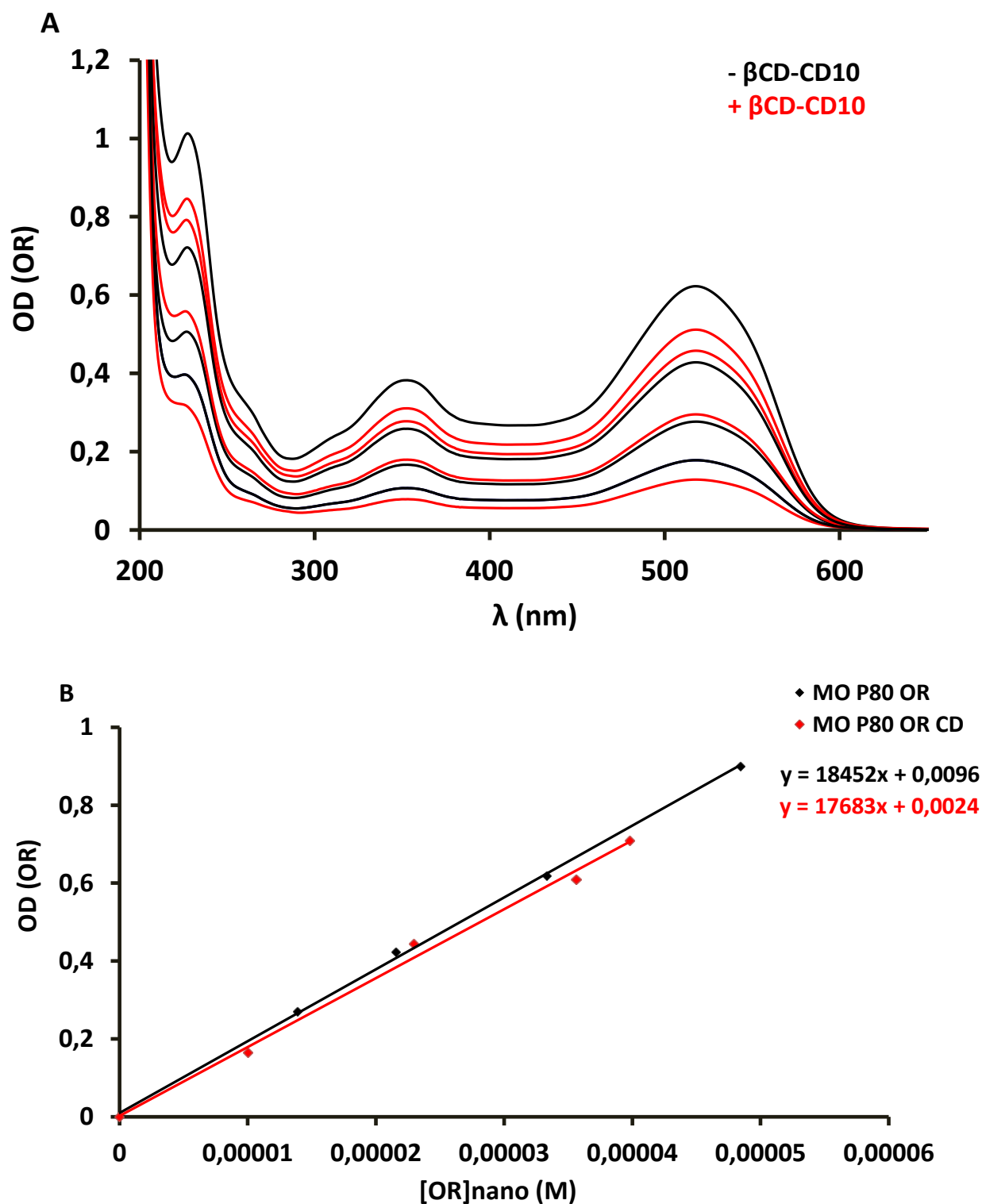


Figure 10. (A) UV-Vis spectra of OR measured after dissolution of the nanocarrier formulations (100 μ L) in ethanol solvent. The MO/P80 and MO/P80/ β CD- n C₁₀ carriers were studied at different OR loadings. (B) Standard calibration plot (absorbance *versus* OR concentration) used for quantification of the nanoencapsulated OR in MO/P80 and MO/P80/ β CD- n C₁₀ prepared from mixed films containing 0.5, 1.0, 1.5 and 2 mol% OR with regard to the nonlamellar lipid MO. [OR]_{nano} stands for the concentration of nanoencapsulated OR in the aqueous dispersions of nanocarriers. Temperature is 25 $^{\circ}$ C.

The wavelength of maximum absorption of OR formulated in nanoparticles dispersions was determined to be $\lambda_{\text{max}} = 524$ nm, whereas its λ_{max} was 516 nm in the organic solution (ethanol). This result, demonstrating the environmental sensitivity of the OR spectral response, suggests that the hydrophobic dye is solubilized in the lipid membranes of the studied nanocarriers.

The molar extinction coefficients of nanoencapsulated OR were estimated from the OD values, at $\lambda_{\text{max}} = 524$ nm, determined in the presence and absence of deep cavitands β -CD- $n\text{C}_{10}$ for the four different amounts of OR added to the mixed assemblies. The similarity of the values $\epsilon_1 = 18452 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (OR/MO/P80 nanodrug formulation) and $\epsilon_2 = 17683 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (OR/MO/P80/ β -CD- $n\text{C}_{10}$ nanodrug formulation) suggests no essential change in the nanostructured environment of the OR chromophore in the two kinds of nanocarrier systems. The presence of the amphiphilic cyclodextrin (4 mol%) in the nanoassemblies does not seem to essentially influence the local environment polarity of OR in the mixed membranes. However, the quantitative estimations show that β -CD- $n\text{C}_{10}$ increases the affinity of OR for the lipid environment.

Analytical determinations performed on the basis of **Figures 9 and 10** and **Figure S9** allowed estimating that 80% of the initially introduced OR in the mixed membrane films is stably incorporated in the nanodrug-loaded carriers after sonication of the MO/P80 dispersions. Interestingly, this percentage increases to 91% for the MO/P80/ β -CD- $n\text{C}_{10}$ assemblies, which indicates that the dual porosity nanocarriers are highly efficient for hydrophobic nanodrug encapsulation and transport.

Conclusion

In therapeutic innovation, the encapsulation efficiency is a major challenge and requires the design of novel drug delivery systems. Different kinds of supramolecular assemblies (liposomes, micelles, polymeric nanoparticles, *etc.*) have been frequently compared as carriers for solubilization of insoluble compounds of therapeutic interest. Cyclodextrin nanosponges and supramolecular scaffolds have attracted considerable interest for contemporary material science and drug delivery applications.

In our work, β CD- $n\text{C}_{10}$ deep cavitand building blocks were used for generation of liquid crystalline multicompartiment nanocarriers comprising dual porosity. A typical feature of the proposed monoolein/ β CD- $n\text{C}_{10}$ nanoparticle assemblies is the dynamic nature of the dispersed system forming cubosome structures at ambient temperature. After sonication, the 3D cubosomal aggregates coexist in the dispersion with a population of smaller-size vesicular bilayer membranes. The deep cavitand β CD- $n\text{C}_{10}$ inserts in the lipid bilayers and stabilizes the cubosomal nanoparticles population. The quantity of β CD- $n\text{C}_{10}$ embedded in the membranes controls the dual porosity of the multicompartiment nanocarriers through a shift of the vesicle-to-cubosome phase transition in favour of the cubic lattice nanoassemblies.

The performed cryo-TEM and SAXS investigations established that the β CD- $n\text{C}_{10}$ deep cavitands induce crystalline order in the MO/P80 membrane assemblies. Both the cryo-TEM and SAXS structural data revealed the formation of mixed lipid/ β CD- $n\text{C}_{10}$ cyclodextrin assemblies, in which the deep cavitand favours the induction of primitive $Im3m$ cubic lattice packing. The latter

is of a slightly lower membrane curvature as compared to the diamond *Pm3m* cubic liquid crystalline structure of hydrated monoolein in the lack of functionalization. The established structural organization of the nanocarriers suggests that they might be excellent candidates for sustained release of encapsulated fragile molecules. Quantitative determinations on nanoencapsulation of a model hydrophobic compound (Oil red) demonstrated that the encapsulation efficiency in the novel dual porosity nanocarriers for the nanodrug may be as high as 91%. The amphiphilic deep cavitand β CD- nC_{10} improves the capacity of the lipid nanocarriers to solubilize hydrophobic small molecular weight molecules up to a saturation limit.

Acknowledgement

The financial support from ANR SIMI10 Nanosciences to the project CYDEXCAR (ANR-11-BS10-0007) is gratefully acknowledged. L.Z. thanks for the Ph.D. scholarship granted by the ANR project CYDEXCAR. J.-J. Vachon is acknowledged for assistance with the polarized optical microscopy set up. The Czech Science Foundation Grant GACR 15-10527J is acknowledged as well. The Diamond Light Source (Didcot, U.K.) is thanked for granting SAXS beam time at the B21 beamline.

Electronic Supplementary Information (ESI) available:

Supplementary experimental details and results (**Table S1 and Figures S1 to S9**) are included in ESI.

References

1. (a) A. Yaghmur and O. Glatter, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2009, **147–148**, 333–342; (b) C.V. Kulkarni, R. Mezzenga and O. Glatter, *Soft Matter*, 2010, **6**, 5615-5624.
2. A. Zabara, R. Negrini, P. Baumann, O. Onaca-Fischer and R. Mezzenga, *Chem. Commun.*, 2014,**50**, 2642-2645.
3. (a) A. Zabara and R. Mezzenga, *Journal of Controlled Release*, 2014, **188**, 31-43; (b) A. Angelova, B. Angelov, R. Mutafchieva and S. Lesieur, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2015, **25**, 214-232; (c) I. D. M. Azmi, L.P. Wu, P.P. Wibroe, C. Nilsson, J. Ostergaard, S. Sturup, B. Gammelgaard, A. Urtti, S.M. Moghimi and A. Yaghmur, *Langmuir*, 2015, **31**, 5042-5049. (d) A. Angelova, B. Angelov, R. Mutafchieva, S. Lesieur and P. Couvreur, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 147-156.
4. (a) A. Sadeghpour, F. Pirolt, G.R. Iglesias and O. Glatter, *Langmuir*, 2014, **30**, 2639-2647 (b) W.J. Sun, J.J. Vallooran and R. Mezzenga, *Langmuir*, 2015, **31**, 4558-4565. (c) C.V. Kulkarni, T.Y. Tang, A.M. Seddon, J.M. Seddon, O. Ces and R. H. Templer, *Soft Matter*, 2010, **6**, 3191–3194; (d) B. Angelov, A. Angelova, S. K. Filippov, M. Drechsler, P. Štěpánek and S. Lesieur, *ACS Nano*, 2014, **8**, 5216-5226.
5. (a) R. Negrini and R. Mezzenga, *Langmuir*, 2011, **27**, 5296–5303. (b) B. Angelov, A. Angelova, S. K. Filippov, G. Karlsson, N. Terrill, S. Lesieur and P. Štěpánek, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9714-9720; (c) W.K. Fong, S. Salentinig, C.A. Prestidge, R. Mezzenga, A. Hawley and B.J. Boyd, *Langmuir*, 2014, **30**, 5373-5377; (d) B. Angelov, A. Angelova, S. K. Filippov, T. Narayanan, M. Drechsler, P. Štěpánek, P. Couvreur and S. Lesieur, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 1959-1964.
6. (a) C. Nilsson, J. Østergaard, S. W. Larsen, C. Larsen, A. Urtti and A. Yaghmur, *Langmuir*, 2014, **30**, 6398-6407; (b) A. Angelova, B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, C. Bourgaux and P. Couvreur, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3089-3093; (c) S. F. Hedegaard, C. Nilsson, P. Laurinmaki, S. Butcher, A. Urtti and A. Yaghmur, *RSC Advances*, 2013, **3**, 24576-24585; (d) A. Angelova, B. Angelov, M. Drechsler, V. M. Garamus and S. Lesieur, *Int. J. Pharm.*, 2013, **454**, 625-632; (e) B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. V. Hoffmann, V. Nicolas and S. Lesieur, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 7676-7686.
7. (a) C.V. Kulkarni, Z. Moinuddin, R. Littlefield, Y. Patil-Sen and M. Hood, *Int. J. Pharmaceutics*, 2015, **479**, 416-421; (b) M. Wadsater, J. Barauskas, T. Nylander and F. Tiberg, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 7063-7069; (c) A. Angelova, B. Angelov, M. Drechsler and S. Lesieur, *Drug Discov. Today*, 2013, **18**, 1263-1271; (d) B. Angelov, A. Angelova, R. Mutafchieva, S. Lesieur, U. Vainio, V. M. Garamus, G. V. Jensen and J. S. Pedersen, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 3073-3081.
8. (a) C.V. Kulkarni, O. Ces, R. H. Templer and J. M. Seddon, *Soft Matter*, 2013, **9**, 6525-6531; (b) A. Angelova, B. Angelov, B. Papahadjopoulos-Sternberg, M. Ollivon and C. Bourgaux, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 2005, **15**, 108-112; (c) B. Angelov, A. Angelova, V. M. Garamus, M. Drechsler, R. Willumeit, R. Mutafchieva, P. Štěpánek and S. Lesieur,

- Langmuir*, 2012, **28**, 16647-16655; (d) H. H. Shen, V. Lake, A. P. Le Brun, M. James, A. P. Duff, Y. Peng, K. M. McLean and P. G. Hartley, *Biomaterials*, 2013, **34**, 8361-8369.
9. (a) H. M. G. Barriga, A. I. I. Tyler, N. L. C. McCarthy, E. S. Parsons, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon and N. J. Brooks, *Soft Matter*, 2015, **11**, 600-607; (b) W. K. Fong, T. Hanley, B. Thierry, N. Kirby and B.J. Boyd, *Langmuir*, 2010, **26**, 6136–6139; (c) A. Angelova, B. Angelov, V. M. Garamus, P. Couvreur and S. Lesieur, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 445-457; (d) N.K. Swarnakar, K. Thanki, S. Jain, *Molec. Pharm.*, 2014, **11**, 1435-1449.
10. (a) P. T. Spicer, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005, **10**, 274-279. (b) P. T. Spicer, W. B. Small, M. L. Lynch and J. L. Burns, *Journal of Nanoparticle Research*, 2002, **4**, 297-311; (c) B. Angelov, A. Angelova, B. Papahadjopoulos-Sternberg, S. Lesieur, J.-F. Sadoc, M. Ollivon and P. Couvreur, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 5813 – 5817; (d) D. Yang, B. Armitage and S. R. Marder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, **2004**, 4402-4409.
11. (a) E. Esposito, P. Mariani, L. Ravani, C. Contado, M. Volta, S. Bido, M. Drechsler, S. Mazzoni, E. Menegatti, M. Morari and R. Cortesi, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **80**, 306-314; (b) B. Angelov, A. Angelova, M. Ollivon, C. Bourgaux and J. Campitelli, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7188-7189; (c) G. Mangiapia, M. Vaccaro, G. D'Errico, H. Frielinghaus, A. Radulescu, V. Pipich, A. M. Carnerup and L. Paduano, *Soft Matter*, 2011, **7**, 10577-10580; (d) M. Komisariski, Y. M. Osornio, J. S. Siegel and E. M. Landau, *Chemistry A Eur. J.*, 2013, **19**, 1262-1267.
12. (a) A. W. Dong, C. Fong, L. J. Waddington, A. J. Hill, B. Boyd and C. J. Drummond, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 1705-1715; (b) B. Angelov, A. Angelova, M. Drechsler, V.M. Garamus, R. Mutafchieva, S. Lesieur, *Soft Matter* 2015, **11**, 3686-3692; (c) E. Nazaruk, M. Szlezak, E. Gorecka, R. Bilewicz, Y.M. Osornio, P. Uebelhart and E.M. Landau, *Langmuir*, 2014, **30**, 1383-1390; (d) J. Barauskas, L. Christerson, M. Wadsäter, F. Lindström, A. K. Lindqvist and F. Tiberg, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 895-903.
13. (a) N. Rahanyan-Kaegi, S. Aleandri, C. Speciale, R. Mezzenga and E. M. Landau, *Chemistry A Eur. J.*, 2015, **21**, 1873-1877; (b) A. Angelova, B. Angelov, S. Lesieur, R. Mutafchieva, M. Ollivon, C. Bourgaux, R. Willumeit and P. Couvreur, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2008, **18**, 41-45; (c) S. B. Rizwan, W. T. McBurney, K. Young, T. Hanley, B. J. Boyd, T. Rades and S. Hook, *J. Control. Release*, 2013, **165**, 16-21; (d) T. E. Hartnett, K. Ladewig, A. J. O'Connor, P. G. Hartley and K. M. McLean, *RSC Advances*, 2015, **3**, 26543-26549.
14. (a) Y.-D. Dong, A. J. Tilley, I. Larson, M. Jayne Lawrence, H. Amenitsch, M. Rappolt T. Hanley and B. J. Boyd, *Langmuir*, 2010, **26**, 9000-9010; (b) B. Angelov, A. Angelova, U. Vainio, V.M. Garamus, S. Lesieur, R. Willumeit and P. Couvreur, *Langmuir*, 2009, **25**, 3734-3742; (c) E. Esposito, L. Ravani, C. Contado, A. Costenaro, M. Drechsler, D. Rossi, E. Menegatti, A. Grandini and R. Cortesi, *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.*, 2013, **33**, 411-418.
15. (a) A. Yaghamur, B. Sartori and M. Rappolt, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, **13**, 3115-3125; (b) T. H. Nguyen, T. Hanley, C. J. Potter and B. J. Boyd, *J. Control. Release*, 2011, **153**, 180-186; (c) N. Tran, X. Mulet, A. M. Hawley, C. E. Conn, J. Zhai, L. J. Waddington and C. J. Drummond, *Nano Lett.*, 2015, **15**, 4229–4233.

16. J. Kubitschke, S. Javor and J. Rebek Jr., *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 9251–9253.
17. (a) A. Singireddy and S. Subramanian, *Journal of Materials Science*, 2014, **49**, 8140–8153; (b) R. Minelli, R. Cavalli, L. Ellis, P. Pettazzoni, F. Trotta, E. Ciamporzero, G. Barrera, R. Fantozzi, C. Dianzani and R. Pili, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012, **47**, 686–694; (c) S.S. Darandale and R. P. Vavia, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2013, **75**, 315–322.
18. (a) J. B. G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choisnard, J.-L. Putaux, A. Gansané, S. B. Sirima, R. Semdé and D. Wouessidjewe, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **80**, 508–517; (b) S. M. N. Simoes, A. Rey-Rico, A. Concheiro and C. Alvarez-Lorenzo, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 6275–6289; (c) M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro and T. Loftsson, *Int. J. Pharm.*, 2012, **428**, 152–163; (d) E. Bilensoy, O. Gürkaynak, M. Ertan, M. Sen and A. A. Hincal, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, **97**, 1519–1529.
19. (a) F.J. Otero-Espinar, J.J. Torres-Labandeira, C. Alvarez-Lorenzo, J. Blanco-Méndez, *J. Drug. Del. Sci. Tech.* 2010, **20**, 289–301. (b) W.F. Lai, *Biomaterials*, 2014, **35**, 401–411; (c) C. Machut-Binkowski, F. Hapiot, R. Cecchelli, P. Martin and E. A. Monflier, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2007, **57**, 567–572.
20. (a) E. Bilensoy, O. Gürkaynak, A. L. Doğan and A. A. Hincal, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **347**, 163–170. (b) M. Massaro, S. Piana, C. G. Colletti, R. Noto, S. Riela, C. Baiamonte, C. Giordano, G. Pizzolanti, G. Cavallaro, S. Milioto and G. Lazzara, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 4074–4081; (c) F. Quaglia, L. Ostacolo, A. Mazzaglia, V. Villari, D. Zaccaria and M. T. Sciortino, *Biomaterials*, 2009, **30**, 374–382; (d) J. Zhang and P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1215–1233.
21. (a) B. M. D. C. Godinho, J. R. Ogier, A. Quinlan, R. Darcy, B. T. Griffin, J. F. Cryan and C. M. Driscoll, *Int. J. Pharmaceutics*, 2014, **473**, 105–112; (b) R. Rajendiran, R.K. Sankaranarayanan and J. Saravanan, *Journal of Molecular Structure*, 2014, **1067**, 252–260; (c) E. Pinho, M. Grootveld, S. Soares Graça and M. Henriques, *Carbohydrate Polymers*, 2014, **101**, 121–135.
22. (a) M. Vecsernyés, F. Fenyvesi, I. Bacskaý, M.A. Deli, L. Szente and E. Fenyvesi, *Archives of Medical Research*, 2014, 1–19; (b) F. Perret, M. Duffour, Y. Chevalier and H. Parrot-Lopez, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, **83**, 25–32; (c) J.M. Lopez-Nicolas, P. Rodriguez-Bonilla and F. Garcia-Carmona, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, **54**, 251–276.
23. (a) R. Challa, A. Ahuja, J. Ali and R.K. Khar, *Pharm. Sci. Tech.*, 2005, **6**, 329–357; (b) S.Y. Zhou, S.X. Ma, H. L. Cheng, L.J. Yang, W. Chen, Y.Q. Yin, Y.M. Shi and X. D. Yang, *Journal of Molecular Structure*, 2014, **1058**, 181–188; (c) S.M. Seyedi, H. Sadeghian, A. Jabbari, A. Assadi and H. Momeni, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 6754–6760; (d) S.M. Seyedi, H. Sadeghian, A. Jabbari, A. Assadieskandar, H. Momeni, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, **19**, 4307–4311.
24. (a) F. Perret, C. Marminon, W. Zeinyeh, P. Nebois, A. Bollacke, J. Jose, H. Parrot-Lopez and M. Le Borgne, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **441**, 491–498; (b) A. Mazzaglia, M. L. Bondi, A. Scala, F. Zito, G. Barbieri, F. Crea, G. Vianelli, P. Mineo, T. Fiore, G. Pellerito, L. Pellerito and M. A. Costa, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3820–3829;

- (c) A. M. O'Mahony, D. Doyle, R. Darcy, J.-F. Cryan, and C. M. O'Driscoll, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, **47**, 896–903.
25. (a) J. B. G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choissnard, J.-L. Putaux, R. Semdé and D. Wouessidjewe, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, **14**, 526–541; (b) L. Choissnard, A. Gèze, C. Vanhaverbeke, J. B. G. Yaméogo, J.-L. Putaux, B. Brasme, L. Jullien, S. Boullanger, C. Elfakir and D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3031–3038; (c) L. Choissnard, A. Gèze, J.-L. Putaux, Y.-S. Wong and D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 515–520; (d) M. Roux, B. Perly and F. Djedaïni-Pilard, *Eur. Biophys. J.*, 2007, **36**, 861–867.
26. (a) L. Choissnard, A. Gèze, B.G.J. Yaméogo, J.L. Putaux and D. Wouessidjewe, *International Journal of Pharmaceutics*, 344, **2007**, 26–32; (b) A. Angelova, C. Fajolles, C. Hocquelet, F. Djedaïni-Pilard, S. Lesieur, V. Bonnet, B. Perly, G. Le Bas and L. Maucclair, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **322**, 304–314; (c) R. Cavalli, F. Trotta, M.E. Carloti, B. Possetti, M. Trotta, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2007, **57**, 657–661; (d) J. Li and X. J. Loh, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1000–1017.
27. (a) R. Villalonga, R. Cao and A. Frago, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3088–3116; (b) G. Crini, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 10940–10975; (c) L. Zerkoune, A. Angelova, L. Choissnard, A. Gèze, D. Wouessidjewe and S. Lesieur, *ICOMF14 Proceedings*, MATEC Web of Conferences, EDP Sciences publisher, 2013, **4**, 05001; (d) T. Aree, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2013, **77**, 439–445.
28. (a) F.L. Callari, A. Mazzaglia, L. Monsù Scolaro, L. Valli and S. Sortino, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 802–805; (b) A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre and A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **212**, 275–279; (c) A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre and A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **212**, 280–285.
29. (a) L. Zerkoune, A. Angelova and S. Lesieur, *Nanomaterials*, 2014, **4**, 741–765; (b) H. Parrot-Lopez, F. Perret and B. Bertino-Ghera, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2010, **68**, 12–26; (c) N. Zafar, H. Fessi and A. Elaissari, *International Journal of Pharmaceutics* 2014, **461**, 351–366.
30. (a) D. Gallois-Montbrun, G. Le Bas, S. Mason, A. Sax, T. Prange and S. Lesieur, *Acta Crystallographica Section B*, 2013, **69**, 214–227; (b) V. Bernat, C. Ringard-Lefebvre, G. Le Bas, B. Perly, F. Djedaini-Pilard and S. Lesieur, *Langmuir*, 2008, **24**, 3140–3149; (c) T. Sun, H. Zhang, L. Kong, H. Qiao, Y. Li, F. Xin and A. Hao, *Carbohydrate Research*, 2011, **346**, 285–293.
31. (a) A. Gèze, S. Aous, I. Baussanne, J.-L. Putaux, J. Defaye, D. Wouessidjewe, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, **242**, 301–305; (b) A. Gèze, L. Choissnard, J. L. Putaux, D. Wouessidjewe, *Materials Science and Engineering C*, 2009, **29**, 458–462.
32. (a) M. Messner, S. V. Kurkov, P. Jansook and T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* 2010, **387**, 199–208 (b) G. Chen and M. Jiang, *Chemical Society Reviews*, 2011, **40**, 2254–2266; (c) Q.-D. Hu, G.-P. Tang and P. K. Chu, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **7**, 2017–2025; (d) Y. Chen and Y. Liu, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 495–505.
33. (a) M. Ramanathan, L. K. Shrestha, T. Mori, Q. Ji, J. P. Hill and K. Ariga, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 10580–10611; (b) A. Angelova, F. Penacorada, B. Stiller, T.

- Zetzsche, R. Ionov, H. Kamusewitz and L. Brehmer, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 6790-6796; (c) J. G. Petrov and A. Angelova, *Langmuir*, 1992, **8**, 3109-3115; (d) A. Angelova, J. Reiche, R. Ionov, D. Janietz and L. Brehmer, *Thin Solid Films*, 1994, **242**, 289-294.
34. (a) M. Cano-Sarabia, A. Angelova, N. Ventosa, S. Lesieur and J. Vecina, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **350**, 10-15; (b) A. Angelova, J.G. Petrov, T. Dudev and B. Galabov, *Colloids and Surfaces*, 1991, **60**, 351; (c) J.G. Petrov, D. Mobius and A. Angelova, *Langmuir*, 1992, **8**, 201-205; (d) J.G. Petrov, A. Angelova and D. Mobius, *Langmuir*, 1992, **8**, 206-212.
35. (a) D. Bennet, M. Marimuthu, S. Kim and J. An, *Int. J. Nanomed*, 2012, **7**, 3399-3419; (b) Y. Mi, J. Zhao and S. S. Feng, *J. Control. Release*, 2013, **169**, 185-192; (c) F. Zhao, H. Yin and J. Li, *Biomaterials*, 2014, **35**, 1050-1062; (d) T. Liu, W. Xue, B. Ke, M. Q. Xie and M. Dong, *Biomaterials*, 2014, **35**, 3865-3872.
36. (a) C. Kim, B. P. Shah, P. Subramaniam and K. B. Lee, *Mol. Pharm.*, 2011, **8**, 1955-1961; (b) S. Sreenivasan and S. Krishnakumar, *Curr. Eye Res.*, 2014, **12**, 1-13; (c) Y. D. Wen, Y. L. Ho, R. J. Shiau, J. K. Yeh, J. Y. Wu, W. L. Wang and S. J. Chiou, *J. Organomet. Chem.*, 2010, **695**, 352-359; (d) T. Liu, M. Wang, T. Wang, Y. Yao and N. Zhang, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2015, **126**, 531-540.
37. (a) E. Markovsky, H. Baabur-Cohen and R. Satchi-Fainaro, *J. Control. Release*, 2014, **187**, 145-157; (b) V. Jain, N. K. Swarnakar, P. R. Mishra, A. Verma, A. K. Mishra and N. K. Jain, *Biomaterials*, 2012, **33**, 7206-7220. (c) H. Richly, B. Schultheis, I. A. Adamietz, P. Kupsch, M. Grubert, R. A. Hilger, M. Ludwig, E. Brendel, O. Christensen and D. Strumberg, *Eur. J. Cancer*, 2009, **45**, 579-587.
38. (a) N. Kolishetti, S. Dhar, P.M. Valencia, L.Q. Lin, R. Karnik, S.J. Lippard, R. Langer, O.C. Farokhzad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 17939-17944; (b) C. Kim, B.P. Shah, P. Subramaniam and K.B. Lee, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, **8**, 1955-1961; (c) F. Zhao, H. Yin and J. Li, *Biomaterials*, 2014, **35**, 1050-1062.
39. (a) C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto, S. Engelskirchen and S. Ahualli, *Phys Chem Chem Phys*, 2011, **13**, 3004-3021. (b) V. Cherezov, J. Clogston, M. Z. Papiz and M. Caffrey, *J. Mol. Biol.*, 2006, **357**, 1605-1618; (c) L. V. Misquitta, Y. Misquitta, V. Cherezov, O. Slatery, J. M. Mohan, D. Hart, M. Zhalnina, W. A. Cramer and M. Caffrey, *Structure*, 2004, **12**, 2113-2124.
40. J. A. Ankrum, O. R. Miranda, K. S. Ng, D. Sarkar, C. Xu and J. M. Karp, *Nature Protocols* 2014, **9**, 233-245.

Electronic Supplementary Information

Mesoporous self-assembled nanoparticles of biotransesterified cyclodextrins and nonlamellar lipids as carriers of water-insoluble substances

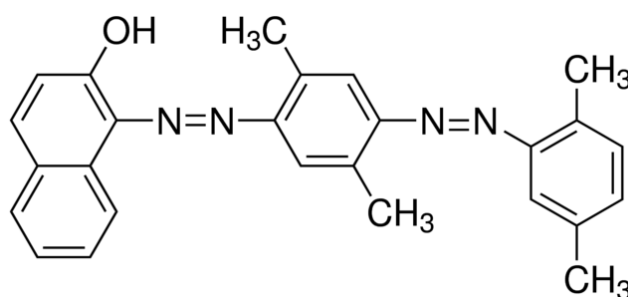
Leïla Zerkoune, Sylviane Lesieur, Jean-Luc Putaux, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe, Borislav Angelov, Corinne Nardin, James Douth, and Angelina Angelova

I. Physico-chemical characteristics

Table S1. Physico-chemical properties of cyclodextrin nanocavities (from *Salústio et al.*, 2011).

	α -cyclodextrin	β -cyclodextrin	γ -cyclodextrin
Number of glucose units	6	7	8
Chemical formula	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubility in water (mol.L ⁻¹)	0,149	0,016	0,179
Ø nanocavity (Å)	5,7	7,8	9,5
Height of the macrocycle (Å)	7,9	7,9	7,9

Figure S1. Chemical structure of Oil red O (OR): 1-[2,5-Dimethyl-4-(2,5-dimethylphenylazo) phenylazo]-2-naphthol (MW 408.49).



II. Additional results from quasi-elastic light scattering (QELS)

Figure S2. Nano-object hydrodynamic diameter measurements by quasi-elastic light scattering presented as intensity and volume distribution plots for self-assembled MO/P80 and MO/P80/ β -CD- n C₁₀ nanocarriers (4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitand content) produced through dispersion by 15 mol% P80 surfactant additive with regard to the nonlamellar lipid MO: (Black plots) MO/15 mol% P80 assemblies; (Red plots) MO/15 mol% P80/4 mol% β CD- n C₁₀ assemblies. Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.

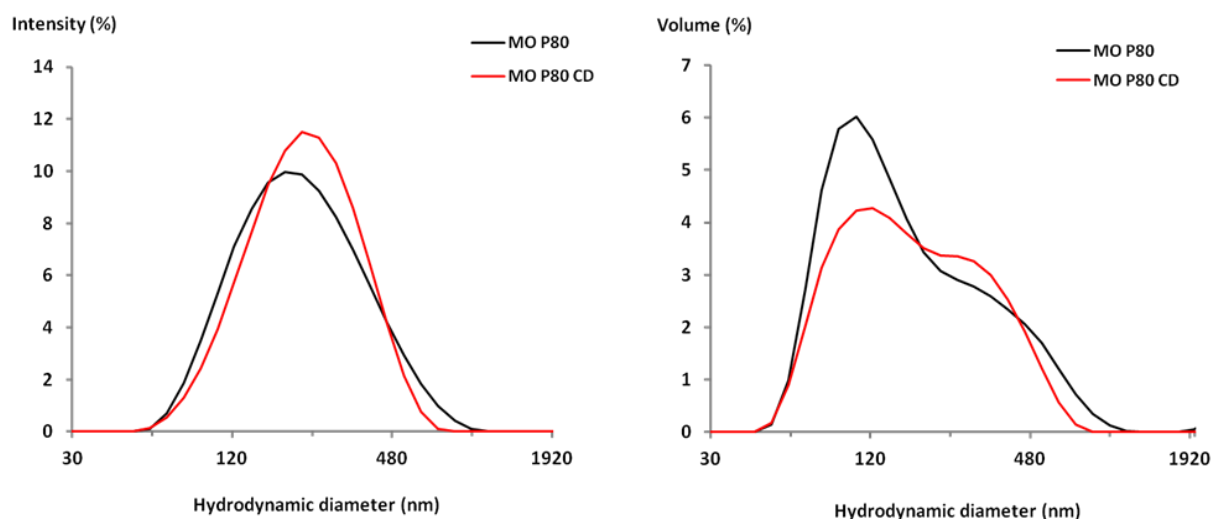


Figure S3. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/P80 nanocarriers obtained upon lipid film dispersion in the presence of variable quantities of surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO: (a) 5 mol% P80; (b) 10 mol% P80; and (c) 15 mol% P80. Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.

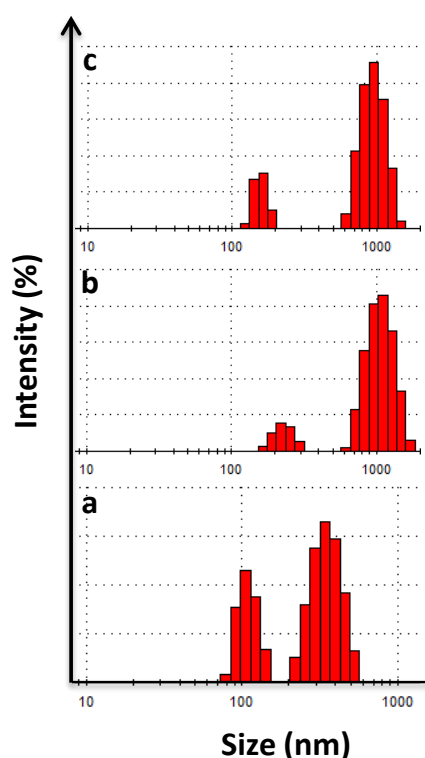


Figure S4. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/P80/ β -CD-nC₁₀ nanocarriers (4 mol% β CD-nC₁₀ deep cavitand content) produced upon dispersion of a mixed film in the presence of variable quantities of surfactant stabilizer with regard to the nonlamellar lipid MO: (a) 5 mol% P80; (b) 10 mol% P80; and (c) 15 mol% P80. Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.

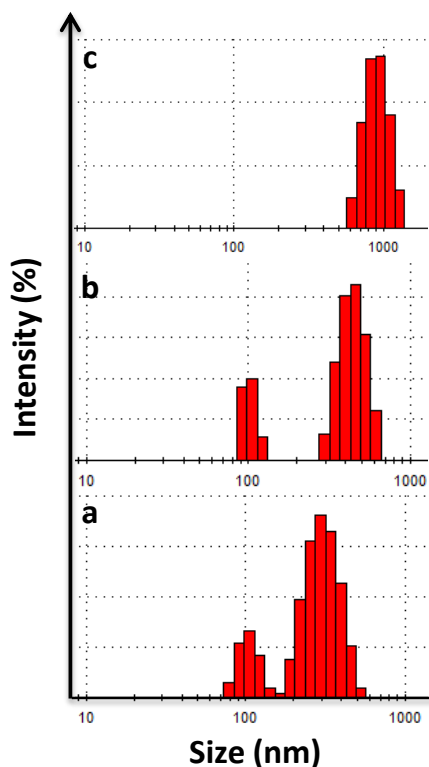


Figure S5. Nano-object hydrodynamic diameter measurements by quasi-elastic light scattering presented as intensity and volume distribution plots for self-assembled MO/5 mol% P80 and MO/5 mol% P80/ β -CD-nC₁₀ nanocarriers (4 mol% β CD-nC₁₀ deep cavitand content) encapsulating variable quantities of hydrophobic guest substance Oil red: 0 mol% (black plots), 0.5 mol% (red plots), 1 mol% (blue plots), 1.5 mol% (purple plots) and 2 mol% OR dye (green plots). Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.

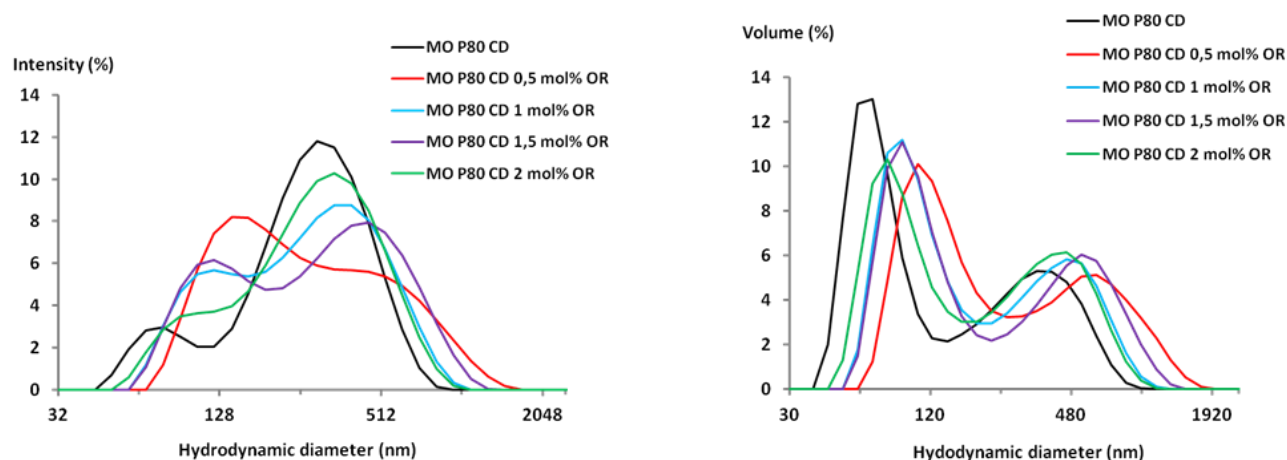


Figure S6. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/5 mol% P80/OR nanocarriers produced upon dispersion of a mixed amphiphilic film encapsulating (a) 0 mol%; (b) 0.5 mol%; (c) 1 mol%; (d) 1.5 mol%, and (e) 2 mol% guest OR dye with regard to the lipid MO. Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.

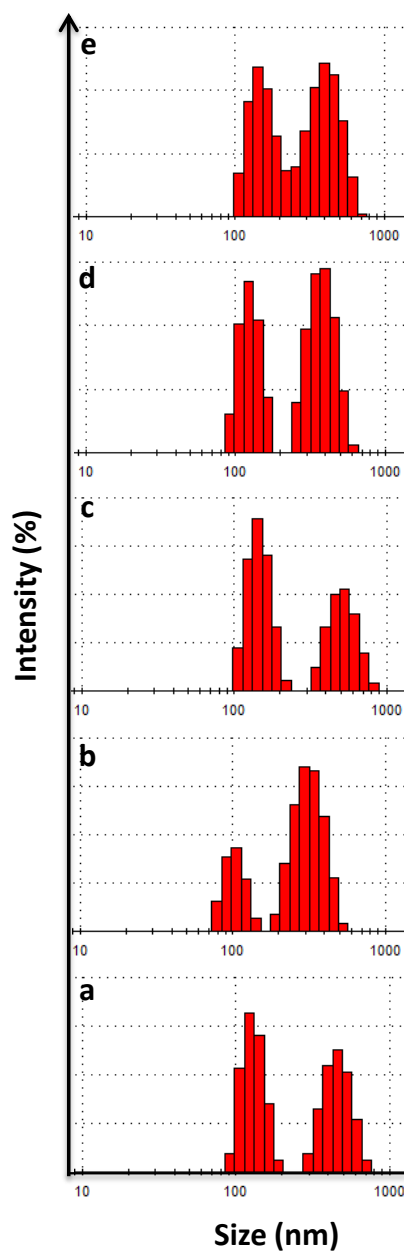
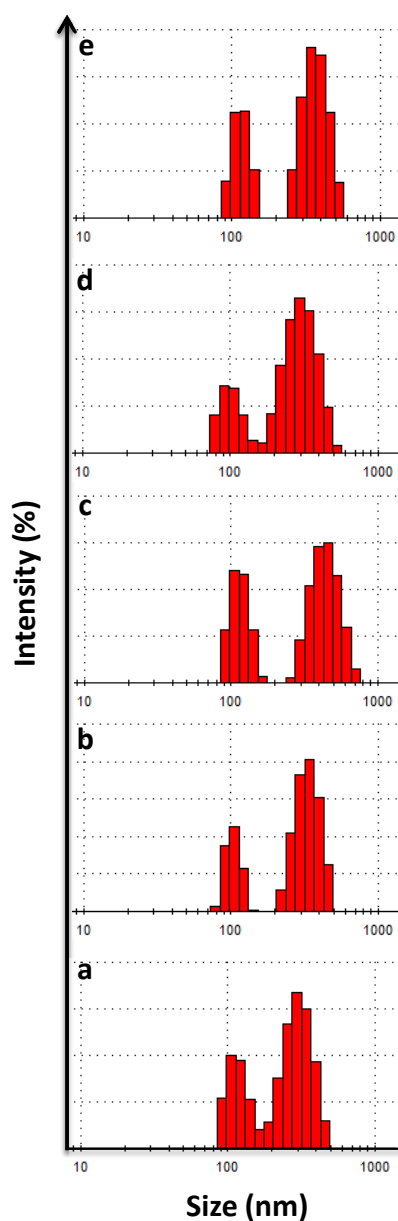


Figure S7. Determination of nano-object populations and hydrodynamic sizes [nm] through a multimodal model analysis of quasi-elastic light scattering data of self-assembled MO/5 mol% P80/ β -CD- n C₁₀/OR nanocarriers (4 mol% β CD- n C₁₀ deep cavitant content) produced upon dispersion of a mixed film encapsulating (a) 0 mol%; (b) 0.5 mol%; (c) 1 mol%; (d) 1.5 mol%, and (e) 2 mol% guest OR dye with regard to the lipid MO. Aqueous phase: Milli Q water. Temperature is 25°C.



III. Additional results from UV-Visible spectroscopy and optical density measurements

Figure S8. (Top) Optical density *versus* concentration curves of oil red (OR) dissolved in ethanol solvent. (Bottom) Standard plot for determination of the molar extinction coefficient of OR ($\epsilon=26994 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) at $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$.

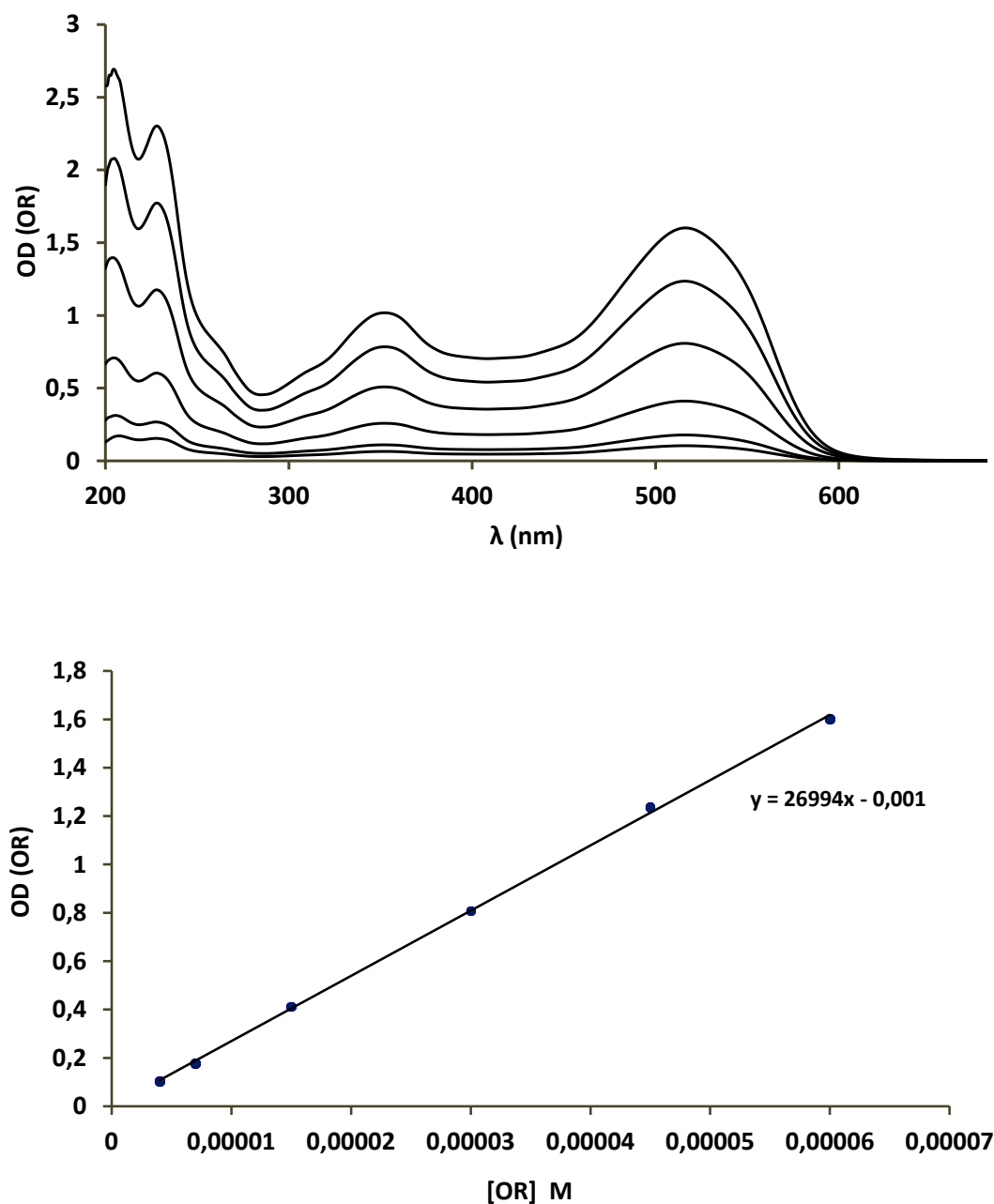
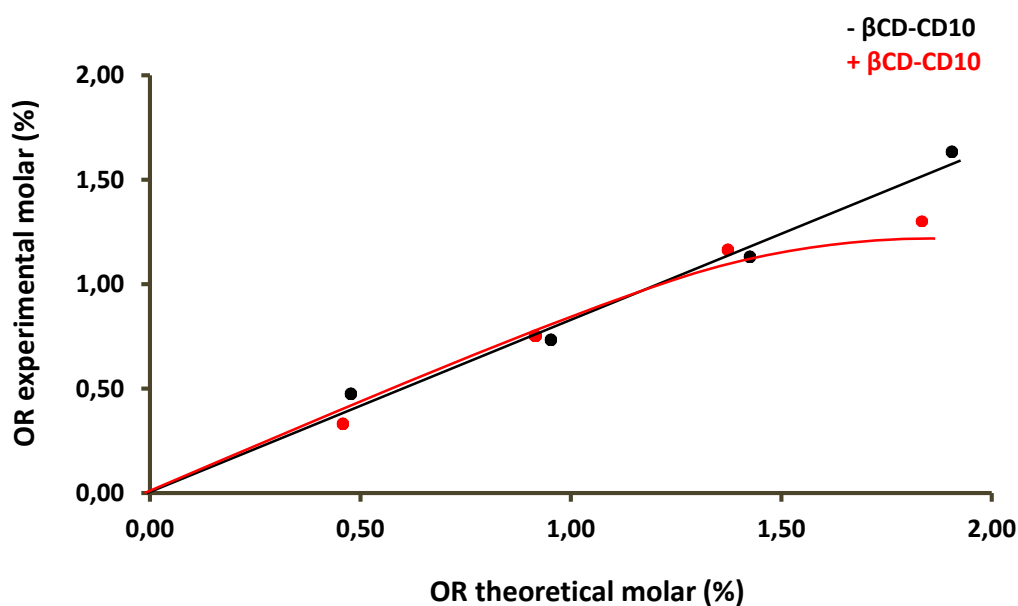


Figure S9. Relationship between the theoretical molar percentage of nanoencapsulated Oil red (OR) in MO/5 mol% P80 assemblies (black symbols) and MO/5 mol% P80/ β -CD-nC₁₀/OR nanocarriers (at 4 mol% β CD-nC₁₀ deep cavitand content) (red symbols) *versus* the experimentally determined values of nanoencapsulated OR from the standard curves OD *versus* OR concentration derived from Figure 10 (see main text). The molar percentage is calculated as [number of moles of OR]×100 / [total number of moles of substances present in the amphiphilic system] (%). The corresponding analytical determinations of the optical densities were done at a wavelength $\lambda = 524$ nm.



IV. References

100. P. J. Salústio, P. Pontes, C. Conduto, I. Sanches, C. Carvalho, J. Arrais, M. Cabral and M. H. Marques, *Pharm Sci.Tech.*, 2011, **12**, 1276-1292.
101. Gulik, A., Delacroix, H., Wouessidjewe, D., and Skiba, M. *Langmuir* 1998, **14**, 1050-1057.
102. L. Boulmedarat, G. Piel, A. Bochot, S. Lesieur, L. Delattre and E. Fattal, *Pharm. Research*, 2005, **22**, 962-971.
103. D. Duchene, G. Ponchel and D. Wouessidjewe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, **36**, 29–40.
104. E. Lemos-Senna, D. Wouessidjewe, D. Duchêne and S. Lesieur, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1998, **10**, 291-301.
105. S. Lesieur, D. Charon, P. Lesieur, C. Ringard-Lefebvre, V. Muguet, D. Duchêne and D. Wouessidjewe, *Chem. Phys. Lipids*, 2000, **106**, 127-144.
106. C. Gervaise, V. Bonnet, O. Wattraint, F. Aubry, C. Sarazin, P.A. Jaffrès and F. Djedäini-Pilard, *Biochimie*, 2012, **94**, 66–74.
107. B. Angelov, M. Ollivon and A. Angelova, *Langmuir*, 1999, **15**, 8225.
108. J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell and B. W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1975, **72**, 1525-1550.
109. R.A. Karjibana, M. Basria, M.B.A. Rahmana and A.B Salleh, *APCBEE Procedia*, 2012, **3**, 287-297.
110. J. Dubochet, M. Adrian, J. J.Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A.W. McDowall and P. Schultz, *Q Rev Biophys.*, 1988, **21**, 129-228.
111. J. Kuntsche, J.C. Horst, H. Bunjes, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **417**, 120-137.

ÉTUDES DE L'INTERACTION
PHOSPHOLIPIDE/CYCLODEXTRINE
AMPHIPHILE
SYSTEME DMPC/ β CD-C10

Etudes de l'interaction Phospholipide/Cyclodextrine amphiphile Système DMPC/ β CD-C10

Cette troisième étude représente une évaluation préliminaire de l'interaction des molécules de β -cyclodextrine bio-estérifiée β CD-C10 avec la dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) en excès d'eau. A forte hydratation ($> 50\%$ masse H_2O), la DMPC s'auto-assemble spontanément pour former des bicouches planes qui s'organisent les unes par rapport aux autres pour constituer un empilement smectique régulier au sein duquel chaque bicouche de lipides est séparée de la suivante par une couche d'eau d'hydratation d'épaisseur constante. Cette organisation particulière est une mésophase appelée phase lamellaire. Par apport d'énergie mécanique (ex : extrusion), il est possible d'obtenir des structures unilamellaires refermées sur elles-mêmes ou vésicules. Les deux types d'assemblage représentent des modèles simplifiés des membranes cellulaires de sorte que la caractérisation de leurs interactions avec une substance exogène permet d'appréhender l'action de cette dernière sur les cellules ainsi que son aptitude à franchir les barrières biologiques. Par ailleurs, les vésicules de phospholipides ou liposomes sont des systèmes réservoirs par essence biocompatibles dont le potentiel en tant que vecteurs de principes actifs a été largement démontré.

Pour ces raisons, nous avons entrepris d'examiner l'évolution des organisations lamellaires de la DMPC en présence de β CD-C10 avec pour double objectif d'évaluer la compatibilité de la cyclodextrine amphiphile avec les membranes biologiques et d'explorer la faisabilité de son insertion au sein de la structures de liposomes.

La DMPC, phospholipide possédant deux chaînes saturées à 14 atomes de carbone, est un lipide à la fois lyotrope et thermotrope, l'hydratation de son groupe polaire étant variable avec la température et ses chaînes hydrocarbonées présentant d'une part un polymorphisme à l'état solide et une transition solide-liquide caractéristique. Ainsi, on observe deux transitions endothermiques lors de l'élévation de la température, rendant compte des modifications structurales de l'organisation des chaînes de la DMPC au sein des bicouches hydratées. De façon intéressante, toute insertion d'une substance hôte dans les bicouches du phospholipide induit une variation de ces transitions en termes de température et variation d'enthalpie ainsi qu'au niveau des paramètres structuraux des phases mixtes formées. Les deux techniques de choix pour rendre compte des interactions hôte/DMPC sont donc d'une part la calorimétrie différentielle à balayage (*differential scanning calorimetry* ou DSC) et d'autre part la diffraction des rayons X aux petits et grands angles (*small-angle X-ray scattering*, SAXS; *wide-angle X-ray scattering*, WAXS) permettant d'accéder respectivement aux grandes distances caractéristiques de l'assemblage supramoléculaire (SAXS) ou inter-chaînes au sein des assemblages (WAXS).

Dans le cas des systèmes nanodispersés, nous avons eu recours à la microscopie électronique par cryo-transmission afin d'observer directement les objets mixtes formés et leur distribution de taille a été établie par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL).

1. Systèmes mixtes DMPC/ β CD-C10 hydratés à 80% en masse d'eau

1.1. Expériences de DSC

La **Figure 1** montre l'allure des différents thermogrammes enregistrés en DSC à une vitesse de chauffage de 2°C/min, sur des mélanges binaires phospholipide/cyclodextrine amphiphile en excès d'eau ayant des rapports molaires en β CD-C10 compris entre 0 et 10 mol%. Il est important de souligner que les profils sont parfaitement répétables après deux cycles de refroidissement-chauffage et homothétiques des enregistrements obtenus à une vitesse de chauffage de 5°C/min, montrant que les mélanges sont étudiés dans leur état d'équilibre thermodynamique.

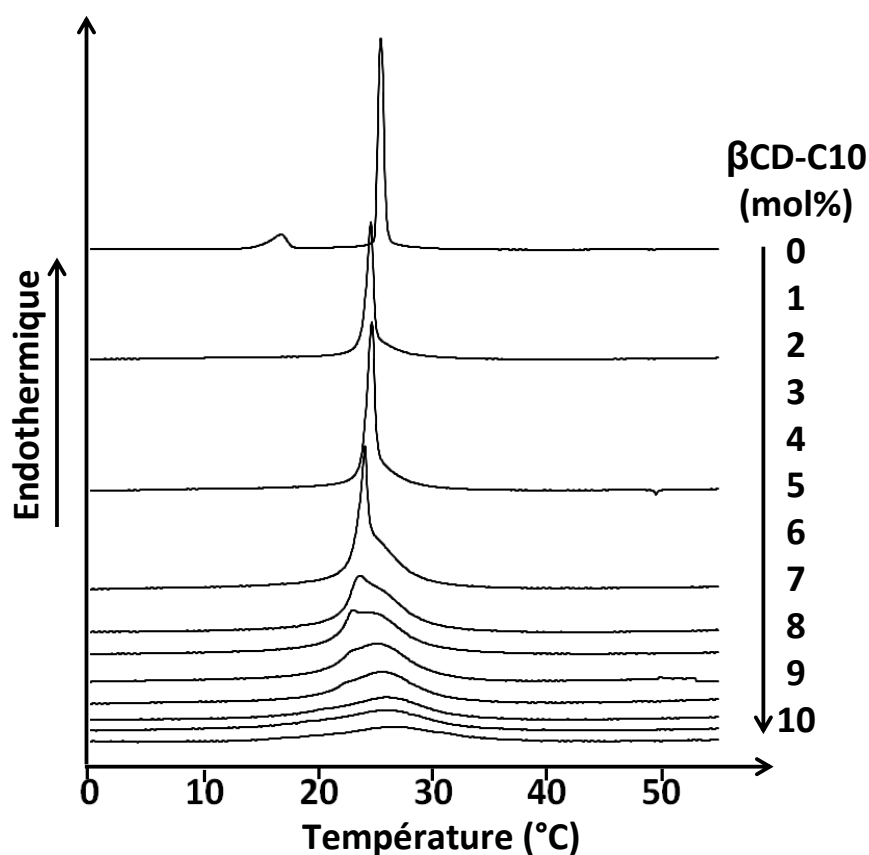


Figure 1. Thermogrammes de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H₂O) enregistrés à une vitesse de chauffage de 2°C /min. Les rapports molaires en cyclodextrine (mol%) sont reportés sur le graphe.

Tout d'abord, le phospholipide seul montre ses deux transitions caractéristiques : (i) la prétransition ($T_{\text{onset}} = 14,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$) qui correspond au passage de la phase lamellaire $L\beta'$ à la phase $P\beta'$, au sein desquelles les chaînes hydrocarbonées sont dans un état solide cristallin respectivement de types orthorhombique et hexagonal, seule l'inclinaison des chaînes par rapport aux groupes polaires est modifiée produisant une ondulation des bicouches de la phase $P\beta'$; (ii) la transition principale ($T_{\text{onset}} = 24,95 \pm 0,5^\circ\text{C}$) associée à la transition solide-liquide des chaînes hydrocarbonées et la formation de la phase lamellaire $L\alpha$ plus fluide (**cf partie bibliographique**).

En présence de cyclodextrine, on note dès 1mol% de β CD-C10, que la prétransition n'est plus observée et que la transition principale se produit à une température plus faible voisine de $23,7^\circ\text{C}$. Le comportement du mélange à 2 mol% est quasi-similaire. On remarque également qu'à ces faibles taux de cyclodextrine, la transition principale se produit sur un intervalle de température étroit, suggérant une forte coopérativité de la transition solide-liquide des chaînes, peu différente de celle de la DMPC seule. La disparition de la prétransition suggère que la phase $P\beta'$ ne se forme plus.

A partir de 3mol% de β CD-C10, la température de début de transition solide-liquide des chaînes diminue continuellement tandis que le signal endothermique s'élargit notablement. On note en particulier la perte progressive du pic étroit noté aux plus faibles rapports molaires de cyclodextrine au profit d'un signal plus large. Les deux événements semblent coexister au moins jusque 8 mol% de β CD-C10.

L'ensemble des résultats de DSC montrent sans ambiguïté que les molécules de cyclodextrine amphiphile affectent l'organisation structurale des chaînes hydrocarbonées du phospholipide et donc qu'elles s'insèrent dans les bicouches de DMPC formant un assemblage mixte dont le comportement thermique est modifié.

1.2 Expériences de Diffraction des Rayons X

Les mêmes échantillons que ceux analysés en DSC ont été examinés en diffractions des rayons X aux petits et grands angles, de part et d'autre de la transition thermique observée, soit respectivement à 10°C (**Figure 2**) et 35°C (**Figure 3**).

La **Figure 2** montre les diagrammes enregistrés aux petits (**Figure 2a**, SAXS) et grands (**Figures 2b**, WAXS) angles. Les paramètres structuraux des assemblages formés sont reportés dans le **Tableau 1**.

A 10°C , la structure lamellaire de la DMPC hydratée de période ici trouvée voisine de $68 \text{ \AA}$ disparaît tout d'abord en présence de taux de cyclodextrine compris entre 1 et 4 mol% au profit d'une nouvelle structure qui, d'après les réflexions de Bragg relevées, est très probablement d'organisation lamellaire. La période de cette nouvelle phase est plus grande, comprise globalement entre 74 et $77 \text{ \AA}$, selon le taux de β CD-C10. Lorsque le rapport molaire de la cyclodextrine atteint 5mol%, cette structure lamellaire dont la période se stabilise au voisinage de $76,6 \text{ \AA}$ coexiste avec une seconde organisation lamellaire dont la période est quasi-constante

et proche de 63 Å. A ce stade, il est possible de suggérer que les molécules de cyclodextrine s'insèrent effectivement dans les bicouches de DMPC modifiant l'empilement smectique des bicouches de phospholipides. En-dessous de 4 mol% de β CD-C10, la structure lamellaire formée est homogène et présente une seule distance inter-lamellaire. Au-delà, l'insertion de molécules de cyclodextrine supplémentaires conduit à la formation d'une seconde organisation smectique qui coexiste probablement avec la première, arrivée quant à elle à saturation en cyclodextrine. Les diagrammes enregistrés aux grands angles (**Figure 2b**, **Tableau 1**) montrent pour la plupart une réflexion de Bragg principale à 4,2 Å accompagnée pour certains d'un épaulement, en accord avec un état solide des chaînes du lipide et une organisation selon un réseau hexagonal (Lesieur et al, 2000).

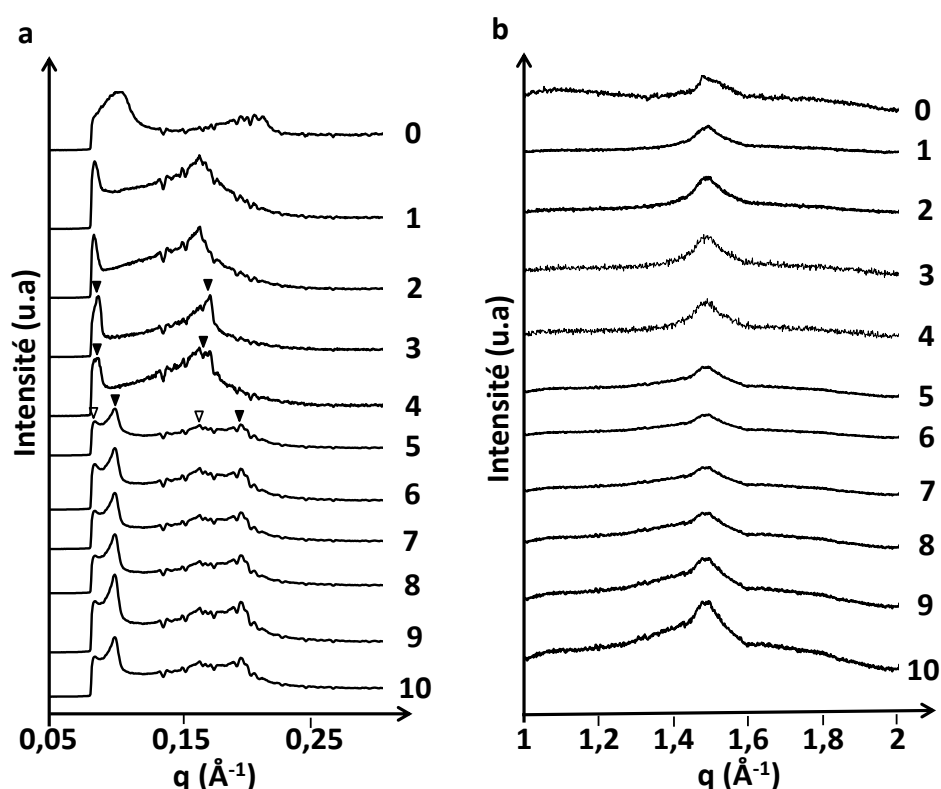


Figure 2. Diagrammes de diffraction aux petits (a) et grands (b) angles, enregistrés à partir de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H_2O) à 10°C. Les rapports molaires en cyclodextrine (mol%) sont reportés sur le graphe. Les intensités des signaux obtenus aux grands angles ont été augmentées d'un facteur environ $\times 10$ par rapport aux intensités des diagrammes obtenus aux petits angles.

Tableau 1. Paramètres structuraux des mélanges binaires β CD-C10/DMPC en excès d'eau déterminés par diffraction des rayons X à 10°C

β CD-C10/DMPC (mol%)	petits angles (SAXS)			grands angles (WAXS) ^a			
	q ($\text{\AA}^{-1}$)		$d(\text{\AA})$	q ($\text{\AA}^{-1}$)		$d(\text{\AA})$	
0	0.091	0.184	0.276	68.3	1.474	1.54	4.26 4.5
1	<i>0.083</i>	0.163	77.1	1.481			4.2
2	<i>0.084</i>	0.164	76.7	1.482			4.2
3	<i>0.088</i>	0.171	73.5	1.489			4.2
4	<i>0.085</i>	0.168	74.8	1.489			4.2
5	<i>0.084</i>	0.16 ₅	76.2	<i>1.42</i>	1.479	4.4	4.24
	0.099	0.19 ₅	63.4				
6	<i>0.085</i>	0.16 ₄	76.6	<i>1.42</i>	1.479	4.4	4.24
	0.099	0.19 ₅	63.5				
7	<i>0.085</i>	0.16 ₄	76.6	<i>1.43</i>	1.482	4.4	4.24
	0.100	0.19 ₅	62.8				
8	<i>0.085</i>	0.16 ₄	76.6	<i>1.43</i>	1.486	4.4	4.23
	0.100	0.19 ₅	62.8				
9	<i>0.085</i>	0.16 ₄	76.6	<i>1.43</i>	1.482	4.4	4.24
	0.100	0.19 ₅	62.8				
10	<i>0.085</i>	0.16 ₄	76.6	<i>1.42</i>	1.479	4.4	4.24
	0.099	0.19 ₆	63.5				

^a Les données en italiques correspondent à des réflexions matérialisées par un épaulement de la réflexion principale

La **Figure 3** montre les diagrammes enregistrés aux petits (**Figure 3a**, SAXS) et grands (**Figures 3b**, WAXS) angles. Les paramètres structuraux des assemblages formés sont reportés dans le **Tableau 2**.

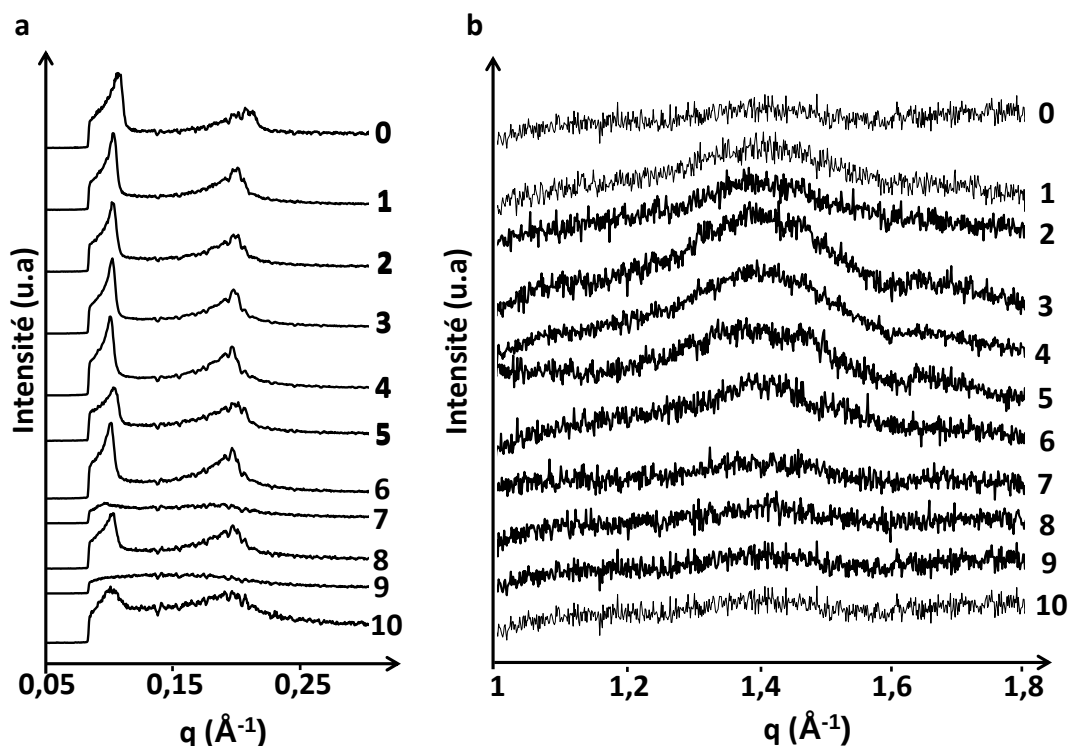


Figure 3. Diagrammes de diffraction aux petits (a) et grands (b) angles, enregistrés à partir de mélanges DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H_2O) à 35°C. Les rapports molaires en cyclodextrine (mol%) sont reportés sur le graphe.

A 35°C, la DMPC seule hydratée dans sa forme $\text{L}\alpha$ présente une période voisine de 59 Å. L'addition de β CD-C10 induit un gonflement de la phase lamellaire dont la distance entre bicouches hydratées est voisine 62 Å en moyenne quelle que soit la composition en cyclodextrine. Il semble fortement que les deux composés soient miscibles au-dessus de la température de transition des chaînes du lipide et forment une phase lamellaire mixte. On note toutefois que cette structure mixte est peu ordonnée comme le montrent la faible intensité, voire la non-détection des réflexions de Bragg. Les diagrammes enregistrés aux grands angles (**Figure 3b**, **Tableau 2**) montrent pour la plupart un signal très large et peu intense voisin de 4,5 Å en accord avec un état liquide des chaînes du lipide.

Tableau 2. Paramètres structuraux des mélanges binaires β CD-C10/DMPC en excès d'eau déterminés par diffraction des rayons X à 35°C

Rapport Molaire β CD-C10/DMPC (mol%)	petits angles (SAXS)		grands angles (WAXS) ^a	
	q (Å ⁻¹)	d(Å)	q (Å ⁻¹)	d(Å)
0	0.106 0.21 ₃	59.2	_b	_b
1	0.102 0.19 ₉	61.6	1.41	4.45
2	0.102 0.19 ₉	61.6	1.41	4.45
3	0.101 0.19 ₆	62.2	1.41	4.45
4	0.100 0.19 ₆	62.8	1.39	4.5
5	0.102 0.19 ₉	61.6	1.41	4.45
6	0.100 0.19 ₅	62.8	1.41	4.45
7	0.096 0.18 ₇	65.7	1.41	4.45
8	0.102 0.19 ₆	61.6	_b	_b
9	_b	_b	_b	_b
10	0.099 0.19 ₃	63.4	_b	_b

^a Signaux larges et peu intenses^b Absence de réflexions

Il est important de remarquer que quelle que soit la température d'observation, nous n'avons pas détecté des réflexions qui pourraient correspondre à l'organisation de la β CD-C10 seule en milieu aqueux. En effet, d'après Choissnard *et al* (2011), cette dernière s'organise en réseau hexagonal de paramètre de maille égal à 44,5 Å.

1.3 Bilan DSC-Diffraction des rayons X et principales conclusions

La **Figure 4a** reporte les températures caractéristiques des transitions endothermiques observées à partir de la DMPC seule et du mélange binaire DMPC/ β CD-C10 en fonction de la composition en cyclodextrine, à savoir les températures de début (T_{onset}) et de fin de transition (T_{offset}) ainsi que la température relevée au début du pic étroit observé entre 4 et 8 mol% et qui est superposé au signal large de fusion sous-jacent (**Figure 1**). Les lignes reliant les différentes températures donnent une ébauche du diagramme de phase de ce mélange binaire. Sur ce même graphique, nous avons symbolisé les différentes structures lamellaires révélées à 10°C ou à 35°C par diffraction des rayons X. La **Figure 4b** correspond à la variation d'enthalpie globale

associée à la transition endothermique ramenée à la quantité de DMPC dans le mélange, quasi-constante d'un échantillon à l'autre, en fonction de la composition du mélange binaire hydraté.

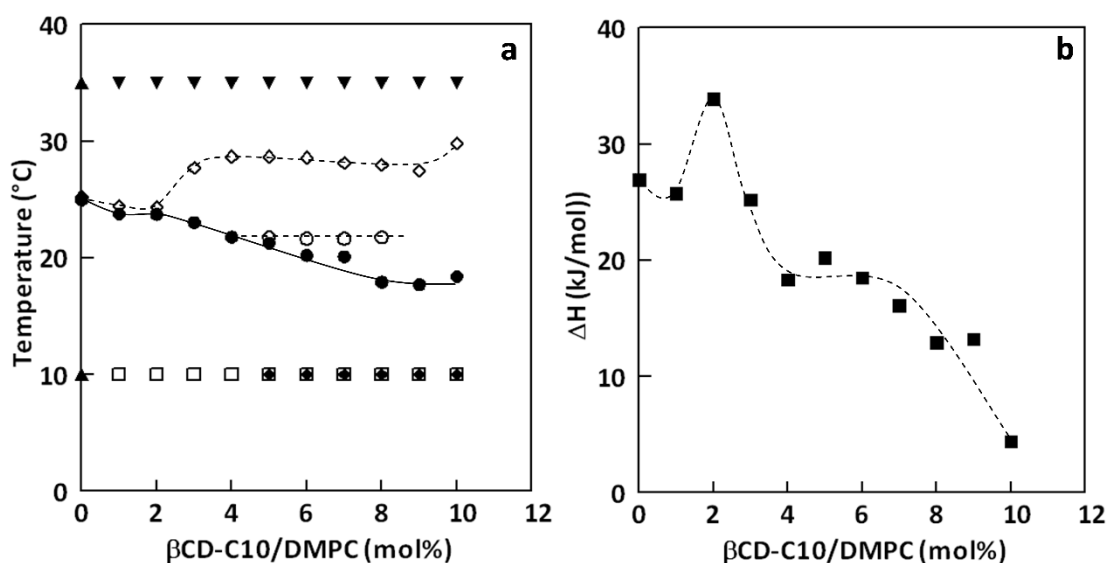


Figure 4. Ebauche du diagramme de phase du mélange binaire DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau (80 % en masse H_2O) (a) : température de début de transition (T_{onset} , ●), température de fin de transition (T_{offset} , ◇), température de début de pic étroit (○) ; structures lamellaires observées en SAXS : DMPC seule (▲ à 10 °C et 35°C), phase lamellaires mixtes (d~74-77 Å, 10°C, □ ; d~63 Å, 10°C, ◆ ; d~62 Å, 35°C, ▼). Variation d'enthalpie globale (ΔH , kJ par mole de DMPC) associée aux transitions observée (b).

Tout d'abord, les phases lamellaires révélées pour la DMPC à 10°C et à 35°C reflètent correctement le comportement structural du phospholipide en excès d'eau, la transition principale voisine de 25°C est en accord avec les données de la littérature ainsi que la variation d'enthalpie qui lui est associée (27 kJ/mole) (Lesieur et al, 2000).

A faible taux de cyclodextrine ($1\text{mol}\% \leq \beta\text{CD-C10} < 3\text{mol}\%$), on note une transition solide-liquide des chaînes du phospholipide légèrement abaissée sans que la coopérativité de la transition ne soit notablement affectée comme le montre l'intervalle de température balayé ($\sim 2^\circ\text{C}$) et la variation d'enthalpie qui augmente ou reste voisine de celle de la DMPC seule. Dans ce domaine, à 10°C, on note l'existence d'une seule phase lamellaire de période plus grande que celle de la DMPC seule. Ces résultats suggèrent fortement que les molécules de cyclodextrine s'insèrent dans les bicouches de DMPC et forment des bicouches mixtes dont l'épaisseur et l'hydratation sont régulières et au sein desquelles, l'organisation des chaînes du lipide s'accorde avec un empilement de type hexagonal régulier (une seule réflexion à 4,2 Å, **Tableau 1**). Lorsque l'on augmente la teneur en β CD-C10, on conserve l'existence de cette phase lamellaire mixte seule jusqu'à 4 mol% puis en coexistence avec une seconde phase lamellaire jusqu'à 10 mol%. Cette évolution se traduit également par une baisse globale de la variation d'enthalpie à mesure que le taux de cyclodextrine augmente. La période de cette seconde structure est plus petite (voisine de 63 Å) et son existence coïncide avec la présence

d'une seconde réflexion de Bragg à 4,4 Å très proche de la signature d'un état liquide des chaînes. Il est donc probable que cette seconde phase lamellaire soit moins ordonnée en raison d'une teneur en molécules de cyclodextrine plus élevée. On peut faire l'hypothèse que la première structure atteint un seuil de saturation et qu'elle transite peu à peu vers la seconde, sa proportion se réduisant progressivement avec l'augmentation du rapport molaire de β CD-C10.

Par ailleurs, la coexistence de ces deux phases à 10°C correspond au pic étroit relevé sur les thermogrammes et dont la température T_{onset} est constante ($21,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$), suggérant l'existence d'une transformation isotherme souvent le reflet d'une non-miscibilité de phases à l'état solide.

A 35°C, le système se simplifie puisqu'il n'est plus constitué que d'une seule phase lamellaire, indiquant que la cyclodextrine amphiphile est miscible à la DMPC dans l'intervalle 0-10 mol% et forme des bicouches mixtes hydratées relativement exemptes de défauts.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux qui avaient été décrits dans le cas de molécules de β -cyclodextrine amphiphile comportant exactement 12 chaînes hydrocarbonées à 6 atomes de carbone. A faible taux de cyclodextrine, les mélanges DMPC/ β CD-C6 hydratés forment à 8°C et 5 mol% une structure mixte ordonnée particulière de symétrie rectangulaire, perdant ainsi la structure lamellaire de la DMPC. Par contre, la variation d'enthalpie associée à la fusion de cette structure est, elle aussi, plus importante que celle mesurée pour le phospholipide seul. Il semble donc qu'à basse température, les cyclodextrines amphiphiles s'associent à la DMPC pour constituer des assemblages mixtes ordonnés, qu'ils soient lamellaires ou non. La fusion des chaînes du lipide entraîne la disparition de cette structure particulière au profit d'une phase lamellaire mixte comme dans le cas de la β CD-C10 ici étudiée. La température de transition associée est de 21°C. Cependant, dès 7mol%, la β CD-C6 ne s'insère plus dans les bicouches de DMPC et forme une structure hexagonale séparée, quelle que soit la température. A noter, que le degré de substitution des hydroxyles secondaires est dans le cas de la β CD-C6 étudiée exactement égal à 12 alors que dans notre cas, la β CD-C10 présente un degré de substitution moyen de 7,3. Il semblerait donc qu'au-delà de la topologie de l'organisation supramoléculaire mixte formée, le degré de miscibilité soit gouverné par la longueur et/ou le nombre de chaînes greffées sur la cavité de la β -cyclodextrine.

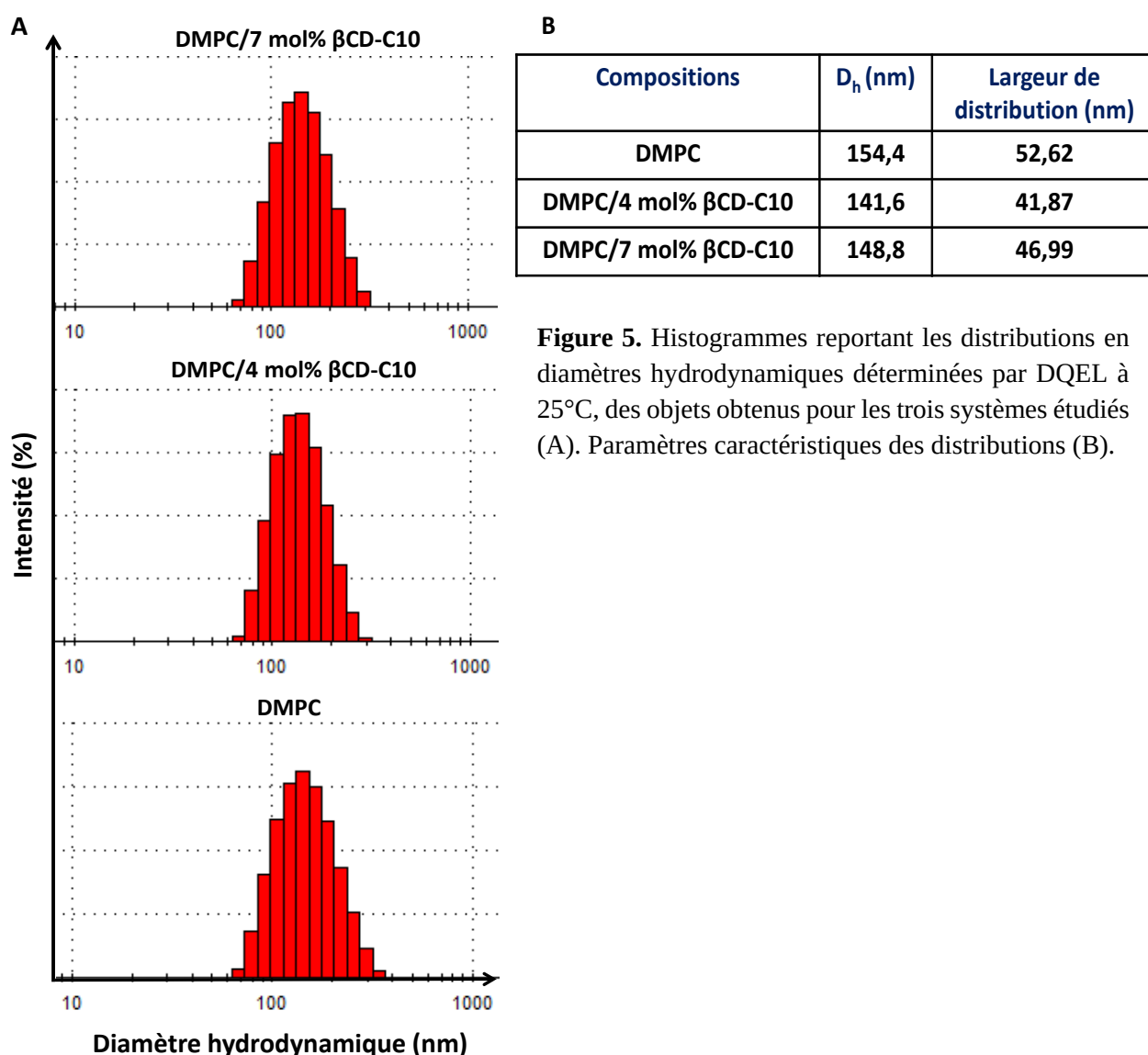
2. Obtention de vésicules mixtes DMPC/ β CD-C10 de dimensions colloïdales

Sur la base des résultats précédents, il était fort encourageant de tenter la préparation de vésicules mixtes DMPC/ β CD-C10 à partir des phases lamellaires qui se forment spontanément par hydratation de films mixtes des deux constituants. Nous avons choisi deux compositions distinctes : (i) la première à 4mol% de cyclodextrine amphiphile, correspondant à la saturation de la phase lamellaire ordonnée observée à 10°C ; (ii) la seconde à 7mol% de cyclodextrine amphiphile, correspondant au domaine intermédiaire pour lequel deux structures lamellaires distinctes coexistent à 10°C. Une fois les films mixtes hydratés à 35°C (1 mM DMPC), ces derniers ont été extrudés à 35°C par passages successifs sur des filtres de polycarbonate de diamètres de pore décroissants jusque 0,1 μm puis les objets formés ont été conservés à 4°C

jusqu'à leur caractérisation. Des vésicules de DMPC seule ont été préparées dans les mêmes conditions afin de servir de témoins.

La **Figure 5** montre les distributions en diamètres hydrodynamiques moyens des populations d'objets contenus dans chacune des préparations. On note pour les trois systèmes la présence unique d'objets de dimensions submicroniques centrées autour d'un diamètre hydrodynamique moyen voisin de 150 nm. Ainsi, l'incorporation de la cyclodextrine amphiphile ne semble pas affecter la formation d'agrégats mixtes colloïdaux.

Les **Figures 6 à 8** montrent les images de cryo-MET réalisées après cryo-congélation depuis la température ambiante ($\sim 25^\circ\text{C}$).



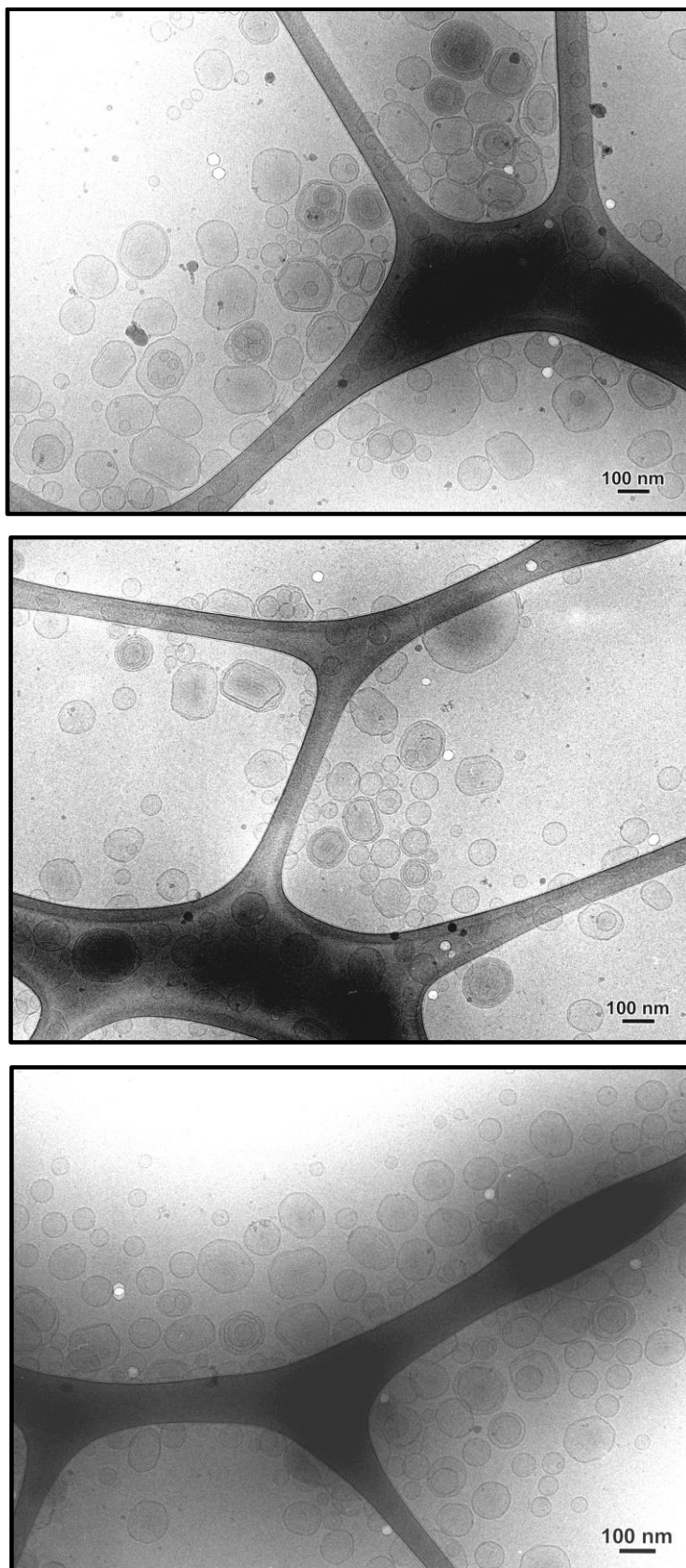


Figure 6 : Images réalisées par cryo-MET des objets obtenus avec la DMPC seule dans l'eau ($[DMPC]=1,0 \cdot 10^{-3} M$). Comme attendu, les images montrent des vésicules majoritairement unilamellaires et de diamètres voisins de 100 nm.

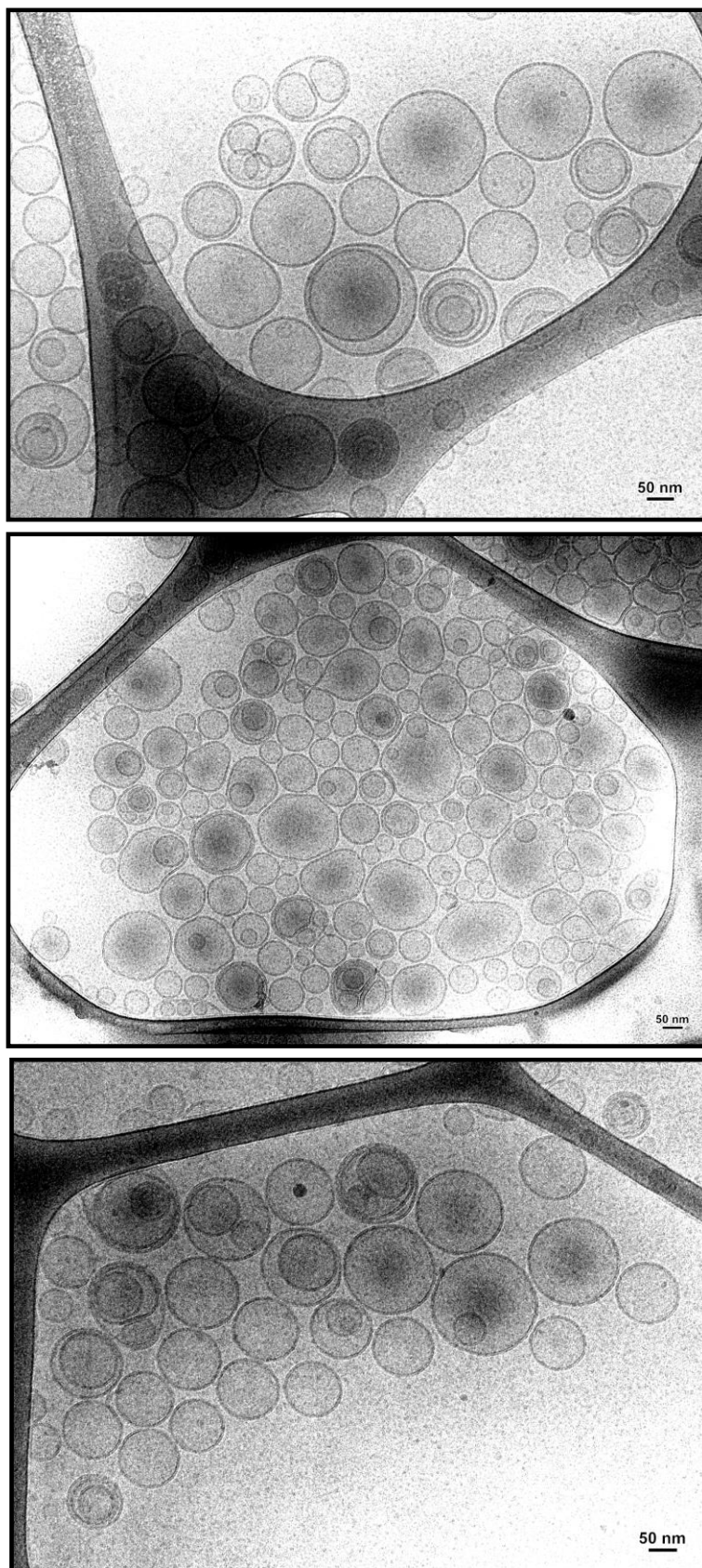


Figure 7 : Images réalisées par cryo-MET des objets mixtes DMPC/ β CD-C10 dans l'eau ($[DMPC]=1,0 \cdot 10^{-3}$ M ; 4 mol% β CD-C10). On observe des vésicules majoritairement unilamellaires de diamètres compris entre 50 et 150 nm.

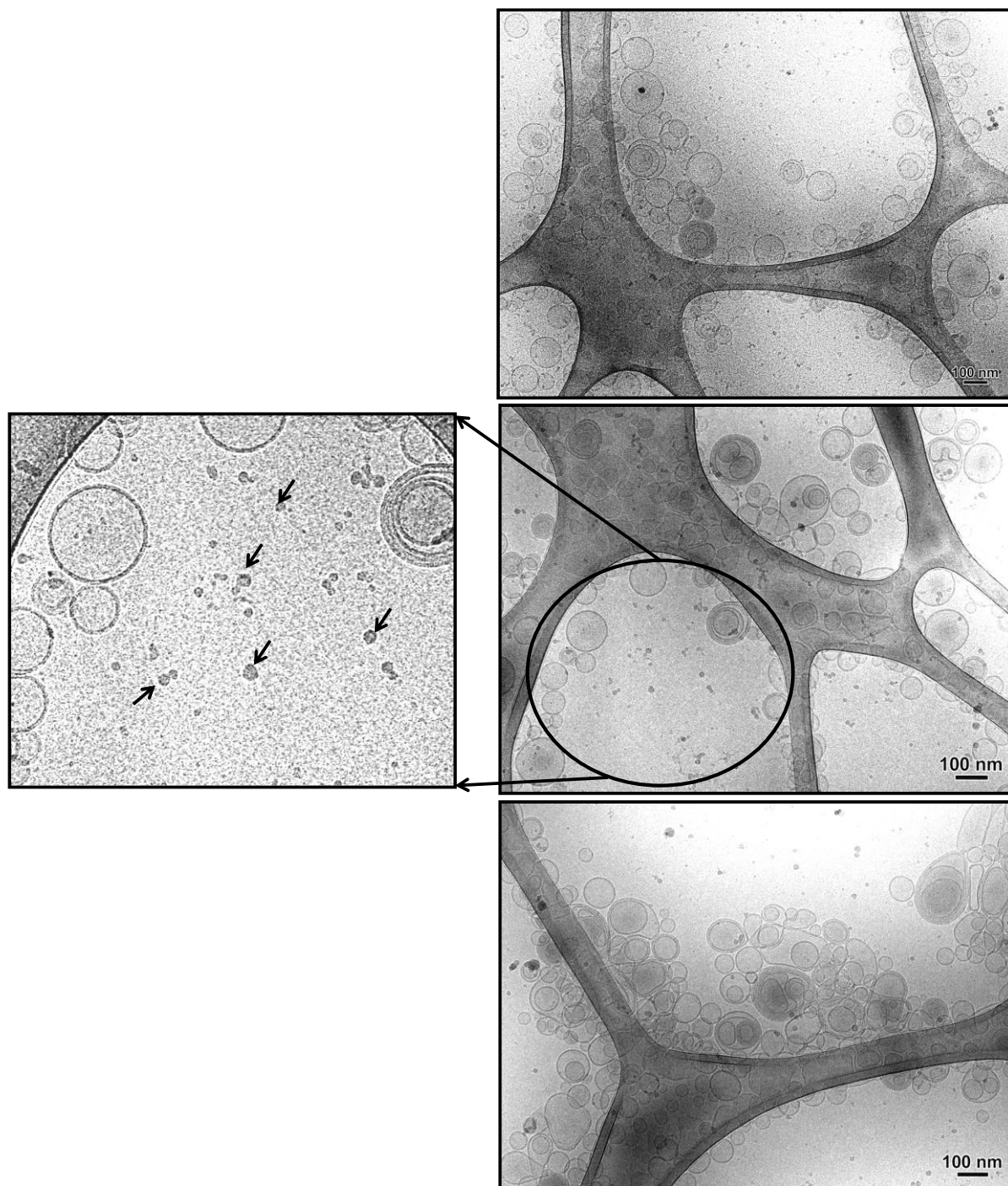


Figure 8: Images réalisées par cryo-MET des objets mixtes DMPC/ β CD-C10 dans l'eau ($[DMPC]=1,0 \cdot 10^{-3}$ M; 7 mol% β CD-C10). On observe principalement des vésicules unilamellaires et multilamellaires dont le diamètre est centré autour de 100 nm. L'image zoomée (à gauche) montre la présence de structures beaucoup plus petites suggérant l'existence de deux types d'objets.

Les données obtenues par DQEL sont en bon accord avec les images obtenues par cryo-MET. Les tailles des agrégats visualisés par microscopie électronique n'excèdent pas 200 nm et présentent une distribution continue centrée sur une centaine de nm. Ces dimensions sont sensiblement inférieures aux diamètres rapportés par DQEL pour la raison que cette dernière technique détermine le diamètre hydrodynamique des objets relatif à leur mouvement brownien et prend donc en compte la couche d'eau entraînée par le déplacement des particules.

Fait intéressant, les objets mixtes issus de l'hydratation d'un film mixte de DMPC et de β CD-C10 sont des vésicules majoritairement unilamellaires et de courbure homogène, démontrant la bonne miscibilité des deux composés. Il semble toutefois qu'à un taux de 7mol% en cyclodextrine, de très petites structures se forment, non détectées par DQEL certainement en raison de leur petite taille et de leur faible proportion. Ce phénomène pourrait être relié aux résultats de DSC et de diffraction de rayons X qui suggèrent qu'à 25°C, température de cryo-congélation des objets, le système n'est pas totalement dans l'état liquide des chaînes et la composition de 7mol% correspond au domaine de séparation de phases à basse température (**Figure 4**).

3. Conclusions

Cette étude dans son ensemble démontre la faisabilité d'obtenir des liposomes mixtes DMPC/ β CD-C10 ce qui est très encourageant pour de futures applications en vectorisation de molécules thérapeutiques. Notamment, l'insertion des cyclodextrines amphiphiles dans des vésicules de phospholipides, compatibles avec les milieux physiologiques et aptes à interagir avec les membranes cellulaires est un aspect capital si l'on considère que les nanoparticules constituées uniquement de cyclodextrines amphiphiles sont instables en présence de sels monovalents tels que NaCl ou KCl.

La seconde information est relative à la capacité du dérivé β CD-C10 à s'insérer dans une bicouche lipidique et donc très certainement à interagir avec les membranes biologiques tout en préservant leur structure de base lamellaire dans la limite d'au moins 10 mol%.

A ce stade, il serait néanmoins profitable de conforter les données structurales ainsi que le comportement thermique des mélanges binaires DMPC/ β CD-C10 en excès d'eau afin d'établir plus précisément le diagramme de phase correspondant. En effet, les expériences de diffraction des rayons X ont été réalisées à seulement deux températures et à l'aide d'un banc de laboratoire dont la source est peu puissante. Le recours au rayonnement synchrotron est indispensable pour progresser et par exemple enregistrer des diagrammes de diffraction lors de cinétiques en température pour décrire pas à pas les transitions endothermiques mises en évidence en DSC.

Références Bibliographiques

Choisnard L., Gèze A., Vanhaverbeke C., Yaméogo J.B.G., Putaux J.L., Brasme B., Jullien L., Boullanger S., Elfakir C. and Denis Wouessidjewe., Physicochemical characterization of α -, β -, and γ Cyclodextrins bioesterified with decanoate chains used as building blocks of colloidal nanoparticles. *Biomacromolecules*. 12, **2011**, 3031-3038.

Lesieur S., Charon D., Lesieur P., Ringard-Lefebvre C., Muguet V., Duchêne D., Wouessidjewe D., Phase behavior of fully hydrated DMPC-amphiphilic cyclodextrin systems. *Chem Physic Lipids*. 106 (2), **2000**, 127-144.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif de ma thèse était de développer des nano-réservoirs multi-compartmentés, destinés à être utilisés comme vecteurs de biomolécules ou de substances biologiquement actives et obtenus par auto-assemblage de lipides et de nouveaux dérivés de β -cyclodextrine (β CD) substitués sur leur face secondaire par des chaînes d'acide gras saturées selon une synthèse originale effectuée par estérification enzymatique des groupes hydroxyle de la cyclodextrine. Mes travaux ont plus spécialement porté sur le dérivé comportant des chaînes hydrocarbonées à 10 atomes de carbone avec un degré de substitution $n=7-8$ (β CD-C10). Cette molécule est insoluble dans l'eau mais présente des propriétés d'agent de surface propice à son insertion dans des organisations lipidiques lyotropes de type cristal-liquide. Par ailleurs, dans des conditions opératoires bien établies de nanopréciipitation, la β CD-C10 s'agrége spontanément en milieu aqueux pour conduire à une dispersion stable de particules submicroniques dont l'arrangement interne adopte une structure hexagonale.

Les travaux de thèse ont été tout d'abord focalisés sur la préparation et la caractérisation de nano-objets auto-assemblés incorporant le dérivé β CD-C10 et un tensioactif soluble (TA) doté de la propriété de détergence. Trois composés non-ioniques ayant des groupes polaires de structures différentes ont été étudiés : le Polysorbate 80 (P80), le Brij 98, et le n-dodécyl β ,D-maltoside (DM). Ab initio, nous souhaitons solubiliser la cyclodextrine amphiphile en milieu aqueux, sous forme de molécules individualisées au sein de micelles de tensioactif afin de pouvoir examiner sa capacité à inclure dans sa cavité une substance hydrophobe. De manière à contrôler le processus de solubilisation, nous avons déterminé les compositions caractéristiques des systèmes TA/ β CD-C10 correspondant à des modifications structurales drastiques, ou changements d'état, lors de l'addition contrôlée d'une solution micellaire de tensioactif à des nanoparticules de cyclodextrine amphiphile préformées par nanopréciipitation. Les domaines d'existence des différents états structuraux issus du mélange TA/ β CD-C10 ont été déterminés par turbidimétrie. Les objets obtenus in fine ont été analysés par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) complétée par la réalisation d'images de microscopie électronique par cryo-transmission (Cryo-MET). Le comportement de partage des trois tensioactifs entre le continuum aqueux et les objets contenant la cyclodextrine amphiphile a été établi. En particulier, les mesures de turbidité montrent qu'à partir d'une certaine teneur en tensioactifs, l'addition supplémentaire de ces derniers conduit à une simple dilution des objets formés soulignant que les molécules de tensioactif ne s'associent plus à la cyclodextrine amphiphile. La limite de solubilisation est atteinte pour les trois tensioactifs à une fraction molaire de 0,95 (P80), 0,36 (Brij 98) et 0,78 (DM) dans les objets et à des concentrations dans la phase aqueuse de $[P80]_{aq} = 39,1$ mM, $[Brij]_{aq} = 1,1$ mM et $[DM]_{aq} = 0,3$ mM, soit respectivement 3000 fois, 4 fois et 2 fois la cmc du TA. Ce résultat montre que les structures contenant la cyclodextrine amphiphile atteignent un niveau de saturation en TA au-delà duquel ces derniers s'accumulent dans le continuum aqueux.

Les analyses en DQEL mettent en évidence que les objets obtenus à ce stade sont de dimension colloïdale mais largement supérieure à celle des micelles de TA seul, suggérant que l'état de micelles mixtes n'est pas atteint.

Le second résultat marquant de cette première étude provient de la démonstration qu'il est possible de préparer des objets nanométriques par simple hydratation de films mixtes TA/ β CD-C10 aux compositions correspondant à l'état structural limite de la miscibilité des deux composés. Les images de cryo-MET mettent en évidence l'existence de structures délimitées par une membrane très probablement constituée de bicouches moléculaires: tubules ou vésicules sphériques. Ces observations confirment clairement que la solubilisation n'est pas totale quel que soit le tensioactif considéré suggérant que la cyclodextrine amphiphile gouverne l'assemblage plurimoléculaire et impose un paramètre d'empilement moyen propice à une courbure spontanée plane.

Le troisième aspect de cette étude concernait l'insertion d'un traceur fluorescent au sein des nano-objets mixtes TA/ β CD-C10, pris comme modèle de future substance hôte. Le rouge de Nile a été choisi pour sa nature hydrophobe, son aptitude à former un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine native et sa grande sensibilité à la polarité de son environnement. La localisation de ce traceur au sein des assemblages mixtes a été examinée par spectroscopie de fluorescence, notamment pour tenter de mettre en évidence l'éventuelle formation d'un complexe d'inclusion avec la β CD-C10. L'organisation intermoléculaire des systèmes a été en particulier approchée par la technique de transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET) en utilisant un donneur hydrosoluble susceptible de détecter le positionnement à l'interface du rouge de Nile. Les résultats montrent l'incorporation de la molécule modèle au sein des objets mixtes dans un environnement local hydrophobe distinct de celui de micelles pures de tensioactifs. Les spectres d'émission de fluorescence montrent que le rouge de Nile, au sein des systèmes TA/ β CD-C10, est situé au voisinage très proche de la cyclodextrine sans toutefois permettre d'affirmer son inclusion effective dans la cavité de cette dernière bien que les expériences de FRET mettent en évidence une localisation proche de l'interface hydrophile/hydrophobe des objets, a priori compatible avec la formation d'un complexe d'inclusion si l'on suppose que les groupes oligosaccharidiques de la β CD-C10 sont en contact avec la phase aqueuse. Si l'on examine plus en détail les données de FRET, les trois systèmes mixtes présentent des différences en termes de rendement de transfert d'énergie en fonction de la teneur en β CD-C10, suggérant une modulation de la localisation du traceur fluorescent vis-à-vis de la cyclodextrine en fonction de la nature du tensioactif.

Dans la seconde partie de la thèse, notre intérêt a porté sur la recherche de conditions permettant de construire des assemblages mixtes nano-dispersés à partir de β CD-C10 et d'un lipide insoluble mais lyotrope, la monooléine (MO), mono-ester de glycérol et d'acide oléique, dont l'hydratation conduit spontanément à la formation de structures bicontinues composées de canaux aqueux délimités par une membrane lipidique et organisés selon une topologie tridimensionnelle bien définie, notamment de type cubique bicontinue. L'idée ici était de conserver la topologie des assemblages de monooléine en présence de cyclodextrine amphiphile et d'élaborer des architectures multi-compartmentées comptant au moins la membrane lipidique, les canaux aqueux et les cavités de β -cyclodextrine. De plus, dans la mesure où ces

nouveaux édifices étaient voués à une future utilisation en vectorisation de principes actifs thérapeutiques, il fallait les stabiliser par des chaînes de PEG, ce qui a été réalisé par addition de Polysorbate 80.

Les résultats montrent que l'association MO/P80 (95 :5 mol%)- β CD-C10, notamment à une composition en cyclodextrine amphiphile de 4 mol% par rapport aux lipides totaux, conduit par simple hydratation de films mixtes à des assemblages plurimoléculaires qui peuvent être dispersés en objets submicroniques par faible apport d'énergie mécanique. L'analyse DQEL de ces systèmes et leur visualisation directe en Cryo-MET ont montré la coexistence de deux types d'objets, des cubosomes et des vésicules. Fait intéressant, l'augmentation de la teneur en cyclodextrine favorise la proportion de cubosomes confirmant que celle-ci est bien incorporée dans la membrane de monooléine. L'étude approfondie de l'encapsulation d'un composé hydrophobe, l'Oil Red, au sein des objets a été menée par spectrophotométrie d'absorption UV-visible, l'Oil Red étant un chromophore aisément dosable en solution éthanolique. Les données obtenues ont permis de montrer que le rendement d'encapsulation de colorant dans les objets mixtes MO/P80/ β CD-C10 atteint 91% contre 81% en absence de cyclodextrine. Ceci peut traduire une différence d'organisation ou de répartition colorant/molécules lipidiques au sein des objets en fonction de la présence ou non de cyclodextrine n'excluant pas une interaction préférentielle avec la cavité de cette dernière au sein des structures mixtes.

La troisième et dernière étude concernait l'évaluation des interactions de la β CD-C10 avec un phospholipide, la dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) dont l'organisation lamellaire pouvait être prise comme modèle très simplifié des membranes biologiques et offrait potentiellement une voie d'obtention de liposomes mixtes phospholipide/ β CD-C10. L'approche envisagée a consisté à parcourir le diagramme de phase binaire en excès d'eau des deux composés dans la région n'excédant pas 10 mol% en cyclodextrine amphiphile, ceci par calorimétrie différentielle (DSC) pour le comportement thermotrope du système et diffraction des rayons X (DRX) aux petits et grands angles pour la caractérisation structurale des phases formées. Les résultats démontrent clairement que les deux composés s'associent pour constituer des phases lamellaires mixtes sans qu'il ne soit détecté une ségrégation de phase de la cyclodextrine seule. Cependant, les données de DRX font apparaître l'existence de deux structures lamellaires distinctes à 10 °C pour des rapports molaires en β CD-C10 supérieurs à 4mol%, soit en-dessous de la transition solide-liquide des chaînes de la DMPC, suggérant une miscibilité partielle des composés au sein des bicouches. Par contre, à 35°C, au-dessus de la température de transition, une seule structure lamellaire est observée quelle que soit la teneur en cyclodextrine entre 1 et 10 mol%, montrant une totale miscibilité phospholipide/cyclodextrine.

Après extrusion séquentielle à 35°C, les mélanges mixtes hydratés à plus de 90% d'eau et contenant 4 et 7 mol% de β CD-C10 produisent des nano-objets, stables et de diamètres hydrodynamiques de distribution monomodale centrée autour de 150 nm d'après l'analyse DQEL, majoritairement des vésicules unilamellaires comme le révèlent les images de Cryo-MET.

Bien que méritant d'être approfondis, notamment concernant la compréhension du diagramme de phase binaire DMPC/ β CD-C10, ces éléments sont très encourageants parce qu'ils soulignent que la cyclodextrine amphiphile a une certaine affinité avec les bicouches de phospholipides et donc devrait en présenter une avec les membranes biologiques, ceci en restant compatible avec la structure lamellaire hôte. D'autre part, nous avons montré qu'il était possible de préparer des liposomes chargés de cyclodextrine amphiphile jusqu'à une teneur au moins égale à 10 mol%.

L'ensemble des résultats acquis au cours de cette thèse démontrent que de nouveaux édifices mixtes à base d'une cyclodextrine amphiphile et d'un composé lipidique peuvent être obtenus, tous issus de processus d'auto-assemblage en milieu aqueux. Ces édifices génèrent soit spontanément soit à l'aide de procédés très simples, des nanostructures stables, riches en lipides et compatibles avec une future utilisation biomédicale ou pharmaceutique. Ces nano-objets sont bi- ou multicompartimentés et contiennent au minimum 4mol% de cavités de β -cyclodextrine localement concentrées dans chacun d'entre eux. On distingue principalement :

- Des vésicules mixtes de tensioactifs PEGylés et de β CD-C10
- Des vésicules mixtes non-ioniques de tensioactif à tête polaire sucre et de β CD-C10
- Des vésicules mixtes de monooléine/ β CD-C10 PEGylées
- Des cubosomes mixtes de monooléine/ β CD-C10 PEGylés
- Des liposomes mixtes DMPC/ β CD-C10

Tous ces systèmes ont la capacité d'incorporer au sein de leur matrice une substance hôte hydrophobe, la présence de cyclodextrine amphiphile se montrant favorable à cette incorporation.

D'un point de vue fondamental, les données présentées dans ce manuscrit illustrent sensiblement la propriété des lipides à façonner des entités supramoléculaires nano-structurées avec d'autres molécules amphiphiles. Inversement, le greffage de résidus lipidiques sur une cyclodextrine se révèle être un excellent moyen pour introduire cette molécule-cage dans une membrane.

D'un point de vue applicatif, ces données sont essentielles pour le développement de futurs vecteurs, puisqu'elles répondent clairement et positivement à la question de pouvoir construire des réservoirs mixtes lipides/cyclodextrine amphiphile propices au transport de molécules actives, problématique posée au départ de la thèse. Elles constituent le point de départ à de nouveaux questionnements soulevés au cours des études entreprises et autant de perspectives. Sans prétendre être exhaustifs, nous pouvons aborder quelques aspects qui mériteraient une attention particulière pour progresser dans la compréhension et l'applicabilité des nano-objets mis au point ici.

Tout d'abord, un avantage visé de l'association de la β CD-C10 avec des lipides est de rendre la cyclodextrine amphiphile compatible avec les milieux biologiques. Cela sous-entend sa capacité à passer les barrières que sont les membranes cellulaires mais aussi à stabiliser les nano-objets porteurs de cavités dans des liquides physiologiques, notamment en présence de sels monovalents. En effet, les nanoparticules de cyclodextrines substituées s'agrègent

fortement dans de telles conditions. Ce point mériterait d'être confirmé, c'est-à-dire de procéder à l'élaboration des objets mixtes en présence de sels et d'examiner leur stabilité. Au-delà, se posera la question de la compatibilité plasmatique des nano-systèmes, en particulier pour une future administration par voie parentérale.

Le second aspect auquel nous n'avons pas répondu de façon certaine porte sur la faculté des molécules de cyclodextrine amphiphile à former effectivement un complexe d'inclusion avec un hôte hydrophobe lorsque ces deux composés se trouvent au sein de la matrice lipidique. Nos résultats ne sont pas contradictoires avec cette hypothèse mais restent insuffisants pour une démonstration. La spectroscopie de fluorescence semble donc limitée pour répondre à ce questionnement. A notre connaissance, il n'y a pas ou très peu d'études publiées ayant permis la mise en évidence directe d'une inclusion dans la cavité d'une cyclodextrine portant des chaînes hydrocarbonées sur sa face secondaire. Il serait peut-être intéressant d'employer la résonance magnétique nucléaire afin de visualiser une éventuelle corrélation entre les protons de la substance hôte et les protons internes de la cavité de la cyclodextrine, à la condition que les concentrations en espèces recherchées soient suffisamment élevées. Bien que le système soit complexe puisqu'à plus de deux constituants et plutôt apparenté à un système au moins bi-phasique, la microcalorimétrie pourrait être un outil à exploiter.

Concernant les nano-objets de type liposomes mixtes et cubosomes mixtes, les systèmes lipidiques de base (liposomes et cubosomes) étant déjà largement référencés comme transporteurs efficaces de substances thérapeutiques ou de biomolécules actives, il apparaît quasiment immédiat d'évaluer ces nouveaux assemblages mixtes quant à leurs interactions avec des systèmes vivants, en commençant par des lignées cellulaires modèles puis en effectuant des premiers tests *in vivo*. L'insertion spontanée de la β CD-C10 au sein de bicouches de DMPC est encourageante à ce stade.

ANNEXES

Annexes

Communications lors de congrès scientifiques

Communications nationales

- 7 et 8 Juin 2012, Châtenay-Malabry: 12èmes Journées de l'Ecole doctorale Innovation thérapeutique: **Fluorescence resonance energy transfer in surfactant micelles incorporating amphiphilic cyclodextrins.**
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 14 et 15 Juin 2012, Grenoble: Journées scientifiques du médicament: nouvelles stratégies thérapeutiques: **Interaction between amphiphilic cyclodextrin/detergent mixed assemblies with vesicle of DMPC: Nanosystems for drug encapsulation and delivery.**
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 10 au 13 Juillet 2012, Paris: 14ème conférence International sur les films moléculaires organisés (ICOMF): **Bioesterified polysubstituted-cyclodextrin/surfactant obtained by multilevel self-assembly.**
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 10 au 14 Novembre 2013, Saint-Jean-Cap-Ferrat (Nice), France: 10th GERLI/16th GEM Lipidomics meeting "From Membranes to Pathologies": **Nanoparticles and micelles of biotransesterified amphiphilic cyclodextrins.**
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 2 au 4 Décembre 2013, Orléans: Groupe de Recherche sur la Vectorisation (GTRV): **Influence of non-ionic surfactants on the formation mixed nano-objects of amphiphilic cyclodextrins and surfactants molecules.**
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.

Communications internationales

- 26 et 27 Septembre 2012 Australie: Controlled Release Society (CRS) :
Inclusion complexation with amphiphilic bio-transesterified cyclodextrins in nanostructured environment.
L. Zerkoune A. Angelova, F.X. Legrand, L. Choisnard, A. Geze, D. Wouessidjewe, and S. Lesieur.
- 7 au 13 Juillet 2013, Londres: ULLA Summer SCHOOL 2013:
Bioesterified cyclodextrins assemblies.
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 2 au 4 Octobre 2013, Turquie: 3^{ème} Conférence Européenne sur les Cyclodextrines:
PEGylated nanoparticles of bioesterified cyclodextrins obtained by self-assembly.
L. Zerkoune A. Angelova, F.X. Legrand, L. Choisnard, A. Geze, D. Wouessidjewe, and S. Lesieur.
- 9 au 30 Mai 2014, Saarbrücken (Allemagne): 17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken (Allemagne):
Particle solubilization of amphiphilic cyclodextrin nanospheres by a non-ionic detergent.
L. Zerkoune A. Angelova, F.X. Legrand, L. Choisnard, A. Geze, D. Wouessidjewe, and S. Lesieur.
- 3 au 7 Août 2014, 18th International Biophysics Congress (IUPAB), Brisbane, Queensland:
Incorporation of amphiphilic cyclodextrins in biomimetic lipid assemblies.
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur.
- 27 au 30 Août 2014, Helsinki: Globalization of Pharmaceuticals Education Network (GPEN):
Supramolecular assemblies of amphiphilic β -cyclodextrin with lipids.
Leïla Zerkoune, Angelina Angelova, Luc Choisnard, Annabelle Gèze, Denis Wouessidjewe and Sylviane Lesieur. (Communication invitee)

Articles publiés

Bioesterified polysubstituted-cyclodextrin/surfactant nanoparticles obtained by multilevel self-assembly.

L. Zerkoune, A. Angelova, L. Choisnard, A. Gèze, D. Wouessidjewe and S. Lesieur. *MATEC Web of Conferences* 4, 05001. 2013.

Nano-Assemblies of modified cyclodextrins and their complexes with guest molecules: incorporation in nanostructured membranes and amphiphile nanoarchitectonics design.

L. Zerkoune, A. Angelova and S. Lesieur. *Nanomaterials*. 4, 741-765. 2014.

ARTICLE

Bioesterified polysubstituted-cyclodextrin/surfactant nanoparticles obtained by multilevel self-assembly.

MATEC Web of Conferences 4, 05001. 2013.

Bioesterified polysubstituted-cyclodextrin/surfactant nanoparticles obtained by multilevel self-assembly

L. Zerkoune¹, A. Angelova^{1,*}, L. Choisnard², A. Gèze², D. Wouessidjewe² and S. Lesieur¹

¹CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, Univ Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France

²DPM, CNRS UMR 5063, ICMG FR 2607, UFR of Pharmacy, University of Grenoble, France

*e-mail: Angelina.Angelova@u-psud.fr

Abstract. The purpose of this work is to investigate the inclusion complexation between a novel amphiphilic biotransesterified cyclodextrin (CD), incorporated in nanostructured environment, and a model drug compound. A water-insoluble γ -cyclodextrin derivative (γ -CD- C_{10}), polysubstituted with multiple ($n=7-8$) decanoyl chains (C_{10}) on the secondary face, is produced by enzymatically-assisted esterification. The γ -CD- C_{10} derivative is embedded in amphiphilic nanoenvironment created by self-assembly with the lipophilic dye Nile red (NR) and the non-ionic surfactant polysorbate 80 (P80). The inclusion complexation and the environmental effects upon the γ -CD- C_{10} /NR/P80 nanoparticle (NP) formation, in a multilevel self-assembly approach, are investigated by means of steady-state fluorescence and Förster resonance energy transfer (FRET) techniques. Quasi-elastic light scattering (QELS) is used to control the NP size distribution during the sequential steps of the assembling process.

1 Introduction

Cyclodextrins (CDs) are recognized host materials capable of inclusion complex formation with guest water-insoluble molecules, which are set in their hydrophobic nanocavities. This feature is being used to improve drug stability and bioavailability by increasing the drug permeability properties, solubility and/or dissolution through inclusion complexation, as well as to reduce the drug toxicity and side effects [1-9]. The formation of complexes between CDs and drug molecules *via* dynamic noncovalent interactions, in a host-guest model, has drawn considerable interest [1,9-12].

A recent methodology for grafting of alkyl chains on the secondary face of native CDs by enzymatic transesterification, using thermolysin as a biocatalyzer, has opened new possibilities for the design of drug nanocarriers with colloidal behaviour [8,9]. Amphiphilic CD derivatives with grafted decanoyl chains (CD- C_{10}) may self-assemble into nanospheres with multilamellar

inner organization or into reservoir-type particles, which can embed lipophilic drugs [5,7-9]. However, the unmodified CD- C_{10} particles may readily aggregate depending on the surroundings. At variance, the modification of the CD- C_{10} particles by nonionic surfactants, like polysorbate 80 (P80) (which involves poly(ethylene glycol) moieties in the polar head-group region) is anticipated to increase their steric stability, bioavailability, and cellular uptake. Towards this possibility, we here create mixed amphiphilic γ -CD- C_{10} /P80 assemblies and study the inclusion complexation mechanism with a fluorophore substance employed as a model drug.

The steps of the multilevel assembly approach leading to formation of polysubstituted-CDs/surfactant/model-drug nanoparticles (NPs) are schematically presented in Fig. 1. The chemical structures of the investigated compounds are shown in Fig. 2. Nile red (NR) was chosen as a model drug (interacting with the CD cavity) because of its hydrophobic fluorophore and

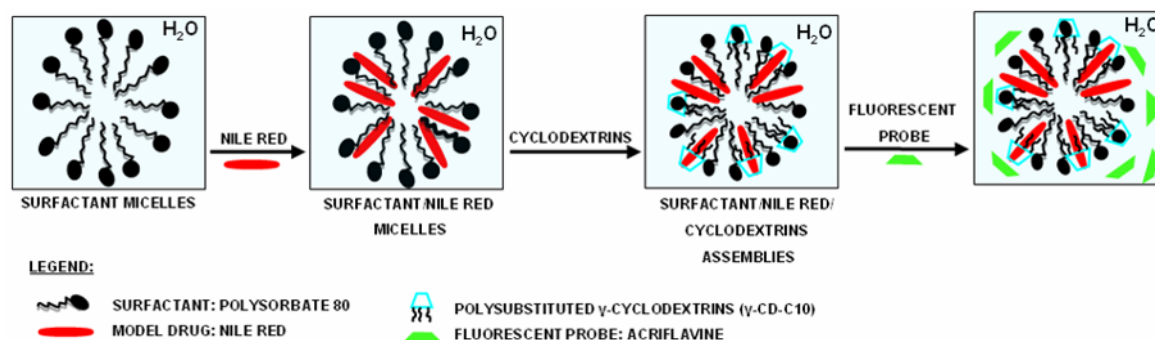


Fig.1. Scheme of the multilevel self-assembly process at a low molar content of γ -CD- C_{10} .

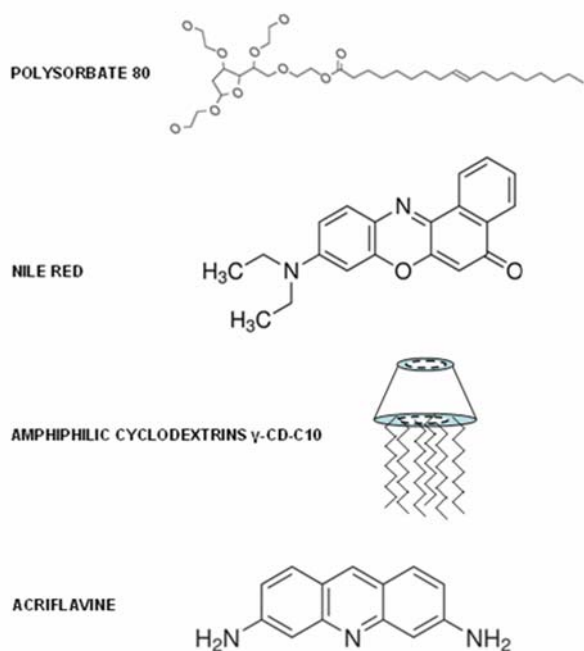


Fig.2. Structural formulae of the investigated molecules.

its stable fluorescence. NR has been previously studied as a polarity-sensitive fluorescence probe suitable for monitoring of structural transformations and intermolecular interactions upon micropolarity changes in the surroundings [13,14].

The formation of an inclusion complex between the γ -CD-C₁₀ molecules and the guest fluorophore NR is studied here by fluorescence techniques. Fluorescence and UV-Visible spectroscopies have been appropriate methods for establishing the formation of inclusion complexes between CDs and fluorophores [15-17]. Here nanostructured environment of PEGylated micelles was prepared using the non-ionic surfactant P80 (Fig. 2). NR was added to the medium in order to form micelles incorporating the fluorophore (Fig. 1). Then, different amounts of cyclodextrins (γ -CD-C₁₀) were added in order to study the complex formation between the lipophilic NR and the CD cavities in nanostructured surroundings. Förster resonance energy transfer (FRET) was investigated between the donor dye acriflavine (AC) (Fig. 2), included in the aqueous phase, and the acceptor NR dye incorporated in the surfactant micelles or in the γ -CD-C₁₀-containing nanoassemblies.

2 Experimental section

2.1 Materials

Polysorbate 80 (P80), Nile red (NR), and acriflavine (AC) were purchased from Sigma-Aldrich. The amphiphilic γ -cyclodextrin derivative, γ -CD-C₁₀, was enzymatically synthesized as described by Choinsard *et al.* [9]. The average molecular weight, M_n , of the γ -CD-C₁₀ ester was 2505 g/mol as determined by MALDI-TOF analysis.

2.2 Micelles preparation

100 ml of P80 micellar solution was prepared at concentration 10 mM in pH 7.4 phosphate buffer (solution A). 0.036 g of hydrophobic NR was added to 50 ml of solution A. This yielded 2.25 mM dye concentration in P80 micellar medium (solution B).

2.3 Preparation of γ -CD-C₁₀/P80 mixed assemblies incorporating the guest NR

NPs dispersions were prepared at different molar ratios of γ -CD-C₁₀ with regard to P80. Briefly, 2.5 mg, 5 mg, 7.5 mg or 10 mg of γ -CD-C₁₀, corresponding to 0.9 mol%, 1.8 mol%, 2.9 mol%, and 3.5 mol% of cyclodextrins, were added to 14900 μ l of solution A (solution C). Then, 100 μ l of solution B were added to solution C in order to obtain 15 ml of γ -CD-C₁₀/P80 mixed assemblies incorporating the fluorophore NR. The resulting concentration of NR was equal to 1.5×10^{-5} M in this 15 ml preparation. Vortexing and sonication was applied to ensure mixing of the components in all cases.

2.4 Fluorescence spectra measurements

Excitation and emission spectra of the two dyes were recorded at room temperature by means of a spectrofluorimeter SPEX Fluorolog (model 1681 0.22 m) with an excitation wavelength of λ_{ex} = 455 nm for acriflavine (AC) and of λ_{ex} = 543 nm for Nile red (NR). The excitation and emission spectra were normalized in order to display the overlapping of bands between the fluorescence emission of AC and the absorption spectrum of NR. The excitation and the emission spectra of AC were obtained in phosphate buffer (pH 7.4), whereas those of NR were acquired in P80 micelles. The AC and NR concentrations were 3.3×10^{-8} M and 5×10^{-6} M, respectively.

2.5 FRET measurements

Steady-state fluorescence spectra measurements were performed with the γ -CD-C₁₀/NR/P80 nanoassemblies in the presence of AC (donor dye) in the aqueous phase using the same equipment. Briefly, 1 ml solution of NR-labelled γ -CD-C₁₀/P80 mixed micelles, incorporating amphiphilic CDs with a varying molar fraction, was dropped down in a spectroscopy cell containing 1980 μ l of phosphate buffer (pH 7.4). For the FRET study, 20 μ l of acriflavine stock solution (C_{stock} = 0.05 mM) were added to the spectroscopy cell. The resulting AC and NR concentrations, in the spectroscopy cell, were of $3.3 \cdot 10^{-8}$ M and $5 \cdot 10^{-6}$ M, respectively. FRET was recorded for the AC/NR donor/acceptor pair at room temperature. The excitation wavelength was set at 480 nm and the emission spectra were collected from 500 to 800 nm.

2.6 Size measurements

The samples studied by fluorescence spectroscopy were analysed also by quasi-elastic light scattering (QELS). The Zetasizer Nano ZS-90 system was a MALVERN instrument (light source He-Ne laser 633 nm, maximum

power 5 mW). Every sample was measured three times. The scattering angle was fixed at 90° and the temperature was 25°C. The concentrations of the samples were the same as for the fluorescence experiments for either the initial P80/NR micelles or the γ -CD- C_{10} /NR/P80 mixed nanoassemblies.

3 Results and discussion

3.1 Fluorescence spectra of the studied dyes

Figure 3 characterizes the AC/NR FRET pair. It shows that the emission spectrum of the donor dye, acriflavine (AC), overlaps with the excitation spectrum of the acceptor dye, Nile red (NR). The established good spectral overlap implies that it should be possible to observe a FRET event from acriflavine to Nile red when the two fluorophores come in a sufficient proximity in the investigated nanostructured system. In fact, FRET occurs when the electronic excitation energy of a donor chromophore is transferred to an acceptor molecule, located nearby, through dipole-dipole interaction occurring in the donor-acceptor pair.

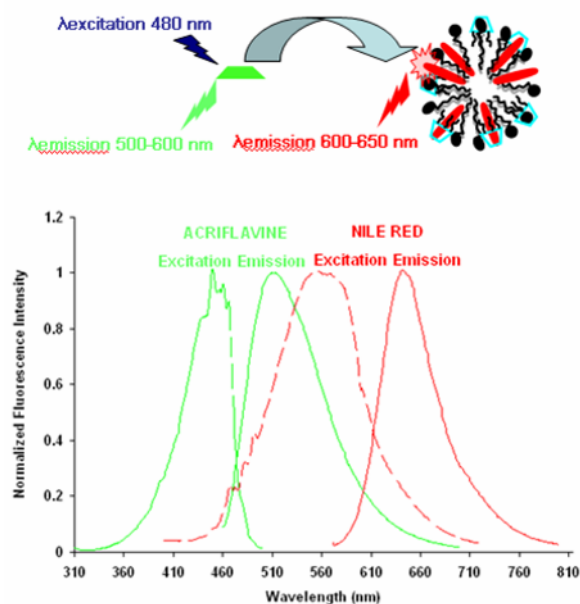


Fig.3. Overlapping between the fluorescence emission of the donor dye (acriflavine) in a phosphate buffer and the absorption spectrum of the acceptor molecule (Nile red) in P80 micelles. The excitation wavelengths were 455 nm and 543 nm for acriflavine and Nile red, respectively. The emission spectra were recorded in the range 460–700 nm and 570–800 nm for the two dyes, respectively.

3.2 Mechanism of inclusion complexation in NPs

In the investigated here colloidal nanoassemblies, the components of the FRET pair are located in different environments. AC is water soluble, while NR is incorporated in the mixed assemblies and may be anchored in the nanocavities of the γ -CD- C_{10} . The donor dye AC surrounds the P80/NR micelles as well as the γ -CD- C_{10} /NR/P80 NPs (Fig. 1, right). A greater proximity

of the two dyes, and hence more efficient FRET, would be achieved if the acceptor (NR) is located at the polar/apolar interfaces of the γ -CD- C_{10} /NR/P80 nano assemblies rather than solubilized deeply in the core of the micelles or the NPs formed at increasing CDs content.

Figure 4 shows that the donor dye AC is strongly fluorescent with a maximum emission at 510 nm. The fluorescence intensity of AC decreases sharply upon the addition of NR-labelled micelles (spectrum 2). The NR fluorescence emission was observed at 630 nm.

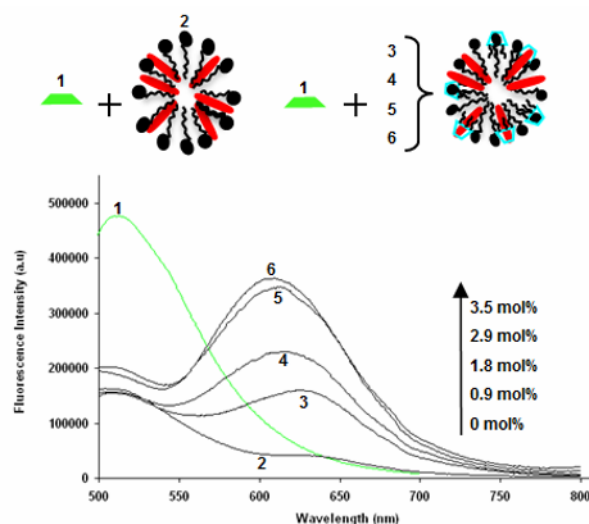


Fig.4. Fluorescence emission spectra of (1) acriflavine in phosphate buffer (pH 7.4) and in (2) Nile red/P80 micelles. The AC concentration is $3.3 \cdot 10^{-8}$ M and the NR concentration is $5 \cdot 10^{-6}$ M. The fluorescence emission maximum of NR is enhanced at increasing concentrations of amphiphilic CDs. The γ -CD- C_{10} molar fraction is varied as (2) 0 mol%, (3) 0.9 mol%, (4) 1.8 mol%, (5) 2.9 mol%, (6) 3.5 mol% with respect to P80 (see Inset). The excitation wavelength for AC is 480 nm.

Spectra 3 to 6 show the progressive increase in the emission maximum intensity of NR upon augmenting the molar fraction of γ -CD- C_{10} molecules in the NPs. The concentration of NR is constant in all cases. Hence, if NR has remained located at the same distance in the mixed structures (3–6) from the AC acceptor, the spectral intensities would be always equal to that in spectrum 2. However, one observes an increase in the fluorescence emission of NR and a blue shift of its fluorescence peak maximum at increasing molar fractions of amphiphilic γ -CD- C_{10} molecules, which present cavities for inclusion complexation. The fluorescence of NR is essentially stronger in the obtained NP assemblies with γ -CD- C_{10} as compared to that in P80 micelles. Evidently, inclusion complexes are formed between γ -CD- C_{10} and NR in nanoconfined geometries.

The increase in the fluorescence emission of NR and the blue shift of the NR peak maximum are more significant at higher molar fractions of γ -CD- C_{10} . This indicates an increased hydrophobicity of the NR surroundings and changes in the micropolarity around the NR fluorophore in the presence of CDs. Altogether, these results confirm that there is an inclusion complex formation between the hydrophobic nanocavities of the CDs and the guest model drug NR.

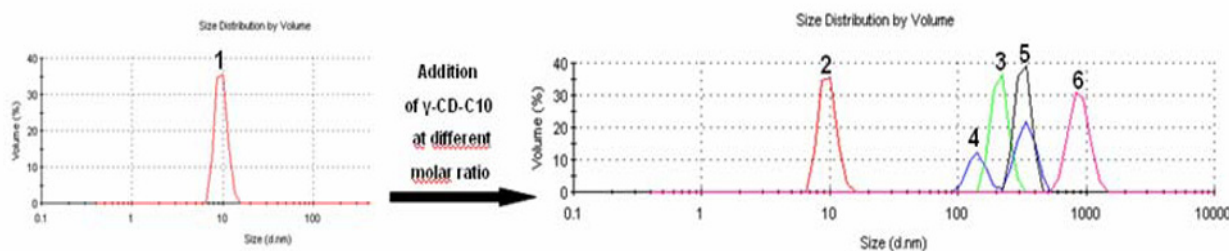


Fig.5. Particle size distributions of polysorbate 80/Nile red micelles (1, red curve) and of polysorbate 80/Nile red/ γ -CD-C₁₀ mixed assemblies with 0 mol% CD (2, red curve), 0.9 mol% CD (3, green curve), 1.8 mol% CD (4, blue curve), 2.9 mol% CD (5, black curve) and 3.5 mol% CD (6, pink curve).

At a low molar fraction of γ -CD-C₁₀ (< 1 mol%), the NR/CDs inclusion complexation most likely occurs at the polar/apolar interfaces of mixed micelles. Under these conditions, the proximity of NR to AC (which is situated in the aqueous phase) is highest and the attenuation of the AC fluorescence peak is maximal. The effects observed at higher molar fractions of CDs require a consideration of the NP sizes obtained upon γ -CD-C₁₀/NR/P80 self-assembly (Fig. 5).

3.3 Nanoparticle sizes

Quasi-elastic light scattering (QELS) was employed for determination of the particles sizes and distributions upon formation of mixed nanoassemblies with amphiphilic γ -CD-C₁₀. Figure 5 shows that there is an increase in the size of the P80/NR assemblies upon addition of CDs. This result confirms that there is an interaction between the amphiphilic CDs and the P80/NR micelles. It also suggests a structural change in the NP organization at increasing CDs content. The formation of γ -CD-C₁₀/NR/P80 assemblies leads to NP sizes in the range from 140 nm to 825 nm. Indeed, NR embedded in large NPs, different from micelles, cannot only be located at the polar/apolar interfaces. Its inclusion in the NPs interior will increase the distance to the AC fluorophore. Hence, the reduction of the AC fluorescence intensity should be smaller for bigger NPs.

4 Conclusions

The performed study demonstrated the inclusion complexation between novel biotransesterified amphiphilic cyclodextrins and a model drug (NR) in nanostructured environment created by multilevel self-assembly. A new FRET pair (AC donor/NR acceptor) was proposed for probing the location of the guest NR in P80 micelles or in the CDs nanocavities in NPs. Both the QELS and the fluorescence measurements were sensitive to the NP organization at varying γ -CD-C₁₀ content. The obtained results provided evidence for the occurrence of host-guest type of interactions in a nanostructured medium. The structural organization of the new NPs requires a separate investigation.

5 References

1. M.E. Davis, M.E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 1023-1035 (2004).
2. C.M. Fernandes, V.M. Teresa, F.J. Veiga, *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 79-88 (2002).
3. S.W. Jun, M.S. Kim, H.J. Park, S. Lee, J.S. Woo, S.J. Hwang, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 413-421 (2007).
4. S.M. Badr-Eldin, S.A. Elkheshen, M.M. Ghorab, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 819-827 (2008).
5. S. Lesieur, D. Charon, P. Lesieur, C. Ringard-Lefebvre, V. Muguet, D. Duchêne, D. Wouessidjewe, *Chem. Phys. Lipids.* **106**, 127-144 (2000).
6. A. Angelova, C. Fajolles, C. Hocquet, F. Djedaïni-Pilard, S. Lesieur, V. Bonnet, B. Perly, G. Le Bas, L. Maclaure, *J. Colloid Interface Sci.* **322**, 304-314 (2008).
7. L. Choïnard, A. Gèze, J.L. Putaux, Y.S. Wong, D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules* **7**, 515-520 (2006).
8. L. Choïnard, A. Gèze, C. Vanhaverbeke, J.B.G. Yaméogo, J.L. Putaux, B. Brasme, L. Julien, S. Boulanger, C. Elfakir, D. Wouessidjewe, *Biomacromolecules*, **12**, 3031-3038 (2011).
9. J.B.G. Yaméogo, A. Gèze, L. Choïnard, J.L. Putaux, A. Gansané, S.B. Sirima, R. Semdé, D. Wouessidjewe, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **80**, 508-517 (2012).
10. R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S.N. Hiremath, *J. Pharm. Sci. Tech.* **2**, 171-183 (2010).
11. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.* **212**, 275-279 (1999).
12. A. Angelova, C. Ringard-Lefebvre, A. Baszkin, *J. Colloid Interface Sci.* **212**, 280-285 (1999).
13. M. Valero, I. Grillo, C.A. Dreiss, *J. Phys. Chem. B* **116**, 1273-1281 (2011).
14. B.D. Wagner, P.G. Boland, J. Lagona, L. Issacs, *J. Phys. Chem. B* **109**, 7686-7691 (2005).
15. S. Rakshit, S. Vasudevan, *J. Am. Chem. Soc.* **7**, 1473-1479 (2008).
16. A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Fujiwara, *JOC article* **71**, 3592-3598 (2006).
17. E. Iglesias, *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 531 (2011).

Résumé:

L'idée directrice de ce travail de thèse était d'introduire au sein de mésophases lipidiques des molécules de β -cyclodextrine (β CD) amphiphiles obtenue par bio-estérification afin d'obtenir des nano-assemblages plurimoléculaires et multi-compartimentés combinant trois fonctions essentielles pour le transport ou la vectorisation de molécules thérapeutiques : (i) la capacité d'incorporer une substance d'intérêt par formation de complexe d'inclusion avec la cyclodextrine ; (ii) être biocompatibles et aptes à passer facilement les barrières biologiques ; (iii) pouvoir co-incorporer une seconde substance d'intérêt, hydrophile ou hydrophobe, dont l'action biologique soit différente de celle assurée par la première substance. L'ensemble des travaux ont porté sur le dérivé β CD-C10 polysubstitué en face secondaire par des chaînes hydrocarbonées en C₁₀ avec un degré moyen de substitution de 7,3. L'association de ce dérivé avec trois catégories de lipides a été envisagée : des tensioactifs micellaires non-ioniques (Brij 98, Polysorbate 80, n-dodécyl- β , D-maltoside), un lipide lyotrope non lamellaire formant des mésophases de type cubique bicontinue (monooléine), un phospholipide s'auto-organisant en bicouches propices à l'obtention de vésicules (dimyristoyl phosphatidylcholine).

Selon une démarche principalement physico-chimique, différentes techniques ont été mises en œuvre pour caractériser les systèmes mixtes lipide/ β CD-C10 aux échelles moléculaire et supramoléculaire : diffusion-diffraction des rayons X, calorimétrie différentielle, spectrophotométrie d'absorption UV-visible, spectroscopie de fluorescence, diffusion de la lumière statique (turbidimétrie) ou quasi-élastique, microscopie optique et microscopie électronique par cryo-transmission.

L'ensemble des résultats démontrent que le dérivé β CD-C10 forme spontanément ou selon un protocole très simple, des assemblages plurimoléculaires mixtes avec les trois catégories de lipides, assemblages dont la topologie dépend de la structure chimique du lipide et du taux de cyclodextrine amphiphile incorporé (tubules, vésicules uni- ou oligolamellaires, cubosomes). Ces assemblages sont stables et capables d'incorporer une substance hôte hydrophobe, notamment les vésicules mixtes tensioactif non-ionique/ β CD-C10 et les cubosomes mixtes monooléine/P80/ β CD-C10.

Mots clés : Cyclodextrines amphiphiles, lipides lyotropes, mésophases lipidiques, tensioactifs non ioniques, agrégats supramoléculaires, auto-assemblages mixtes.

Laboratoire de rattachement :

UMR CNRS 8612-Institut Galien Paris-Sud
Laboratoire de Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés
5 rue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry cedex

Pôle : Pharmacotechnie et Physico-Chimie Pharmaceutique

Université Paris-Sud 11
UFR « Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry »
5 rue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry cedex