HAL open science

Émulsions stabilisées par des nanoparticules biocompatibles pour des applications pharmaceutiques : influence de la nature et de la morphologie des nanoparticules

Baptiste Robin

To cite this version:

Baptiste Robin. Émulsions stabilisées par des nanoparticules biocompatibles pour des applications pharmaceutiques : influence de la nature et de la morphologie des nanoparticules. Pharmacie galénique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ010 . tel-04033253

HAL Id: tel-04033253

https://theses.hal.science/tel-04033253v1

Submitted on 17 Mar 2023

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.

Émulsions stabilisées par des nanoparticules biocompatibles pour des applications pharmaceutiques : influence de la nature et de la morphologie des nanoparticules

Biocompatible nanoparticle-stabilized emulsions for pharmaceutical applications: influence of the nature and morphology of the nanoparticles

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité du doctorat : Pharmacotechnie et Biopharmacie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France
Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 15 mars 2021, par

Baptiste ROBIN

Composition du Jury

Patrick PERRIN Professeur des Universités, Sorbonne Université	Président
Lazhar BENYAHIA Professeur des Universités, Le Mans Université	Rapporteur & Examinateur
Véronique NARDELLO-RATAJ Professeure des Universités, Centrale Lille Institut	Rapporteuse & Examinatrice
Valérie RAVAINE Professeure des Universités, Bordeaux INP	Examinatrice
Nicolas TSAPIS Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Examinateur

Direction de la thèse

Nicolas HUANG Maître de Conférences, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Florence AGNELY Professeure des Universités, Université Paris-Saclay	Co-directrice de thèse

Thèse de doctorat

NNT : 2021UPASQ010

Remerciements

Ce manuscrit est le fruit de trois années de travail au sein de l'Institut Galien Paris-Saclay. Je remercie donc **Elias Fattal** et **Myriam Taverna**, en tant que directeur et directrice de cette structure de recherche dans laquelle l'excellence côtoie toujours la bienveillance. J'espère aujourd'hui proposer un travail de qualité, et digne de la grande compétence scientifique que j'ai trouvée dans l'Institut.

Pour l'évaluation de ce travail, je veux aussi remercier le **Professeur Lazhar Benyahia**, la **Professeure Véronique Nardello-Rataj**, le **Professeur Patrick Perrin**, la **Professeure Valérie Ravaine** et le **Docteur Nicolas Tsapis**. Je suis honoré que vous ayez accepté de participer à cette thèse, et suis ravi d'être lu par vous.

En outre, cette thèse de doctorat fut l'occasion de rencontres très importantes pour moi, et je veux avoir un mot pour les nombreuses personnes qui ont fait de ce doctorat une aventure unique.

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, **Nicolas Huang**, avec qui tout a débuté. C'est toi qui m'as contacté, en 2017, pour me proposer ce projet… Merci à toi pour la confiance que tu m'as accordée à ce moment-là, et que tu ne m'as jamais retirée. Sous ta direction, j'ai toujours pu exprimer mon point de vue, toujours pu participer activement à la conduite du projet. Je me suis trompé parfois, mais je me suis toujours senti soutenu, et cette liberté m'a permis de m'affirmer en tant que chercheur. Je n'oublierai pas non plus ta sympathie et toutes ces discussions du quotidien que nous avons partagées.

Je remercie aussi **Florence Agnely**, co-directrice de cette thèse, qui n'a eu de cesse d'apporter sa rigueur et son expérience au projet. Tes remarques toujours pertinentes sur les résultats expérimentaux et sur l'orientation du projet nous ont toujours fait avancer. Je garde notamment en mémoire cette réunion au cours de laquelle tu nous as conseillé d'étudier la transition vitreuse de nos polymères. Force est de constater que ton intuition était la bonne ! Au-delà de tes indéniables compétences scientifiques, tu as aussi su entretenir une ambiance familiale au laboratoire, avec nos nombreux repas d'équipe ! Et si la crise sanitaire a mis un coup d'arrêt à notre consommation de fromage, je n'ai aucun doute que les bonnes habitudes reprendront un jour le dessus !

Il est un autre acteur de cette thèse que je veux remercier particulièrement, en la personne de **Nicolas Tsapis**. Ce projet est depuis le début (bien avant mon arrivée) une collaboration entre Nicolas, Florence et toi. C'est une chance pour le projet, et ce fut aussi une chance pour moi. Ton instinct et tes connaissances scientifiques font de toi un collaborateur de choix. Mais je veux te remercier bien au-delà de cela, car tes qualités humaines sont sans commune mesure. Toujours souriant, toujours à l'écoute, tu t'es rendu disponible à chaque fois que j'avais besoin de parler. Après chacune de nos discussions, je quittais ton bureau plein d'inspiration, de nouvelles idées et d'énergie. Tu m'as aussi beaucoup guidé dans la construction de mon projet professionnel, et tes conseils m'ont été d'un grand secours. Merci pour tout cela Nicolas, et j'espère vivement que nos chemins se recroiseront.

Ce projet fit l'objet de nombreuses autres collaborations, dont je tiens à remercier un à un les acteurs :

- **François-Xavier Legrand** et **David Chapron**, de l'équipe 2 de l'Institut Galien, pour leur aide dans la réalisation des expériences de DSC et de micro-DSC. L'apport de ces techniques dans le projet est capital, et votre investissement y est pour quelque chose. Merci pour votre disponibilité et pour nos discussions toujours constructives.
- **Sandrine Geiger**, de l'équipe 3 de l'Institut Galien, pour les expériences en AFM sur nos comprimés de nanoparticules. Merci pour le temps que tu m'as accordé.
- **Laurence Moine**, de l'équipe 5 de l'Institut Galien, pour nos discussions animées sur les polymères. Malgré mon absence évidente de prédisposition à la synthèse de polymères, tu as toujours été là pour m'aider et échanger. Je te dois une fière chandelle pour la publication sur le PLGA !
- **Valérie Nicolas**, de la plateforme MIPSIT, pour les observations en microscopie confocale. Votre bonne humeur communicative et votre humour à toute épreuve a sublimé chacun de nos échanges. Sans oublier votre grande compétence, qui nous a permis d'obtenir de nombreuses réponses à nos questions.
- **Michaël Trichet** et **Alexis Canette**, du service de microscopie électronique de l'IBPS, pour les heures d'observation en CryoMEB. Votre professionnalisme et votre flexibilité nous ont permis d'obtenir de beaux résultats, malgré des échantillons parfois (très) capricieux. Votre réactivité dans la correction des publications, ainsi que la pertinence de vos remarques ont été très appréciées.

Alexis, je garde en mémoire les après-midis de congélation pleins de discussions riches et variées. J'ai apprécié ta curiosité et ta culture, ainsi que ta persévérance à observer sous toutes les coutures des échantillons dont nous n'avons pas toujours tiré grand-chose !

- **Cynthia Gillet** et **Claire Boulogne**, d'Imagerie-Gif, pour m'avoir formé à la manipulation du MET, pour leur disponibilité et leurs réponses à mes nombreuses questions. Et toujours avec le sourire !

Ce projet a aussi été l'occasion d'accueillir à plusieurs reprises des stagiaires, dont le travail est à souligner :

- La toute première stagiaire que j'ai eu le plaisir d'encadrer a été **Camille Perrier**, pour un court mois de stage de découverte. Ces heures passées à préparer des capsules de DSC n'ont pas été vaines, tu peux être fière de toi ! J'ai déjà vanté ta curiosité, ta motivation et ta fiabilité, que j'ai beaucoup apprécié. Et si je continuerai probablement à me moquer des cadres en marketing, devant toi j'essaierai de le faire avec bienveillance !
- Je remercie aussi **Ophélie Bellance-Mina**, qui a réalisé son stage de M2 principalement sur la préparation des nanoparticules anisotropes. Je n'étais certes pas ton encadrant, mais j'ai passé beaucoup de temps avec toi, au quotidien. Nous avons vécu ensemble les hauts et les bas de la recherche, et ton stage avec nous fut l'occasion d'en apprendre plus sur moi-même (ainsi que sur le quadrille). Je te souhaite un bel avenir dans la formulation ; quant à moi j'espère avoir un jour la chance de boire à nouveau du chocolat de communion, sur un air d'Eugène Mona.
- Je remercie aussi **Elise Hamel**, qui fut mon assistante « angles de contact » pendant un stage de découverte de deux semaines. Ta grande curiosité et ta motivation m'ont impressionné, et ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi. Bonne route à toi !
- Enfin, j'ai une pensée pour **Petra Kovjenic**, qui a travaillé sur les applications de nos émulsions de Pickering dans un contexte thérapeutique. Tu n'as certes pas travaillé directement avec moi, mais nous avons tout de même eu de nombreuses discussions sur les émulsions, qui ont toujours été très agréables et intéressantes. Je ne doute pas que tu seras une chercheuse redoutable ! Et merci pour le Shokata !

Outre mes missions de recherche, ce doctorat fut aussi pour moi l'occasion de participer à l'enseignement universitaire, aux côtés de **Vincent Faivre, Sinda Lepêtre, Ali Makki, Simona Mura,** et **Eloïsa Berbel-Manaia**. Merci à vous tous pour les moments que nous avons partagé en TP. Cette expérience fut enrichissante pour moi, et vous avez tous contribué à la rendre belle. Je voudrais adresser des remerciements plus particulièrement à **Mariana Varna-Pannerec**. Tu as été la première à me laisser la main sur la présentation des TP, et ce fut une étape très importante pour moi qui en mourrais tellement d'envie. Merci pour ta confiance, et pour tes conseils. Un jour, j'espère faire comme toi : j'aurai des moniteurs pour m'assister, et je leur dirai « Je me souviens, quand j'ai commencé… ». Et je penserai à toi. Je remercie aussi **Juliette Vergnaud**, qui m'a permis de participer à l'UE « Projet Professionnel » et d'encadrer mon propre groupe d'étudiants, avec mon acolyte Céline d'abord, puis seul. J'ai pu continuer à prendre confiance en situation d'enseignement, et j'y ai pris vraiment beaucoup de plaisir. Je remercie enfin **Amélie Bochot**, pour nos discussions sur l'enseignement. Mais surtout parce que je suis attaché à l'esprit « pharmacien », et à ce que ce diplôme représente. Et tu en es pour moi un parfait exemple, inspirant, et j'espère en être un jour aussi digne que toi.

Je souhaite aussi remercier **Elias Fattal**, qui a été le directeur de l'unité pendant la plus grande partie de ma thèse. Ce n'est cependant pas par simple politesse envers le chef que je vous remercie, mais pour les mots sympathiques et les petites anecdotes par lesquels vous m'avez témoigné votre amitié pendant vos rondes matinales. Vous vous êtes aussi impliqué personnellement dans ma recherche d'un post-doctorat. Me sentir aidé m'a redonné de l'énergie et de la motivation, à un moment où j'en avais besoin. Je vous en remercie

J'accorde une grande importance aux relations humaines au travail, et j'ai encore de nombreuses personnes à remercier à ce titre… Pour le simple fait qu'ils sont comme ils sont. Parce qu'ils m'ont apporté le sourire et le plaisir de venir au labo.

J'ai une pensée pour **Anne et Emeline**, les gardiennes du lyophilisateur ! J'ai toujours pris beaucoup de plaisir à venir vous voir, probablement parce que vous aimez parler autant que moi… J'étais souvent en retard en sortant de votre bureau, mais comment faire autrement quand on est avec des personnes sympathiques comme vous ? Je garde

de vous le souvenir de nos conversations, vos conseils de préparation de muffins (encore désolé pour cet échec), et l'humilité indispensable à tout pharmacien devant une rampe à vide. N'est pas chimiste qui veut.

Je remercie naturellement tous les permanents de l'équipe 3, **Florence, Nicolas, Nour Eddine, Bertrand et Sandrine,** pour tous les moments que nous avons passés ensemble. Des plus gros repas d'équipe aux plus courtes conversations de couloir, j'ai été ravi de partager ces trois années avec vous. Et même si nous, les doctorants, ne sommes que de passage, je me sentirai toujours membre de l'équipe.

Il manque à l'appel des permanents une dernière personne, et non des moindres. C'est parce que j'ai voulu lui consacrer un petit paragraphe, juste pour elle. **Ghozlène**, tu es non seulement un élément central de la vie du labo, mais aussi (surtout) une amie. C'est vrai, on peut maintenant voir notre amour commun pour les ghraiba homs et la kunefe comme un signe du destin. Mais à la vérité, c'est ta générosité, ta main toujours tendue, que j'apprécie le plus. Quels que soient les problèmes que l'on rencontre, au labo comme dans la vie personnelle, on devrait tous avoir une Ghozlène pour échanger, pour trouver des solutions, ou juste pour nous écouter. Tu es toujours là quand on en a besoin, et je te dois bien ces quelques mots. Merci à toi.

J'ai bien d'autres amis à remercier ; amis à qui je ferai le cadeau de ne pas les mentionner par leurs surnoms, afin de préserver leur dignité. **Thomas**, j'ai tout de suite su que tu serais un compagnon d'aventure indispensable. Nous avons tous les deux cette capacité folle à débattre d'à peu près tout, c'est appréciable. Mais c'est surtout ta capacité à me faire sourire, soit par ton humour totalement absurde, soit par ta maladresse légendaire, que j'apprécie. Par ta bonne humeur et le soin que tu portes aux autres, tu les tires vers le haut (et pas seulement à Rocket League). **Amine**, toi et moi nous avons formé un duo de choc, connu de tous pour nos rires sonores et notre constance à dire (et faire) n'importe quoi. Un rien nous amuse, et notre collaboration étroite fut probablement une bénédiction pour notre santé mentale à tous les deux. Tu fais partie de ces personnes que l'on qualifie de « solaires », sans que l'on sache toujours expliquer ce que cela veut dire. **Zeineb**, nous sommes unis à jamais par la valeur de notre glycémie : à cause de toi, je vais probablement déclarer un diabète de type 2 précoce, mais notre amitié en vaut la peine. Parce qu'au-delà de la harissa hloua, tu m'as surtout apporté ton écoute (je vais finir par croire que c'est une vertu tunisienne) et tes conseils bienveillants. Tu as été un soutien important dans la dernière ligne droite, et je

t'en remercie. **Fanny**, une sorte de confort évident s'est immédiatement installé entre nous quand tu es arrivée au labo. Nés à quelques semaines d'écart, nous partageons de nombreux traits de caractère : une totale absence de fair-play, un plaisir non feint à se raconter nos vies, à partager des photos d'animaux mignons, et à se goinfrer. Certes, cela ressemble un peu à une liste de défauts, mais j'aime savoir qu'avec toi dans le groupe, je ne serai pas celui qui commandera le plus de brochettes bœuf-fromage. **Candice** enfin, qui préfère souvent être derrière la caméra que devant… Partager ton bureau avec moi aura eu pour effet indésirable de surcharger la mémoire de ton téléphone, mais on se sera bien amusé quand même ! Nous avons partagé notre amour des potions (sûrement une appétence de pharmaciens) ; cependant nos plus grands moments ne doivent rien aux philtres, mais bien aux filtres Snapchat. Fais bon usage de ces archives, et ne ruine pas ma carrière s'il te plaît. Merci à vous cinq pour tous ces beaux moments. La difficulté du départ sera probablement due à la distance qui va bientôt nous séparer. Mais rassurons-nous : la force des Backstreet Boys nous unissant, je doute que la séparation soit bien longue.

J'ai aussi eu le plaisir de réaliser ce doctorat avec deux camarades de master, que j'apprécie et que j'admire. J'ai eu la chance de vivre avec elles une année universitaire décisive, un très beau voyage à Cracovie, puis les affres et les joies de la thèse. **Céline**, quand le petit limougeaud que je suis est arrivé « à Paris », il ne se doutait de rien. Il ne savait pas qu'en se rapprochant du groupe des châtenaisiens, il allait nouer certains liens indéfectibles. Des vacances dans l'arrière-pays Montpelliérain devaient sceller notre amitié, et faire de toi une alliée indispensable au cours de ces trois ans pendant lesquelles nous avons partagé nos échecs, nos doutes, nos colères, mais aussi nos joies et pas mal de rires ! **Islem**, tu es le soleil de la tour B, avec ce sourire qui ne quitte jamais ton visage. Te croiser au détour d'un couloir est un plaisir, et souvent une grande source de réconfort. Merci à toutes les deux pour ce bout de chemin ensemble.

Je vais terminer en remerciant **mes parents**, pour ce qu'ils m'ont donné de force et de liberté. J'ai toujours pu faire mes propres choix sans que leur soutien ne défaille un seul instant. Cela m'a conduit à faire un métier que j'ai choisi, et que j'aime. Et cela me donne l'envie de continuer à rêver. Je remercie aussi **mon frère, et mes sœurs**, parce qu'ils font de moi un grand même quand je suis au plus bas. And finally, the one to whom I dedicate the very last paragraph of each manuscript, for 4 years now (third time quand

même !). **Giang**. Very few people in the lab know you. But if some of them appreciate me, even just a little bit, they should know that it is probably thanks to the way you make me shine. You played a key role in that thesis: you got me up when I was down, made me proud when I doubted, made me hope when I despaired. Just by the magic of that dimple you have when you smile, of that spark you have in your eyes. *"You make me smile with my heart"* and that's the sweetest support I can dream of.

Sommaire

Remerciements.....1

Sommaire.....8

Liste des abréviations en français.....14

Liste des abréviations en anglais.....15

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale.....19

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 - Emulsions de Pickering : Caractéristiques physicochimiques et paramètres d'influence.....27

Introduction.....29

1. Généralités sur les émulsions.....29

1.1. Mécanismes de déstabilisation des émulsions.....30

1.2. Stabilisation des émulsions par des tensioactifs.....32

1.3. Stabilisation des émulsions par des biopolymères.....34

1.4. Stabilisation des émulsions par des particules solides : introduction aux émulsions de Pickering...35

2. Formation et caractéristiques des émulsions de Pickering.....37

2.1. Stabilité des émulsions.....37

2.1.1. Energie de désorption des particules à l'interface.....38

2.1.2. Cinétique d'adsorption des particules à l'interface.....40

2.1.3. Taux de couverture et organisation des particules à l'interface.....41

2.1.4. Comportement des particules en excès dans la phase continue.....46

2.2. Taille des gouttelettes.....47

2.2.1. Concept de coalescence limitée.....47

2.2.2. Influence de la concentration en particules et du volume de la phase dispersée sur la taille des gouttelettes.....48

2.2.3. Influence de la taille des particules sur la taille des gouttelettes.....51

2.2.4. Influence du sens de l'émulsion sur la taille des gouttelettes.....52

2.2.5. Influence du procédé sur la taille des gouttelettes.....53

2.3. Sens des émulsions....56
2.3.1. Loi de Finkle et mouillabilité....56
2.3.2. Emulsions multiples et inversion de phases : autres paramètres en jeu....62
2.3.3. Quelques exceptions : les émulsions anti-Finkle....71
3. Emulsions de Pickering stabilisées par des particules non sphériques....72
3.1. Influence de la forme des particules sur leur adsorption à l'interface....74
3.1.1. Déplacement vers l'interface....74
3.1.2. Orientation des particules à l'interface....74
3.1.3. Angle de contact dans le système triphasique....77
3.1.4. Energie de désorption....79
3.2. Influence de la forme des particules sur leurs interactions à l'interface....80
3.3. Influence de la forme des particules sur les propriétés des émulsions de Pickering....83
3.3.1. Influence de la forme des particules sur la taille des gouttelettes....84
3.3.2. Influence de la forme des particules sur la stabilité des émulsions....84
3.3.3. Influence de la forme des particules sur le sens des émulsions....87
Conclusion....87
Références....88

CHAPITRE 2 - Préparation de nanoparticules polymères anisotropes....103
Introduction....105
1. Généralités....105
2. Préparation de particules polymères anisotropes à partir de particules sphériques préformées....108
2.1. Préparation par étirement de film polymère....108
2.2. Polymérisation au sein d'un matériau poreux....110
2.3. Démouillage d'une phase liquide non miscible....110
2.4. Agrégation de particules sphériques....111
2.5. Polymérisation assistée par ensemencement....113
3. Préparation de particules polymères anisotropes *de novo*....119
3.1. Auto-assemblage induit par la polymérisation (PISA)....119
3.2. Précipitation de polymères préformés....121
3.3. Procédés microfluidiques....123

3.4. Procédés électrodynamiques....125

4. Matériaux utilisés dans la préparation de particules polymères anisotropes....126

Conclusion....129

Références....129

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 3 - Morphologie des émulsions de Pickering stabilisées par des nanoparticules biodégradables de PLGA : Influence des caractéristiques du PLGA sur les propriétés des émulsions....139

Introduction – Résumé....141

Abstract....145

1. Introduction....146

2. Material and methods....147

2.1. Material....147

2.2. Polymer characterisation....148

2.3. NP preparation....148

2.4. NP characterisation....149

2.4.1. Size and ζ -potential measurements....149

2.4.2. Amount of PVA adsorbed on the surface of NP....149

2.4.3. Study of NP wettability....150

2.5. Emulsion preparation....151

2.6. Emulsion characterisation....151

2.6.1. Macroscopic aspect....151

2.6.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)....151

2.6.3. Scanning Electron Cryo-Microscopy (CryoSEM)....152

2.6.4. Differential scanning calorimetry (DSC)....152

3. Results and discussion....153

3.1. Polymer and NP characterisation....153

3.2. PLGA characteristics influence the emulsion properties....154

3.2.1. Influence of NP wettability....154

3.2.2. Influence of the glass transition....160

4. Conclusion.....162

Acknowledgements.....163

Supporting Material.....163

Supporting Material 1: Polymer characterisation.....163

Supporting Material 2: NP characterisation.....165

Supporting Material 3: Contact angle measurement on NP tablets versus PLGA films.....166

Supporting Material 4: Analysis of the tablet surface by AFM.....169

Supporting Material 5: Phase inversion and multiple emulsions.....171

Supporting Material 6: Evidence of NP adsorption on CLSM images.....176

Supporting Material 7: Emulsion stability.....178

Supporting Material 8: Graphical determination of $T_{g(0)}$.....181

References.....182

CHAPITRE 4 - Préparation de particules polymères non sphériques.....191

Introduction – résumé.....193

Abstract.....196

1. Introduction.....197

2. Material and methods.....199

2.1. Materials.....199

2.2. PLA-*b*-PEG-COOH synthesis and characterisation.....200

2.3. NP preparation.....201

2.4. NP characterisation.....201

2.4.1. Transmission Electron Microscopy (TEM).....201

2.4.2. Micro-Differential Scanning Calorimetry (Micro-DSC).....202

2.5. Evaluation of NP internalisation.....202

2.5.1. Cell culture.....202

2.5.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).....203

2.5.3. Flow cytometry.....203

3. Results.....204

3.1. Polymer characterisation.....204

3.2. Parameters influencing the NP shape.....204

3.3. Thermal stability of worm-like NP....206

3.4. Cellular uptake of worm-like NP....207

4. Discussion....209

4.1. Formation and division of worm-like NP....209

4.2. Cellular uptake of worm-like NP....212

5. Conclusion....214

Acknowledgement....214

Supporting Material....215

Supporting Material 1: Influence of pH on NP shape....215

Supporting Material 2: Degradation of the PLA block during the division of worm-like NP....216

Supporting Material 3: Effect of the presence of cholate sodium on the division of the worm-like NP.217

Supporting Material 4: Graphical determination of the glass transition temperature of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP suspended in water....218

References....218

CHAPITRE 5 - Emulsions de Pickering stabilisées par des nanoparticules biocompatibles de PLA-*b*-PEG : Influence de la forme des nanoparticules sur les propriétés des émulsions..223

1. Introduction....225

2. Matériel et méthodes....227

2.1. Matériel....227

2.2. Préparation et purification des NP....227

2.3. Caractérisation des NP....228

2.3.1. Intégrité des NP après purification....228

2.3.2. Efficacité de la purification....228

2.4. Préparation des émulsions....230

2.5. Caractérisation des émulsions....230

2.5.1. Sens des émulsions....230

2.5.2. Aspect et taille des gouttelettes....231

2.5.3. Adsorption des NP à l'interface eau-huile....231

3. Résultats et Discussion....231

3.1. Purification des NP et effet sur les émulsions....232

3.1.1. Purification par centrifugation unique....232

3.1.2. Purification par centrifugations répétées....235

3.2. Influence de la forme des particules sur les caractéristiques des émulsions....239

4. Conclusion....241

Annexes....242

Annexe 1 : Influence de la concentration résiduelle en cholate de sodium après un cycle de centrifugation sur la taille des gouttelettes....242

Annexe 2 : Influence du procédé d'émulsification sur l'intégrité des NP....243

Références....243

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale....247

1. Influence des différents paramètres étudiés sur les caractéristiques des émulsions de Pickering....252

2. Optimisation de la préparation des filoparticules....256

3. Intérêt des émulsions étudiées dans le contexte pharmaceutique....259

Références....264

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives....269

Liste des abréviations en français

CryoMEB : Cryo-Microscopie électronique à balayage

E/H : Eau-dans-Huile

E/H/E : Eau-dans-Huile-dans-Eau

FP : Filoparticule

H/E : Huile-dans-Eau

H/E/H : Huile-dans-Eau-dans-Huile

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

NP : Nanoparticule(s)

PEG : Poly(éthylène glycol)

PLA : Polylactide

PLA-*b*-PEG : Polylactide-*bloc*- Poly(éthylène glycol)

PLGA : Poly(lactide-*co*-glycolide)

PLGE : Poly(lactide-*co*-glycolide)-*bloc*-poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(lactide-*co*-glycolide)

SP : Nanoparticule sphérique

Liste des abréviations en anglais

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

CryoSEM : Scanning Electron Cryo-Microscopy

DSC : Differential Scanning Calorimetry

FreSCa-CryoSEM : Freeze-fracture Shadow-Casting Scanning Electron Cryo-Microscopy

GA : Glycolic acid

LA : Lactic acid

LCST : Lower Critical Solution Temperature

Micro-DSC : Micro Differencial Scanning Calorimetry

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

NP : Nanoparticle

O/W : Oil-in-Water

PEG : Poly(ethylene glycol)

PISA : Polymerisation-Induced Self-Assembly

PLA : Polylactide

PLA-*b*-PEG : Polylactide-*block*- Poly(ethylene glycol)

PLGA : Poly(Lactide-co-Glycolide)

PMMA : Poly(Methyl Methacrylate)

PVA : Poly(Vinyl Alcohol)

SEC : Size Exclusion Chromatography

TEM : Transmission Electronic Microscopy

T_g : Glass transition temperature

UCST : Upper Critical Solution Temperature

W/O : Water-in-Oil

W/O/W : Water-in-Oil-in-Water

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le terme français « émulsion » est dérivé du latin *emulgere*, qui signifie « traire » [1]. Cette étymologie nous rappelle que le lait, qui est l'émulsion naturelle la plus répandue, est composé d'une phase aqueuse dans laquelle sont dispersées des gouttelettes de matières grasses. De façon plus générale, les émulsions sont des mélanges de deux liquides non miscibles dont l'un est dispersé (phase dispersée) dans l'autre (phase continue) sous forme de gouttelettes [2]. Utilisées dans de nombreux domaines, elles sont particulièrement intéressantes pour un usage pharmaceutique. En effet, la phase dispersée peut servir à encapsuler des molécules actives : cela permet de les protéger de la dégradation, d'augmenter leur solubilité et de contrôler leur libération, augmentant ainsi leur biodisponibilité [3]. Ces systèmes ont cependant l'inconvénient majeur d'être thermodynamiquement instables, ce qui impose l'utilisation de stabilisants [4]. Les tensioactifs synthétiques sont aujourd'hui les excipients les plus employés dans l'industrie pour stabiliser les émulsions [5]. Cependant, ces derniers présentent une certaine toxicité pour la santé humaine et pour l'environnement [6]. Dans un cadre thérapeutique, des effets secondaires locaux telles qu'une irritation sont notamment observés suite à des applications répétées sur le long terme [7]. Souvent considérés comme mineurs, ces effets secondaires peuvent cependant représenter une diminution de la qualité de vie lorsqu'ils surviennent sur des peaux fortement lésées, dans le cadre de certaines pathologiques comme le psoriasis par exemple.

Dans le domaine pharmaceutique, de nouvelles approches de stabilisation ont donc été développées telles que l'utilisation de biopolymères [8] ou de particules solides [9]. Lorsqu'une émulsion est stabilisée par des particules solides, elle est appelée « émulsion de Pickering », du nom d'un des premiers chercheurs à avoir observé ces systèmes au début du XXe siècle [10]. Depuis, un grand nombre de ces émulsions a été décrit dans la littérature. Des particules de compositions très diverses ont été utilisées pour stabiliser ces émulsions de Pickering. Dans la liste des matériaux les plus utilisés, on retrouve des particules constituées de silice [11], de polymères synthétiques [12,13], de protéines [14], de cellulose [15], *etc.* Les émulsions obtenues sont caractérisées par leur grande stabilité, notamment due à l'adsorption irréversible des particules à l'interface des gouttelettes, formant ainsi une barrière physique contre la coalescence [16]. Elles ont aussi l'avantage de permettre un contrôle précis de la taille des gouttelettes, avec une distribution généralement étroite [17]. Ces caractéristiques des émulsions de Pickering en font un

candidat de choix pour remplacer les émulsions classiques stabilisées par des tensioactifs. Cependant, si les mécanismes de leur stabilisation sont souvent bien compris sur des systèmes modèles, les études physico-chimiques manquent sur des systèmes plus complexes adaptés à des applications pharmaceutiques.

Dans ce contexte est né notre projet, réalisé au sein de l'Institut Galien Paris-Saclay (UMR CNRS 8612) à la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Saclay, sous la direction du Docteur Nicolas Huang et de la Professeure Florence Agnely au sein de l'équipe 3 « Physique pharmaceutique ». Ce travail a donné lieu à une collaboration étroite avec le Docteur Nicolas Tsapis de l'équipe 5 « Ingénierie particulaire et cellulaire à visée thérapeutique ». Notre objectif a été d'étudier des émulsions de Pickering à fort potentiel pharmaceutique, afin de comprendre les mécanismes de leur stabilisation. Plus précisément, nous avons voulu décrire comment les caractéristiques des nanoparticules (NP) influaient sur les propriétés des émulsions de Pickering qu'elles stabilisaient. Nous avons notamment étudié l'influence de la mouillabilité et la forme des NP. Ce projet s'inscrivant, à long terme, dans une démarche de développement d'une forme pharmaceutique, les NP devaient être au minimum biocompatibles, voire biodégradables. Les matériaux naturels étant parfois sujet à une variabilité inter-lot plus importante pouvant limiter la possibilité d'industrialisation, nous avons choisi de travailler sur des polymères synthétiques : le poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) et le polylactide-*bloc*-poly(éthylène glycol) (PLA-*b*-PEG). La phase huileuse, quant à elle, était un mélange de triglycérides à chaînes moyennes très utilisé en pharmacie : le Miglyol 812N.

Ce manuscrit, rédigé en français et en anglais, s'articule en deux grandes parties :

La première est une **synthèse bibliographique**, divisée en deux chapitres :

- Le **chapitre 1** est d'abord une introduction générale aux émulsions de Pickering et à leurs intérêts majeurs. Il présente ensuite les mécanismes régissant la stabilité *(i)* des émulsions, *(ii)* la taille des gouttes, et *(iii)* le type d'émulsion, accompagnés d'une analyse des facteurs influençant ces trois grandes propriétés. L'un de ces facteurs, la forme des particules stabilisantes, est traité à part car les phénomènes liés à ce facteur font rarement l'objet d'une synthèse, et méritent un intérêt particulier.

- Le **chapitre 2** traite des méthodes de préparation des particules polymères anisotropes, et de la compatibilité des matériaux utilisés en vue d'applications pharmaceutiques.

La deuxième partie du manuscrit concerne les **travaux expérimentaux** de ce projet de thèse, et s'organise en deux blocs :

- Le **chapitre 3** est un travail sur des émulsions stabilisées par des NP sphériques de PLGA. Il s'intéresse notamment à l'influence des caractéristiques du PLGA sur la mouillabilité et la température de transition vitreuse des NP, et donc sur les propriétés des émulsions de Pickering finales. Cette étude est présentée sous la forme d'un article scientifique en anglais, déjà soumis à publication.
- Les **chapitre 4 et 5** portent, pour leur part, sur l'utilisation de NP anisotropes de PLA-*b*-PEG, notamment sous forme de filoparticules (FP, particules cylindriques courbes de largeur nanométrique), et leur comparaison avec des NP sphériques obtenues avec le même polymère :
    - Le **chapitre 4** décrit le procédé de préparation de filoparticules de PLA-*b*-PEG et discute du mécanisme conduisant à leur formation. Leur instabilité à haute température est aussi explorée, et mis à profit pour préparer des particules sphériques du même matériau. Ce chapitre est aussi présenté sous forme d'un article scientifique en anglais, qui sera soumis à publication.
    - Le **chapitre 5** est dédié à l'utilisation de ces NP de PLA-*b*-PEG de différentes formes pour préparer des émulsions de Pickering. L'influence de la forme sur la stabilité des émulsions y est notamment discutée. Ces dernières expériences ayant eu lieu entre mars et décembre 2020, leur réalisation a été fortement perturbée par les événements liés à la pandémie de Covid19. L'étude n'a donc pas été jugée assez aboutie pour faire l'objet d'une publication dans l'immédiat.

Une discussion générale permet de mettre en lumière les paramètres sur lesquels il est pertinent d'agir pour modifier la stabilité des émulsions, la taille des gouttelettes, le type d'émulsion, ainsi que sa viscosité. La forme des NP s'avérant être un facteur très intéressant à étudier, une analyse critique du procédé d'obtention des filoparticules de PLA-*b*-PEG est ensuite présentée. Puis l'intérêt et les potentialités pharmaceutiques des émulsions de Pickering présentées dans ce manuscrit seront discutées. Cette discussion

revient ainsi sur les points clés de ce travail, en considérant l'ensemble des principaux résultats et en s'appuyant sur les données de la littérature.

Enfin, une conclusion générale fait le point sur les avancées apportées par ce travail et sur les perspectives envisagées pour compléter la compréhension des résultats obtenus au cours de cette thèse, et jeter les bases de projets à venir.

Références

[1] Emulsion, Dict. Académie Fr. 9e Édition. (1935). https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A9E1236 (accessed December 7, 2020).

[2] P. Wehrlé, Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique, 2e édition, Maloine, Paris, 2012.

[3] G. Marti-Mestres, F. Nielloud, Emulsions in Health Care Applications—An Overview, J. Dispers. Sci. Technol. 23 (2002) 419–439. https://doi.org/10.1080/01932690208984214.

[4] T.F. Tadros, ed., Emulsion Formation and Stability, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013. https://doi.org/10.1002/9783527647941.

[5] M. Scherlund, M. Malmsten, A. Brodin, Stabilization of a thermosetting emulsion system using ionic and nonionic surfactants, Int. J. Pharm. 173 (1998) 103–116. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00219-1.

[6] T. Cserháti, E. Forgács, G. Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, Environ. Int. 28 (2002) 337–348. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00032-6.

[7] N. Branco, I. Lee, H. Zhai, H.I. Maibach, Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an in vivo study, Contact Dermatitis. 53 (2005) 278–284. https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00703.x.

[8] E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord, F. Agnely, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, Int. J. Pharm. 436 (2012) 359–378. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052.

[9] C. Albert, M. Beladjine, N. Tsapis, E. Fattal, F. Agnely, N. Huang, Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications, J. Controlled Release. 309 (2019) 302–332. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003.

[10] S.U. Pickering, CXCVI.—Emulsions, J Chem Soc Trans. 91 (1907) 2001–2021. https://doi.org/10.1039/CT9079102001.

[11] T.S. Horozov, B.P. Binks, Particle-Stabilized Emulsions: A Bilayer or a Bridging Monolayer?, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 773–776. https://doi.org/10.1002/anie.200503131.

[12] F. Qi, J. Wu, G. Sun, F. Nan, T. Ngai, G. Ma, Systematic studies of Pickering emulsions stabilized by uniform-sized PLGA particles: preparation and stabilization mechanism, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 7605–7611. https://doi.org/10.1039/C4TB01165A.

[13] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery, Int. J. Pharm. 531 (2017) 134–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.065.

[14] V. Paunov, O. Cayre, P. Noble, S. Stoyanov, K. Velikov, M. Golding, Emulsions stabilised by food colloid particles: Role of particle adsorption and wettability at the liquid interface, J. Colloid Interface Sci. 312 (2007) 381–389. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.031.

[15] I. Capron, B. Cathala, Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals, Biomacromolecules. 14 (2013) 291–296. https://doi.org/10.1021/bm301871k.

[16] V. Schmitt, M. Destribats, R. Backov, Colloidal particles as liquid dispersion stabilizer: Pickering emulsions and materials thereof, Comptes Rendus Phys. 15 (2014) 761–774. https://doi.org/10.1016/j.crhy.2014.09.010.

[17] S. Arditty, C.P. Whitby, B.P. Binks, V. Schmitt, F. Leal-Calderon, Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions, Eur. Phys. J. E. 11 (2003) 273–281. https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10018-6.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

Emulsions de Pickering :

Caractéristiques physicochimiques et paramètres d'influence

Introduction

Les émulsions de Pickering, bien que connues de longue date, font toujours l'objet d'études fondamentales visant à comprendre les mécanismes régissant leur stabilisation. En effet, bien qu'elles soient de plus en plus utilisées à des fins applicatives, et ce dans des domaines très divers, les propriétés particulières de ces émulsions restent toujours sujettes à discussion. Ainsi, l'influence des paramètres de procédé et de formulation sur les caractéristiques des émulsions de Pickering a été largement étudiée au fil du temps, mais des contradictions persistent parfois. Ces dernières sont probablement dues à la diversité des matériaux utilisés, des techniques de préparation et des techniques de caractérisation, qui ne permettent pas toujours des comparaisons directes entre les résultats. L'objectif de cette synthèse bibliographique est de montrer un panorama aussi complet que possible des paramètres influençant les caractéristiques physico-chimiques des émulsions de Pickering. Ainsi, après avoir rappelé un certain nombre de généralités sur ces systèmes, nous exposerons les mécanismes déterminant *(i)* la stabilité des émulsions de Pickering, *(ii)* la taille des gouttelettes et *(iii)* le sens des émulsions. Le détail de ces mécanismes permettra l'analyse des paramètres influençant ces trois grandes caractéristiques. Cette vision d'ensemble doit conduire à la discussion de contradictions éventuelles, et à la mise en lumière du caractère multifactoriel des propriétés des émulsions de Pickering. Cette synthèse bibliographique, portant majoritairement sur des émulsions stabilisées par des particules sphériques, se terminera par un chapitre traitant de l'influence de la morphologie des particules stabilisantes sur les caractéristiques des émulsions. Cette thématique fait en effet l'objet d'un nombre grandissant de publications, du fait notamment que l'on peut aujourd'hui facilement produire des particules de formes très variées.

1. Généralités sur les émulsions

Les émulsions sont des matériaux utilisés aujourd'hui dans de nombreux domaines, comme l'agroalimentaire, la chimie, le génie-civil, la pharmacie ou la cosmétique [1,2]. Elles sont communément décrites comme étant des mélanges de deux phases liquides non miscibles, l'une étant dispersée dans l'autre [3]. La plupart du temps, ces phases sont respectivement constituées d'huile et d'eau, bien que deux phases aqueuses immiscibles

puissent aussi être utilisées [4]. Quant aux procédés permettant d'opérer la dispersion, ils sont nombreux et vont des techniques les plus classiques (rotor-stator, ultrasons) aux plus élaborées (homogénéisation haute pression, microfluidique) [5].

Dans le domaine pharmaceutique, les émulsions peuvent se présenter sous de très nombreuses formes. Les formes les plus classiques, relativement simples, sont celles utilisées en traitement d'affections cutanées ou en dermocosmétique, comme les laits (émulsions fluides) ou les crèmes (émulsions visqueuses) [3,6]. Mais il est aussi possible d'intégrer des émulsions à des systèmes de délivrance d'actifs plus sophistiqués comme des pâtes, des suppositoires, des ovules, des dispositifs transdermiques, des implants, ou des gels [6]. Cette multitude de formes permet leur administration par de nombreuses voies [7,8]. Par voie intraveineuse, elles peuvent être utilisées comme systèmes de délivrance de substances actives [9], comme antidote [10], ou à des fins nutritionnelles [11]. Leur injection par voie intramusculaire [12] ou sous-cutanée [13] est aussi possible. Outre leur administration parentérale, les émulsions peuvent aussi être utilisées par voie orale, notamment par l'administration de formes solides auto-émulsionnables [7]. Enfin, de nombreuses voies topiques sont disponibles, comme les voies cutanée et transcutanée [14,15], ophtalmique [16,17], vaginale [18], rectale [19] ou encore nasale [20].

De façon générale, l'intérêt principal des émulsions pour des applications pharmaceutiques est la possibilité d'encapsuler des substances actives dans la phase dispersée. Cette encapsulation permet, d'une part, la protection de l'actif vis-à-vis des dégradations physiques, chimiques ou enzymatiques lors du stockage et *in vivo.* D'autre part, l'actif étant administré sous sa forme dissoute dans la phase dispersée, l'étape de dissolution dans les milieux physiologiques est contournée, et la mise à disposition de l'actif pour l'absorption est accélérée. Cet avantage est d'autant plus intéressant pour les molécules hydrophobes, dont la dissolution dans les milieux aqueux de l'organisme est souvent difficile [21]. Ainsi, l'encapsulation d'une substance active en émulsion a pour double intérêt sa protection et sa mise à disposition rapide sous forme dissoute, augmentant ainsi la quantité potentielle disponible pour l'absorption, et donc la biodisponibilité [8].

1.1. Mécanismes de déstabilisation des émulsions

Si les émulsions présentent de nombreux avantages pour des applications pharmaceutiques, elles ont aussi l'inconvénient majeur d'être thermodynamiquement

instables [22]. Plusieurs mécanismes de déstabilisation peuvent être observés, comme le montre la Figure 1. Tout d'abord, les émulsions peuvent subir une phase de crémage, dans le cas où la phase dispersée est moins dense que la phase continue. Ce phénomène implique la migration des gouttelettes vers le haut de l'échantillon, sous l'effet de la poussée d'Archimède. Dans le cas inverse où les gouttelettes sont plus denses que la phase continue, elles migrent vers le bas, donnant lieu au phénomène de sédimentation.

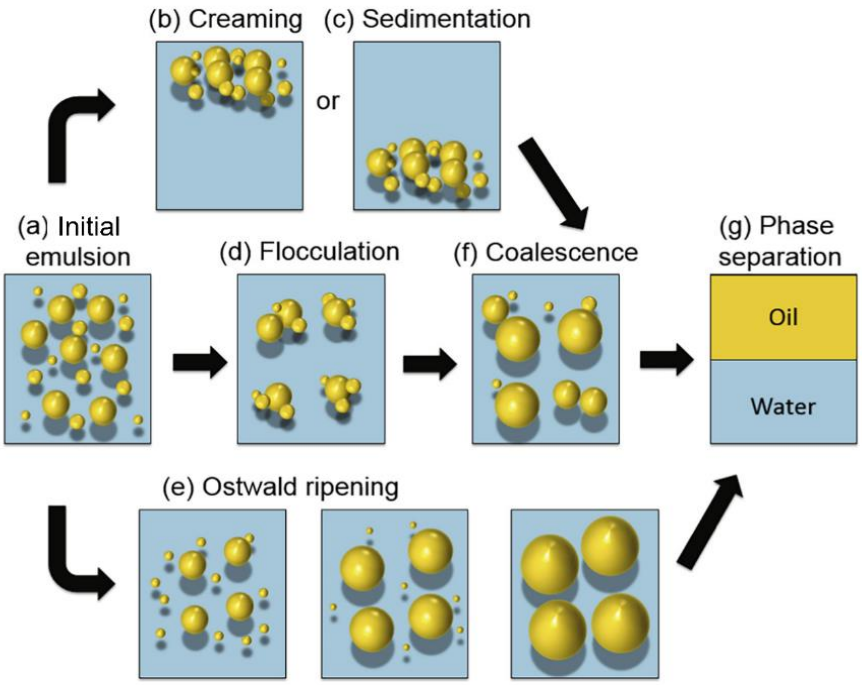


Figure 1 : Représentation schématique des différents mécanismes de déstabilisation des émulsions (figure issue de Low *et al.* [23]).

Selon la théorie DLVO (d'après Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) décrivant les interactions entre deux particules en fonction de la distance qui les sépare, les gouttelettes peuvent aussi former des agrégats. Ce phénomène, appelé « floculation », est notamment dû aux forces attractives de Van der Waals [24]. Crémage, sédimentation et floculation ne représentent pas un réel problème pour le formulateur, car ce sont des phénomènes réversibles. En effet, il suffit d'agiter l'émulsion avant utilisation pour qu'elle se redisperse de façon homogène [2].

En revanche, le rapprochement des gouttes inhérent à ces trois premiers phénomènes peut entraîner la coalescence, dont le résultat est irréversible. En effet, la phase continue forme, entre deux gouttes, un film qui peut s'affiner jusqu'à se rompre, permettant alors

la fusion des gouttes [25]. Si la coalescence se prolonge durablement, la taille des gouttes augmente alors jusqu'à une séparation complète des deux phases.

Enfin, le dernier type d'instabilité, lui aussi irréversible, est le mûrissement d'Ostwald. Il repose sur le fait que l'insolubilité totale n'existe pas : les deux phases constituant l'émulsion sont toujours partiellement miscibles l'une dans l'autre, même très faiblement. Selon la loi de Kelvin, la solubilité de la phase dispersée dans la phase continue dépend de la taille des gouttelettes suivant l'Équation 1 :

$$\ln\left(\frac{C_{sat}(r)}{C_{sat}(\infty)}\right) = \frac{2\gamma v_{mol}}{rRT} \qquad \text{Équation 1}$$

où $C_{sat}(r)$ est la solubilité d'une goutte de phase dispersée de rayon r dans la phase continue, $C_{sat}(\infty)$ est la solubilité usuelle de la phase dispersée dans la phase continue, γ est la tension interfaciale entre la phase continue et la phase dispersée, v_{mol} est le volume molaire de la phase dispersée, R est la constante des gaz parfaits, et T la température. Ainsi, dans une émulsion polydisperse, la solubilité de la phase dispersée dans la phase continue augmente quand le rayon des gouttelettes diminue [3]. La concentration de phase dispersée dissoute est donc plus grande au voisinage des petites gouttes que des grosses, générant un gradient de concentration. Cela donne lieu *in fine* à la diffusion de la phase dispersée vers les grosses gouttes, *via* la phase continue. On observe donc une disparition progressive des petites gouttes au profit des grosses, et donc un resserrement de la distribution de taille des gouttes [26]. La vitesse de mûrissement est notamment fonction du type d'huile utilisé, les huiles polaires ayant tendance à l'accélérer [3]. Le phénomène est aussi accru par une taille de gouttelettes initialement polydisperse [27].

1.2. Stabilisation des émulsions par des tensioactifs

Si le mûrissement d'Ostwald peut être contourné par l'emploi d'huiles peu polaires et une taille de gouttelettes homogène, la stabilisation vis-à-vis de la coalescence nécessite l'ajout de stabilisants. La plupart du temps, ces derniers sont des molécules amphiphiles dites « tensioactives », qui se placent aux interfaces et stabilisent les gouttes par différents mécanismes. Premièrement, elles limitent le rapprochement entre les gouttes, notamment par répulsions électrostatiques dans le cas de tensioactifs ioniques [3].

Deuxièmement, si, malgré les forces répulsives, deux gouttes se rapprochent, les tensioactifs peuvent limiter la coalescence en diminuant localement la tension interfaciale. Le rapprochement génère le pincement d'un mince film de phase continue entre les deux gouttes, et une déformation de ces dernières (Figure 2). Cette déformation entraîne un déplacement des molécules de tensioactifs vers la périphérie du film : la tension interfaciale est alors plus basse en périphérie du film, et plus élevée au centre, générant ainsi un gradient de tension interfaciale. Cela entraîne un mouvement de liquide des zones de basse tension interfaciale vers les zones de haute tension interfaciale : c'est l'effet Marangoni [28]. Le film de phase continue entre les gouttes est ainsi maintenu par la tension interfaciale plus forte en son centre, ce qui inhibe le mécanisme de coalescence.

Ce frein à la coalescence n'est cependant garanti que si le tensioactif est dissous dans la phase continue. En effet, le gradient de tension interfaciale favorise alors la diffusion du tensioactif vers le centre du film de phase continue pincé entre les gouttes. Mais ce dernier étant très fin, il contient souvent trop peu de tensioactif pour regarnir totalement l'interface. Ce manque de tensioactif au sein du film maintient alors l'effet Marangoni stabilisant. En revanche, si le tensioactif est dans la phase dispersée, il lui est alors possible de regarnir l'interface appauvrie, et donc d'interrompre l'effet Marangoni. La coalescence ne peut alors pas être inhibée. Ce phénomène est notamment à l'origine de la loi empirique de Bancroft, selon laquelle un tensioactif tend à stabiliser des émulsions dont la phase continue est celle dans laquelle il est le plus soluble [25].

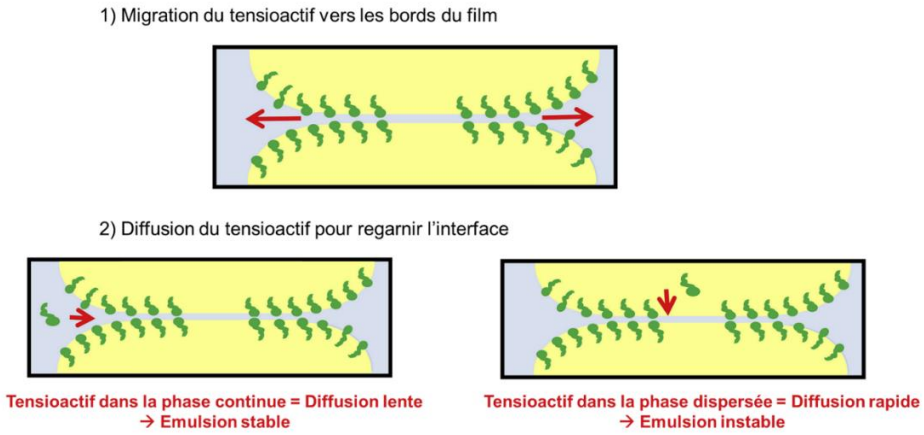


Figure 2 : Représentation schématique de l'amincissement du film entre deux gouttes. En haut : le tensioactif est entraîné sur la périphérie, donnant un gradient de tension interfaciale, d'où un effet Marangoni s'opposant à l'amincissement du film. En bas : le gradient de tension interfaciale est équilibré plus rapidement lorsque le tensioactif est dans la phase dispersée (à droite) que lorsqu'il est dans la phase continue (à gauche), d'où une moindre stabilité (figure adaptée de Langevin [25]).

Les tensioactifs sont ainsi des agents stabilisants très efficaces, ce qui explique leur omniprésence dans les émulsions cosmétiques, chimiques, alimentaires, *etc*. Cependant, tous ne sont pas utilisables pour des applications pharmaceutiques [7,8,29]. De plus, ceux qui sont autorisés à cet usage doivent être utilisés avec parcimonie. En effet, de nombreuses publications mettent en évidence leur toxicité potentielle vis-à-vis des cellules épithéliales, notamment lors d'administrations répétées [30–34]. Cette toxicité est due à l'interaction des molécules de tensioactifs avec les lipides, mais aussi et surtout avec les protéines des couches superficielles des épithélia. Certaines études montrent en effet que plus un tensioactif interagit avec les protéines, plus il est irritant [35]. Ces irritations peuvent nuire au confort d'utilisation des médicaments, notamment lorsqu'ils sont appliqués par voie topique sur une peau ou une muqueuse déjà lésée. L'observance du patient est donc en jeu. D'autres solutions de stabilisation doivent donc être proposées afin de limiter ces risques d'irritations.

1.3. Stabilisation des émulsions par des biopolymères

Une des solutions envisageables est l'utilisation de polymères tensioactifs, et notamment des biopolymères, représentés par les protéines et les polysaccharides. Ces biopolymères, utilisés pour leur moindre toxicité en comparaison aux tensioactifs classiques, stabilisent les émulsions *via* trois mécanismes différents. Le premier est la diminution de la tension interfaciale, comme décrit pour les tensioactifs classiques dans la section 1.2. Le deuxième mécanisme passe par les répulsions stériques et/ou électrostatiques (pour les polymères chargés) entre les gouttelettes, opérées par les biopolymères adsorbés aux interfaces. Enfin, les biopolymères peuvent augmenter la viscosité de la phase continue dans le cas où celle-ci est aqueuse, limitant les mouvements et les rencontres des gouttelettes, et donc leur instabilité [36,37]. Si ces mécanismes sont bien souvent efficaces pour stabiliser les gouttelettes, il convient de prêter une attention particulière aux quantités de biopolymère utilisées. A certaines concentrations, ils peuvent forcer la floculation par deux mécanismes : la déplétion ou le pontage (Figure 3). Brièvement, la déplétion est un phénomène se déroulant après le rapprochement de deux gouttelettes : un gradient de concentration en biopolymère est généré, car le film séparant les deux gouttelettes est dépourvu de chaînes polymères, alors que la phase continue autour en est riche. La pression osmotique chasse alors l'eau du film entre les gouttelettes, forçant le rapprochement de ces dernières et donc la floculation. Quant au pontage, il consiste

simplement en l'adsorption d'une même chaîne de biopolymère sur deux gouttelettes simultanément, empêchant leur dispersion [38].

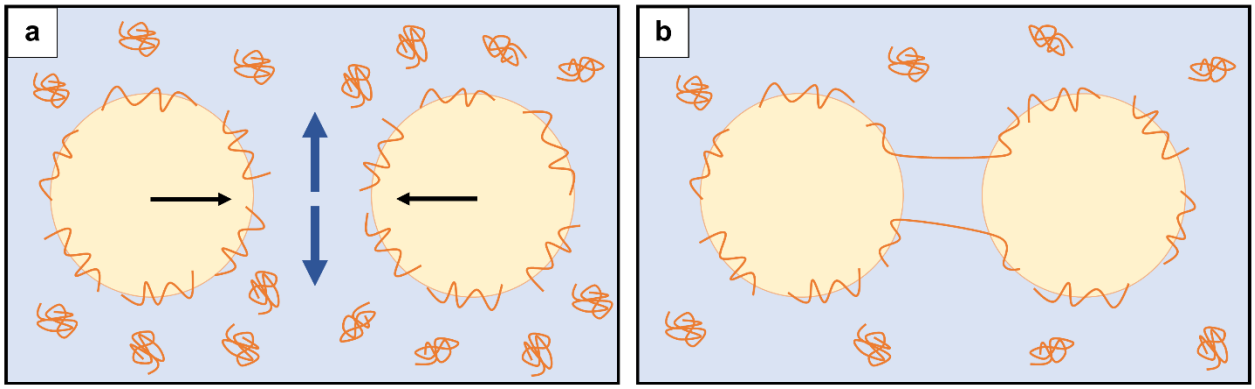


Figure 3 : Mécanismes conduisant à la floculation des gouttelettes en présence de biopolymères, (a) par déplétion ou (b) par pontage.

En dehors des mécanismes de stabilisation qu'ils mettent en jeu, les biopolymères présentent d'autres différences avec les tensioactifs classiques. Leur cinétique d'adsorption par exemple, est plus lente que celle des tensioactifs, et ne permet donc pas la stabilisation de gouttelettes aussi petites [36,39]. De plus, si les biopolymères forment souvent une organisation interfaciale moins dense que les tensioactifs classiques, leur adsorption est considérée comme irréversible, ce qui peut procurer aux émulsions une très bonne stabilité [40].

Largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire, les biopolymères permettent ainsi de stabiliser les émulsions de façon efficace, tout en contournant les problématiques de toxicité liées à l'utilisation des tensioactifs classiques. Leur usage reste cependant limité en pharmacie, et de nombreux aspects restent encore à explorer comme les potentielles interactions de ces composés avec les molécules actives, leur influence sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique, *etc.* [36].

1.4. Stabilisation des émulsions par des particules solides : introduction aux émulsions de Pickering

Les émulsions peuvent être stabilisées par l'adsorption de particules solides, une méthode qui connait par ailleurs un essor considérable depuis vingt ans. Ce phénomène a d'abord été décrit par le biochimiste Walter Ramsden en 1903. Il a notamment montré que la

solubilité des protéines pouvait diminuer sous agitation. Les solides formés produisaient un film à l'interface eau-air, notamment capable de stabiliser des bulles [41]. Quelques années après, Spencer Pickering, un chercheur travaillant sur les procédés horticoles, décrivait, quant à lui, la stabilisation d'un mélange d'huile minérale et de chaux par les particules d'oxyde de calcium composant la chaux [42]. Il observait déjà certaines des propriétés spécifiques des émulsions stabilisées par des particules solides (que l'on appellera plus tard « émulsions de Pickering »), notamment le lien entre la concentration en particules et la taille des gouttes d'huile. La très bonne stabilité de ces émulsions trouve principalement son origine dans la barrière physique que forment les particules autour des gouttelettes, empêchant ainsi la coalescence. Ce mécanisme de stabilisation, principalement basé sur l'encombrement stérique, diffère nettement de celui des tensioactifs classiques et des biopolymères.

Peu étudiées à la suite de ces deux publications, ces émulsions connaissent depuis plusieurs années un regain d'intérêt majeur, et sont maintenant développées pour diverses utilisations dans les domaines de l'agro-alimentaire, de la cosmétique, de la pharmacie, *etc*. Du fait de la multitude d'utilisations envisagées, de très nombreux matériaux ont été proposés pour produire des particules stabilisantes. C'est le cas de certains matériaux inorganiques, en tête desquels on retrouve la silice. La surface des particules de silice étant facile à modifier [43–45], ces dernières sont un excellent modèle pour l'étude physico-chimique des émulsions de Pickering. D'autres équipes utilisent des particules d'oxyde de fer [46], d'argile [45,47], de graphène [48,49], *etc*. Outre ces quelques exemples de matériaux inorganiques, on trouve aussi de nombreuses particules organiques. Souvent moins toxiques, elles peuvent ainsi être utilisées pour des applications agro-alimentaires [50] ou pharmaceutiques [5]. C'est le cas des particules de polysaccharides (amidon [51], cellulose [52], chitosane [53]), des particules de protéines [54], des nanoparticules lipidiques solides [54–56], des particules de cyclodextrines [57], des particules d'actifs organiques purs [58], *etc*. Nous porterons dans cette thèse un intérêt particulier aux particules à base de polymères de synthèse, comme le poly(lactide-co-glycolide) [59,60], le polylactide-poly(éthylène glycol) [61], ou encore le poly(caprolactone)-poly(éthylène glycol) [61]. Ces particules ont en effet un intérêt pharmaceutique notable, car elles permettent de stabiliser des émulsions sans tensioactifs irritants, et sans toxicité propre puisqu'elles sont biocompatibles, voire biodégradables.

Citons enfin le cas des émulsions stabilisées par des protéines globulaires, qui fait encore débat quant à savoir si elles peuvent être ou non qualifiées d'émulsions de Pickering [5]. En effet, si l'adsorption de certaines protéines aux interfaces, comme la ferritine, ne fait aucun doute [62], le changement de conformation qu'elles subissent après adsorption remet en question leur caractère particulaire [36,63]. Certains auteurs soutiennent cependant que c'est précisément ce changement de conformation qui procure à certaines émulsions stabilisées par des protéines un comportement similaire à celles stabilisées par des microgels. A cet égard, ces protéines sont donc parfois comparées à des particules molles [64], ce qui autorise à les considérer comme des stabilisants d'émulsions de Pickering.

De nombreuses applications sont aujourd'hui trouvées pour les émulsions de Pickering, mais la recherche fondamentale est encore très active sur le sujet. La suite de cette revue bibliographique aura pour objectif de comprendre la formation des émulsions de Pickering, de présenter les mécanismes de stabilisation qui font leur particularité, et de mettre en lumière les paramètres pouvant influer sur ces mécanismes.

2. Formation et caractéristiques des émulsions de Pickering

La formation d'une émulsion de Pickering se déroule en quatre grandes étapes, qui sont : *(i)* la formation des gouttes par cisaillement de la phase à disperser, *(ii)* l'approche et la collision des particules solides avec les gouttelettes, *(iii)* l'adsorption des particules, et éventuellement *(iv)* la formation d'un réseau et la stabilisation des gouttes [65]. Tout facteur susceptible d'avoir un effet sur ces étapes a potentiellement un impact sur les caractéristiques des émulsions de Pickering. De nombreuses études ont permis d'identifier les paramètres de formulation et de procédé influençant ces caractéristiques finales. Dans cette section, nous nous attacherons ainsi à décrire les mécanismes par lesquels certains paramètres influencent la stabilité des émulsions, la taille de leurs gouttes, et leur sens.

2.1. Stabilité des émulsions

Une émulsion se caractérise par sa stabilité cinétique, en particulier sa résistance au phénomène de coalescence. Dans le cas des émulsions les plus classiques stabilisées par des tensioactifs, cette résistance est plutôt générée par diminution de la tension interfaciale (et de l'effet Marangoni en découlant) ou par répulsions électrostatiques,

comme décrit dans la section 1.2. Pour les émulsions de Pickering en revanche, le mécanisme semble beaucoup plus simple : les particules adsorbées à l'interface forment une barrière physique empêchant le contact direct entre deux gouttes. L'établissement d'une telle barrière nécessite *(i)* que les particules stabilisantes s'adsorbent à l'interface de manière irréversible, *(ii)* et dans des temps inférieurs à ceux de la coalescence. Il faut aussi *(iii)* que l'organisation des nanoparticules permette de couvrir les zones de contact entre deux gouttelettes, voire *(iv)* d'empêcher le rapprochement de ces dernières. Cette section est l'occasion de décrire l'ensemble de ces mécanismes, ainsi que les paramètres les influençant.

2.1.1. Energie de désorption des particules à l'interface

A l'inverse des émulsions stabilisées par des tensioactifs, la stabilisation d'émulsions de Pickering n'entraîne pas d'équilibre dynamique entre particules dispersées et particules adsorbées à l'interface [66,67]. En effet, lorsqu'une particule s'adsorbe, elle diminue l'énergie interfaciale d'une valeur E_a appelée « énergie d'adsorption ». Cet abaissement est notamment dû à la réduction de l'interface de contact entre les deux phases liquides. Une fois l'adsorption effectuée, la désorption de cette particule nécessite un apport d'énergie E_d au système, d'une valeur équivalente à E_a (Équation 2) [68] :

$$E_d = \pi r^2 \gamma_{ow} (1 - |\cos\theta|)^2 \qquad \text{Équation 2}$$

où r est le rayon de la particule considérée, θ son angle de contact dans le système triphasique (Figure 4), et γ_{ow} la tension interfaciale entre la phase huileuse et la phase aqueuse [69]. Le paramètre ayant l'influence la plus importante sur l'énergie de désorption est la taille des particules. Comme le montre la Figure 5a, l'énergie de désorption augmente avec la taille, pouvant aisément atteindre des valeurs supérieures à l'énergie thermique kT de plusieurs ordres de grandeur, avec des particules allant de 100 nm à 100 µm. Ainsi, l'énergie nécessaire au détachement des particules solides les plus couramment utilisées est telle que leur adsorption est considérée comme irréversible. Précisons qu'il est tout de même possible de forcer la désorption, notamment par compression de l'interface [70,71]. De telles contraintes n'ont cependant pas lieu au sein d'une émulsion au repos, et sont seulement susceptibles d'être appliquées au cours de la caractérisation d'interfaces contenant des particules.

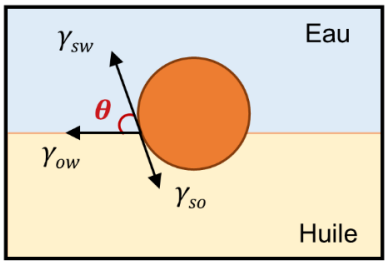


Figure 4 : Angle de contact θ dans le système triphasique formé par une particule adsorbée à une interface eau-huile. La valeur de cet angle est notamment fonction de la tension interfaciale entre la particule et l'huile γ_{so}, la tension interfaciale entre la particule et l'eau γ_{sw}, et la tension interfaciale entre l'huile et l'eau γ_{ow}.

L'Équation 2 met aussi en lumière la dépendance de l'énergie de désorption à l'angle de contact des particules. Comme le montre la Figure 5b, cette énergie est d'autant plus élevée que l'angle de contact est proche de 90°, angle auquel la particule est mouillée de façon égale par l'eau et l'huile (voir section 2.3.1). Si la mesure de l'angle de contact dans le système triphasique est difficile à réaliser, cette théorie est cependant couramment vérifiée empiriquement, car les particules de mouillabilité intermédiaire offrent une meilleure stabilité aux émulsions que les particules très hydrophiles ou très hydrophobes [72]. Néanmoins, un angle de contact intermédiaire peut aussi favoriser la stabilité des émulsions par d'autres mécanismes, comme la formation d'un réseau dans la phase continue. Ce point sera notamment développé dans la section 2.1.4.

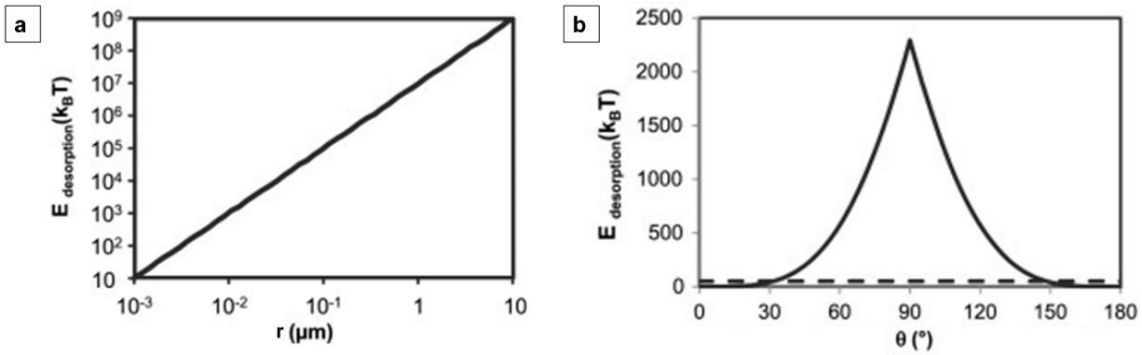


Figure 5 : Représentation graphique de l'évolution de l'énergie de désorption d'une particule à l'interface, en fonction a) du rayon r de la particule et b) de l'angle de contact θ dans le système triphasique. La ligne en pointillés est l'énergie thermique kT. Les valeurs en ordonnées sont purement informatives, et sont valables pour un ensemble de paramètres donnés (tension interfaciale, taille de particule, angle de contact) (Figure adaptée de Schmitt et al. [66]).

2.1.2. Cinétique d'adsorption des particules à l'interface

Si l'adsorption irréversible des particules à l'interface est assurément un facteur promouvant la stabilité des émulsions de Pickering, cette adsorption doit tout de même se faire en un temps relativement court. Pour obtenir une émulsion stable, il faut donc que la vitesse d'adsorption des particules soit supérieure à la vitesse de coalescence des gouttelettes. Dans le cas d'une émulsification par un procédé microfluidique [73] ou par membrane [74], le transport des particules vers l'interface est plutôt induit par un mécanisme de diffusion. Dans de tels cas, les particules de petite taille semblent permettre une meilleure stabilisation, du fait de leur diffusion plus rapide en comparaison aux particules de grandes tailles [23,75]. En revanche, lorsque l'émulsion est préparée dans des conditions de flux turbulent (par rotor-stator par exemple), les particules sont mises en mouvement par un mécanisme de convection, généré par les turbulences du liquide. La probabilité de rencontre entre particules et gouttes augmente ainsi avec le taux de cisaillement. Notons que la rencontre entre deux gouttelettes non stabilisées est elle aussi facilitée, conduisant donc aussi à un certain degré de coalescence. On ne peut cependant pas conclure *a priori* quant à la stabilité finale de l'émulsion, le résultat dépendant de l'efficacité de la coalescence autant que de la vitesse d'absorption des particules [76]. Quoiqu'il en soit, des études montrent que l'émulsification par rotor-stator accélère l'adsorption par rapport à une agitation manuelle [77]. Dans ces conditions, les particules de plus grande taille seraient transportées plus rapidement que les petites particules, car elles sont plus sensibles aux flux convectifs des turbulences [78]. Leur adsorption aux interfaces est donc facilitée [79].

Ces considérations sur la taille des particules sont vérifiées dans le cas où il n'y a aucune barrière d'adsorption à l'interface. Or, une telle barrière existe, d'autant plus quand les particules sont chargées. En effet, une particule chargée s'approchant de l'interface fait l'objet de forces répulsives ayant deux origines principales : la présence à l'interface de particules chargées préalablement adsorbées, et/ou l'effet de « charge image » [80]. Ce deuxième phénomène est notamment régi par l'Équation 3 :

$$q_{image} = q_{particule}\left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}\right) \qquad \text{Équation 3}$$

où q_{image} est la charge image, $q_{particule}$ la charge de la particule, ε_1 la permittivité de la première phase formant l'interface et ε_2 la permittivité de la deuxième phase. Ainsi, une

particule chargée se déplaçant d'un milieu aqueux (de haute permittivité ε_1) vers un milieu huileux (de basse permittivité ε_2) peut subir une force répulsive venant de l'huile, proportionnelle à sa propre charge : on parle alors de barrière d'adsorption (Figure 6) [81,82]. Dans les rares cas où les particules sont dispersées dans l'huile et qu'elles y sont dans un état chargé, la charge image est de signe opposé à la charge de la particule : la force est alors attractive, et l'adsorption des particules est favorisée. Ce cas étant cependant très minoritaire, les particules chargées subissent la plupart du temps l'effet de la barrière d'adsorption. Cette dernière peut par ailleurs être atténuée en ajoutant des sels à la phase aqueuse. Ces derniers peuvent écranter les charges à l'interface et autour des particules, empêchant l'apparition d'une charge image, et permettant ainsi une adsorption plus rapide [74].

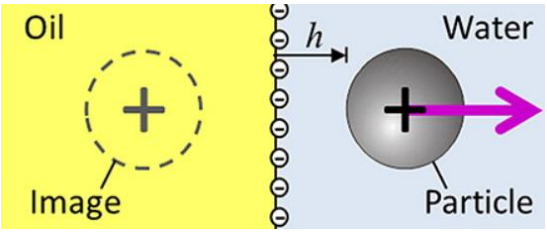


Figure 6 : Effet de « charge image » apparaissant à une distance *h* de l'interface, et donnant lieu à une force répulsive limitant l'adsorption des nanoparticules chargées à une interface (figure adaptée de Wang *et al.* [82]).

2.1.3. Taux de couverture et organisation des particules à l'interface

2.1.3.1. Organisation des particules en monocouche dense

Une fois les particules adsorbées à l'interface, elles peuvent s'organiser de multiples façons, selon leurs propriétés physico-chimiques (Figure 5). D'un point de vue énergétique, l'organisation en monocouche dense (Figure 7a) est la plus favorable, car elle permet un contact minimal entre phase aqueuse et phase huileuse. La stabilisation thermodynamique est un cas extrême, dans lequel aucun contact n'existe entre les deux phases liquides. Elle nécessite donc une couverture totale de l'interface, ce qui n'est possible qu'avec des particules de taille hétérogène : les petites particules comblent alors les espaces laissés entre les grosses (Figure 8) [68].

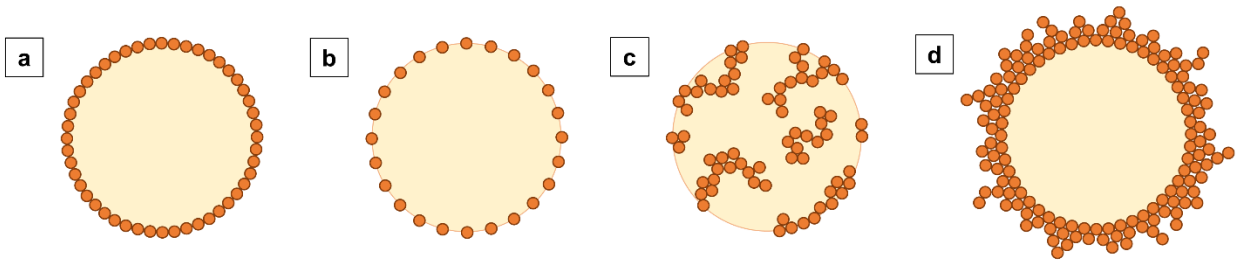


Figure 7 : Représentation schématique de gouttelettes stabilisées par des nanoparticules adoptant différentes organisations : a) Monocouche dense, b) Cristal colloïdal épars, c) Agrégats, d) Couches multiples.

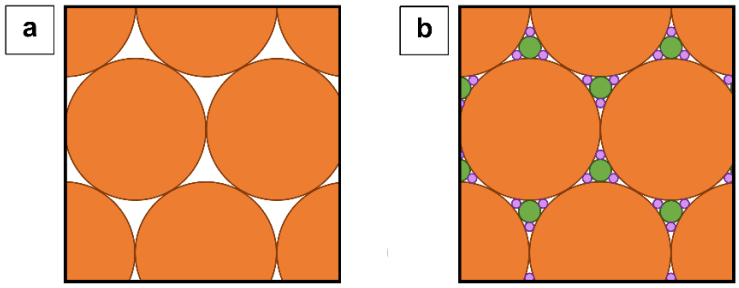


Figure 8 : Empilement optimal de particules sur un plan. (a) Une population monodisperse de particules permet usuellement d'atteindre une densité surfacique d'environ 90%, ce qui laisse des espaces et donc empêche d'atteindre la stabilité thermodynamique. (b) En revanche, les particules de distribution polydisperse permettent d'atteindre des densités surfaciques plus élevées, les plus petites particules se logeant dans les espaces laissés par les plus grosses.

Cependant, une monocouche dense peut être obtenue sans couverture totale, et conduire malgré tout à une bonne stabilisation cinétique des émulsions. En effet, pour une courbure de gouttelettes et une taille de particule données, il existe une distance maximale entre deux particules permettant d'éviter que les deux gouttelettes ne se touchent directement (Figure 9). Les particules sont mobiles à l'interface et peuvent, par leur mouvement spontané sur une interface peu occupée, ou par réarrangement forcé suite à l'adsorption d'autres particules en grand nombre, se rapprocher les unes des autres. Ce rapprochement induit la réduction de la distance h', qui est la distance entre le sommet de la goutte d'huile et la droite passant par le centre des particules les plus proches de ce sommet [79]. Lorsque des particules non chargées sont assez proches pour que h' soit inférieure à la moitié de la hauteur de protrusion h_w des particules (qui est fonction de l'angle de contact θ et du rayon r des particules), alors le contact direct entre les deux gouttelettes d'une émulsion au repos est impossible. La coalescence est ainsi empêchée par encombrement stérique. Ce type d'organisation est permis par les particules ne présentant pas de charges

de surface, et qui ont donc la possibilité de se rapprocher suffisamment pour réduire la distance *h´* [83].

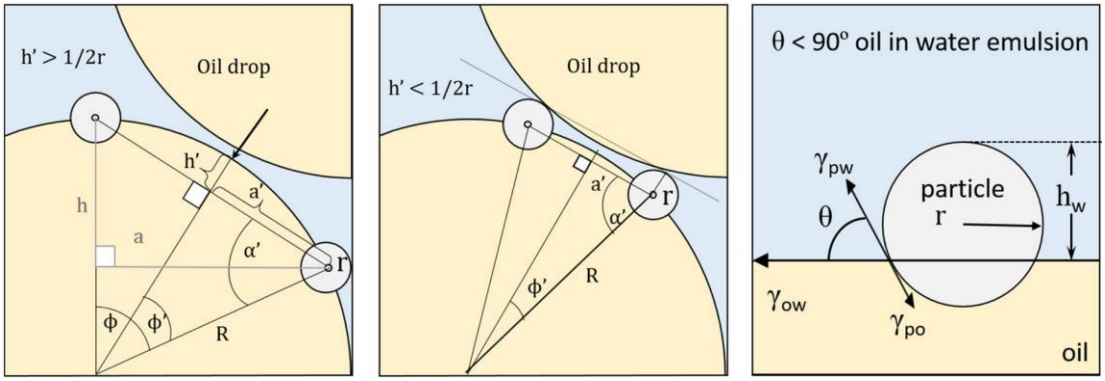


Figure 9 : Représentation schématique de l'espace minimal nécessaire entre deux particules pour obtenir un encombrement stérique empêchant la coalescence de deux gouttes d'huile. A gauche, l'espace est trop important pour empêcher la coalescence. Au milieu, l'espace est suffisamment petit pour éviter le contact. A droite, la hauteur de protrusion h_w des particules est montrée comme dépendant de l'angle de contact θ et du rayon *r* de la particule (figure issue de Matos *et al.* [79]).

2.1.3.2. Organisation des particules en monocouche éparse : cristaux colloïdaux et agrégats

Dans le cas de particules chargées, l'organisation peut être toute autre. De telles particules ne peuvent en effet pas former de monocouche dense, du fait des répulsions électrostatiques qu'elles génèrent. Elles s'organisent donc en cristal colloïdal (Figure 7b) [84–86], ou couvrent très partiellement l'interface en formant des agrégats (Figure 7c) [87–90]. L'origine électrostatique de telles organisations semble appuyée par certaines études montrant qu'un changement de pH, en modifiant la charge de surface, permet de passer d'une monocouche dense à une couverture incomplète, et inversement [87]. Bien que la stabilité de telles émulsions soient mise en doute par certains auteurs [91], il semblerait que certains mécanismes présentés ci-après permettent tout de même d'empêcher la coalescence de gouttelettes partiellement couvertes de particules.

a) Charges de surface

La stabilisation n'est plus uniquement stérique, car les particules donnant ce type d'organisation sont souvent chargées : la répulsion électrostatique entre deux gouttelettes peut donc être un premier levier contre leur coalescence [78].

b) Pontage

Un autre mécanisme possible est le pontage, c'est-à-dire le partage par deux gouttes d'une même couche de particules (Figure 10) [88], sur des zones en forme de disque ou d'anneau [92]. Les gouttelettes peuvent fournir chacune une partie des particules nécessaires, mais parfois toutes les particules proviennent de la même goutte [93]. Le pontage n'est possible qu'à la condition que les particules émergent suffisamment des gouttelettes pour être adsorbées à deux interfaces liquide-liquide simultanément. Les particules ne doivent cependant pas trop émerger des gouttelettes : un mauvais ancrage dans la phase dispersée ne permet pas la bonne résistance du pont formé [94]. La formation des ponts serait alors réversible, et une répétition de cycles pontage/dépontage permettrait l'échange de particules entre les gouttelettes [95]. Les ponts se forment lorsque l'interface est incomplètement couverte par les particules, et permettent un rapprochement des gouttelettes sans coalescence (grâce au film de phase continue présent entre les deux). Les émulsions soumises au pontage sont d'ailleurs bien souvent floculées, tout en conservant leur stabilité [87].

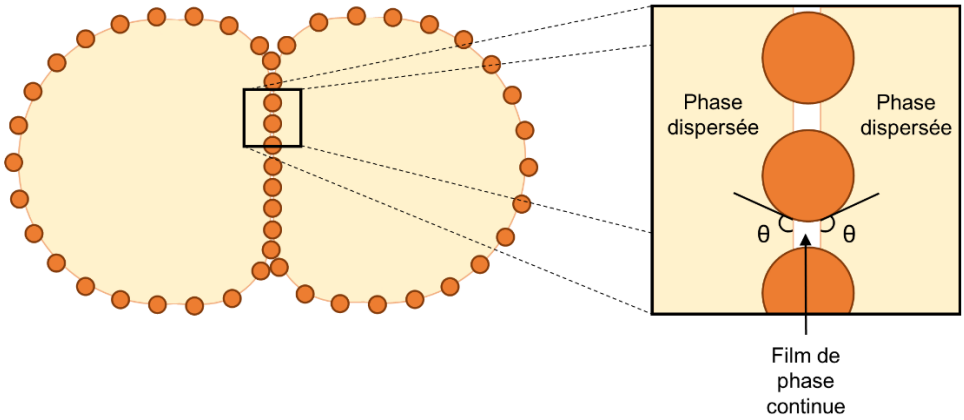


Figure 10 : Représentation schématique du phénomène de pontage entre deux gouttelettes, séparées par un film de phase continue. Les particules sphériques établissent le même angle de contact θ aux deux interfaces auxquelles elles sont adsorbées.

c) Réallocation des particules

Enfin, le dernier mécanisme potentiellement en jeu est la réallocation des particules aux points de contact [87,89]. En effet, quand deux gouttelettes se rapprochent, les particules réparties tout autour se rassembleraient au niveau du point de contact, formant très localement une monocouche dense empêchant la coalescence (Figure 11). Ce phénomène

s'expliquerait par l'état dipolaire des particules chargées à l'interface. Leur charge de surface est en effet différente des deux côtés de l'interface ; cela génère des interactions attractives entre les particules présentes aux deux interfaces, les poussant à se regrouper au point de contact. L'état floculé de ces émulsions pourrait aussi être en partie dû à cette interaction de type « dipôle-dipôle » [88].

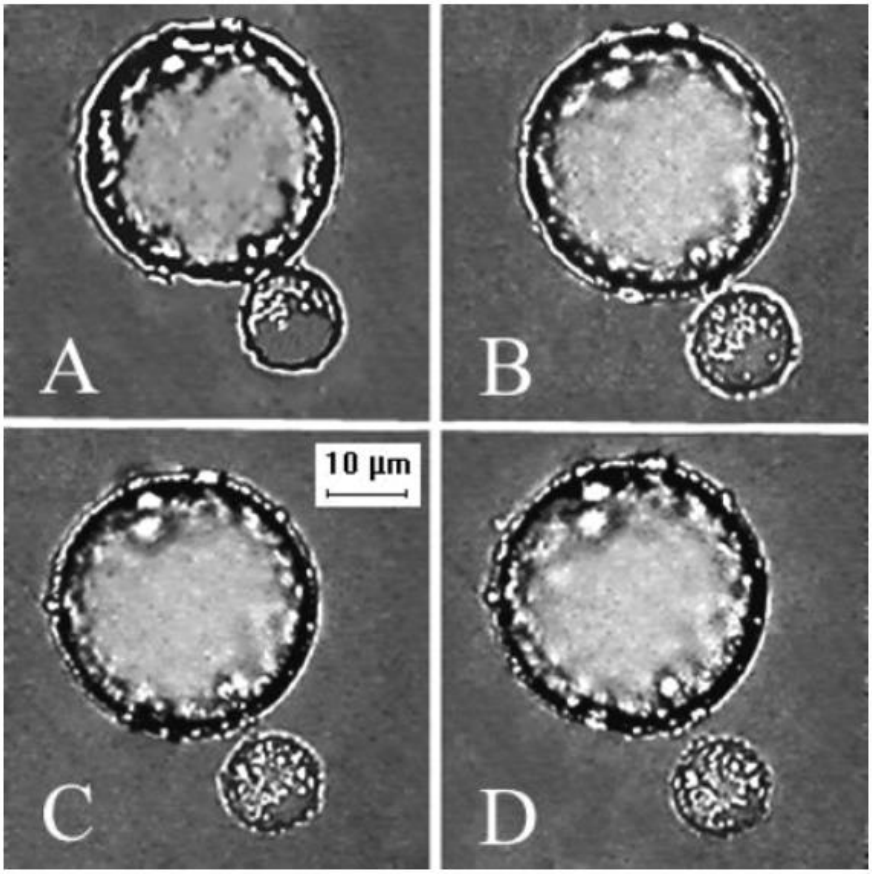


Figure 11 : Séparation de deux gouttelettes après un contact ayant supposément entraîné une réallocation des particules au point de contact (séquence dans l'ordre chronologique de A à D). Les régions les plus claires sur la petite gouttelette sont celles couvertes de particules. Les particules, rassemblées au point de contact sur l'image A, se re-déploient ensuite sur toute l'aire interfaciale, une fois les gouttelettes séparées (figure issue de Vignati *et al.* [89]).

2.1.3.3. Organisation des particules en couches multiples

Enfin, les gouttelettes peuvent être stabilisées par plusieurs couches de particules (Figure 7d). Ces cas, plus rarement décrits, pourraient expliquer des comportements particuliers comme la stabilisation d'émulsions anti-Finkle [96] ou encore l'obtention d'émulsions

multiples en une seule étape [97]. Ces cas seront détaillés plus précisément dans la section 2.3.

2.1.4. Comportement des particules en excès dans la phase continue

Il convient également de relever le rôle potentiel des particules en excès, non adsorbées à l'interface, dans la stabilité des émulsions de Pickering. Du fait que les particules utilisées pour stabiliser des émulsions de Pickering ont toujours une mouillabilité intermédiaire, leur affinité pour la phase continue peut être limitée, les conduisant à s'agréger. Les particules non utilisées pour la couverture des gouttelettes peuvent ainsi former des réseaux dans la phase continue, conduisant à la gélification de cette dernière [67]. Cette gélification a l'avantage majeur de limiter le rapprochement entre les gouttelettes, conduisant à une amélioration de la stabilité des émulsions [98,99]. Ce mécanisme peut être favorisé par un ajout de sels dans la phase continue. En effet, les sels peuvent écranter d'éventuelles charges présentes à la surface des particules, limitant ainsi les répulsions électrostatiques pour favoriser leur agrégation [100]. L'ajout de fortes concentrations de particules qui ne s'adsorbent pas à l'interface peut aussi générer une gélification par le phénomène de floculation par déplétion [101].

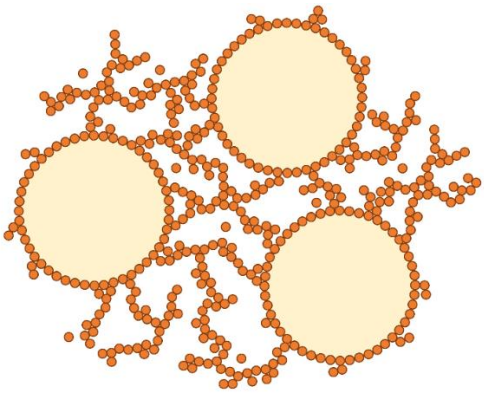


Figure 12 : Représentation schématique de gouttelettes stabilisées par un réseau de particules en excès dans la phase continue.

La gélification de la phase externe ne peut cependant pas être considérée à proprement parler comme un mécanisme de stabilisation caractéristique des émulsions de Pickering [102,103]. En effet, l'augmentation de la viscosité de la phase continue est une stratégie de stabilisation connue de longue date (souvent par l'utilisation de polymères), et commune à tous les types d'émulsions, quel que soit le type de stabilisant utilisé [3].

Notons tout de même que dans le cas des émulsions de Pickering, cette gélification peut être réalisée sans ajout d'aucun ingrédient supplémentaire, simplement par l'agrégation des particules en excès. Et si ce mécanisme de stabilisation est souvent considéré comme moins efficace que le mécanisme classique par couverture des gouttelettes, la combinaison des deux donne cependant d'excellents résultats en termes de stabilité [104].

2.2. Taille des gouttelettes

2.2.1. Concept de coalescence limitée

Au-delà de sa stabilité, une émulsion se caractérise par la taille de ses gouttelettes. Pour les émulsions de Pickering, cette dernière est régie par un phénomène appelé « coalescence limitée » [105], dont la condition *sine qua non* est l'irréversibilité de l'adsorption des particules à l'interface des gouttelettes (une propriété spécifique aux émulsions de Pickering). Dans un premier temps, l'étape d'émulsification permet de diviser la phase dispersée et donc d'augmenter l'aire interfaciale. Les particules s'adsorbent alors de manière irréversible à l'interface nouvellement créée. Si l'aire interfaciale créée est supérieure à l'aire que peuvent stabiliser les particules, alors les gouttelettes coalescent. Cette coalescence se poursuit jusqu'à ce que l'aire interfaciale soit suffisamment réduite pour être stabilisée par les particules. Le système atteint alors équilibre : la coalescence est dite « limitée ».

Selon les capacités de couverture des particules, cet équilibre peut être atteint à un stade plus ou moins avancé de la coalescence. Trois régimes sont décrits. Dans un premier cas, l'émulsification génère une aire interfaciale qui dépasse les capacités de couverture par les particules, ces dernières étant en trop petit nombre pour arrêter la coalescence. Cette dernière se poursuit alors jusqu'à la séparation complète des deux phases : aucune émulsion stable ne peut être préparée dans ces conditions [91]. Dans un deuxième cas, l'émulsification génère une aire interfaciale qui dépasse initialement les capacités de couverture par les particules, mais ces dernières sont en nombre suffisant pour arrêter la coalescence avant la séparation complète des deux phases. La taille et la dispersité des gouttelettes à l'équilibre est alors entièrement régie par les capacités de couverture des particules [77,91]. Dans un dernier cas, l'aire interfaciale générée par l'émulsification est inférieure aux capacités de couverture des particules. Ces dernières stabilisent alors les gouttelettes telles qu'elles sont produites, sans laisser s'opérer de coalescence. La taille

des gouttelettes n'est, dans ce cas, pas régie par les capacités de couverture des particules (qui sont en excès par rapport à l'aire à stabiliser) mais simplement par les capacités du procédé d'émulsification à générer de l'aire interfaciale [106,107].

En plus de la taille moyenne des gouttelettes, le phénomène de coalescence limitée a aussi un impact sur la distribution de taille de ces mêmes gouttelettes. Certaines études montrent ainsi que la coalescence limitée tend à resserrer cette distribution, conférant aux émulsions de Pickering une faible dispersité. En effet, la probabilité de coalescence entre deux gouttelettes est proportionnelle à l'aire non stabilisée [105]. En d'autres termes, les gouttelettes de petite taille, couvertes de peu de particules, ont plus de chance de coalescer que les gouttelettes de grande taille, issues de la coalescence et donc mieux recouvertes. Ainsi, même des émulsions produites par des procédés de rotor-stator, d'homogénéisation haute pression ou de sonication (produisant souvent des émulsions polydisperses [46]) possèdent *in fine* une dispersité faible. A noter cependant que dans le cas où l'aire interfaciale générée par l'émulsification est totalement recouverte par les particules, sans passer par une étape de coalescence, cette réduction de la dispersité ne peut pas s'effectuer. Il arrive donc, dans ces conditions particulières, d'obtenir des émulsions de Pickering relativement polydisperses.

Ainsi, la compréhension du mécanisme de coalescence limitée, et du régime autorisé par les conditions expérimentales, permet d'identifier un certain nombre de paramètres d'influence, pouvant servir à prédire et contrôler la granulométrie des gouttelettes à l'équilibre.

2.2.2. Influence de la concentration en particules et du volume de la phase dispersée sur la taille des gouttelettes

Comme décrit précédemment, lorsque l'émulsification génère une aire interfaciale qui dépasse initialement les capacités de couverture par les particules, la taille finale des gouttelettes est régie par les capacités de couverture des particules. Bien que cette situation ne soit pas la seule possible, elle est emblématique des émulsions de Pickering, car elle permet d'obtenir une taille de gouttelettes prévisible par de nombreux modèles et une distribution granulométrique resserrée.

Le premier modèle a été décrit par Wiley (Équation 4) [108] :

$$D_d = \frac{6V_d}{n_p {d_p}^2} \qquad \text{Équation 4}$$

où D_d est le diamètre moyen des gouttelettes, V_d est le volume total de phase dispersée, n_p est la quantité de particules et d_p leur diamètre. Très simple, ce modèle montre notamment que le diamètre moyen des gouttelettes est inversement proportionnel à la quantité de particules. Cela correspond bien au principe de coalescence limitée : plus il y a de particules stabilisantes, plus la coalescence est limitée, conduisant à la stabilisation de petites gouttelettes. Ce modèle montre aussi le lien de proportionnalité entre le diamètre des gouttelettes et le volume de phase dispersée, que d'autres équipes confirmeront par la suite [91]. Enfin, l'influence du diamètre des particules est mise en lumière, mais ce point sera rediscuté dans la section 2.2.3.

Ce premier modèle, bien que très informatif, se base sur l'hypothèse que les particules recouvrent la totalité de l'interface. Or, une telle densité est impossible avec des particules qui sont très majoritairement sphériques : en empilement compact, des sphères ne peuvent couvrir que 90% de la surface [91]. L'introduction du paramètre de densité de couverture dans le modèle est d'autant plus importante que certaines émulsions peuvent être stabilisées alors même que les gouttelettes ne sont que très partiellement couvertes [87]. Dans ce contexte, le modèle proposé par Schmitt *et al.* [66] améliore potentiellement la précision des prédictions, car il inclut la fraction de l'interface recouverte de particules (Équation 5) :

$$\frac{1}{D_d} = \frac{m_p}{6C\rho_p V_d}\frac{a_p}{v_p} \qquad \text{Équation 5}$$

où D_d est le diamètre moyen des gouttelettes, m_p est la masse totale de particules, a_p est l'aire projetée d'une particule sur l'interface, C est la fraction de l'interface recouverte de particules, ρ_p est la masse volumique des particules, V_d est le volume total de phase dispersée, et v_p le volume des particules. A noter que, si elle se présente sous une forme légèrement différente, cette équation est en réalité très similaire au modèle de Wiley, $m_p/\rho_p.v_p$ équivalant au nombre de nanoparticules n_p, et l'aire projetée a_p représentant, dans le cas de particules sphériques, l'influence du diamètre des particules d_p. La différence

majeure entre ce modèle et celui de Wiley réside donc dans la prise en compte de la densité de couverture. Cette densité peut varier, comme expliqué dans la section 2.1.3. Le paramètre C peut ainsi prendre une valeur de 0,9 dans le cas d'un empilement hexagonal compact, inférieur à 0,9 dans le cas d'un empilement moins dense, ou supérieur à 0,9 dans le cas de multicouches ou d'agrégats de particules [66].

Une publication d'Arditty *et al.*, souvent citée comme référence sur le principe de la coalescence limitée, présente un modèle assez similaire, mais ayant l'avantage d'appréhender les variations du diamètre moyen des gouttelettes D_d en fonction du temps t (Équation 6) [77] :

$$\frac{1}{D_d(t)} = \frac{s(t)\, m_p}{6V_d} \qquad \text{Équation 6}$$

où m_p est la masse totale de particules, V_d est le volume total de phase dispersée, et $s(t)$ l'aire interfaciale spécifique à un temps t. Ce nouveau terme n'est autre que le rapport de l'aire interfaciale totale disponible à un temps t sur la masse totale de particules. C'est ce paramètre qui rend compte de la densité de couverture des particules. Une fois de plus, le diamètre des gouttelettes est fonction de la quantité de particules et du volume total de la phase dispersée. Notons que l'influence de la taille des particules n'apparaît cependant plus directement dans l'équation, ce qui ne semble pas altérer la qualité prédictive de ce modèle.

Une étude de Frelichowska *et al.* reprend exactement le même modèle [91]. L'originalité de cet article vient dans le fait que la taille des gouttelettes n'est plus présentée comme dépendant du volume de phase dispersée ou de la quantité de particules prises séparément. La relation est établie expérimentalement entre la taille des gouttes D_d et le ratio V_d/m_p, ce qui permet selon les auteurs de rendre compte du phénomène de coalescence limitée de façon plus pertinente.

Notons que tous ces modèles sont basés sur une approximation de l'angle de contact des particules recouvrant la surface des gouttelettes. L'aire couverte par une particule est toujours équivalente à l'aire projetée par la particule à l'équateur : cela correspond donc à un angle de contact de 90°. Tsabet et Fradette [107] ont choisi de prendre en compte l'angle de contact dans leur calcul de l'aire couverte par les particules. Cela est cependant discutable, car quelle que soit la ligne de contact entre l'interface et les particules, c'est

bien le diamètre à l'équateur qui encombre l'interface. L'influence de l'angle de contact des particules sur la taille des gouttelettes n'est donc potentiellement pas aussi importante que supposée par Tsabet et Fradette.

2.2.3. Influence de la taille des particules sur la taille des gouttelettes

Les modèles précédents, bien que souvent cités, ne doivent pas faire oublier les propositions d'autres auteurs, dont celle de Binks et Lumsdon (Équation 7) [109] :

$$r_d = \frac{4\,V_d r_p}{V_p} \qquad \text{Équation 7}$$

où r_d est le rayon moyen des gouttelettes, V_d est le volume total de phase dispersée, V_p le volume total de particules, et r_p leur rayon moyen. Dans ce modèle, le rayon des gouttelettes est proportionnel au volume de phase dispersée, comme c'était le cas avec les modèles précédents. En revanche, il se distingue en suggérant qu'une relation de proportionnalité existe entre le rayon des gouttelettes et le rayon des particules, à volume total de particules (V_p) constant. Bien que cela semble aller à l'encontre des autres modèles, cette théorie est appuyée par des résultats expérimentaux, montrant une linéarité entre les deux paramètres sur une certaine gamme de diamètres de particules.

Une critique peut cependant être formulée à l'encontre de ce modèle. En effet, si le diamètre des particules augmente à volume total de particule constant, cela signifie que la concentration en particules diminue en parallèle. La variation de la taille des gouttelettes peut donc résulter autant de la variation de taille des particules que de la variation de concentration. En ce sens, l'équation de Wiley (Équation 4), est intéressante. En effet, elle permet d'affirmer que si le volume de phase dispersée et le nombre de particules sont fixes, alors une diminution de la taille des particules entraîne une moindre couverture des interfaces, donc une coalescence plus importante qui débouche sur une augmentation de la taille des gouttes. On voit donc que, lorsque les modèles prennent en compte le nombre de particules, et non leur masse ou leur volume total, alors l'analyse de l'influence de la taille particulaire est largement facilitée. L'équation de Schmitt *et al.* (Équation 5) permet, elle aussi, de prendre indirectement en compte la taille des particules (par le biais du paramètre a_p, aire projetée d'une particule sur l'interface) en fixant leur nombre ($m_p/\rho_p.v_p$). Quant à l'équation d'Arditty *et al.* (Équation 6), elle regroupe la taille de particules avec le

nombre de particules et l'aire interfaciale, sous le paramètre s d'aire interfaciale spécifique. Bien qu'il n'empêche pas l'étude de l'influence de la seule taille des particules sur la taille des gouttelettes, ce modèle n'est pas le plus adapté à cet objectif, du fait de la complexité du paramètre s.

Au-delà de cette discussion sur la pertinence des modèles prédictifs, notons que pour certains auteurs, il reste admis comme une règle empirique que la préparation de gouttelettes de petites taille nécessite des petites particules [79]. Ils conseillent ainsi de choisir une taille de particules inférieure d'au moins un ordre de grandeur à la taille des gouttelettes désirées [23]. Cette règle s'explique par la forte courbure des petites gouttelettes, trop importante pour autoriser une couverture satisfaisante par des grosses particules.

2.2.4. Influence du sens de l'émulsion sur la taille des gouttelettes

Golemanov *et al.* proposent, pour leur part, de modéliser la coalescence limitée de façon différente selon que les particules se trouvent initialement dans la phase continue ou dispersée [110]. Le modèle expérimental utilisé dans cette étude est composé d'une solution aqueuse de NaCl et d'hexadécane, mélangés par rotor-stator. La stabilisation est assurée par des particules de polystyrène fonctionnalisées en surface par des groupements sulfates. Lorsque la fraction volumique de l'huile est fixée à 0,5, la phase aqueuse (où sont dispersées les particules) se retrouve dispersée dans la phase huileuse, donnant lieu à une émulsion eau-dans-huile (E/H) stable. Cette situation est relativement rare et trouvera son explication dans la description des mécanismes décrits dans la section 2.3. Quoi qu'il en soit, la nécessité d'un modèle particulier pour les systèmes stabilisés par des particules venant de la phase dispersée se justifie par le fait que les particules disponibles à l'adsorption sont en quantités limitées lorsqu'elles viennent de l'intérieur des gouttes. Golemanov *et al.* proposent le modèle suivant (Équation 8) :

$$D_d = \frac{8rC\rho_p}{\varphi_p \rho_s} \qquad \text{Équation 8}$$

où D_d est le diamètre moyen des gouttelettes, r est le rayon moyen des particules, C est la fraction de l'interface recouverte de particules, ρ_p est la densité des particules, ρ_s est la densité de la phase dispersée, et φ_p est la fraction massique des particules dans la phase

dispersée. Ainsi, ce modèle théorique indique que la taille des gouttelettes est inversement proportionnelle à la fraction massique des particules dans la phase dispersée, et donc à leur concentration. De façon plus surprenante, la quantité de phase dispersée d'aurait aucune influence, contrairement aux émulsions dont les particules sont suspendues dans la phase continue. Les résultats expérimentaux confirment la pertinence de ce modèle pour ce type assez rare d'émulsions.

2.2.5. Influence du procédé sur la taille des gouttelettes

Tous les modèles décrits jusqu'à présent sont pertinents lorsque l'émulsification génère une aire interfaciale qui dépasse initialement les capacités de couverture par les particules. Or, si ce n'est pas le cas, les particules stabilisent l'interface telle qu'elle est produite par l'émulsification, et aucune coalescence ultérieure n'est possible. La taille des gouttelettes est alors régie par les caractéristiques du procédé. Si sa prédiction est difficile, une étude attentive de la littérature permet d'isoler un certain nombre de paramètres pouvant influencer la taille des gouttelettes. Ces paramètres sont notamment présents dans certains nombres adimensionnels, utilisés pour décrire les forces mises en jeu dans les mécanismes d'émulsification.

La division de la phase dispersée par les méthodes les plus courantes d'émulsification type rotor-stator, broyeur colloïdal ou homogénéisateur à haute pression, dépend du régime d'écoulement de l'émulsion. La capacité d'un régime d'écoulement à rompre une interface pour générer des gouttelettes est souvent analysée par le biais du nombre adimensionnel de Weber [111] , noté We et défini selon l'Équation 9 [112]:

$$We = \frac{v^2 l \rho}{\gamma} \qquad \text{Équation 9}$$

où v est la vitesse des gouttelettes, l la longueur caractéristique de l'espace où s'écoule le liquide, ρ la masse volumique du liquide, et γ la tension interfaciale entre les deux phases de l'émulsion, qui s'oppose à la rupture. Un nombre de Weber élevé indique une forte déformation des gouttelettes, et donc une forte capacité du procédé à rompre ces gouttelettes pour générer de l'aire interfaciale. A partir de cette formule, on comprend que la géométrie de l'appareil a une influence sur la taille des gouttelettes, tout comme la vitesse de cisaillement [113]. D'autres articles, portant notamment sur l'émulsification par

un procédé rotor-stator, mettent en avant l'importance du nombre de viscosité Vi (Équation 10) [107,114].

$$Vi = \sqrt{\frac{\rho_c}{\rho_d}} \frac{\mu_d N l}{\gamma} \qquad \text{Équation 10}$$

où ρ_c *et* ρ_d sont respectivement les masses volumiques de la phase continue et de la phase dispersée, μ_d est la viscosité de la phase dispersée, N est la vitesse du rotor (en rotation par secondes), l la longueur caractéristique de l'espace où s'écoule le liquide, et γ la tension interfaciale entre les deux phases de l'émulsion. Ce nombre adimensionnel, moins courant que le nombre de Weber, montre cependant l'importance des mêmes paramètres de procédé : la longueur caractéristique et la vitesse d'agitation. Enfin, certains auteurs montrent l'importance du temps d'agitation sur la taille des gouttelettes qui peut parfois, de façon surprenante, augmenter avec le temps [97]. Ce phénomène, intimement lié au mécanisme d'inversion de phases, sera développé dans la section 2.3.2.

Dans le cas d'une émulsification par un procédé microfluidique, le nombre adimensionnel utilisé pour appréhender la division de la phase dispersée au point de rencontre des deux phases est le nombre capillaire Ca. Calculé pour la phase dispersée et pour la phase continue, il met en jeu des paramètres opératoires relativement similaires à ceux impliqués dans le nombre de Weber [115–118], comme le montre l'Équation 11 :

$$Ca = \frac{v\eta}{\gamma} \qquad \text{Équation 11}$$

où v est la vitesse de la phase considérée, η la viscosité de la phase considérée, et γ la tension interfaciale entre les deux phases de l'émulsion. Ainsi, tout comme le nombre de Weber présenté pour les procédé rotor-stator, le nombre capillaire utilisé pour les procédés microfluidiques représente le rapport entre les forces d'inertie, et les forces interfaciales. Cependant, le mécanisme de formation des gouttes est totalement différent entre les deux procédés. Dans un procédé rotor-stator, une gouttelette préformée doit être déformée au maximum par les forces d'inertie pour être rompue : We doit donc être élevé pour favoriser la rupture des gouttelettes. Dans un procédé microfluidique, un front de phase à disperser s'avance vers un front de phase dispersante. Les forces d'inertie

(vitesse et viscosité des phases) s'opposent à la formation de gouttelettes, qui sont plutôt favorisées par une forte tension interfaciale au point de rencontre : le nombre capillaire doit être faible pour assurer la rupture en gouttelettes. En règle générale, on considère que la rupture de la phase dispersée en gouttelettes est possible lorsque le Ca des deux phases est inférieur à 1. Des phases de faible viscosité, générant une forte tension interfaciale, et s'écoulant à faibles débits, ont donc tendance à favoriser la formation de gouttelettes. Le nombre de Weber et le nombre capillaire sont donc proches dans leur expression, mais leur interprétation diffère, notamment en fonction du procédé auquel ils s'appliquent. Ainsi, pour les procédés microfluidiques, le nombre capillaire est préféré au nombre de Weber dans le cadre d'une émulsification.

Lorsque l'émulsification est réalisée par application d'ultrasons, le mécanisme de division de la phase dispersée est encore très différent des procédés précédents. Très schématiquement, les ultrasons génèrent une dépression provoquant la formation bulles gaz par cavitation, puis l'implosion de ces bulles. L'onde de choc suivant cette implosion génère des contraintes pouvant déformer et rompre les gouttelettes [119]. Dans ce contexte, le paramètre le plus influent est l'intensité acoustique (directement liée à l'amplitude de sonication), l'impact de la fréquence d'oscillation de la sonde sur la taille des gouttelettes ne semblant pas démontrée [120,121]. Le temps d'émulsification est aussi un paramètre favorisant une petite taille de gouttelettes [122]. Enfin, l'émulsification par membrane offre la possibilité de contrôler la granulométrie de l'émulsion en modifiant la taille des pores de la membrane, la pression transmembranaire ou encore la vitesse de la phase continue [113,123].

Tout au long de cette section, nous avons exposé les paramètres à contrôler pour tirer avantage, selon les cas, de la capacité des particules à couvrir l'interface, ou de l'influence du procédé d'émulsification. Dans les cas où la coalescence limitée est à l'œuvre, il existe même plusieurs modèles simples permettant de prédire la taille des gouttelettes. En outre, certains auteurs développent des méthodes de prédiction plus complexes. C'est le cas de Tsabet et Fradette, qui proposent une démarche complète de modélisation de la stabilisation des gouttelettes. Cette méthode sert à modéliser, dans le cadre d'une émulsification au rotor-stator, la formation des gouttes, leur collision avec les particules, l'attachement des particules à l'interface, et enfin l'efficacité de la couverture. Les auteurs peuvent alors déduire de façon précise la taille finale des gouttelettes, sans faire

d'hypothèse préalable sur l'existence ou non d'un phénomène de coalescence limitée [107]. Cette démarche semi-empirique, bien qu'efficace, reste difficile à mettre en œuvre du fait notamment du grand nombre de paramètres à connaître pour appliquer les calculs.

2.3. Sens des émulsions

2.3.1. Loi de Finkle et mouillabilité

2.3.1.1. Principe

Outre la stabilité et la taille des gouttelettes, une émulsion se caractérise également par son sens, c'est-à-dire la détermination des phases continue et dispersée. Ainsi, les émulsions sont composées soit de gouttelettes d'huile dans l'eau (H/E), soit de gouttelettes d'eau dans l'huile (E/H). Ces émulsions, constituées d'une phase dispersée dans l'autre, sont dites « simples ». Parfois, la phase dispersée peut elle-même contenir des gouttelettes : on parle alors d'émulsions « multiples ». Ces dernières peuvent être de type eau-dans-huile-dans-eau (E/H/E) ou huile-dans-eau-dans-huile (H/E/H) [124]. Le sens de ces émulsions peut être déterminé expérimentalement par ajout de colorants ou par conductimétrie : une émulsion dont la phase continue est aqueuse possède une conductivité élevée et dissout très bien le bleu de méthylène (hydrophile), alors que les émulsions dont la phase continue est huileuse ont une faible conductivité et dissolvent plutôt le rouge Soudan (hydrophobe) [2].

Le sens des émulsions est avant tout gouverné par la mouillabilité des particules stabilisantes, évaluée grâce à l'angle de contact θ des particules dans le système triphasique. Ce dernier représente l'angle entre la phase aqueuse, la phase huileuse, et la particule (Figure 13), et se définit selon l'équation de Young (Équation 12) [125] :

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{so} - \gamma_{sw}}{\gamma_{ow}} \qquad \text{Équation 12}$$

où γ_{so} est la tension interfaciale entre la particule et l'huile, γ_{sw} la tension interfaciale entre la particule et l'eau, et γ_{ow} la tension interfaciale entre l'huile et l'eau. L'angle de contact d'une particule est un paramètre comparable au HLB (balance hydrophile/lipophile) des tensioactifs [126], en ce qu'ils permettent tous les deux de décrire l'affinité relative des stabilisants vis-à-vis des phases aqueuse et huileuse. La valeur de HLB permet de prédire

le sens d'une émulsion stabilisée par des tensioactifs, grâce à la loi empirique de Bancroft [127]. Comme décrit dans la section 1.2, une émulsion stable a pour phase continue la phase dans laquelle le tensioactif est le mieux solubilisé. Un tensioactif de HLB bas, hydrophobe, conduit donc plutôt à des émulsions E/H, et inversement. De façon analogue, il est possible de prédire le sens d'une émulsion de Pickering en fonction de l'angle de contact des particules stabilisantes. Selon la loi de Finkle, un angle de contact θ < 90° signifie que la particule s'ancre davantage dans la phase aqueuse : elle est donc plutôt hydrophile. Comme le montre la Figure 13, l'encombrement généré donne une courbure tendant à aboutir à des émulsions H/E. A l'inverse, une particule d'angle de contact θ > 90° stabilise plutôt des émulsions E/H [128]. Cette loi empirique a été maintes fois vérifiée avec des particules de mouillabilités variées. Parmi elles, on retrouve souvent des particules de silice [44,45,72,129,130], mais aussi des particules d'argiles [45,47], des nanoparticules lipidiques solides [56], des particules polymères [131], *etc*.

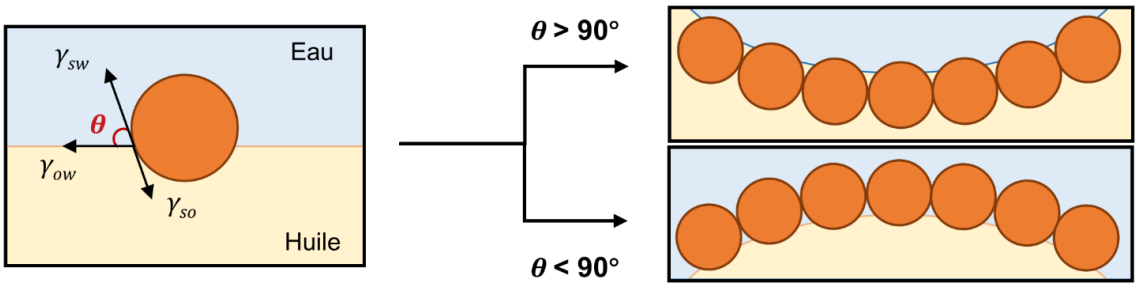


Figure 13 : Angle de contact θ d'une particule sphérique à une interface plane (à gauche). Un angle de contact θ supérieur à 90° (particule hydrophobe, en haut) conduit plutôt une émulsion E/H, alors qu'un angle de contact θ inférieur à 90° (particule hydrophile, en bas) donne préférentiellement une émulsion H/E.

Si les émulsions de Pickering stabilisées selon la loi de Finkle sont souvent des émulsions simples, il est possible de mettre à profit cette loi pour générer des émulsions multiples. De nombreux auteurs décrivent la préparation d'émulsions multiples en deux étapes, avec deux populations de particules de mouillabilités différentes. Un procédé courant consiste à préparer une première émulsion E/H stabilisée par des nanoparticules de silice fumée (hydrophobes). Cette émulsion est alors à son tour dispersée dans une phase aqueuse contenant des nanoparticules d'oxyde de fer (hydrophiles), conduisant à la formation d'une émulsion E/H/E [132,133]. Un exemple de ce procédé est donné en Figure 14. Ce type de procédé en deux étapes peut aussi être mis en œuvre pour produire des émulsions H/E/H [134].

Outre des particules de silice fumée et d'oxyde de fer, d'autres types de particules peuvent aussi être utilisées pour produire des émulsions multiples. Ainsi, l'interface huile-dans-eau peut être stabilisée par des particules de cellulose [134,135] ou des particules de silice recouvertes de poly(éthylène imine) (un polymère hydrophile) [136]. L'interface eau-dans-huile peut, quant à elle, être stabilisée par le même type de particules, après alkylation de la cellulose ou du poly(éthylène imine) [134,136], mais aussi par des particules d'oxyde de fer hydrophobisées [135].

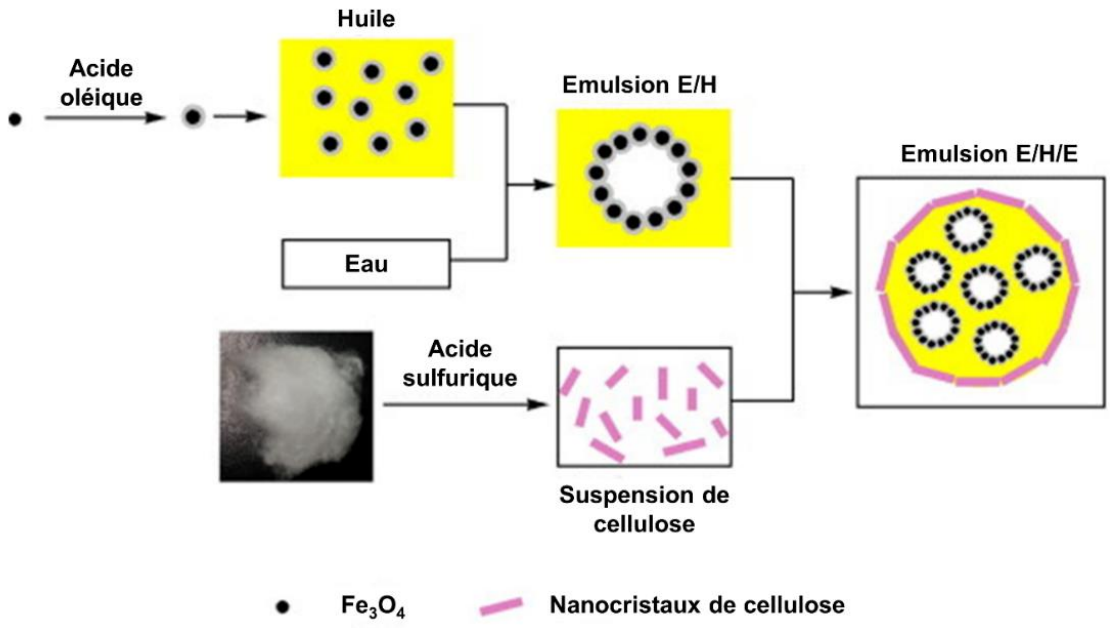


Figure 14 : Procédé de préparation d'une émulsion E/H/E en deux étapes. L'interface interne est stabilisée par des nanoparticules d'oxide de fer hydrophobisées par de l'acide oléique, quand l'interface externe est stabilisée par des nanocristaux de cellulose (figure issue de Zhu *et al.* [135]).

2.3.1.2. Mesure de l'angle de contact θ

L'angle de contact θ permet ainsi de connaître le type d'émulsion favorisé selon la loi de Finkle. Il est cependant difficile à mesurer, car il demande l'immobilisation d'une interface plane sans la modifier, pour pouvoir l'observer et mesurer l'angle de contact de chaque particule prise individuellement (Figure 15a). Cette immobilisation peut se faire par une congélation très rapide de l'interface, comme dans le cas de la *FreSCa-CryoSEM* [137]. Cette technique nécessite cependant l'utilisation d'une instrumentation spécifique, ce qui la rend difficile à mettre en œuvre. L'immobilisation des particules peut aussi se faire par *gel trapping*. Brièvement, une interface eau-huile plane est générée, en présence de

gomme gellane dans la phase aqueuse chaude. Après adsorption des particules à l'interface, le système est refroidi, gélifiant ainsi la phase aqueuse. L'huile est ensuite retirée, et une couche de poly(diméthylsiloxane) est coulée et réticulée sur cette interface gélifiée. Cette couche est alors décollée, arrachant au passage les particules : l'angle de contact de ces dernières est alors mesuré par observation microscopique de la couche de poly(diméthylsiloxane) [138]. Bien qu'assez aisée dans sa mise en œuvre, cette méthode ne s'applique pas à tous les systèmes, qui doivent notamment supporter des températures relativement élevées (de l'ordre de 50 °C) pour empêcher la gomme gellane de gélifier avant absorption des particules à l'interface. Cette méthode nécessite aussi de vérifier l'absence d'interaction de la gomme gellane (ou de tout autre polymère gélifiant non tensioactif) avec les particules et l'interface.

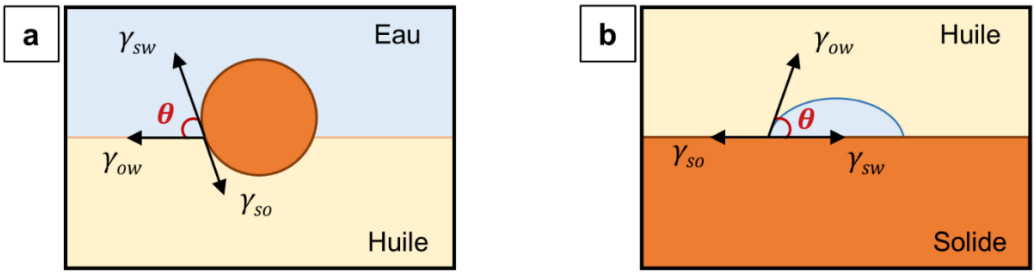


Figure 15 : Représentation schématique de (a) l'angle de contact θ dans le système triphasique, et (b) le même angle de contact θ mesuré macroscopiquement après dépôt d'une goutte d'eau sur un support solide immergé dans l'huile. Les tensions interfaciales γ_{so} (entre le solide et l'huile), γ_{sw} (entre le solide et l'eau) et γ_{wo} (entre l'eau et l'huile) sont représentées par des flèches.

Ainsi, les méthodes étudiant l'angle de contact θ de chaque particule prise individuellement sont probablement les plus représentatives de la mouillabilité des particules en émulsion. Cependant, les limites techniques de ces méthodes sont parfois difficiles à surmonter. Il reste donc très courant de mesurer l'angle de contact macroscopique d'une goutte sessile d'eau ou d'huile sur un substrat plat fait du même matériau que les particules (Figure 15b) [125]. Si cet angle de contact macroscopique répond lui aussi à l'équation de Young (Équation 12), il est primordial de ne pas le confondre avec l'angle de contact dans le système triphasique. En effet, des différences peuvent apparaître entre ces deux angles, car certains paramètres influents à l'échelle d'une particule sont négligeables à l'échelle d'un support solide plat macroscopique. Ainsi, Zanini et Isa suggèrent que la mesure macroscopique de l'angle de contact ne tient pas compte de nombreuses caractéristiques des particules, comme leur forme ou

l'homogénéité physico-chimique de leur surface [139]. Cet angle de contact macroscopique doit donc être interprété avec précautions, bien qu'il puisse être utile à des fins de comparaison entre plusieurs matériaux étudiés dans les mêmes conditions.

2.3.1.3. Paramètres influençant l'angle de contact θ

Ces méthodes de mesure de l'angle de contact θ ont permis à certains auteurs de mettre en évidence que la valeur de l'angle de contact d'une particule ne dépendait pas seulement du matériau principal qui la compose. Par exemple, la nature de l'huile utilisée en émulsion est un facteur influençant énormément l'angle de contact. Cela s'explique aisément par l'équation de Young, qui régit la valeur de l'angle de contact (Équation 12). Cette équation met en avant la relation entre l'angle de contact et la tension interfaciale entre chaque élément du système triphasique. Il apparaît dès lors que, selon la nature de l'huile, les interactions qu'elle entretient avec l'eau et les particules solides sont différentes, d'où un comportement interfacial différent [140]. Ainsi, Binks et Lumsdon ont démontré que des particules de silice sont plutôt hydrophobes en présence d'huiles polaires (stabilisant alors des émulsions E/H), et plutôt hydrophiles en présence d'huiles apolaires (stabilisant des émulsions H/E) [141]. Golemanov *et al.* [110], puis Frelichowska *et al.* [142] ont depuis confirmé cette observation.

La nature chimique de la surface des particules a aussi une influence importante sur l'angle de contact [125]. Certains articles soulignent ainsi l'influence de la composition chimique de la surface : Binks a ainsi réalisé plusieurs études démontrant qu'une forte présence de fonctions silanols en surface de particules de silice conférait à ces dernières une plus grande hydrophilie [72,143]. A l'inverse, la modification de particules de silice hydrophiles par greffage de γ-méthacryloxypropyl triméthoxysilane à leur surface tend à les rendre plus hydrophobes [44]. La présence de polymères tensioactifs à la surface des particules peut aussi modifier l'angle de contact de ces dernières. Ainsi, Albert *et al.* a démontré que l'adsorption d'alcool polyvinylique à la surface de particules de poly(lactide-co-glycolide) les rendait plus hydrophiles [59].

Certains auteurs soulignent l'impact des propriétés physiques des particules sur leur angle de contact θ. La taille des particules est par exemple un paramètre à prendre en compte. McBride souligne ainsi que plus la taille des particules augmente, moins la tension de ligne a une influence sur l'angle de contact θ, qui tend alors à augmenter [144]. La rugosité de la surface particulaire est aussi un paramètre très influent [145,146]. En effet, si l'équation

d'Young (Équation 12) convient parfaitement pour prédire l'angle de contact de solides lisses, l'étude des solides rugueux nécessite une adaptation de ce modèle. Deux cas de figures sont possibles. Selon le modèle de Wenzel, le liquide mouillant la surface solide pénètre dans les rugosités : l'hydrophobie ou l'hydrophilie de la surface se trouve renforcée par les rugosités (Figure 16a) [147]. En revanche, selon le modèle de Cassie-Baxter, une fraction de milieu environnant est piégée dans les rugosités, qui ne sont donc pas occupées par la goutte de liquide mouillant la surface. Le matériau en question possède alors une mouillabilité réduite vis-à-vis du liquide constituant la goutte (Figure 16b) [148]. Dans ce contexte, San-Miguel et Behrens ont démontré que des émulsions stabilisées par des particules de poly(acide méthacrylique-co-méthacrylate de méthyle) d'un diamètre de 0,9 µm voient leur stabilité augmenter avec la rugosité des particules (comprise entre 0 et 6 nm). Au-delà de 6 nm cependant, les émulsions sont instables. En effet, jusqu'à 6 nm, le modèle de Wenzel prévaut, et permet un bon mouillage croissant des particules (suspendues initialement dans l'eau) par l'huile. Au-delà de 6 nm en revanche, la rugosité est telle que le modèle de Cassie-Baxter prévaut, et l'huile ne peut pas mouiller les aspérités des particules, empêchant ainsi l'adsorption de ces dernières à l'interface, et donc la stabilisation de l'émulsion. Cette proposition est par ailleurs étayée par d'autres publications, notamment celle de Zanini *et al.* [149].

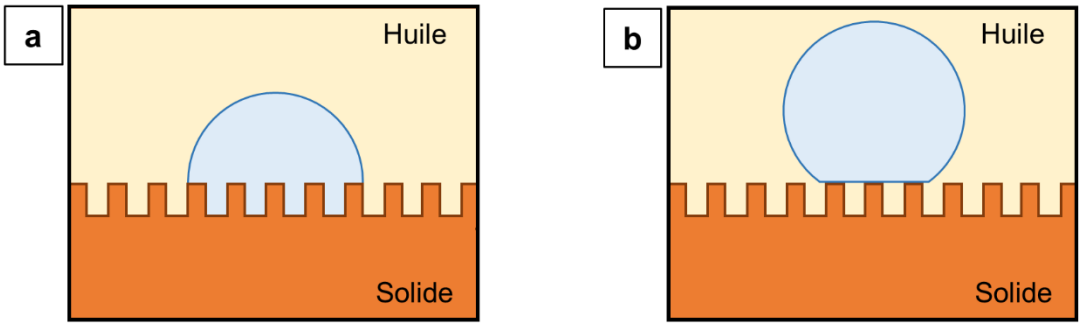


Figure 16 : Représentation schématique de comportement d'une goutte d'eau sur un support solide rugueux immergé dans l'huile, selon le modèle (a) de Wenzel et (b) de Cassie-Baxter.

Enfin, il convient de noter l'importance, souvent sous-estimée, du milieu de dispersion des particules avant émulsification. En effet, de nombreux articles montrent qu'il est possible d'obtenir des émulsions de sens opposés avec les mêmes particules, en changeant simplement la phase de dispersion des particules [45,141,143,149]. Cela est imputé à l'hystérésis mise en évidence lors de mesures d'angle de contact sur des matériaux rugueux répondant au modèle de Wenzel [145,150]. En effet, sur de tels matériaux, l'angle

de contact avec l'eau est différent selon que le front d'eau avance ou recule sur la surface (Figure 17) : on définit ainsi l'angle de contact en avancée et l'angle de contact en recul. Ce phénomène est similaire à ce qui se passe à la surface d'une particule lors de l'émulsification [143,151]. En effet, au moment du contact entre les trois phases, une particule préalablement suspendue dans l'huile se positionne à l'interface selon l'angle de contact en avancée, comme si l'eau avançait sur la surface de la particule. A l'inverse, une particule préalablement suspendue dans l'eau se place plutôt à l'interface selon l'angle de recul, comme si l'huile faisait reculer l'eau le long de la surface particulaire. Pour limiter les biais expérimentaux liés au choix du milieu de dispersion par l'expérimentateur, certains auteurs proposent de déposer les particules sous forme de poudre, entre les deux phases avant l'émulsification [129]. Les particules se disperseraient spontanément alors dans la phase pour laquelle elles ont le plus d'affinité. Cette méthode nécessite cependant d'avoir accès aux particules sous forme pulvérulente, ce qui n'est pas toujours possible.

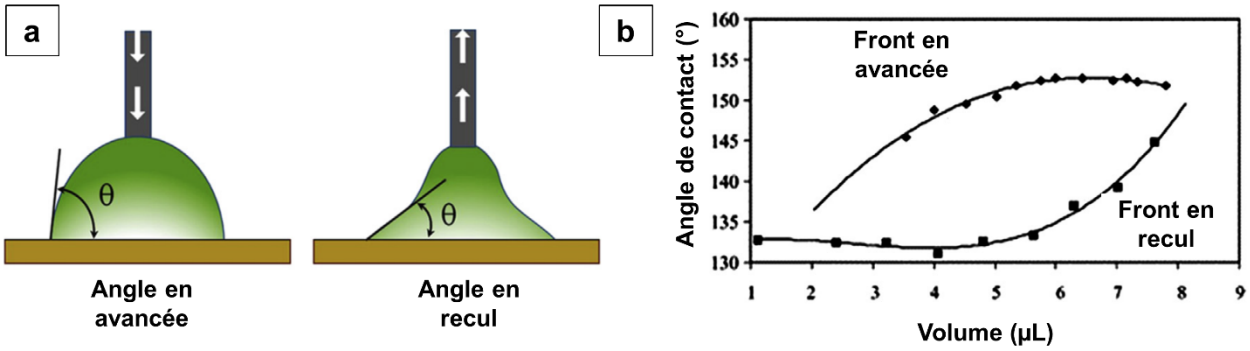


Figure 17 : Hystérésis mise en évidence lors d'une mesure d'angle de contact par la méthode de la goutte sessile sur un matériau rugueux (figure issue de Hebbar *et al.* [150]).

2.3.2. Emulsions multiples et inversion de phases : autres paramètres en jeu

Ainsi, l'étude des angles de contact a permis la compréhension du phénomène de mouillage des particules, et l'identification des paramètres qui l'influencent. Cela permet d'appliquer la loi de Finkle pour prédire le sens d'émulsions, et donc maîtriser le développement de nouvelles formulations, que l'on désire préparer des émulsions simples ou multiples. Cependant, cette loi empirique ne prend en compte que la mouillabilité des particules pour prédire le sens de l'émulsion. Or, ce dernier peut être modifié en mettant à profit de nombreux autres paramètres, notamment par l'initiation d'une inversion de phases. Que les émulsions soient stabilisées par des particules ou par des tensioactifs, on

décrit deux types d'inversions de phases : l'inversion transitionnelle et l'inversion catastrophique. Pour identifier les paramètres potentiellement influents, il convient tout d'abord de comprendre les mécanismes sous-tendant ces deux types d'inversions.

2.3.2.1. Inversion de phases transitionnelle

L'inversion de phases transitionnelle est due à un changement d'affinité du stabilisant. Dans le cas d'émulsions de Pickering, la variation d'une condition environnementale comme le pH peut entraîner un changement de mouillabilité des particules. Par exemple, Tan *et al.* stabilisent des émulsions à l'aide de nanoparticules de silice dont la surface est fonctionnalisée avec de l'anhydride phtalique. À pH 7,5, le groupement carboxyle de l'anhydride phtalique est protoné : l'absence de charge rend ces particules relativement hydrophobes, donnant lieu à des émulsions E/H dans les conditions de l'expérience. En changeant seulement le pH, les auteurs ont alors observé une inversion de phases. En effet, à pH 5,5, une partie des groupements carboxyles sont déprotonés, et donc chargés négativement. Cela confère aux particules une relative hydrophilie, qui leur permet de stabiliser des émulsions H/E [152]. Une inversion transitionnelle est possible par la modification du pH de la phase aqueuse [153–155], mais aussi de la température [153], ou de la salinité [154,156,157]. La modification de la mouillabilité des particules inverse la courbure de l'interface : la phase dispersée devient alors la phase continue, en passant par un état transitoire bicontinu [158,159]. Le sens de l'émulsion est ainsi entièrement régi par le changement de mouillabilité, et la loi de Finkle s'applique directement.

2.3.2.2. Inversion de phases catastrophique

a) Principe

L'inversion de phases catastrophique, quant à elle, est un phénomène tout à fait différent qui implique de nombreux paramètres. Elle résulte de l'augmentation de la fraction volumique effective de la phase dispersée, jusqu'à ce que les gouttelettes coalescent massivement pour former la phase continue [158]. Précisons que les études théoriques portant sur l'inversion catastrophique ont été majoritairement publiées dans les années 1990, lorsque les émulsions de Pickering étaient encore peu étudiées. La majorité des articles détaillant le mécanisme d'inversion catastrophique est donc issue de recherche sur les tensioactifs classiques. Nous utilisons sciemment ces théories pour les appliquer aux émulsions de Pickering, car les études expérimentales décrivant l'influence des paramètres de procédé sur l'inversion de phases des émulsions de Pickering nous

semblent concorder avec la théorie d'inversion catastrophique des émulsions stabilisées par des tensioactifs.

Ce mécanisme est nommé « inversion catastrophique », car les théoriciens ont d'abord tenté de le conceptualiser par la théorie mathématique dite « des catastrophes » [160]. Cette théorie a cependant montré ses limites, tout comme le modèle thermodynamique qui lui a succédé [161]. Ces deux modèles ont donc été remplacé par un modèle cinétique, qui reste aujourd'hui le plus pertinent [158]. Selon ce modèle, le phénomène d'inversion de phases se déroule comme décrit en Figure 18.

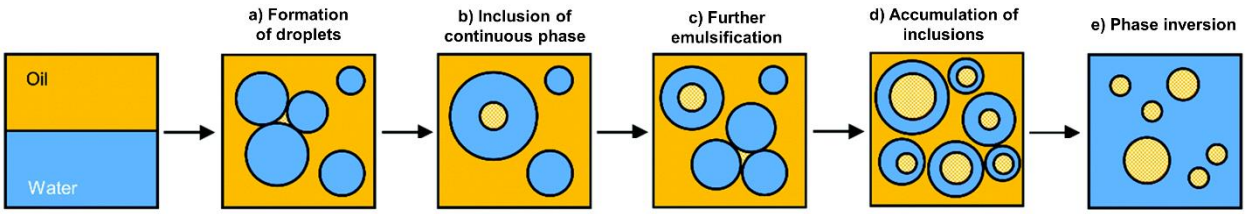


Figure 18 : Schéma représentant le mécanisme de l'inversion de phases catastrophique (figure adaptée de Kim *et al.* [162]).

Dans cet exemple, les phases huileuse et aqueuse sont cisaillées par un système rotor-stator, générant dans un premier temps des gouttelettes d'eau, donc une émulsion E/H (Figure 18a). Le stabilisant peut s'adsorber à l'interface nouvellement créée. S'installe alors une première compétition entre la rupture des grosses gouttes et la coalescence des petites. Dans le cas où le stabilisant s'adsorbe vite et en quantités suffisantes, la coalescence est empêchée : le taux de rupture est supérieur ou égal au taux de coalescence, et l'émulsion conserve son sens E/H. En revanche, dans le cas où les gouttelettes ne sont pas suffisamment stabilisées, la coalescence est possible. Une cascade d'événements se met alors en place, pouvant conduire à l'inversion de phases catastrophique, si les conditions sont réunies. A l'approche de deux gouttelettes, ces dernières s'aplatissent légèrement et un film de phase continue se forme dans l'espace interstitiel, comme décrit dans la section 1.2. Les gouttelettes n'étant pas stabilisées, le film peut se rompre, et la coalescence entraîne la fusion des deux gouttes. Tout ou partie du film peut alors se retrouver piégé dans la gouttelette nouvellement créée : ces gouttelettes internes sont appelées « inclusions » (Figure 18b, Figure 19) [97,162,163]. S'établit alors une deuxième compétition, entre la formation des inclusions et leur échappement. En effet, si elles ne sont pas stabilisées, les inclusions peuvent rejoindre

l'interface et se vider dans la phase continue [164]. Dans le cas où le taux d'échappement est supérieur au taux de formation des inclusions, un équilibre dynamique s'installe et la structure de l'émulsion n'évolue plus : elle reste à l'état d'émulsion simple (E/H dans notre exemple). En revanche, si les inclusions sont stabilisées, alors il s'en forme plus vite qu'elles ne s'échappent. L'émulsion est alors multiple, et la fraction volumique effective de la phase dispersée augmente, par le biais des inclusions. La taille des gouttelettes augmente en effet sans que l'expérimentateur n'ajoute de phase dispersée). Le diamètre des gouttelettes étant augmenté, elles sont davantage susceptibles d'être rompues par le cisaillement toujours en cours (Figure 18c) [165]. Mais les petites gouttelettes issues de la rupture peuvent coalescer à nouveau, accumulant des inclusions au fur et à mesure des cycles de rupture/coalescence (Figure 18d). Ainsi, on observe une augmentation de plus en plus rapide de la fraction volumique effective de la phase dispersée. En laissant ce phénomène se poursuivre, la phase continue se retrouve presque totalement dans les inclusions. L'empilement des gouttelettes peut être très dense [166], et leur coalescence massive peut alors survenir : c'est l'inversion de phases catastrophique (Figure 18e) [163]. La phase dispersée devient continue, tandis que les inclusions de phase continue deviennent la phase dispersée.

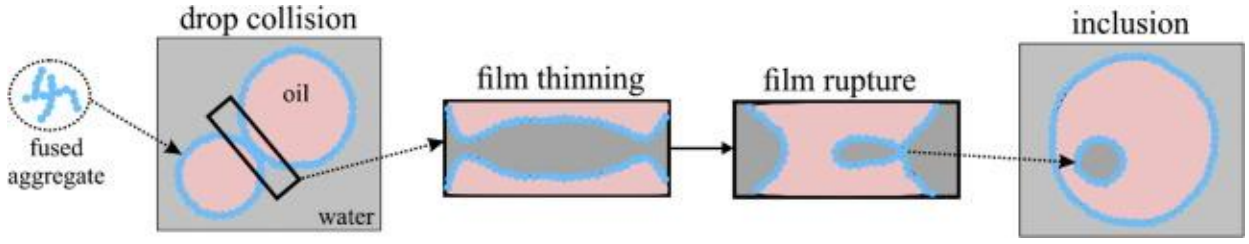


Figure 19 : Schéma représentant la formation d'inclusions de phase continue au sein des gouttelettes au cours de la coalescence de ces dernières (figure issue de Whitby et Parthipan [97]).

b) Paramètres influençant le mécanisme d'inversion de phases catastrophique

Ce mécanisme d'inversion catastrophique permet de mieux identifier les paramètres pouvant influencer le sens de certaines émulsions. Tout d'abord, l'inversion de phases nécessite une **vitesse d'agitation importante**, dans le cas d'un procédé rotor-stator, car cela favorise en même temps la rupture et la rencontre (et donc la coalescence) des gouttelettes. Une telle vitesse permet donc une accumulation rapide d'inclusions, accélérant ainsi l'inversion de phases [167]. Cet effet de la vitesse d'agitation a été démontré sur des émulsions de Pickering, par Zang et Clegg, sur des émulsions

composées de 75% v/v d'eau et de 25% v/v de toluène contenant des particules de silice fumée à hauteur de 0,4% v/v. Ils montrent qu'une émulsion cisaillée à 5 000 rpm (soit un taux de cisaillement de 8 560 s^{-1}) pendant 3 min est de type E/H, alors qu'à 25 000 rpm (soit un taux de cisaillement de 45 800 s^{-1}), elle subit une inversion de phases conduisant après quelques secondes à une émulsion H/E [168]. Weijgertze *et al.* ont aussi observé une inversion de phases d'émulsions décane-dans-eau stabilisées par des particules rugueuses de polystyrène, après augmentation de la vitesse d'agitation [169].

Au cours du phénomène de coalescence, intervient un autre paramètre crucial : la **fraction de phase dispersée**. Dans le cas où la fraction volumique de phase dispersée est faible, le nombre de gouttes étant relativement faible, il y a peu de collisions : la coalescence ne joue pas un rôle prépondérant [163]. Les émulsions sont alors simples, et suivent la loi de Finkle. En revanche, lorsque la phase dispersée est en quantité suffisante, la coalescence des gouttelettes est plus fréquente, et peut mener à la formation d'émulsions multiples, voire à l'inversion de phases [129,162,169,170]. La fraction de phase dispersée est donc bien un paramètre important. Il faut cependant noter que cette inversion catastrophique provoquée par une augmentation de la fraction dispersée reste conditionnée par l'**angle de contact θ**, tant et si bien que certains auteurs utilisent des cartes bi-dimensionnelles d'inversion de phases, servant initialement à décrire des émulsions stabilisées par des tensioactifs, pour décrire le comportement d'émulsions de Pickering (Figure 20) [98].

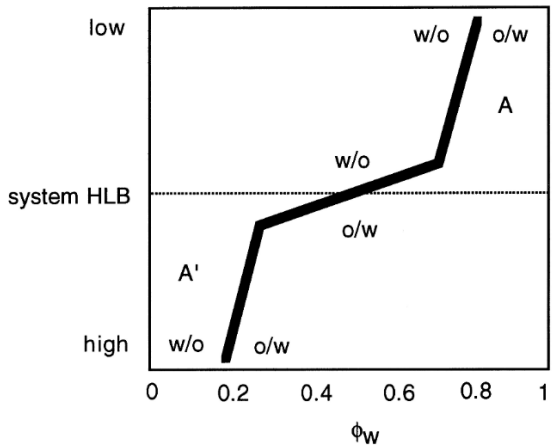


Figure 20 : Représentation schématique bi-dimensionnelle des inversions de phases potentielles au sein d'une émulsion stabilisée par des tensioactifs. La ligne brisée représente l'inversion de phases, qui dépend de la mouillabilité du stabilisant (ici, le HLB d'un tensioactif) et du ratio eau-huile (ici représenté par la fraction de phase aqueuse φ_w). Les émulsions des zones A et A' sont considérées comme anormales, car elles ne suivent pas la loi de Bancroft (figure adaptée de Binks et Lumsdon [98]).

Selon cette représentation, il apparaît que le ratio eau-huile à l'inversion varie de façon importante en fonction de la mouillabilité du stabilisant. Par exemple, un stabilisant hydrophobe (HLB bas) pré-suspendu dans l'huile stabilise des émulsions E/H (en accord avec la loi de Finkle), et il faut incorporer beaucoup d'eau pour obtenir l'inversion vers la zone A, dite anormale car non compatible avec la loi de Finkle (d'où une certaine instabilité [98]). Avec un stabilisant moins hydrophobe (HLB plus élevé), l'inversion survient avec des fractions d'eau moins importante. Ce phénomène est notamment dû à la capacité du système à stabiliser les inclusions. L'inversion est en effet d'autant plus aisée que les particules sont à même de stabiliser les inclusions (empêchant leur échappement). Pour les émulsions de Pickering, trois mécanismes sont envisagés pour expliquer la stabilisation des inclusions :

- La première proposition, évidente et largement reprise, consiste à dire que l'angle de contact des particules doit être proche de 90°, ce qui permettrait aux particules de se placer indifféremment aux interfaces E/H et H/E [171,172]. Il convient cependant de préciser que ces publications expliquant la formation d'émulsions multiples par un angle de contact proche de 90° ne se fondent pas sur la mesure de l'angle du système triphasique mesuré *in situ*, mais un angle de contact macroscopique mesuré sur une surface plane. Il conviendrait donc de vérifier cette hypothèse en mesurant l'angle de contact des particules individuelles à l'interface eau-huile.

- Une deuxième proposition expliquant la stabilisation des inclusions est basée sur la rugosité des particules stabilisantes. Comme discuté dans la section 2.3.1.3, les matériaux rugueux obéissant au modèle de Wenzel ne se caractérisent pas par un unique angle de contact, mais par un angle d'avancée et un angle de recul, avec une hystérésis entre ces deux valeurs [145]. Certains auteurs avancent ainsi que selon l'angle obtenu pour la particule en question, elle serait capable de stabiliser les deux types d'interfaces [140]. Cette hypothèse ne s'applique cependant pas à tous les cas, car la coexistence des angles de contact d'avancée et de recul dans une même émulsion suppose qu'une fraction de particules aient été suspendues dans chaque phase préalablement à l'émulsification [143,151].

- La troisième proposition pour expliquer la possible stabilisation des deux types d'interfaces par un même type de particules est l'hétérogénéité de la mouillabilité

au sein d'un ensemble de nanoparticules. Cette hétérogénéité peut être due autant aux propriétés de surface des particules [173] qu'aux forces interparticulaires ayant cours à l'interface [137,174].

Ainsi, la fraction de phase dispersée et la mouillabilité des particules sont des paramètres influençant la coalescence des gouttelettes et la stabilisation des inclusions. De la même façon, on peut discuter de l'effet de la **concentration en particules** sur l'inversion de phases. En effet, une concentration importante en particules peut permettre un recouvrement optimal de l'interface, limitant ainsi la coalescence des gouttelettes. L'inversion de phases est alors plus difficile à obtenir, comme l'ont décrit par certains auteurs travaillant sur des particules de silice fumée [143,170]. Cependant, Whitby et Parthipan montrent que de fortes concentrations de ces mêmes particules favorisent la stabilisation des inclusions [97], ce qui peut aussi permettre d'aboutir à l'inversion de phases. L'effet de la concentration en particules est donc ambivalent et dépend de la gamme de concentration et du système étudiés.

L'influence de la **cinétique d'adsorption des particules** aux interfaces pourrait être discutée de la même façon. En effet, on a vu dans la section 2.1.2 que les particules s'adsorbaient plus lentement aux interfaces que les tensioactifs classiques, faisant de la cinétique d'adsorption un paramètre important dans la stabilité des émulsions. Il paraît donc logique qu'une cinétique d'adsorption rapide des particules puissent favoriser en même temps *(i)* la stabilisation des premières gouttelettes formées, empêchant ainsi leur coalescence, et *(ii)* la stabilisation des inclusions dans le cas où certaines se formeraient malgré la coalescence empêchée. Une cinétique d'adsorption rapide pourrait donc, à l'instar d'une forte concentration en particules, favoriser ou non l'inversion de phases, selon les conditions opératoires. À notre connaissance, ce point n'a cependant jamais été discuté.

La **viscosité de la phase dispersée** peut elle aussi influencer le mécanisme d'inversion de phases. Certaines publications montrent en effet qu'une phase dispersée visqueuse empêche l'adsorption des particules à la surface des gouttelettes. Fournier *et al.* démontrent par exemple qu'une huile de silicone de 1,4 Pa.s limite significativement l'adsorption de microparticules de fer [175]. Pour Fernandes Barros *et al.*, une différence d'absorption des particules est déjà observable entre deux huiles de polydiméthylsiloxane de viscosités égales à 0,02 et 0,1 Pa.s [170]. Les particules s'adsorbant moins à l'interface, la coalescence des gouttelettes est facilitée, initiant la formation d'inclusions. De plus, ces

inclusions seraient immobilisées dans le cas d'huiles très visqueuses, ce qui limiterait leur échappement. Sabri *et al.* observent ainsi une grande quantité d'inclusions d'eau dans des gouttelettes de polydiméthylsiloxane de 10 000 cSt [176]. La viscosité des gouttelettes favoriserait ainsi l'inversion de phases. Cet effet est cependant sujet à controverse, certains articles soulignant que des gouttelettes visqueuses ont moins tendance à coalescer que des gouttelettes fluides [177]. Une fois encore, l'effet dépend de la gamme de viscosité à laquelle l'étude est réalisée.

Enfin, des études montrent que la formation d'émulsions multiples, puis l'inversion de phases, nécessitent un **temps d'agitation** long. Cela permet en effet de laisser le temps aux inclusions de s'accumuler et à la phase dispersée d'atteindre la fraction volumique critique entraînant l'inversion de phases [163]. Zang et Clegg ont démontré l'effet du temps d'agitation sur les émulsions de Pickering, et ont démontré que des émulsions de type eau-dans-toluène après 1 min pouvaient subir une inversion catastrophique en maintenant l'agitation pendant 5 min [168]. Cet effet est confirmé par de nombreux articles [97,129].

c) Synthèse

Ainsi, l'analyse du phénomène d'inversion de phases catastrophique nous permet de comprendre l'ensemble du mécanisme régissant le sens des émulsions, et d'identifier les paramètres d'influence. Nombre d'études physicochimiques étudient l'influence d'un paramètre sur le sens des émulsions en fixant arbitrairement les autres, ce qui implique nécessairement un biais lié à ces choix arbitraires. Nous proposons donc un schéma récapitulatif à l'expérimentateur désireux d'appréhender ces phénomènes dans leur globalité, pour une analyse physico-chimique pertinente des systèmes étudiés (Figure 21).

Si de nombreux paramètres peuvent avoir une influence sur le sens d'une émulsion de Pickering, il est toutefois à noter que la mouillabilité reste le paramètre-clé, même pour les émulsions issues d'une inversion de phases. En effet, une inversion transitionnelle n'est qu'un changement de mouillabilité dû à un paramètre exogène. Quant aux émulsions résultant d'une inversion catastrophique, leur formation et leur stabilité sont conditionnées par l'adhésion des particules aux interfaces, notamment autour des inclusions. Cela nécessite donc une mouillabilité adéquate.

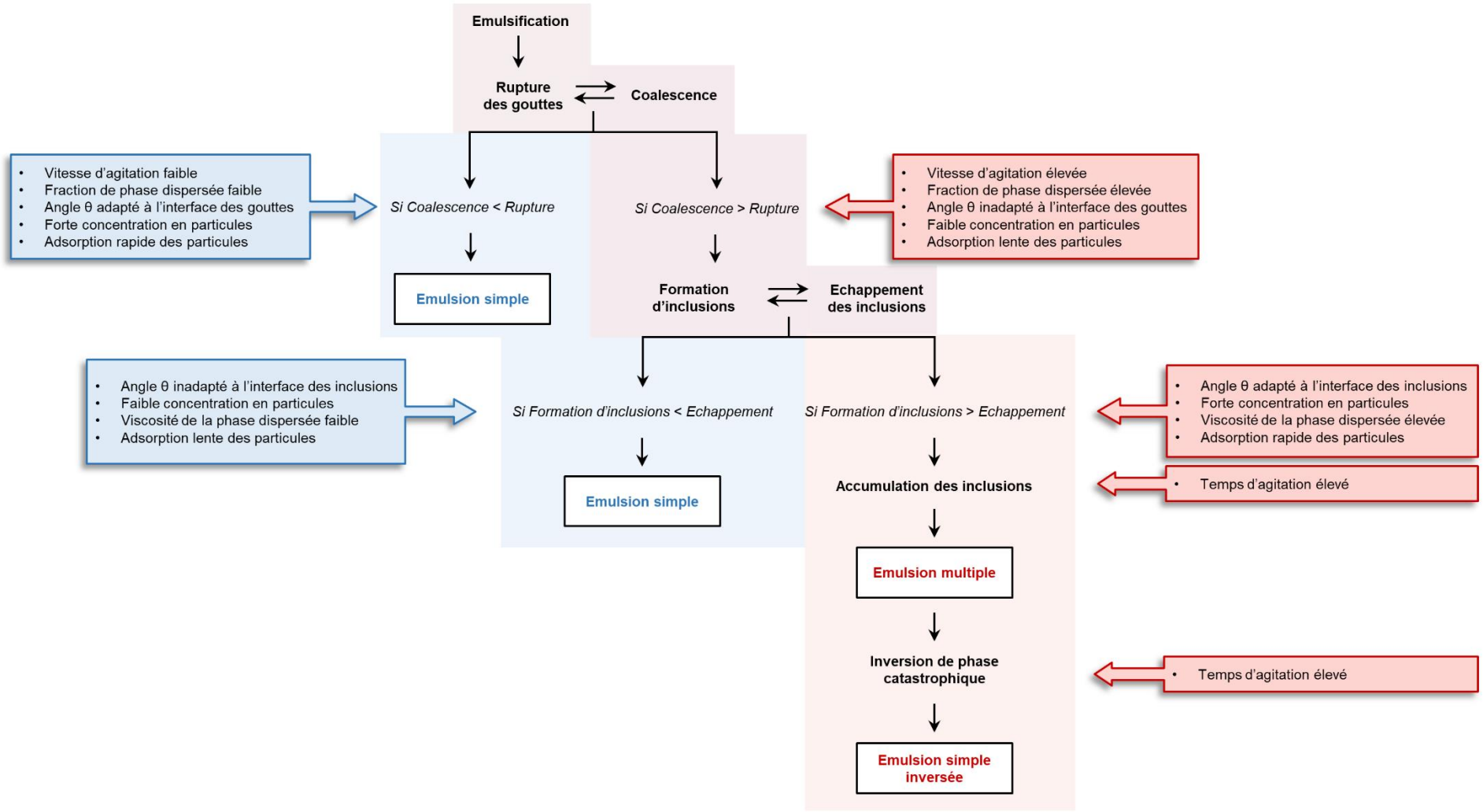


Figure 21 : Schéma synthétique détaillant les étapes clés de l'inversion de phases catastrophique, et les paramètres influençant le sens d'une émulsion : en bleu, la voie conduisant à une émulsion simple, en rouge la voie conduisant à une émulsion multiple voire une inversion de phase.

2.3.3. Quelques exceptions : les émulsions anti-Finkle

La loi de Finkle énonce que la phase continue d'une émulsion de Pickering tend à être la phase avec laquelle les particules ont le plus d'affinité. Ainsi, des particules ayant un angle de contact inférieur à 90° stabiliserait préférentiellement des émulsions H/E, et inversement pour les particules ayant un angle de contact supérieur à 90°. Cela sous-entend que les particules sont toujours situées dans la phase continue de l'émulsion. Or, lorsqu'une émulsion subit une inversion de phases catastrophique, comme décrit dans la section 2.3.2.2, les particules se retrouvent dans la phase dispersée. Dans l'hypothèse où de telles émulsions seraient stables, elles seraient en désaccord avec la loi de Finkle.

Quelques auteurs utilisent alors la notion d'émulsion « anti-Finkle » (ou « anti-Bancroft ») pour décrire des émulsions dont les particules stabilisantes se trouvent dans la phase dispersée, quel que soit par ailleurs leur angle de contact. C'est le cas par exemple de Weijgertze *et al.*, qui étudient l'influence de la vitesse d'agitation, de la fraction de phase dispersée, et de la rugosité des particules, sur l'inversion de phases. Ils observent que bon nombre des émulsions E/H générées par inversion de phases sont stables, alors même que les particules de polystyrène sont dispersées préalablement dans la phase aqueuse. Les auteurs affirment que cela est possible dans la mesure où les conditions expérimentales permettent aux particules de prendre leur position d'équilibre à l'interface. Ainsi, la relative hydrophobie de leurs particules (qui sont cependant dispersibles dans l'eau) serait un paramètre favorable. Une rugosité modérée (jusqu'à 7,5 nm) permettrait aussi une meilleure adsorption aux interfaces, grâce au régime de Wenzel. Il serait donc bien possible d'obtenir des émulsions anti-Finkle par inversion de phases.

D'autres comportements anti-Finkle ont été décrits avec des émulsions eau-dans-alcane stabilisées par des nanoparticules de latex, initialement suspendues dans la phase aqueuse. Par exemple, Golemanov *et al.* décrivent des émulsions E/H stabilisées par des nanoparticules hydrophobes de polystyrène [110]. Ce résultat semble à première vue respecter la loi de Finkle, à ceci près que les nanoparticules sont dispersées dans la phase aqueuse, et se retrouvent donc au sein des gouttelettes. En cela, les auteurs considèrent ces émulsions comme anti-Finkle. Si le mécanisme conduisant à cette structure reste inexpliqué, il semble nécessiter la présence de contre-ions écrantant les charges de surface des nanoparticules. La baisse des répulsions électrostatiques entraînerait donc une agrégation des particules, préalable indispensable à la stabilisation de ces émulsions anti-Finkle.

Des émulsions anti-Finkle ont enfin été décrites dans le cas d'une stabilisation par des microgels. Ces derniers sont définis comme des particules polymères gonflées de solvant, et dotées d'une déformabilité importante. Certains auteurs décrivent des microgels de poly(N-isopropylacrylamide) ou de poly(N-isopropylacrylamide-co-acide méthacrylique) stabilisant des émulsions E/H, alors même que ces microgels se trouvent dans les gouttelettes d'eau [96,178]. La formation de telles émulsions nécessite l'utilisation d'une huile protique (tels que les alcools linéaires, l'octanol par exemple), ayant la capacité de pénétrer dans les microgels pour en modifier les propriétés [96]. Habituellement, les microgels montrent une certaine déformabilité après adsorption à l'interface ; ils prennent l'apparence « d'œufs au plat » qui, en se chevauchant, forment un réseau empêchant la coalescence [179]. Or, en présence d'octanol, les microgels perdraient leur capacité à se déformer à l'interface. En parallèle, la présence d'octanol favoriserait les forces attractives entre particules, entraînant la formation de multicouches de microgels sphériques. Selon les hypothèses formulées par les auteurs, cette organisation en multicouche ne permettraient la formation d'émulsions stables que si les microgels hydrophiles sont à l'intérieur des gouttes, d'où l'observation d'émulsions E/H [96].

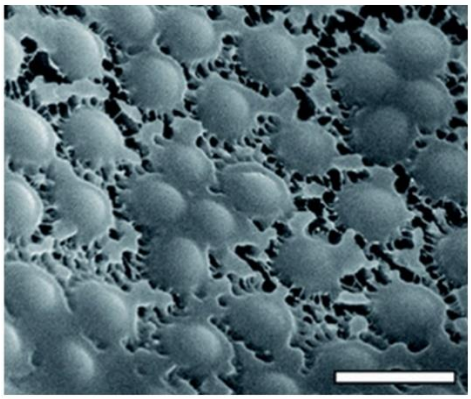


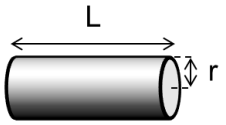
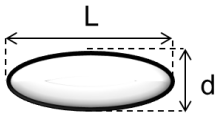
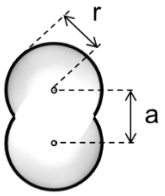
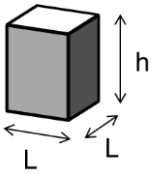
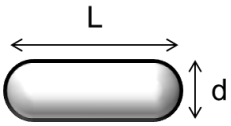
Figure 22 : Image de CryoMEB de la surface d'une gouttelette d'heptane dans de l'eau, recouverte de microgels de poly(*N*-isopropylacrylamide) réticulés. Barre d'échelle : 1 µm (figure issue de Destribats *et al.* [179]).

3. Emulsions de Pickering stabilisées par des particules non sphériques

Les mécanismes décrits dans les sections précédentes sont aujourd'hui bien connus grâce aux travaux de nombreuses équipes. Cependant, une large majorité de ces études physico-chimiques ont été conduites sur des systèmes stabilisés par des particules sphériques. Or,

un nombre grandissant d'études porte actuellement sur le comportement des particules non sphériques, parfois regroupées sous l'appellation générale de « particules anisotropes ». Les formes les plus courantes sont décrites dans le Tableau 1. Leur anisotropie est quantifiée par l'intermédiaire du rapport d'aspect, qui est en général le rapport entre la dimension la plus longue et la dimension la plus courte. Si sa définition exacte varie légèrement selon les formes considérées, un rapport d'aspect élevé indique toujours une anisotropie importante.

Tableau 1 : Formes anisotropes de particules polymères les plus courantes, dimensions caractéristiques et définition de leur rapport d'aspect

Appellation de la forme	Schéma de la forme et dimensions caractéristiques	Formule du rapport d'aspect	Référence
Cylindre		$\frac{L}{2r}$	[180]
Ellipsoïde		$\frac{L}{d}$	[181,182]
Haltère		$\frac{2r + a}{2r}$	[182]
Orthorhombique		$\frac{h}{L}$	[183]
Sphérocylindre		$\frac{L}{d}$	[184]

L'utilisation de telles particules doit amener un questionnement sur leur énergie de désorption, leur position à l'interface à l'équilibre, les déformations d'interface qu'elles génèrent et donc les interactions qu'elles subissent [185]. Ces phénomènes, souvent

étudiés sur des interfaces eau-air planes, peuvent ensuite être mis à profit pour moduler les caractéristiques d'émulsions de Pickering préparées avec des particules anisotropes.

3.1. Influence de la forme des particules sur leur adsorption à l'interface

3.1.1. Déplacement vers l'interface

Tout d'abord, il semblerait que la forme ait une influence sur le déplacement des particules vers l'interface à stabiliser. En effet les particules allongées s'orientent dans le sens du cisaillement, et donc se déplacent moins vite pendant l'émulsification que les particules sphériques de volume équivalent. La probabilité de rencontre avec une gouttelette est donc moindre pour une particule allongée que pour une particule sphérique [79].

3.1.2. Orientation des particules à l'interface

Une fois adsorbées à l'interface, les particules prennent une position d'équilibre qui peut nettement varier en fonction des conditions. Cette position des particules non sphériques a été modélisée pour de nombreuses formes différentes, et de façon générale, il semble que l'orientation préférentielle des particules à l'interface soit celle permettant de couvrir la plus grande surface possible. Elle est donc fonction de la forme, du rapport d'aspect et de l'angle de contact des particules [186].

Morris *et al.* ont notamment modélisé le comportement des particules orthorhombiques, en fonction de leur rapport d'aspect et de leur mouillabilité [183,187]. Ils concluent que plus une particule orthorhombique est basse et large, plus elle tend à se placer en position « face-up » (avec une face vers le haut, donc son axe le plus long parallèle à l'interface), et ce quel que soit la mouillabilité de la particule. Au contraire, plus on s'approche de la forme cuboïde, plus la position est dépendante de l'angle de contact. Les particules cuboïdes peuvent adopter, à un angle de contact donné, trois orientations différentes : « *face-up* », « *edge-up* » (arête vers le haut) ou « *vertex-up* » (sommet vers le haut) (Figure 23). L'analyse *in silico* sur un modèle d'interface liquide-vapeur montre qu'un cuboïde prend préférentiellement une configuration *face-up* quand l'angle de contact est faible (45°) et *vertex-up* quand l'angle se rapproche de 90°. Ce comportement est confirmé par d'autres travaux [188,189]. Les auteurs ont aussi modélisé la capacité des particules orthorhombiques à stabiliser un film liquide entre deux couches d'air : la position *face-up* serait la plus stabilisante, la rupture du film demandant alors plus d'énergie [183]. Pour

stabiliser un tel film, il faudrait préférer une particule orthorhombique basse et large, ou un cuboïde avec un faible angle de contact (inférieur 65°). Notons cependant que le modèle utilisé ne prend pas en compte les interactions entre particules, ni leur organisation à l'interface.

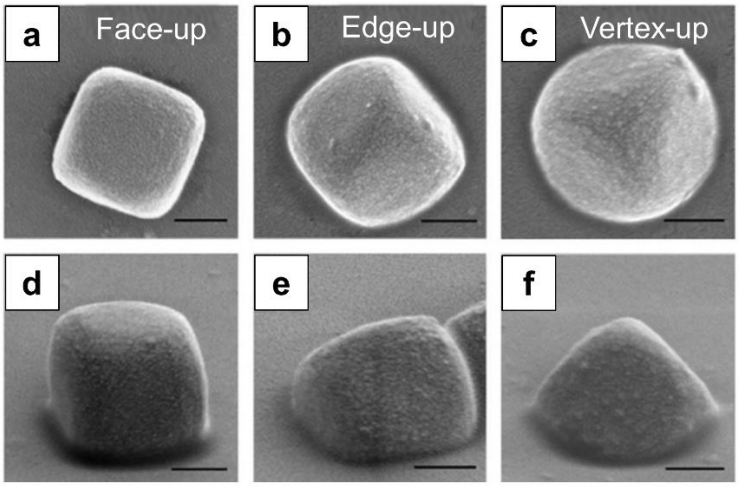


Figure 23 : Images de microscopie électronique à balayage (MEB) montrant trois différentes orientations de particules cuboïdes d'hématite, à une interface eau-décane, vue du dessus (a-c) ou obtenues à un angle de 60°(d-f) (Barre d'échelle : 0,5 µm) (figure issue de Anjali et Basavaraj [189]).

L'influence du rapport d'aspect et de la mouillabilité sur la position d'équilibre s'observe aussi avec des particules cylindriques. À un angle de contact de 90°, ces particules prennent une configuration « *end-up* » (l'extrémité vers le haut) si elles sont plus courtes que large (c'est-à-dire assimilables à des disques, avec un rapport d'aspect inférieur à 1). En revanche, lorsqu'elles sont plus longues que larges (avec un rapport d'aspect supérieur à 1), elles prennent une configuration « *side-up* » (leur axe le plus long étant parallèle à l'interface). Aux autres valeurs d'angle de contact, le rapport d'aspect critique délimitant la transition entre les positions *end-up* et *side-up* est simplement déplacée, mais la logique est similaire (Figure 24) [190].

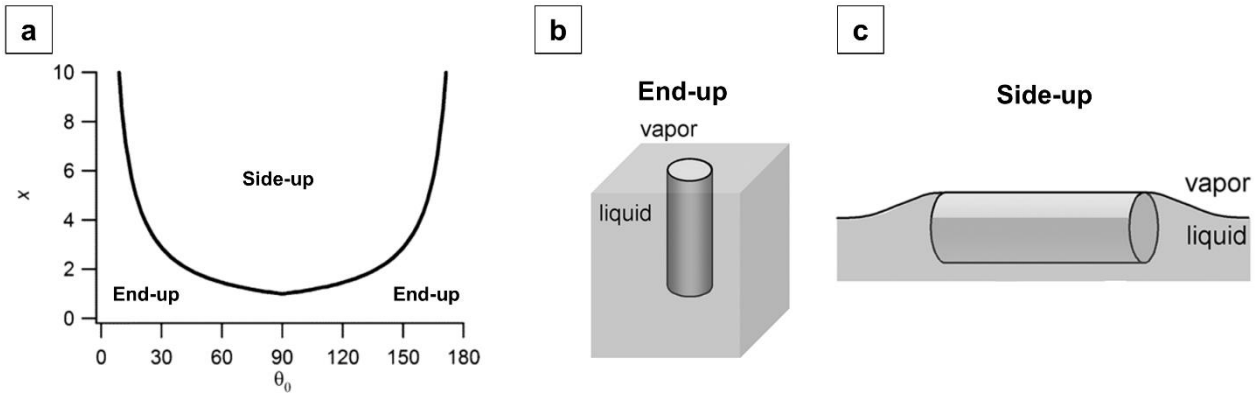


Figure 24 : (a) Diagramme de phase montrant les orientations de particules cylindriques, en fonction du rapport d'aspect x et de l'angle de contact θ_o, accompagné des représentations schématiques des orientations (b) *end-up* et (c) *side-up* (figure adaptée de Lewandowski *et al.* [190]).

D'autres particules de formes allongées ont été étudiées dans la littérature. Par exemple, des particules d'hématite en forme d'haltères et de sphérocylindres (cylindres aux extrémités arrondies, voir Tableau 1) prennent plutôt une configuration *side-up*, bien qu'elles soient relativement hydrophiles [189]. Cette configuration s'explique probablement par un rapport d'aspect supérieur à 2. Des particules ellipsoïdes (aussi appelées « particules prolates ») de polystyrène ont aussi fait l'objet d'études, et semblait aussi se placer en configuration *side-up* [181,191]. Il est à noter que plus la ligne de contact est longue, plus la barrière d'adsorption est importante. Ainsi, les particules allongées peuvent s'adsorber à l'interface en configuration *end*-up dans un premier temps, avant de basculer pour atteindre une position d'équilibre *side-up* [192].

Enfin, le cas des particules Janus semble plus complexe. Ces particules ont la caractéristique d'avoir deux pôles de mouillabilité différente. On peut donc s'attendre à ce que, lorsque de telles particules sont adsorbées à une interface, la ligne de contact soit superposée à la limite entre les deux pôles. C'est en effet vrai avec certaines particules, comme les particules Janus en forme de disque [193], ou encore les particules proches de la sphéricité (rapport d'aspect proche de 1) [182]. Cette position est d'autant plus favorisée que la différence de mouillabilité entre les deux pôles est importante [182]. Cependant, lorsque les particules Janus ont des formes plus allongées, comme les particules en haltères ou les ellipsoïdes, l'orientation répond à des contraintes plurielles (Figure 25). En effet, si les propriétés de surface favorisent une orientation *end-up* (axe long perpendiculaire à l'interface), les caractéristiques de forme poussent une orientation *side-up* (axe long parallèle à l'interface). Les modèles prédisent alors une position d'équilibre

inclinée, sorte de compromis entre les deux orientations sus-décrites [182]. Une étude expérimentale sur des particules en haltères montre qu'avec un rapport d'aspect de 1,7, la position majoritaire est bien la position inclinée [194].

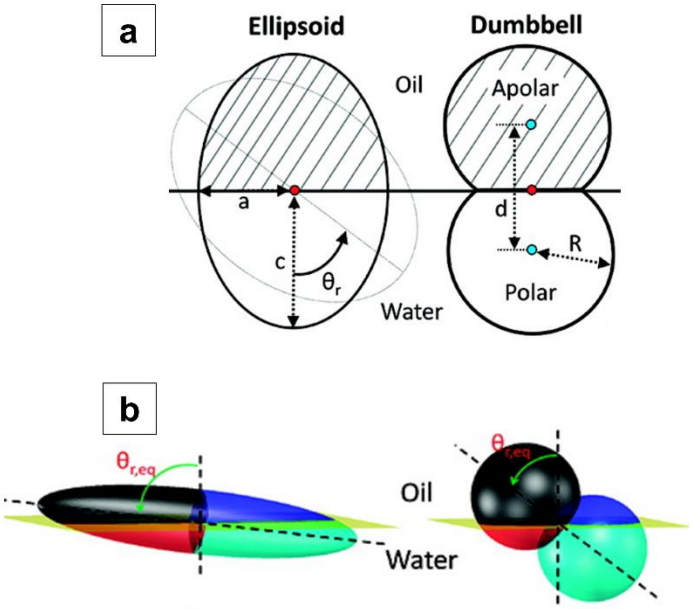


Figure 25 : (a) Orientation théorique de particules Janus non sphériques (ellipsoïde à gauche, haltère à droite), adsorbées à une interface eau-huile, dans le cas où le rapport d'aspect ne serait pas pris en compte. La région apolaire des particules est hachurée. La ligne de contact serait au niveau de la limite entre les pôles de mouillabilité différente. (b) Modélisation de l'orientation des mêmes particules, en prenant en compte leurs propriétés de surface et leur rapport d'aspect. Cette orientation basculée donne lieu à quatre zone distinctes : en noir la zone apolaire mouillée par l'huile, en bleu la zone polaire mouillée par l'huile, en rouge la zone apolaire mouillée par l'eau, et en vert la zone polaire mouillée par l'eau (figure adaptée de Park et Lee [182]).

3.1.3. Angle de contact dans le système triphasique

Comme nous l'avons décrit précédemment, la position des particules non sphériques à l'interface dépend notamment de leur mouillabilité. Cela soulève la question de la mesure de l'angle de contact dans le milieu triphasique, rendue complexe par la forme des particules et les déformations de l'interface qu'elles entraînent (ce point sera détaillé dans la section 3.2). Pour des particules sphériques, les méthodes utilisées pour mesurer l'angle de contact dans le système triphasique sont l'interférométrie, le *gel trapping* ou la *FreSCa-CryoSEM*. Dans le cas des particules non sphériques, les mêmes techniques sont utilisées, mais avec quelques choix et aménagements dans les formules utilisées et les mesures

réalisées. Anjali *et al.* utilisent le *gel trapping* pour fixer des particules d'hématite de formes variées à l'interface, et pouvoir les observer en CryoMEB. Pour déterminer l'angle de contact de particules sphérocylindriques ou en haltères, ces dernières sont observées par leur extrémité, ce qui permet de les assimiler à une sphère et d'en mesurer facilement certaines distances caractéristiques (Figure 26) [189]. Ces distances sont alors insérées dans la formule de Paunov pour évaluer l'angle de contact [195] :

$$\sin\theta = \frac{d_c}{d} \qquad \text{Équation 13}$$

avec d le diamètre équatorial et d_c le diamètre à la ligne de contact. Une méthode similaire peut être utilisée pour des particules cylindriques [190].

Dans le cas de particules cuboïdes, la mesure se complique car un cube est difficilement assimilable à une sphère. Anjali *et al.* ont donc choisi d'exprimer la mouillabilité des cuboïdes par le ratio entre la hauteur immergée du cuboïde dans la phase aqueuse sur sa hauteur totale [189]. Cette méthode ne s'applique que lorsque les cuboïdes sont en configuration *face-up*. Il n'y a à notre connaissance pas de solution de ce type proposée pour les cuboïdes placés dans d'autres configurations.

Une autre possibilité est d'utiliser l'interférométrie, à l'instar des travaux de Loudet et Pouligny sur des particules ellipsoïdes [181]. L'angle de contact est alors calculé à partir des déformations imposées par la particule à l'interface. A noter cependant que les ellipsoïdes de polystyrène sont sujets à des variations locales de mouillabilité, dues au procédé de fabrication. En effet, ces particules sont obtenues par étirement de particules sphériques : cela peut entraîner une augmentation de la charge de surface [191] ou un alignement des chaînes polymères [196] au niveau des extrémités de l'ellipsoïde, d'où une plus grande hydrophilie par rapport au centre. Malgré cette difficulté liée à ce type précis de particules, l'interférométrie reste une méthode de référence dans la détermination des angles de contact de particules non sphériques. Zanini et Isa considèrent que l'angle de contact de ces particules doit toujours être mesuré en regard des déformations alentour, et c'est aujourd'hui la seule technique prenant ces déformations en compte. Elle est cependant limitée à l'étude de particules micrométriques : il convient donc de trouver des solutions alternatives pour les particules les plus petites. Le *gel trapping* et la *FreSCa-CryoSEM* ne permettent pas de quantifier les déformations, mais leur couplage à la

microscopie à force atomique pourrait être une solution pour analyser la topologie des surfaces [139].

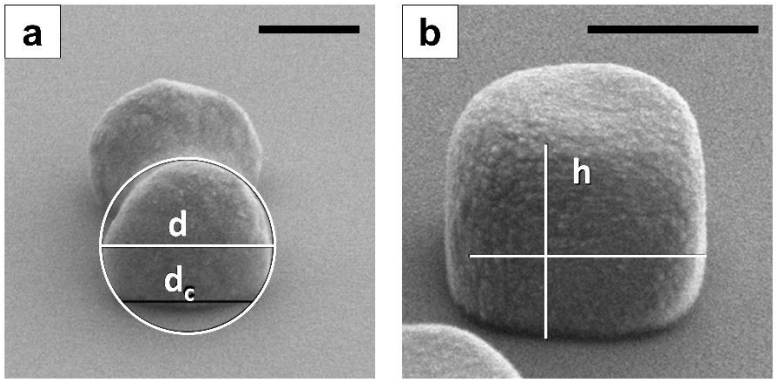


Figure 26 : Paramètres extraits pour le calcul de l'angle de contact des particules : (a) particule en haltère, *d* est le diamètre équatorial et d_c le diamètre à la ligne de contact (b) particule cuboïde, où *a* est la longueur du cuboïde et *h* la hauteur exposée à la phase aqueuse. Les deux images ont été obtenue par *gel trapping*, à une interface eau-air. Barre d'échelle : 1 µm (figure adaptée de Anjali et Basavaraj [189]).

3.1.4. Energie de désorption

Une fois la particule adsorbée à sa position d'équilibre, il convient de s'intéresser à sa capacité ou non à se désorber. L'énergie de désorption d'une particule sphérique, donnée en Équation 2, dérive en fait d'une équation plus générale (Équation 14) [189] :

$$E_d = \gamma_{ow}(A_c + A_{pw}\cos\theta) \qquad \text{Équation 14}$$

avec γ_{ow} la tension interfaciale entre les deux phases liquides, A_c l'aire interfaciale occupée par la particule, et A_{pw} l'aire de l'interface particule-eau. Cette équation est adaptable à toutes les formes de particules, et à toutes les positions possibles. Il ressort par exemple d'une étude d'Anjali *et al.* que les sphérocylindres de rapport d'aspect 1,6 à 2,6 présentent des énergies de désorption deux fois plus importantes que des sphères de volume équivalent [189]. Cela s'explique aisément car ces sphérocylindres positionnent leur axe le plus long parallèlement à l'interface, maximisant donc l'aire interfaciale qu'elle occupe. Les particules cuboïdes présentent elles aussi des énergies de désorption supérieures aux particules sphériques, mais l'écart est très léger [189]. De façon générale, l'énergie de désorption est plus importante pour les particules anisotropes, mais cela a assez peu d'intérêt du fait que les particules sphériques s'adsorbent déjà de façon irréversible.

3.2. Influence de la forme des particules sur leurs interactions à l'interface

Lorsque des particules sont adsorbées à une interface, elles poussent cette dernière à se déformer, formant un ménisque. Dans le cas de particules non sphériques, cette déformation n'est pas homogène sur tout le contour de la particule. En effet, le système doit respecter l'équation de Young (Équation 12), qui veut que l'angle de contact dans le système triphasique soit constant tout autour de la ligne de contact de la particule [197]. Or, lorsque la particule n'est pas symétrique par rapport à la normale de l'interface (donc dans de nombreux cas d'anisotropie), alors la déformation de l'interface donne des lignes de contact non-planaires. Selon leur forme et leur position à l'interface, les particules vont ainsi générer des élévations et des dépressions autour d'elles. Quand des déformations créées par deux particules voisines se chevauchent, les particules interagissent pour minimiser l'excès d'énergie interfaciale créé par la déformation, lissant ainsi les gradients de déformation. Ce mécanisme est à l'origine de forces capillaires : deux élévations ou deux dépressions tendent à s'attirer, quand dépressions et élévations se repoussent mutuellement [186]. Du fait de ces interactions, aucune monocouche de type cristal colloïdaux épars (comme décrit dans la partie 2.1.3.2, Figure 7b) n'a à ce jour été décrite dans la littérature pour des particules anisotropes [185]. Cela les différencie nettement des particules sphériques, qui s'organisent principalement en fonction d'autres types d'interactions directes (comme les interactions électrostatiques) [197].

Dans le cas de particules cuboïdes hydrophiles (donc en configuration *face-up*), les forces capillaires favorisent la configuration face-à-face, bien que les configurations arête-contre-arête et arête-contre-face soient aussi représentées [198]. Des observations microscopiques montrent que ces interactions donnent lieu à une organisation hexagonale ou trigonale, totalement différente des chaines observées en suspension dans l'eau, ce qui démontre la spécificité des interactions observées à l'interface (Figure 27). Localement, on observe même des densités de couverture plus importantes que ce qu'il est possible d'obtenir avec des sphères [46].

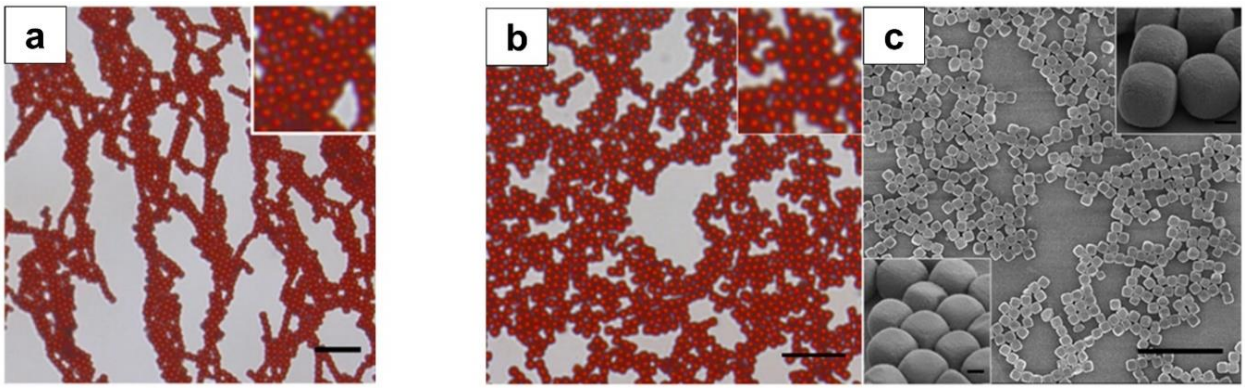


Figure 27 : Organisation des particules cuboïdes d'hématite (a) en suspension dans l'eau, sous l'influence du champ géomagnétique (observées au microscope optique, barre d'échelle : 10 µm), l'insert montrant l'arrangement carré des particules ; (b) et (c) les mêmes cuboïdes à l'interface eau-air, respectivement observées en microscopie optique et en MEB après immobilisation par *dip-coating* (barre d'échelle : 0.5 µm), les inserts montrant des arrangements trigonaux et hexagonaux (figure adaptée de Anjali et Basavaraj [198]).

Dans le cas de particules ellipsoïdes hydrophiles (ange de contact fixé à 65°), l'organisation au sein des agrégats peut être différente selon le nombre de particules participant à l'interaction, et l'homogénéité de rapport d'aspect au sein de l'échantillon (Figure 28) [181]. Ainsi, des modélisations *in silico* montrent que deux ellipsoïdes identiques s'organisent préférentiellement en configuration côte-à-côte, quand deux ellipsoïdes de rapports d'aspect différents préfèrent une configuration V. Les modèles se complexifient à partir de trois particules, mais il semblerait que trois ellipsoïdes puissent indifféremment s'organiser en configuration côte-à-côte ou en triangle, le bilan énergétique étant similaire.

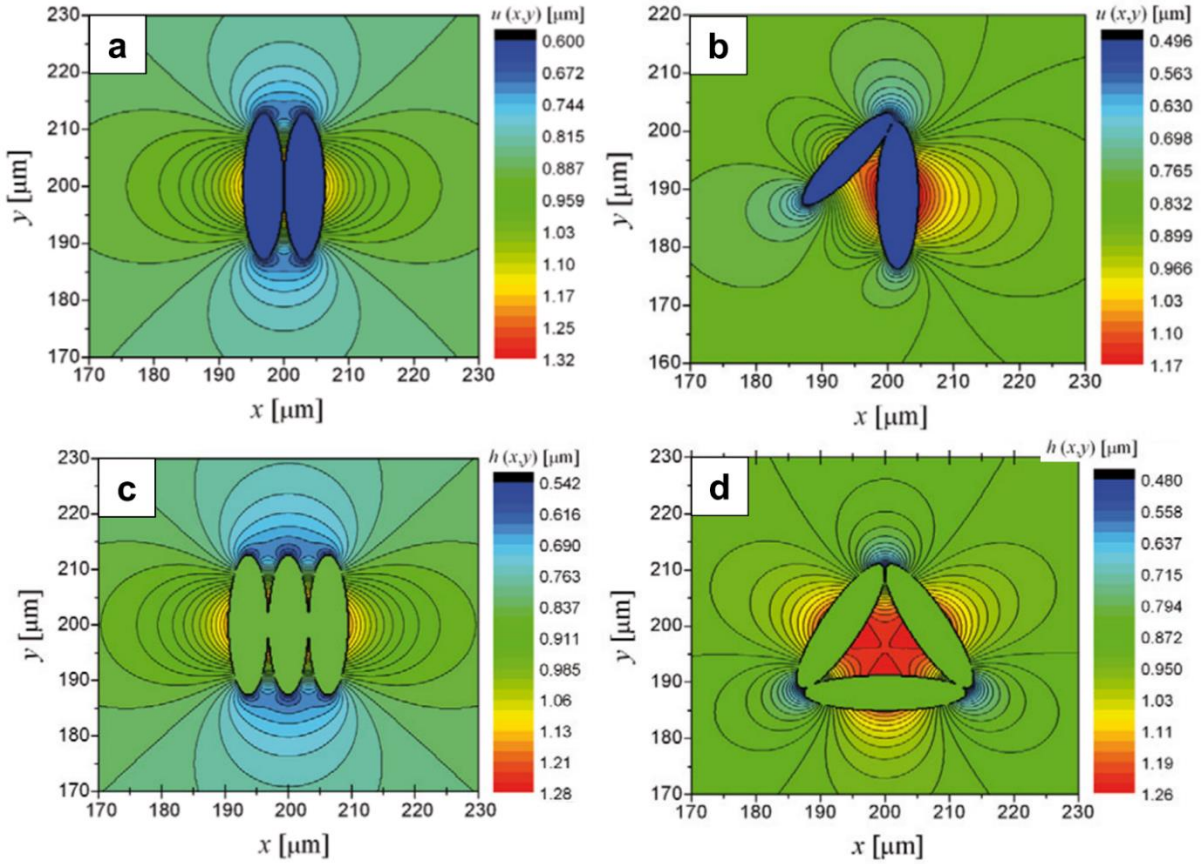


Figure 28 : Représentation graphique des profils interfaciaux u(x, y) autour de particules ellipsoïdes adsorbées à une interface eau-air, avec (a) deux ellipsoïdes identiques en configuration côte-à-côte, (b) deux ellipsoïdes de rapports d'aspect différents en configuration V, (c) et (d) trois ellipsoïdes identiques pouvant s'organiser respectivement en configuration côte-à-côte ou en triangle (figure adaptée de Loudet et Pouligny [181])

Les particules cylindriques déforment quant à elles l'interface selon un schéma quadripolaire : une élévation à chaque extrémité, et une dépression sur chaque côté de la particule [199]. Cette déformation pousse les particules à former des chaînes, chaque extrémité interagissant avec l'extrémité d'une autre particule (Figure 29a). Il a cependant été aussi observé des interactions côte-à-côte, favorisées par une courbure de l'interface, comme à la surface de gouttes par exemple [200]. De telles interactions peuvent donner des structures très ordonnées à grande échelle (Figure 29b). Les particules les plus longues, que l'on appelle tantôt fibres tantôt filaments, ont pour leur part plutôt tendance à former des faisceaux en interagissant « côte-à-côte », que ce soit sur une interface plane [201] ou courbée [180].

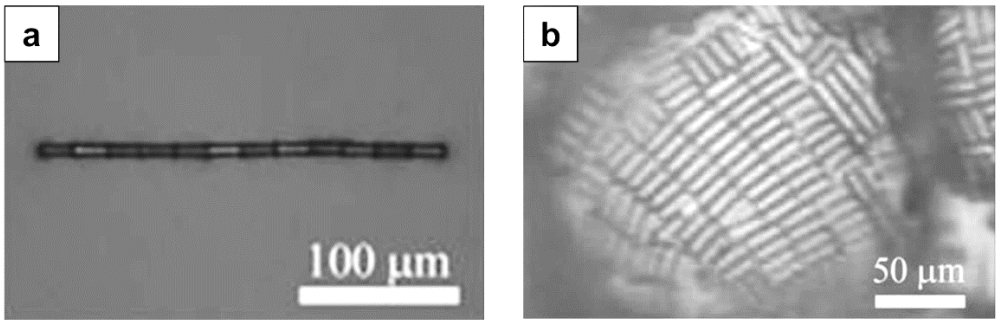


Figure 29 : Image de MEB environnementale de particules cylindriques de résine époxy : (a) formant une chaîne à une interface plane eau-air gélifiée par des interactions « extrémité-à-extrémité » ; (b) formant un réseau dense par des interactions « côte-à-côte » à la surface d'une gouttelette eau-dans-hexadécane. Les particules ont un rapport d'aspect x = 2.5 (figure adaptée de Lewandowski *et al.* [200]).

En outre, il convient de noter que certaines forces, en dehors des forces capillaires, peuvent avoir une influence sur l'organisation interfaciale des particules. C'est notamment le cas des interactions électrostatiques, qui peuvent donner lieu à des organisations non prédites par les simulations basées sur les forces capillaires. L'interaction peut par exemple permettre à des ellipsoïdes de se connecter d'extrémité en extrémité, alors que la force capillaire seule favorise une configuration côte-à-côte [202].

3.3. Influence de la forme des particules sur les propriétés des émulsions de Pickering

Les études sur les particules anisotropes présentées jusqu'à présent sont, pour la plupart, réalisées sur des interfaces eau-air planes, dans des conditions modèles. Récemment, de nombreuses équipes ont proposé de mettre à profit ces études fondamentales pour stabiliser des émulsions de Pickering avec des particules non sphériques. Ainsi, on peut citer des émulsions stabilisées par des spores végétales [203], des bactéries recouvertes de chitosane [204], des fibres de chitine régénérée [205], des fibres de sépiolite [206], des particules d'hydroxyapatite sphériques, cylindriques ou fibreuses [207], des nanotubes de carbone multi-feuillets [208], des particules cylindriques de silice [209], des particules d'hématite cuboïdes, sphérocylindriques ou en haltères [46,210], des particules cylindriques de polystyrène [210], *etc*. Nous ne nous attarderons pas sur chacune de ces études, et nous attacherons seulement ici à mettre en lumière l'influence de la forme des nanoparticules sur la taille des gouttelettes, leur stabilité, et le sens des émulsions obtenues.

3.3.1. Influence de la forme des particules sur la taille des gouttelettes

Tout d'abord, les particules non sphériques sont soumises à la coalescence limitée, quelle que soit leur forme. Bien que les équations soient différentes pour chaque forme, la relation linéaire entre la taille des gouttelettes et la concentration en nanoparticules est souvent vérifiée par les auteurs, et reste donc l'un des principes caractéristiques des émulsions de Pickering. On note ainsi des études sur la coalescence limitée d'émulsions stabilisées par des particules ellipsoïdes [79], cuboïdes [46], cylindriques [209], ou encore des fibres [180].

3.3.2. Influence de la forme des particules sur la stabilité des émulsions

La forme des particules stabilisantes peut aussi avoir, *in fine*, une influence sur la stabilité des émulsions. On relève en général trois mécanismes permettant à ces particules d'influer sur la stabilité : l'augmentation de la viscoélasticité de l'interface (par le biais des interactions capillaires notamment), la plus ou moins bonne couverture des gouttelettes, et la formation de réseaux entre les gouttelettes.

Madivala *et al.* ont montré qu'à un taux de couverture donné, l'utilisation de particules de polystyrène ellipsoïdes rendent l'interface plus élastique que des particules sphériques. En effet, les forces capillaires promeuvent la formation de réseaux dans le cas des particules ellipsoïdes, et l'interface est alors plus résistante mécaniquement [202]. Cette observation a été confirmée sur des particules ellipsoïdes d'hématite [211]. L'augmentation du rapport d'aspect sur une gamme de 1 à 6 a conduit à une augmentation des forces capillaires et donc de l'élasticité de l'interface. Ainsi, les particules à haut rapport d'aspect permettent la stabilisation d'une émulsion n-décane/eau alors que, dans les mêmes conditions, les particules sphériques ou peu allongées n'empêchent pas un déphasage rapide. Les particules les plus allongées procurent donc aux émulsions une meilleure stabilité.

Cependant, au-delà d'une valeur critique de rapport d'aspect, les mécanismes semblent être différents. Les nanofibres de cellulose qui ont été utilisées pour le démontrer sont assez flexibles pour se courber et se plaquer sur l'interface, assurant une adsorption efficace de ces très longues particules [212]. Elles donnent alors des taux de couverture différents selon leur rapport d'aspect : les fibres les plus courtes (rapport d'aspect de 13) donnent en effet des taux de couverture de 100 %, du fait d'un encombrement stérique moindre qui limite peu l'adsorption à l'interface [180]. Comparées aux plus longues fibres (rapport d'aspect de 160) qui ne recouvrent que 40 % de la surface des gouttelettes, les

fibres courtes permettraient donc *a priori* une meilleure stabilité. Cependant, l'utilisation de fibres longues permet la mise en place d'un deuxième mécanisme de stabilisation. Ces dernières s'adsorbent à la surface de plusieurs gouttes en même temps, immobilisant les gouttelettes en un réseau les empêchant de coalescer. Ces émulsions sont ainsi très stables elles aussi, et nécessitent même des concentrations moindres de particules [180]. Ainsi, les particules allongées, quel que soit leur rapport d'aspect, présentent des avantages indéniables pour stabiliser des émulsions.

Les particules Janus sont elles aussi des émulsifiants intéressants, car la mouillabilité de chaque pôle, le ratio de surface entre les deux pôles, et le rapport d'aspect total des particules peuvent être modifiés. Nous ne nous intéresserons ici qu'à l'influence du rapport d'aspect, mais certaines revues traitent du sujet dans sa globalité, sans omettre aucun paramètre [68]. Si les émulsions de Pickering sont considérées comme cinétiquement stables (ce qui implique une relative stabilité mais n'empêche pas la séparation de phases à long terme), des modélisations semblent suggérer qu'il est possible de générer des émulsions de Pickering thermodynamiquement stables. Pour cela, il suffirait d'utiliser des particules Janus en haltère, se positionnant en configuration *end-up* (axe long perpendiculaire à l'interface) [213]. Cette position permettrait en effet d'obtenir des lignes de contact planes, et donc une absence de forces capillaires permettant une organisation en réseau hexagonal compact. Or, pour obtenir un tel résultat, la particule en question doit avoir des pôles de mouillabilités très différentes (différence d'angle de contact triphasique d'au moins 80°) et une morphologie proche de la sphéricité (rapport d'aspect inférieur à 1,4) [182]. L'utilisation de particules Janus plus anisotropes semble donc, de prime abord, ne pas favoriser la stabilité des émulsions.

Cependant, Koike *et al.* ont produit des émulsions de Pickering très stables avec des microplaquettes Janus (chaque face possédant un mouillabilité propre) [214]. En produisant des plaquettes de forme variable (carrés, triangles, pentagones, hexagones, et disques) par photolithographie, il est possible d'observer les différences d'organisation de chaque forme à la surface de gouttelettes (Figure 30). Toutes ces particules produisent un pavage plus ou moins régulier autour des grosses gouttes sphériques, en s'adsorbant en configuration *face-up* (c'est-à-dire parallèlement à l'interface). L'organisation la plus dense (et donc la plus stable) est celle obtenue avec les triangles, les carrés et les hexagones, qui permettent une imbrication parfaite, bien que des espaces persistent par endroit. Les disques et les pentagones en revanche ne permettent pas une couverture optimale quand

bien même ils adopteraient une organisation hexagonale compacte. Il est intéressant de remarquer que les plus petites gouttes prennent la forme de polyèdres réguliers, et non plus de sphères. Elles sont en ainsi tétraédriques avec des plaquettes triangulaires, cubiques avec des plaquettes carrées, et dodécaédriques avec des plaquettes pentagonales. Ces structures sont extrêmement stables. Notons que les hexagones et les disques de se prêtent pas à ce type de petites structures régulières. On voit ainsi que les particules Janus peuvent très bien stabiliser des émulsions, même si elles ne sont pas proches de la sphéricité.

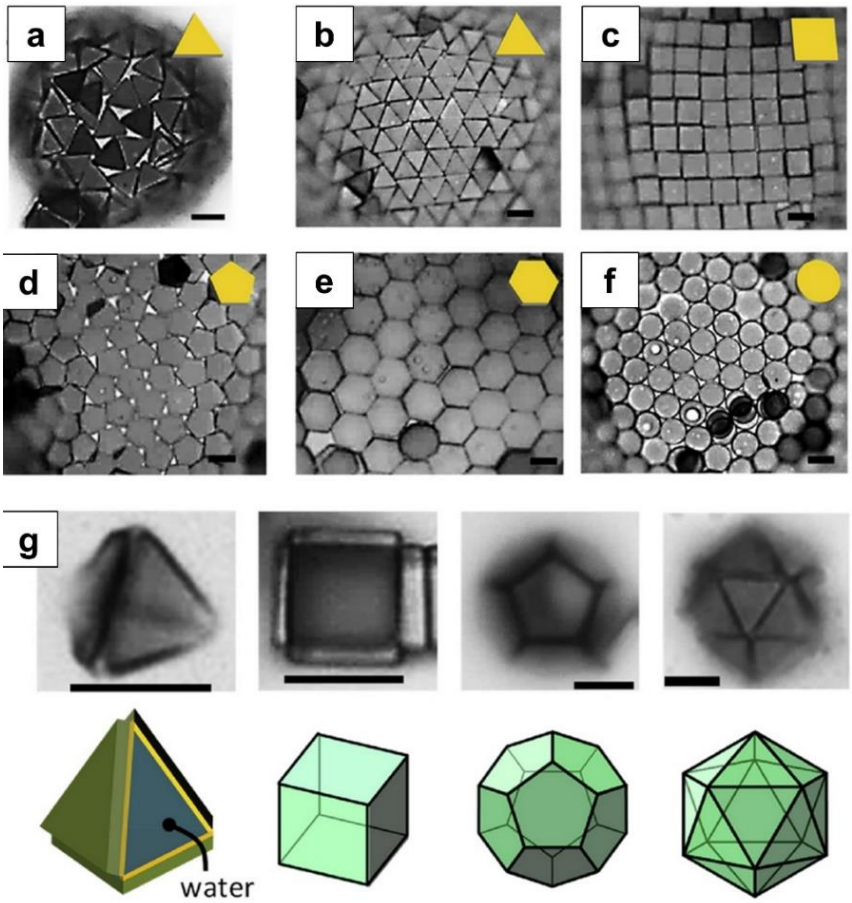


Figure 30 : Organisation de plaquettes amphiphiles vue au microscope optique . (a) Gouttelette avant agitation, (b) Grosse gouttelette stabilisée par des plaquettes triangulaires, (c) Grosse gouttelette stabilisée par des plaquettes carrées, (d) Grosse gouttelette stabilisée par des plaquettes hexagonales, (e) Grosse gouttelette stabilisée par des plaquettes hexagonales, (f) Grosse gouttelette stabilisée par des disques. Les émulsions (b) à (f) sont obtenues après une agitation modérée. (g) Petites gouttelettes de la forme de polyèdres réguliers, selon le type de plaquettes utilisées. Barre d'échelle : 10 µm. (figure issue de la revue d'Iwashita [68], d'après les résultats de Koike *et al.* [214])

3.3.3. Influence de la forme des particules sur le sens des émulsions

Enfin, la forme des particules peut avoir une influence sur le sens des émulsions. En effet, Nonomura *et al.* ont étudié le comportement de particules appelées « microbols » sur la morphologie des émulsions [140]. Ils montrent d'abord que les gouttelettes obtenues ne sont pas toujours sphériques. Les gouttelettes subissent des cisaillements au cours de l'émulsification, qui les déforment : si l'adsorption des particules est suffisante pour stabiliser les gouttelettes avant leur relaxation, alors elles peuvent conserver une forme allongée (dite « en grain de café », selon les auteurs). Ce mécanisme n'est cependant pas spécifique des particules en microbols, car des gouttelettes de formes similaires ont été obtenues avec des particules sphériques [215]. En revanche, il est démontré que la cavité des microbols génère une hystérésis de mouillabilité, leur donnant la possibilité d'accueillir indifféremment de la phase aqueuse, de la phase huileuse ou de l'air. Ce phénomène, déjà décrit avec des particules sphériques rugueuses dans la section 2.3.1.3, est ici généré par la présence d'une seule grande cavité. Ainsi, selon l'histoire des particules, et notamment le milieu dans lequel elles ont été dispersées avant l'émulsification, le sens de l'émulsion peut être complètement différent. L'utilisation d'un seul et même type de microbols rend donc possible la production d'émulsions E/H, H/E, ou multiples.

Ainsi, les particules non sphériques ont un comportement interfacial bien différent des particules sphériques, et propre à chaque forme. Si l'influence de ces particules sur des interfaces planes est de mieux en mieux comprise, il y a peu d'études sur leur comportement en émulsion. Leur influence sur les propriétés des émulsions doit encore être explorée, notamment au moyen de comparaisons systématiques entre particules sphériques et anisotropes de même composition. Ces études, encore trop rares, permettrait alors d'isoler l'influence de la forme dans l'analyse des résultats.

Conclusion

Ainsi, les émulsions de Pickering se distinguent des émulsions stabilisées par des tensioactifs classiques ou par des biopolymères, de bien des façons. Leur stabilité est assurée par des particules solides adsorbées aux interfaces de façon irréversible, qui s'organisent en monocouches plus ou moins denses ou en multicouches, ce qui permet d'empêcher deux interfaces d'entrer en contact. Les particules en excès peuvent aussi créer un réseau dans la phase continue, qui limite encore les contacts entre gouttelettes. La

taille des gouttelettes produites dépend des capacités du procédé d'émulsification autant que de la capacité des particules à recouvrir l'interface, selon le phénomène de coalescence limitée. Enfin, le sens des émulsions est une propriété découlant principalement de l'angle de contact des particules, selon la loi de Finkle. De nombreux autres paramètres peuvent cependant entrer en compte dans l'établissement du sens final de l'émulsion, notamment *via* le phénomène d'inversion de phases.

Si toutes ces notions ont été bien souvent appréhendées en utilisant des particules sphériques, d'autres formes sont possibles, qui ajoutent de la complexité au système. En effet, les particules anisotropes tendent à déformer l'interface autour d'elles de façon inhomogène, générant ainsi des forces capillaires entre elles. Les structures générées par ces interactions interparticulaires influencent alors la capacité des particules à couvrir les gouttelettes, ainsi que la viscoélasticité des interfaces. Les éventuelles cavités présentes à la surface de ces particules anisotropes peuvent aussi influencer le sens des émulsions, faisant de la forme des particules un paramètre de plus à considérer dans le mécanisme de formation des gouttelettes. Une connaissance exhaustive de ces paramètres pourrait nous permettre de mieux prédire les propriétés des émulsions, pour le développement rapide et pertinent d'émulsions d'intérêt pharmaceutique par exemple.

Références

[1] M. Chappat, Some applications of emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 91 (1994) 57–77. https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02976-8.

[2] P. Wehrlé, Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique, 2e édition, Maloine, Paris, 2012.

[3] A.-M. Pensé-Lhéritier, Conception des produits cosmétiques: la formulation, 2nd ed., Lavoisier, 2016.

[4] J. Esquena, Water-in-water (W/W) emulsions, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 25 (2016) 109–119. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.09.010.

[5] C. Albert, M. Beladjine, N. Tsapis, E. Fattal, F. Agnely, N. Huang, Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications, J. Controlled Release. 309 (2019) 302–332. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003.

[6] D.K. Sarker, Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developer's Toolbag, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013. https://doi.org/10.1002/9781118648384.

[7] F. Nielloud, G. Marti-Mestres, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions : Second Edition, Revised and Expanded, CRC Press, 2000. https://doi.org/10.1201/9780429344688.

[8] G. Marti-Mestres, F. Nielloud, Emulsions in Health Care Applications—An Overview, J. Dispers. Sci. Technol. 23 (2002) 419–439. https://doi.org/10.1080/01932690208984214.

[9] K. Hörmann, A. Zimmer, Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review, J. Controlled Release. 223 (2016) 85–98. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.016.

[10] J.W. Spray, Review of Intravenous Lipid Emulsion Therapy:, J. Infus. Nurs. 39 (2016) 377–380. https://doi.org/10.1097/NAN.0000000000000194.

[11] A.N. Biesboer, N.A. Stoehr, A Product Review of Alternative Oil-Based Intravenous Fat Emulsions, Nutr. Clin. Pract. 31 (2016) 610–618. https://doi.org/10.1177/0884533616661174.

[12] C. Fox, Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery, Molecules. 14 (2009) 3286–3312. https://doi.org/10.3390/molecules14093286.

[13] R. Dubey, Controlled-release injectable microemulsions: recent advances and potential opportunities, Expert Opin. Drug Deliv. 11 (2014) 159–173. https://doi.org/10.1517/17425247.2014.870151.

[14] M.A. Schubert, C.C. Muller-Goymann, Novel colloidal delivery systems for dermal application, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 14 (2004) 423–434. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(04)50080-1.

[15] G.W. Lu, P. Gao, Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery, in: V.S. Kulkarni (Ed.), Handb. Non-Invasive Drug Deliv. Syst., William Andrew Publishing, Boston, 2010: pp. 59–94. https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4.

[16] C.C. Peng, L.C. Bengani, H.J. Jung, J. Leclerc, C. Gupta, A. Chauhan, Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 21 (2011) 111–121. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50010-3.

[17] S. Tamilvanan, S. Benita, The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 357–368. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.033.

[18] C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, G. Sandri, Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 92 (2015) 39–52. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001.

[19] M. Sznitowska, M. Gajewska, S. Janicki, A. Radwanska, G. Lukowski, Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits, Eur. J. Pharm. Biopharm. 52 (2001) 159–163. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00157-6.

[20] C. Comfort, G. Garrastazu, M. Pozzoli, F. Sonvico, Opportunities and Challenges for the Nasal Administration of Nanoemulsions, Curr. Top. Med. Chem. 15 (2015) 356–368. https://doi.org/10.2174/1568026615666150108144655.

[21] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability, Pharm. Res. 12 (1995) 413–420. https://doi.org/10.1023/A:1016212804288.

[22] T.F. Tadros, ed., Emulsion Formation and Stability, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013. https://doi.org/10.1002/9783527647941.

[23] L.E. Low, S.P. Siva, Y.K. Ho, E.S. Chan, B.T. Tey, Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion, Adv. Colloid Interface Sci. 277 (2020) 102117. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102117.

[24] J. Vilasau, C. Solans, M.J. Gómez, J. Dabrio, R. Mújika-Garai, J. Esquena, Stability of oil-in-water paraffin emulsions prepared in a mixed ionic/nonionic surfactant system, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 389 (2011) 222–229. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.08.023.

[25] D. Langevin, Coalescence in foams and emulsions: Similarities and differences, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 44 (2019) 23–31. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.09.001.

[26] S.S. Davis, H.P. Round, T.S. Purewal, Ostwald ripening and the stability of emulsion systems: an explanation for the effect of an added third component, J. Colloid Interface Sci. 80 (1981) 508–511. https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90210-1.

[27] P. Kundu, K. Arora, Y. Gu, V. Kumar, I.M. Mishra, Formation and stability of water-in-oil nano-emulsions with mixed surfactant using in-situ combined condensation-dispersion method, Can. J. Chem. Eng. 97 (2019) 2039–2049. https://doi.org/10.1002/cjce.23481.

[28] C. Kalelkar, The Inveterate Tinkerer 11. Marangoni Effect, Resonance. 23 (2018) 225–233. https://doi.org/10.1007/s12045-018-0607-1.

[29] R. Duro, C. Souto, J.L. Gómez-Amoza, R. Martínez-Pacheco, A. Concheiro, Interfacial Adsorption of Polymers and Surfactants: Implications for the Properties of Disperse Systems of Pharmaceutical Interest, Drug Dev. Ind. Pharm. 25 (1999) 817–829. https://doi.org/10.1081/DDC-100102244.

[30] N. Branco, I. Lee, H. Zhai, H.I. Maibach, Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an in vivo study, Contact Dermatitis. 53 (2005) 278–284. https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00703.x.

[31] I. Effendy, H.I. Maibach, Surfactants and experimental irritant contact dermatitis, Contact Dermatitis. 33 (1995) 217–225. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00470.x.

[32] L. Kiss, F.R. Walter, A. Bocsik, S. Veszelka, B. Ózsvári, L.G. Puskás, P. Szabó-Révész, M.A. Deli, Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Cremophor EL and RH40 on Endothelial and Epithelial Cells, J. Pharm. Sci. 102 (2013) 1173–1181. https://doi.org/10.1002/jps.23458.

[33] E. Lémery, S. Briançon, Y. Chevalier, C. Bordes, T. Oddos, A. Gohier, M.-A. Bolzinger, Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 469 (2015) 166–179. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.019.

[34] K.A. Walters, W. Bialik, K.R. Brain, The effects of surfactants on penetration across the skin*, Int. J. Cosmet. Sci. 15 (1993) 260–271. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1993.tb00572.x.

[35] K.P. Ananthapadmanabhan, D.J. Moore, K. Subramanyan, M. Misra, F. Meyer, Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing, Dermatol. Ther. 17 (2004) 16–25. https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1002.x.

[36] E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord, F. Agnely, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, Int. J. Pharm. 436 (2012) 359–378. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052.

[37] M. Zembyla, B.S. Murray, A. Sarkar, Water-in-oil emulsions stabilized by surfactants, biopolymers and/or particles: a review, Trends Food Sci. Technol. 104 (2020) 49–59. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.028.

[38] T.B.J. Blijdenstein, E. van der Linden, T. van Vliet, G.A. van Aken, Scaling Behavior of Delayed Demixing, Rheology, and Microstructure of Emulsions Flocculated by Depletion and Bridging, Langmuir. 20 (2004) 11321–11328. https://doi.org/10.1021/la048608z.

[39] E. Dickinson, Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures, Food Hydrocoll. 25 (2011) 1966–1983. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001.

[40] M. A. Bos, T. van Vliet, Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review, Adv. Colloid Interface Sci. 91 (2001) 437–471. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00077-4.

[41] W. Ramsden, Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation).—Preliminary account, Proc. R. Soc. Lond. 72 (1904) 156–164. https://doi.org/10.1098/rspl.1903.0034.

[42] S.U. Pickering, CXCVI.—Emulsions, J Chem Soc Trans. 91 (1907) 2001–2021. https://doi.org/10.1039/CT9079102001.

[43] S. Björkegren, L. Nordstierna, A. Törncrona, A. Palmqvist, Hydrophilic and hydrophobic modifications of colloidal silica particles for Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 487 (2017) 250–257. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.031.

[44] Y. Meng, W. Sun, H. Yang, W. Wang, N. Jin, Y. Zhao, X. Zhang, H. Lü, Fine tuning of surface properties of SiO2 nanoparticles for the regulation of Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 592 (2020) 124603. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124603.

[45] N. Yan, M.R. Gray, J.H. Masliyah, On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 193 (2001) 97–107. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00748-8.

[46] J.W.J. de Folter, E.M. Hutter, S.I.R. Castillo, K.E. Klop, A.P. Philipse, W.K. Kegel, Particle Shape Anisotropy in Pickering Emulsions: Cubes and Peanuts, Langmuir. 30 (2014) 955–964. https://doi.org/10.1021/la402427q.

[47] W. Li, L. Yu, G. Liu, J. Tan, S. Liu, D. Sun, Oil-in-water emulsions stabilized by Laponite particles modified with short-chain aliphatic amines, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 400 (2012) 44–51. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.044.

[48] M.A. Creighton, Y. Ohata, J. Miyawaki, A. Bose, R.H. Hurt, Two-Dimensional Materials as Emulsion Stabilizers: Interfacial Thermodynamics and Molecular Barrier Properties, Langmuir. 30 (2014) 3687–3696. https://doi.org/10.1021/la500216n.

[49] W. Yi, H. Wu, H. Wang, Q. Du, Interconnectivity of Macroporous Hydrogels Prepared via Graphene Oxide-Stabilized Pickering High Internal Phase Emulsions, Langmuir. 32 (2016) 982–990. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04477.

[50] C.C. Berton-Carabin, K. Schroën, Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges, Annu. Rev. Food Sci. Technol. 6 (2015) 263–297. https://doi.org/10.1146/annurev-food-081114-110822.

[51] F. Zhu, Starch based Pickering emulsions: Fabrication, properties, and applications, Trends Food Sci. Technol. 85 (2019) 129–137. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.012.

[52] S. Fujisawa, E. Togawa, K. Kuroda, Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions and their applications, Sci. Technol. Adv. Mater. 18 (2017) 959–971. https://doi.org/10.1080/14686996.2017.1401423.

[53] B.R. Shah, Y. Li, W. Jin, Y. An, L. He, Z. Li, W. Xu, B. Li, Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation, Food Hydrocoll. 52 (2016) 369–377. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.015.

[54] V. Paunov, O. Cayre, P. Noble, S. Stoyanov, K. Velikov, M. Golding, Emulsions stabilised by food colloid particles: Role of particle adsorption and wettability at the liquid interface, J. Colloid Interface Sci. 312 (2007) 381–389. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.031.

[55] R. Gupta, D. Rousseau, Surface-active solid lipid nanoparticles as Pickering stabilizers for oil-in-water emulsions, Food Funct. 3 (2012) 302. https://doi.org/10.1039/c2fo10203j.

[56] H. Lim, M. Jo, C. Ban, Y.J. Choi, Interfacial and colloidal characterization of oil-in-water emulsions stabilized by interface-tunable solid lipid nanoparticles, Food Chem. 306 (2020) 125619. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125619.

[57] L. Leclercq, V. Nardello-Rataj, Pickering emulsions based on cyclodextrins: A smart solution for antifungal azole derivatives topical delivery, Eur. J. Pharm. Sci. 82 (2016) 126–137. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.017.

[58] Z. Luo, B.S. Murray, A. Yusoff, M.R.A. Morgan, M.J.W. Povey, A.J. Day, Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil−Water Interface, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 2636–2645. https://doi.org/10.1021/jf1041855.

[59] C. Albert, N. Huang, N. Tsapis, S. Geiger, V. Rosilio, G. Mekhloufi, D. Chapron, B. Robin, M. Beladjine, V. Nicolas, E. Fattal, F. Agnely, Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions, Langmuir. 34 (2018) 13935–13945. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02558.

[60] F. Qi, J. Wu, G. Sun, F. Nan, T. Ngai, G. Ma, Systematic studies of Pickering emulsions stabilized by uniform-sized PLGA particles: preparation and stabilization mechanism, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 7605–7611. https://doi.org/10.1039/C4TB01165A.

[61] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery, Int. J. Pharm. 531 (2017) 134–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.065.

[62] S. Fujii, A. Aichi, M. Muraoka, N. Kishimoto, K. Iwahori, Y. Nakamura, I. Yamashita, Ferritin as a bionano-particulate emulsifier, J. Colloid Interface Sci. 338 (2009) 222–228. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.028.

[63] D.J. McClements, Protein-stabilized emulsions, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 9 (2004) 305–313. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003.

[64] C.-H. Tang, Globular proteins as soft particles for stabilizing emulsions: Concepts and strategies, Food Hydrocoll. 103 (2020) 105664. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105664.

[65] È. Tsabet, L. Fradette, Effect of the properties of oil, particles, and water on the production of Pickering emulsions, Chem. Eng. Res. Des. 97 (2015) 9–17. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.02.016.

[66] V. Schmitt, M. Destribats, R. Backov, Colloidal particles as liquid dispersion stabilizer: Pickering emulsions and materials thereof, Comptes Rendus Phys. 15 (2014) 761–774. https://doi.org/10.1016/j.crhy.2014.09.010.

[67] Y. Chevalier, M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 439 (2013) 23–34. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054.

[68] Y. Iwashita, Pickering–Ramsden emulsions stabilized with chemically and morphologically anisotropic particles, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. (2020) S1359029420300492. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.05.004.

[69] S. Levine, B.D. Bowen, S.J. Partridge, Stabilization of emulsions by fine particles I. Partitioning of particles between continuous phase and oil/water interface, Colloids Surf. 38 (1989) 325–343. https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80271-9.

[70] A. Nelson, D. Wang, K. Koynov, L. Isa, A multiscale approach to the adsorption of core–shell nanoparticles at fluid interfaces, Soft Matter. 11 (2014) 118–129. https://doi.org/10.1039/C4SM01881H.

[71] V. Garbin, J.C. Crocker, K.J. Stebe, Forced Desorption of Nanoparticles from an Oil–Water Interface, Langmuir. 28 (2012) 1663–1667. https://doi.org/10.1021/la202954c.

[72] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-Free Emulsions, Langmuir. 16 (2000) 8622–8631. https://doi.org/10.1021/la000189s.

[73] X. Yao, Z. Liu, M. Ma, Y. Chao, Y. Gao, T. Kong, Control of Particle Adsorption for Stability of Pickering Emulsions in Microfluidics, Small. 14 (2018) 1802902. https://doi.org/10.1002/smll.201802902.

[74] M.S. Manga, O.J. Cayre, R.A. Williams, S. Biggs, D.W. York, Production of solid-stabilised emulsions through rotational membrane emulsification: influence of particle adsorption kinetics, Soft Matter. 8 (2012) 1532–1538. https://doi.org/10.1039/C1SM06547E.

[75] J. Wu, G.-H. Ma, Recent Studies of Pickering Emulsions: Particles Make the Difference, Small. 12 (2016) 4633–4648. https://doi.org/10.1002/smll.201600877.

[76] A. Nandi, D.V. Khakhar, A. Mehra, Coalescence in Surfactant-Stabilized Emulsions Subjected to Shear Flow, Langmuir. 17 (2001) 2647–2655. https://doi.org/10.1021/la001473m.

[77] S. Arditty, C.P. Whitby, B.P. Binks, V. Schmitt, F. Leal-Calderon, Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions, Eur. Phys. J. E. 11 (2003) 273–281. https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10018-6.

[78] S. Tcholakova, N.D. Denkov, A. Lips, Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers, Phys. Chem. Chem. Phys. 10 (2008) 1608. https://doi.org/10.1039/b715933c.

[79] M. Matos, A. Marefati, R. Bordes, G. Gutiérrez, M. Rayner, Combined emulsifying capacity of polysaccharide particles of different size and shape, Carbohydr. Polym. 169 (2017) 127–138. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.006.

[80] T. Nallamilli, B.P. Binks, E. Mani, M.G. Basavaraj, Stabilization of Pickering Emulsions with Oppositely Charged Latex Particles: Influence of Various Parameters and Particle Arrangement around Droplets, Langmuir. 31 (2015) 11200–11208. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02443.

[81] V.R. Dugyala, J.S. Muthukuru, E. Mani, M.G. Basavaraj, Role of electrostatic interactions in the adsorption kinetics of nanoparticles at fluid–fluid interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 18 (2016) 5499–5508. https://doi.org/10.1039/C5CP05959C.

[82] H. Wang, V. Singh, S.H. Behrens, Image Charge Effects on the Formation of Pickering Emulsions, J. Phys. Chem. Lett. 3 (2012) 2986–2990. https://doi.org/10.1021/jz300909z.

[83] T.S. Horozov, B.P. Binks, Particle-Stabilized Emulsions: A Bilayer or a Bridging Monolayer?, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 773–776. https://doi.org/10.1002/anie.200503131.

[84] L.L. Dai, S. Tarimala, C. Wu, S. Guttula, J. Wu, The Structure and Dynamics of Microparticles at Pickering Emulsion Interfaces, Scanning. 30 (2008) 87–95. https://doi.org/10.1002/sca.20087.

[85] T.S. Horozov, R. Aveyard, J.H. Clint, B.P. Binks, Order−Disorder Transition in Monolayers of Modified Monodisperse Silica Particles at the Octane−Water Interface, Langmuir. 19 (2003) 2822–2829. https://doi.org/10.1021/la020858x.

[86] R. Aveyard, B.P. Binks, J.H. Clint, P.D.I. Fletcher, T.S. Horozov, B. Neumann, V.N. Paunov, J. Annesley, S.W. Botchway, D. Nees, A.W. Parker, A.D. Ward, A.N. Burgess, Measurement of Long-Range Repulsive Forces between Charged Particles at an Oil-Water Interface, Phys. Rev. Lett. 88 (2002) 246102. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.246102.

[87] M. Destribats, S. Gineste, E. Laurichesse, H. Tanner, F. Leal-Calderon, V. Héroguez, V. Schmitt, Pickering Emulsions: What Are the Main Parameters Determining the Emulsion Type and Interfacial Properties?, Langmuir. 30 (2014) 9313–9326. https://doi.org/10.1021/la501299u.

[88] F. Gautier, M. Destribats, R. Perrier-Cornet, J.-F. Dechézelles, J. Giermanska, V. Héroguez, S. Ravaine, F. Leal-Calderon, V. Schmitt, Pickering emulsions with stimulable particles: from highly- to weakly-covered interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 9 (2007) 6455. https://doi.org/10.1039/b710226g.

[89] E. Vignati, R. Piazza, T.P. Lockhart, Pickering Emulsions: Interfacial Tension, Colloidal Layer Morphology, and Trapped-Particle Motion, Langmuir. 19 (2003) 6650–6656. https://doi.org/10.1021/la034264l.

[90] B.P. Binks, M. Kirkland, Interfacial structure of solid-stabilised emulsions studied by scanning electron microscopy, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 3727–3733. https://doi.org/10.1039/B110031A.

[91] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, Y. Chevalier, Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 351 (2010) 348–356. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.019.

[92] T.S. Horozov, R. Aveyard, J.H. Clint, B. Neumann, Particle Zips: Vertical Emulsion Films with Particle Monolayers at Their Surfaces, Langmuir. 21 (2005) 2330–2341. https://doi.org/10.1021/la047993p.

[93] H. Xu, M. Lask, J. Kirkwood, G. Fuller, Particle Bridging between Oil and Water Interfaces, Langmuir. 23 (2007) 4837–4841. https://doi.org/10.1021/la063593l.

[94] D.J. French, P. Taylor, J. Fowler, P.S. Clegg, Making and breaking bridges in a Pickering emulsion, J. Colloid Interface Sci. 441 (2015) 30–38. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.032.

[95] D.J. French, A.T. Brown, A.B. Schofield, J. Fowler, P. Taylor, P.S. Clegg, The secret life of Pickering emulsions: particle exchange revealed using two colours of particle, Sci. Rep. 6 (2016) 31401. https://doi.org/10.1038/srep31401.

[96] M. Destribats, V. Lapeyre, E. Sellier, F. Leal-Calderon, V. Schmitt, V. Ravaine, Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Water-Dispersible Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels: Understanding Anti-Finkle Behavior, Langmuir. 27 (2011) 14096–14107. https://doi.org/10.1021/la203476h.

[97] C.P. Whitby, R. Parthipan, Influence of particle concentration on multiple droplet formation in Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 554 (2019) 315–323. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.017.

[98] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Catastrophic Phase Inversion of Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Hydrophobic Silica, Langmuir. 16 (2000) 2539–2547. https://doi.org/10.1021/la991081j.

[99] J.A. Juárez, C.P. Whitby, Oil-in-water Pickering emulsion destabilisation at low particle concentrations, J. Colloid Interface Sci. 368 (2012) 319–325. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.029.

[100] T.S. Horozov, B.P. Binks, T. Gottschalk-Gaudig, Effect of electrolyte in silicone oil-in-water emulsions stabilised by fumed silica particles, Phys. Chem. Chem. Phys. 9 (2007) 6398. https://doi.org/10.1039/b709807n.

[101] L. Bai, S. Huan, W. Xiang, O.J. Rojas, Pickering emulsions by combining cellulose nanofibrils and nanocrystals: phase behavior and depletion stabilization, Green Chem. 20 (2018) 1571–1582. https://doi.org/10.1039/C8GC00134K.

[102] D. Huc-Mathis, G. Almeida, C. Michon, Pickering emulsions based on food byproducts: A comprehensive study of soluble and insoluble contents, J. Colloid Interface Sci. 581 (2021) 226–237. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.078.

[103] B.S. Murray, Pickering emulsions for food and drinks, Curr. Opin. Food Sci. 27 (2019) 57–63. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.05.004.

[104] X. Jia, R. Xu, W. Shen, M. Xie, M. Abid, S. Jabbar, P. Wang, X. Zeng, T. Wu, Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose, Food Hydrocoll. 43 (2015) 275–282. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.024.

[105] T.H. Whitesides, D.S. Ross, Experimental and Theoretical Analysis of the Limited Coalescence Process: Stepwise Limited Coalescence, J. Colloid Interface Sci. 169 (1995) 48–59. https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1005.

[106] B.R. Midmore, Effect of Aqueous Phase Composition on the Properties of a Silica-Stabilized W/O Emulsion, J. Colloid Interface Sci. 213 (1999) 352–359. https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6108.

[107] È. Tsabet, L. Fradette, Semiempirical Approach for Predicting the Mean Size of Solid-Stabilized Emulsions, Ind. Eng. Chem. Res. 54 (2015) 11661–11677. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b02910.

[108] R.M. Wiley, Limited coalescence of oil droplets in coarse oil-in-water emulsions, J. Colloid Sci. 9 (1954) 427–437. https://doi.org/10.1016/0095-8522(54)90030-6.

[109] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Pickering Emulsions Stabilized by Monodisperse Latex Particles: Effects of Particle Size, Langmuir. 17 (2001) 4540–4547. https://doi.org/10.1021/la0103822.

[110] K. Golemanov, S. Tcholakova, P.A. Kralchevsky, K.P. Ananthapadmanabhan, A. Lips, Latex-Particle-Stabilized Emulsions of Anti-Bancroft Type, Langmuir. 22 (2006) 4968–4977. https://doi.org/10.1021/la0603875.

[111] P. Walstra, P.E.A. Smulders, Emulsion Formation, in: B.P. Binks (Ed.), Mod. Asp. Emuls. Sci., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998: pp. 56–99. https://doi.org/10.1039/9781847551474-00056.

[112] R.-H. Chen, W.-C. Wang, Y.-W. Chen, Like-drop collisions of biodiesel and emulsion diesel, Eur. J. Mech. - BFluids. 60 (2016) 62–69. https://doi.org/10.1016/j.euromechflu.2016.07.009.

[113] Q. Yuan, O.J. Cayre, M. Manga, R.A. Williams, S. Biggs, Preparation of particle-stabilized emulsions using membrane emulsification, Soft Matter. 6 (2010) 1580. https://doi.org/10.1039/b921372d.

[114] R.V. Calabrese, C.Y. Wang, N.P. Bryner, Drop breakup in turbulent stirred-tank contactors. Part III: Correlations for mean size and drop size distribution, AIChE J. 32 (1986) 677–681. https://doi.org/10.1002/aic.690320418.

[115] J.K. Nunes, S.S.H. Tsai, J. Wan, H.A. Stone, Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fibre synthesis, J. Phys. Appl. Phys. 46 (2013) 114002.

[116] J.D. Tice, A.D. Lyon, R.F. Ismagilov, Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels, Anal. Chim. Acta. 507 (2004) 73–77. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.024.

[117] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, A.P. Lee, Droplet microfluidics, Lab Chip. 8 (2008) 198–220. https://doi.org/10.1039/B715524G.

[118] C.N. Baroud, F. Gallaire, R. Dangla, Dynamics of microfluidic droplets, Lab Chip. 10 (2010) 2032–2045. https://doi.org/10.1039/C001191F.

[119] M.K. Li, H.S. Fogler, Acoustic emulsification. Part 2. Breakup of the large primary oil droplets in a water medium, J. Fluid Mech. 88 (1978) 513–528. https://doi.org/10.1017/S0022112078002244.

[120] S.P. Siva, K.-W. Kow, C.-H. Chan, S.Y. Tang, Y.K. Ho, Prediction of droplet sizes for oil-in-water emulsion systems assisted by ultrasound cavitation: Transient scaling law based on dynamic breakup potential, Ultrason. Sonochem. 55 (2019) 348–358. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.040.

[121] J.P. Canselier, H. Delmas, A.M. Wilhelm, B. Abismaïl, Ultrasound Emulsification—An Overview, J. Dispers. Sci. Technol. 23 (2002) 333–349. https://doi.org/10.1080/01932690208984209.

[122] S. Vassaux, G. Savary, L. Le Pluart, M. Grisel, On the key role of process parameters to control stability and properties of Pickering emulsions stabilized by montmorillonite, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 583 (2019) 123952. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123952.

[123] C. Charcosset, I. Limayem, H. Fessi, The membrane emulsification process—a review, J. Chem. Technol. Biotechnol. 79 (2004) 209–218. https://doi.org/10.1002/jctb.969.

[124] B.P. Binks, ed., Modern Aspects of Emulsion Science:, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2007. https://doi.org/10.1039/9781847551474.

[125] A. Maestro, E. Guzmán, F. Ortega, R.G. Rubio, Contact angle of micro- and nanoparticles at fluid interfaces, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 19 (2014) 355–367. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.04.008.

[126] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by 'HLB", J. Soc. Cosmet. Chem. 1 (1949) 311–326.

[127] W.D. Bancroft, The Theory of Emulsification, VI, J. Phys. Chem. 19 (1915) 275–309. https://doi.org/10.1021/j150157a002.

[128] P. Finkle, H.D. Draper, J.H. Hildebrand, The theory of emulsification, J. Am. Chem. Soc. 45 (1923) 2780–2788. https://doi.org/10.1021/ja01665a002.

[129] B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, B.L. Holt, P. Beaussoubre, K. Wong, Phase inversion of particle-stabilised perfume oil–water emulsions: experiment and theory, Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (2010) 11954. https://doi.org/10.1039/c0cp00558d.

[130] E. Santini, E. Guzmán, M. Ferrari, L. Liggieri, Emulsions stabilized by the interaction of silica nanoparticles and palmitic acid at the water–hexane interface, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 460 (2014) 333–341. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.054.

[131] K.S. Silmore, C. Gupta, N.R. Washburn, Tunable Pickering emulsions with polymer-grafted lignin nanoparticles (PGLNs), J. Colloid Interface Sci. 466 (2016) 91–100. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.042.

[132] S. Zou, H. Liu, Y. Yang, Z. Wei, C. Wang, Multihollow nanocomposite microspheres with tunable pore structures by templating Pickering double emulsions, React. Funct. Polym. 73 (2013) 1231–1241. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.06.006.

[133] Q. Gao, C. Wang, H. Liu, Y. Chen, Z. Tong, Dual nanocomposite multihollow polymer microspheres prepared by suspension polymerization based on a multiple pickering emulsion, Polym Chem. 1 (2010) 75–77. https://doi.org/10.1039/B9PY00255C.

[134] A.G. Cunha, J.-B. Mougel, B. Cathala, L.A. Berglund, I. Capron, Preparation of Double Pickering Emulsions Stabilized by Chemically Tailored Nanocelluloses, Langmuir. 30 (2014) 9327–9335. https://doi.org/10.1021/la5017577.

[135] W. Zhu, W. Ma, C. Li, J. Pan, X. Dai, Well-designed multihollow magnetic imprinted microspheres based on cellulose nanocrystals (CNCs) stabilized Pickering double emulsion polymerization for selective adsorption of bifenthrin, Chem. Eng. J. 276 (2015) 249–260. https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.084.

[136] M. Williams, N.J. Warren, L.A. Fielding, S.P. Armes, P. Verstraete, J. Smets, Preparation of Double Emulsions using Hybrid Polymer/Silica Particles: New Pickering Emulsifiers with Adjustable Surface Wettability, ACS Appl. Mater. Interfaces. 6 (2014) 20919–20927. https://doi.org/10.1021/am505581r.

[137] L. Isa, F. Lucas, R. Wepf, E. Reimhult, Measuring single-nanoparticle wetting properties by freeze-fracture shadow-casting cryo-scanning electron microscopy, Nat. Commun. 2 (2011) 438. https://doi.org/10.1038/ncomms1441.

[138] V.N. Paunov, O.J. Cayre, The Gel Trapping Technique: A Novel Method for Characterizing the Wettability of Microparticles and the Replication of Particle Monolayers, in: A. Vaseashta, D. Dimova-Malinovska, J.M. Marshall (Eds.), Nanostructured Adv. Mater. Appl. Sens. Optoelectron. Photovolt. Technol., Springer Netherlands, 2005: pp. 363–366.

[139] M. Zanini, L. Isa, Particle contact angles at fluid interfaces: pushing the boundary beyond hard uniform spherical colloids, J. Phys. Condens. Matter. 28 (2016) 313002. https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/31/313002.

[140] Y. Nonomura, N. Kobayashi, N. Nakagawa, Multiple Pickering Emulsions Stabilized by Microbowls, Langmuir. 27 (2011) 4557–4562. https://doi.org/10.1021/la2003707.

[141] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Effects of oil type and aqueous phase composition on oil–water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity, Phys. Chem. Chem. Phys. 2 (2000) 2959–2967. https://doi.org/10.1039/b002582h.

[142] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, Y. Chevalier, Pickering emulsions with bare silica, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 343 (2009) 70–74. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.01.031.

[143] B.P. Binks, J.A. Rodrigues, Types of Phase Inversion of Silica Particle Stabilized Emulsions Containing Triglyceride Oil, Langmuir. 19 (2003) 4905–4912. https://doi.org/10.1021/la020960u.

[144] S.P. McBride, B.M. Law, Influence of Line Tension on Spherical Colloidal Particles at Liquid-Vapor Interfaces, Phys. Rev. Lett. 109 (2012) 196101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.196101.

[145] E. Martines, K. Seunarine, H. Morgan, N. Gadegaard, C.D.W. Wilkinson, M.O. Riehle, Superhydrophobicity and Superhydrophilicity of Regular Nanopatterns, Nano Lett. 5 (2005) 2097–2103. https://doi.org/10.1021/nl051435t.

[146] M. Hu, C.-P. Hsu, L. Isa, Particle Surface Roughness as a Design Tool for Colloidal Systems, Langmuir. 36 (2020) 11171–11182. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02050.

[147] R.N. Wenzel, Resistance of solid surfaces to wetting by water, Ind. Eng. Chem. 28 (1936) 988–994. https://doi.org/10.1021/ie50320a024.

[148] A.B.D. Cassie, S. Baxter, Wettability of porous surfaces, Trans. Faraday Soc. 40 (1944) 546–551. https://doi.org/10.1039/TF9444000546.

[149] M. Zanini, C. Marschelke, S.E. Anachkov, E. Marini, A. Synytska, L. Isa, Universal emulsion stabilization from the arrested adsorption of rough particles at liquid-liquid interfaces, Nat. Commun. 8 (2017) 15701. https://doi.org/10.1038/ncomms15701.

[150] R.S. Hebbar, A.M. Isloor, A.F. Ismail, Contact Angle Measurements, in: Membr. Charact., Elsevier, 2017: pp. 219–255. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00012-7.

[151] A. Stocco, M. Nobili, A comparison between liquid drops and solid particles in partial wetting, Adv. Colloid Interface Sci. 247 (2017) 223–233. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.014.

[152] Y. Tan, K. Xu, C. Liu, Y. Li, C. Lu, P. Wang, Fabrication of starch-based nanospheres to stabilize pickering emulsion, Carbohydr. Polym. 88 (2012) 1358–1363. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.018.

[153] S. Björkegren, M.C.A. Freixiela Dias, K. Lundahl, L. Nordstierna, A. Palmqvist, Phase Inversions Observed in Thermoresponsive Pickering Emulsions Stabilized by Surface Functionalized Colloidal Silica, Langmuir. 36 (2020) 2357–2367. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03648.

[154] B.P. Binks, R. Murakami, S.P. Armes, S. Fujii, Effects of pH and Salt Concentration on Oil-in-Water Emulsions Stabilized Solely by Nanocomposite Microgel Particles, Langmuir. 22 (2006) 2050–2057. https://doi.org/10.1021/la053017+.

[155] G. Gu, Z. Zhou, Z. Xu, J.H. Masliyah, Role of fine kaolinite clay in toluene-diluted bitumen/water emulsion, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 215 (2003) 141–153. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00422-3.

[156] L. Liu, X. Pu, Y. Zhou, X. Wu, D. Luo, Z. Ren, Phase Inversion of Pickering Emulsions by Electrolyte for Potential Reversible Water-in-Oil Drilling Fluids, Energy Fuels. 34 (2020) 1317–1328. https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b03117.

[157] Q.B. Meng, P. Yang, T. Feng, X. Ji, Q. Zhang, D. Liu, S. Wu, F. Liang, Z. Zheng, X.-M. Song, Phosphomolybdic acid-responsive Pickering emulsions stabilized by ionic liquid functionalized Janus nanosheets, J. Colloid Interface Sci. 507 (2017) 74–82. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.097.

[158] G.E.J. Vaessen, M. Visschers, H.N. Stein, Predicting Catastrophic Phase Inversion on the Basis of Droplet Coalescence Kinetics, Langmuir. 12 (1996) 875–882. https://doi.org/10.1021/la950379g.

[159] J. Allouche, E. Tyrode, V. Sadtler, L. Choplin, J.-L. Salager, Simultaneous Conductivity and Viscosity Measurements as a Technique To Track Emulsion Inversion by the Phase-Inversion-Temperature Method, Langmuir. 20 (2004) 2134–2140. https://doi.org/10.1021/la035334r.

[160] E. Dickinson, Interpretation of emulsion phase inversion as a cusp catastrophe, J. Colloid Interface Sci. 84 (1981) 284–287. https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90290-3.

[161] G.E.J. Vaessen, H.N. Stein, The Applicability of Catastrophe Theory to Emulsion Phase Inversion, J. Colloid Interface Sci. 176 (1995) 378–387. https://doi.org/10.1006/jcis.1995.9954.

[162] S. Kim, K. Kim, S.Q. Choi, Controllable one-step double emulsion formation via phase inversion, Soft Matter. 14 (2018) 1094–1099. https://doi.org/10.1039/C7SM02134H.

[163] F. Groeneweg, W.G.M. Agterof, P. Jaeger, J.J.M. Janssen, J.A. Wieringa, J.K. Klahn, On the Mechanism of the Inversion of Emulsions, Chem. Eng. Res. Des. 76 (1998) 55–63. https://doi.org/10.1205/026387698524596.

[164] J.K. Klahn, J.J.M. Janssen, G.E.J. Vaessen, R. de Swart, W.G.M. Agterof, On the escape process during phase inversion of an emulsion, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 210 (2002) 167–181. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00376-X.

[165] E.G. Chatzi, C. Kiparissides, Dynamic simulation of bimodal drop size distributions in low-coalescence batch dispersion systems, Chem. Eng. Sci. 47 (1992) 445–456. https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80032-8.

[166] A.W. Pacek, A.W. Nienow, I.P.T. Moore, On the structure of turbulent liquid—liquid dispersed flows in an agitated vessel, Chem. Eng. Sci. 49 (1994) 3485–3498. https://doi.org/10.1016/S0009-2509(94)85027-5.

[167] A. Gilchrist, K.N. Dyster, I.P.T. Moore, A.W. Nienow, K.J. Carpenter, Delayed phase inversion in stirred liquid-liquid dispersions, Chem. Eng. Sci. 44 (1989) 2381–2384. https://doi.org/10.1016/0009-2509(89)85172-3.

[168] D. Zang, P.S. Clegg, Relationship between high internal-phase Pickering emulsions and catastrophic inversion, Soft Matter. 9 (2013) 7042–7048. https://doi.org/10.1039/C3SM00133D.

[169] H.M.H. Weijgertze, W.K. Kegel, M. Zanini, Patchy rough colloids as Pickering stabilizers, Soft Matter. 16 (2020) 8002–8012. https://doi.org/10.1039/D0SM00807A.

[170] F.M. Fernandes Barros, C. Chassenieux, M.M. de Souza Lima, L. Benyahia, Structure and rheology during catastrophic phase inversion of Pickering emulsions stabilized with fumed silica particles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 593 (2020) 124630. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124630.

[171] Y. Zhu, J. Sun, C. Yi, W. Wei, X. Liu, One-step formation of multiple Pickering emulsions stabilized by self-assembled poly(dodecyl acrylate-co-acrylic acid) nanoparticles, Soft Matter. 12 (2016) 7577–7584. https://doi.org/10.1039/C6SM01263A.

[172] J. Chen, R. Vogel, S. Werner, G. Heinrich, D. Clausse, V. Dutschk, Influence of the particle type on the rheological behavior of Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 382 (2011) 238–245. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.02.003.

[173] M. Tang, T. Wu, X. Xu, L. Zhang, F. Wu, Factors that affect the stability, type and morphology of Pickering emulsion stabilized by silver nanoparticles/graphene oxide nanocomposites, Mater. Res. Bull. 60 (2014) 118–129. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.08.019.

[174] C. Snoeyink, S. Barman, G.F. Christopher, Contact Angle Distribution of Particles at Fluid Interfaces, Langmuir. 31 (2015) 891–897. https://doi.org/10.1021/la5040195.

[175] C.-O. Fournier, L. Fradette, P.A. Tanguy, Effect of dispersed phase viscosity on solid-stabilized emulsions, Chem. Eng. Res. Des. 87 (2009) 499–506. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.11.008.

[176] F. Sabri, W. Raphael, K. Berthomier, L. Fradette, J.R. Tavares, N. Virgilio, One-step processing of highly viscous multiple Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 560 (2020) 536–545. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.10.098.

[177] A.K. Chesters, The modelling of coalescence processes in fluid-liquid dispersions : a review of current understanding, Chem. Eng. Res. Des. 69 (1991) 259–270.

[178] S. Schmidt, T. Liu, S. Rütten, K.-H. Phan, M. Möller, W. Richtering, Influence of Microgel Architecture and Oil Polarity on Stabilization of Emulsions by Stimuli-Sensitive Core–Shell Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) Microgels: Mickering versus Pickering Behavior?, Langmuir. 27 (2011) 9801–9806. https://doi.org/10.1021/la201823b.

[179] M. Destribats, V. Lapeyre, M. Wolfs, E. Sellier, F. Leal-Calderon, V. Ravaine, V. Schmitt, Soft microgels as Pickering emulsion stabilisers: role of particle deformability, Soft Matter. 7 (2011) 7689. https://doi.org/10.1039/c1sm05240c.

[180] I. Kalashnikova, H. Bizot, P. Bertoncini, B. Cathala, I. Capron, Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions, Soft Matter. 9 (2012) 952–959. https://doi.org/10.1039/C2SM26472B.

[181] J.C. Loudet, B. Pouligny, How do mosquito eggs self-assemble on the water surface?, Eur. Phys. J. E. 34 (2011) 76. https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11076-9.

[182] B.J. Park, D. Lee, Equilibrium Orientation of Nonspherical Janus Particles at Fluid−Fluid Interfaces, ACS Nano. 6 (2012) 782–790. https://doi.org/10.1021/nn204261w.

[183] G. Morris, S.J. Neethling, J.J. Cilliers, An investigation of the stable orientations of orthorhombic particles in a thin film and their effect on its critical failure pressure, J. Colloid Interface Sci. 361 (2011) 370–380. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.061.

[184] L. Meng, Y. Jiao, S. Li, Maximally dense random packings of spherocylinders, Powder Technol. 292 (2016) 176–185. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.01.036.

[185] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Shape-Anisotropic Colloids at Interfaces, Langmuir. 35 (2019) 3–20. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01139.

[186] L. Botto, E.P. Lewandowski, M. Cavallaro, K.J. Stebe, Capillary interactions between anisotropic particles, Soft Matter. 8 (2012) 9957. https://doi.org/10.1039/c2sm25929j.

[187] G. Morris, S.J. Neethling, J.J. Cilliers, A model for investigating the behaviour of non-spherical particles at interfaces, J. Colloid Interface Sci. 354 (2011) 380–385. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.039.

[188] R. Daniello, K. Khan, M. Donnell, J.P. Rothstein, Effect of contact angle on the orientation, stability, and assembly of dense floating cubes, Phys. Rev. E. 89 (2014) 023014. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.023014.

[189] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Contact angle and detachment energy of shape anisotropic particles at fluid-fluid interfaces, J. Colloid Interface Sci. 478 (2016) 63–71. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.060.

[190] E.P. Lewandowski, P.C. Searson, K.J. Stebe, Orientation of a Nanocylinder at a Fluid Interface, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 4283–4290. https://doi.org/10.1021/jp0563282.

[191] J.C. Loudet, A.G. Yodh, B. Pouligny, Wetting and Contact Lines of Micrometer-Sized Ellipsoids, Phys. Rev. Lett. 97 (2006) 018304. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.018304.

[192] L. Dong, D.T. Johnson, Adsorption of Acicular Particles at Liquid−Fluid Interfaces and the Influence of the Line Tension, Langmuir. 21 (2005) 3838–3849. https://doi.org/10.1021/la047851v.

[193] Y. Nonomura, S. Komura, K. Tsujii, Adsorption of Disk-Shaped Janus Beads at Liquid−Liquid Interfaces, Langmuir. 20 (2004) 11821–11823. https://doi.org/10.1021/la0480540.

[194] L. Isa, N. Samudrala, E.R. Dufresne, Adsorption of Sub-Micron Amphiphilic Dumbbells to Fluid Interfaces, Langmuir. 30 (2014) 5057–5063. https://doi.org/10.1021/la500463m.

[195] V.N. Paunov, Novel Method for Determining the Three-Phase Contact Angle of Colloid Particles Adsorbed at Air−Water and Oil−Water Interfaces, Langmuir. 19 (2003) 7970–7976. https://doi.org/10.1021/la0347509.

[196] S. Coertjens, P. Moldenaers, J. Vermant, L. Isa, Contact Angles of Microellipsoids at Fluid Interfaces, Langmuir. 30 (2014) 4289–4300. https://doi.org/10.1021/la500888u.

[197] H. Lehle, E. Noruzifar, M. Oettel, Ellipsoidal particles at fluid interfaces, Eur. Phys. J. E. 26 (2008) 151–160. https://doi.org/10.1140/epje/i2007-10314-1.

[198] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Shape-Induced Deformation, Capillary Bridging, and Self-Assembly of Cuboids at the Fluid–Fluid Interface, Langmuir. 33 (2017) 791–801. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03866.

[199] E.P. Lewandowski, M. Cavallaro, L. Botto, J.C. Bernate, V. Garbin, K.J. Stebe, Orientation and Self-Assembly of Cylindrical Particles by Anisotropic Capillary Interactions, Langmuir. 26 (2010) 15142–15154. https://doi.org/10.1021/la1012632.

[200] E.P. Lewandowski, J.A. Bernate, P.C. Searson, K.J. Stebe, Rotation and Alignment of Anisotropic Particles on Nonplanar Interfaces, Langmuir. 24 (2008) 9302–9307. https://doi.org/10.1021/la801167h.

[201] S. Jordens, L. Isa, I. Usov, R. Mezzenga, Non-equilibrium nature of two-dimensional isotropic and nematic coexistence in amyloid fibrils at liquid interfaces, Nat. Commun. 4 (2013) 1917. https://doi.org/10.1038/ncomms2911.

[202] B. Madivala, J. Fransaer, J. Vermant, Self-Assembly and Rheology of Ellipsoidal Particles at Interfaces, Langmuir. 25 (2009) 2718–2728. https://doi.org/10.1021/la803554u.

[203] B.P. Binks, J.H. Clint, G. Mackenzie, C. Simcock, C.P. Whitby, Naturally Occurring Spore Particles at Planar Fluid Interfaces and in Emulsions, Langmuir. 21 (2005) 8161–8167. https://doi.org/10.1021/la0513858.

[204] P. Wongkongkatep, K. Manopwisedjaroen, P. Tiposoth, S. Archakunakorn, T. Pongtharangkul, M. Suphantharika, K. Honda, I. Hamachi, J. Wongkongkatep, Bacteria Interface Pickering Emulsions Stabilized by Self-assembled Bacteria–Chitosan Network, Langmuir. 28 (2012) 5729–5736. https://doi.org/10.1021/la300660x.

[205] Y. Zhang, Z. Chen, W. Bian, L. Feng, Z. Wu, P. Wang, X. Zeng, T. Wu, Stabilizing oil-in-water emulsions with regenerated chitin nanofibers, Food Chem. 183 (2015) 115–121. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.030.

[206] L. Zhang, Z. Li, L. Wang, D. Sun, High temperature stable W/O emulsions prepared with in-situ hydrophobically modified rodlike sepiolite, J. Colloid Interface Sci. 493 (2017) 378–384. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.056.

[207] S. Fujii, M. Okada, T. Furuzono, Hydroxyapatite nanoparticles as stimulus-responsive particulate emulsifiers and building block for porous materials, J. Colloid Interface Sci. 315 (2007) 287–296. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.071.

[208] N. Briggs, A.K.Y. Raman, L. Barrett, C. Brown, B. Li, D. Leavitt, C.P. Aichele, S. Crossley, Stable pickering emulsions using multi-walled carbon nanotubes of varying wettability, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 537 (2018) 227–235. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.010.

[209] S.V. Daware, M.G. Basavaraj, Emulsions Stabilized by Silica Rods via Arrested Demixing, Langmuir. 31 (2015) 6649–6654. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00775.

[210] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, General destabilization mechanism of pH-responsive Pickering emulsions, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 30790–30797. https://doi.org/10.1039/C7CP04665K.

[211] B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions, Soft Matter. 5 (2009) 1717. https://doi.org/10.1039/b816680c.

[212] I. Capron, B. Cathala, Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals, Biomacromolecules. 14 (2013) 291–296. https://doi.org/10.1021/bm301871k.

[213] F. Tu, B.J. Park, D. Lee, Thermodynamically Stable Emulsions Using Janus Dumbbells as Colloid Surfactants, Langmuir. 29 (2013) 12679–12687. https://doi.org/10.1021/la402897d.

[214] R. Koike, Y. Iwashita, Y. Kimura, Emulsion Droplets Stabilized by Close-Packed Janus Regular Polygonal Particles, Langmuir. 34 (2018) 12394–12400. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02323.

[215] M. Kaganyuk, A. Mohraz, Shear-induced deformation and interfacial jamming of solid-stabilized droplets, Soft Matter. 16 (2020) 4431–4443. https://doi.org/10.1039/D0SM00374C.

CHAPITRE 2

Préparation de nanoparticules polymères anisotropes

Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons détaillé les paramètres influençant les caractéristiques des émulsions de Pickering. Nous avons à cette occasion démontré l'intérêt des particules non sphériques dans la stabilisation des émulsions de Pickering. L'anisotropie des particules peut notamment être source d'une grande stabilité des émulsions qu'elles stabilisent, ce qui en fait des stabilisants très prometteurs.

Nous proposons à présent de décrire les différentes méthodes de fabrication de ces particules non sphériques. Nos travaux portant principalement sur des matériaux polymères, nous limiterons cette synthèse bibliographique aux seules méthodes impliquant des particules polymères. Précisons que ces dernières seront considérées dans leur ensemble : nous traiterons tout autant des particules solides, qui ne gonflent pas dans le solvant, que des particules de type « gel » (nanogels, microgels), qui gonflent dans le solvant (notamment dans la phase aqueuse).

Dans un premier temps, nous présenterons un ensemble de méthodes de production de particules anisotropes à partir de particules sphériques préalablement formées. Viendront ensuite les méthodes permettant de produire des particules non sphériques *de novo*. Enfin, une dernière partie fera la synthèse des différents matériaux utilisés, et de leur pertinence dans le contexte pharmaceutique qui nous intéresse pour ce projet.

1. Généralités

Dans la grande majorité des cas, les systèmes particulaires sont constitués d'éléments sphériques. Néanmoins, de nombreux travaux soulèvent aujourd'hui les avantages que peuvent avoir des particules non sphériques, dans des domaines d'application très variés. La photonique est un des exemples les plus souvent cités, avec le développement de cristaux colloïdaux. Ces matériaux sont percés de canaux qui servent à conduire un signal lumineux sans déperdition de photon. En effet, un cristal colloïdal est caractérisé par une « fréquence interdite » : la lumière ondulant à cette fréquence ne peut pas pénétrer le cristal colloïdal entourant les canaux, et se voit forcée de circuler uniquement dans ces derniers [1]. La gamme de fréquences interdites dépendant de la structure cristalline, l'utilisation de particules de différentes formes est intéressante car elle permet

des structures cristallines variées, et donc d'ajuster la bande interdite du matériau [2–4]. La préparation de microgels anisotropes est aussi un axe de développement original dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. En effet, l'anisotropie de tels microgels (encapsulant des cellules) leur confère des caractéristiques d'assemblage pouvant conduire, *in fine*, à la formation d'organes artificiels [5].

Le paramètre de forme peut aussi avoir une importance lorsque les particules sont utilisées comme vecteurs médicamenteux. En effet, il peut avoir une influence sur la trajectoire des particules dans le flux sanguin, leur adhésivité aux parois vasculaires et leur internalisation cellulaire [6]. L'influence de la forme des particules sur leur internalisation est probablement le phénomène le plus étudié, mais semble encore largement incompris, tant les résultats sont contradictoires d'une étude à l'autre. Les cylindres, qui sont les particules anisotropes les plus utilisées, sont parfois moins bien internalisées que les sphères [7,8], parfois mieux [9–11]. Il semblerait que les conditions expérimentales aient une influence majeure sur le résultat, et des études supplémentaires sont nécessaires. Champion *et al.* suggèrent aussi que des particules anisotropes pourraient offrir une cinétique de libération d'actifs encapsulés différente des particules sphériques [12]. En effet, Safari *et al.* montrent que, pour des particules d'un volume donné, la forme cylindrique permettrait une libération d'actif plus rapide que des sphères, du fait d'une surface plus importante [13]. Fan *et al.* notent une absence de *burst release* (c'est-à-dire d'une libération très rapide en début de cinétique) avec les cylindres [14]. Ce constat n'est cependant pas partagé par tous les auteurs [13].

Enfin, l'utilisation de particules peut aussi trouver son intérêt dans la stabilisation d'émulsions de Pickering, quel que soit l'usage de ces dernières [15,16]. On a ainsi vu dans le chapitre 1 que l'emploi de telles particules pouvait engendrer des déformations de l'interface, et donc générer des interactions capillaires entre les particules. Cela peut notamment avoir pour effet une augmentation de la stabilité des émulsions, par augmentation de l'élasticité de l'interface [17]. L'utilisation de particules en forme de « plaquettes » permet aussi de stabiliser des gouttelettes de formes non sphériques [18]. Par ailleurs, certaines particules appelées microbols permettraient un contrôle du sens de l'émulsion, en piégeant l'une des deux phases dans leur cavité [19].

Dans une revue de littérature, Yu *et al.* décrivent un large panel de particules non sphériques constituées de divers polymères [20], et en propose une classification en quatre classes principales, qui sont *(i)* les particules régulières (ellipsoïdes, cylindres,

disques, *etc.*), *(ii)* les particules irrégulières (particules en forme de framboise, de confettis, *etc.*), *(iii)* les particules poreuses et *(iv)* et les particules Janus (Figure 1). A noter que les auteurs. considèrent toutes les particules Janus comme non sphériques. Or, les particules Janus sont par définition anisotropes chimiquement, mais peuvent tout de même être isotropes morphologiquement, et donc sphériques. Dans cette courte synthèse bibliographique, le cas des particules Janus sphériques ne sera pas abordé.

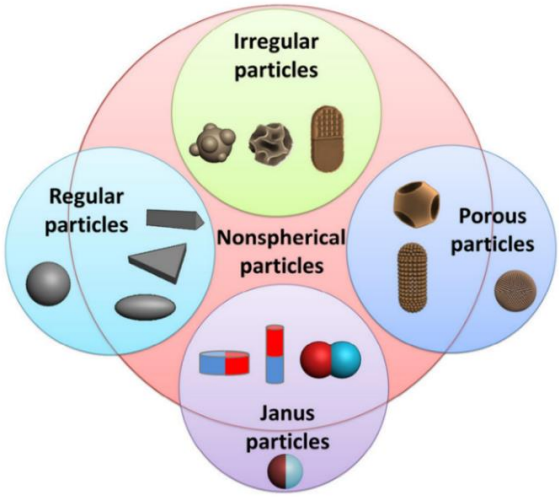


Figure 1 : Classification des particules polymères non sphériques selon Yu *et al.* [20].

La sphère est la forme permettant à un système de minimiser sa surface et donc son énergie interfaciale, pour un volume donné. Les procédés classiques de préparation de particules mettent bien souvent en jeu des phénomènes de tension de surface, ce qui favorise largement la formation de sphères [20]. Ainsi, hormis pour quelques exemples de particules anisotropes naturelles (comme certaines nanofibres de cellulose extraites par hydrolyse de la biomasse [21]), la production de telles particules nécessite le développement de procédés innovants. L'enjeu de cette synthèse est de rassembler les articles traitant de ces procédés, en en décrivant le principe et en donnant des exemples de particules polymères anisotropes qui en résultent. Précisons que la grande variété de formes possibles conduit parfois les auteurs à utiliser un vocabulaire très imagé pour décrire les particules obtenues. Dans la mesure du possible, nous illustrerons cette revue par des images de microscopie qui aideront le lecteur à s'imaginer les formes présentées. Un certain nombre de formes sont cependant retrouvées très fréquemment ; les plus couramment étudiées ont été décrites dans le tableau 1 du chapitre 1, section 4.

2. Préparation de particules polymères anisotropes à partir de particules sphériques préformées

2.1. Préparation par étirement de film polymère

Une des méthodes les plus courantes pour préparer des particules polymères anisotropes est celle de l'étirement de film, proposée initialement par Ho *et al.* [22]. Selon cette méthode, il convient d'abord d'incorporer les particules sphériques (de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres) dans une solution de polymère, souvent de l'alcool polyvinylique [22–26], mais aussi parfois du poly(diméthylsiloxane) [27]. Cette solution est ensuite étalée sur une surface, et séchée, pour obtenir un film. Le film est alors amené à une température supérieure à la température de transition vitreuse du matériau composant les nanoparticules, et subit une traction : cela entraîne son étirement et la déformation des particules qui y sont incluses. L'amplitude d'étirement peut aller jusqu'à 120 % [14], voire plus de 200 % dans certaines études [25]. La température peut ensuite être diminuée, afin de fixer la forme étirée des particules. Le film est enfin dissout pour récupérer les particules anisotropes. Ho *et al.* furent ainsi les premiers à produire des particules de polystyrène ellipsoïdes de quelques micromètres par cette méthode [22]. D'autres auteurs ont utilisé la même méthode pour produire des ellipsoïdes cœur-couronne de polystyrène-poly(*N*-isopropylméthacrylamide) [25], ou encore des ellipsoïdes de poly(méthacrylate de méthyle) [27]. Des nanoparticules peuvent aussi être allongées par cette méthode~~s~~, comme les particules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) de Palazzo *et al.* [26]. Notons la proposition de Champion *et al.* d'étirer le film polymérique à température ambiante dans un premier temps, pour ensuite monter la température dans un deuxième temps. Ils suggèrent aussi l'utilisation de solvants, notamment pour conférer aux nanoparticules des plis ou des pores [23]. En utilisant ces méthodes, seules ou combinées entre elles, ces auteurs démontrent qu'il est possible de donner à des particules de polystyrène un très grand nombre de formes (Figure 2).

Fan *et al.* démontrent par ailleurs pour des particules de poly(lactide-*co*-glycolide)-*bloc*-poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA-PEG-PLGA, aussi appelé PLGE) de 70 à 130 nm que l'étirement à chaud donne plutôt des cylindres, quand l'étirement à froid (avec un chauffage après l'étirement) conduit plutôt à des ellipsoïdes. Ils démontrent aussi que plus l'amplitude d'étirement du film est importante, plus le

rapport d'aspect des particules finales est élevé. Ce rapport d'aspect n'est cependant pas seulement influencé par l'amplitude d'étirement : la viscosité des polymères formant les particules, l'épaisseur du film, et les forces d'adhésion entre les particules et le film sont autant de paramètres clés [23].

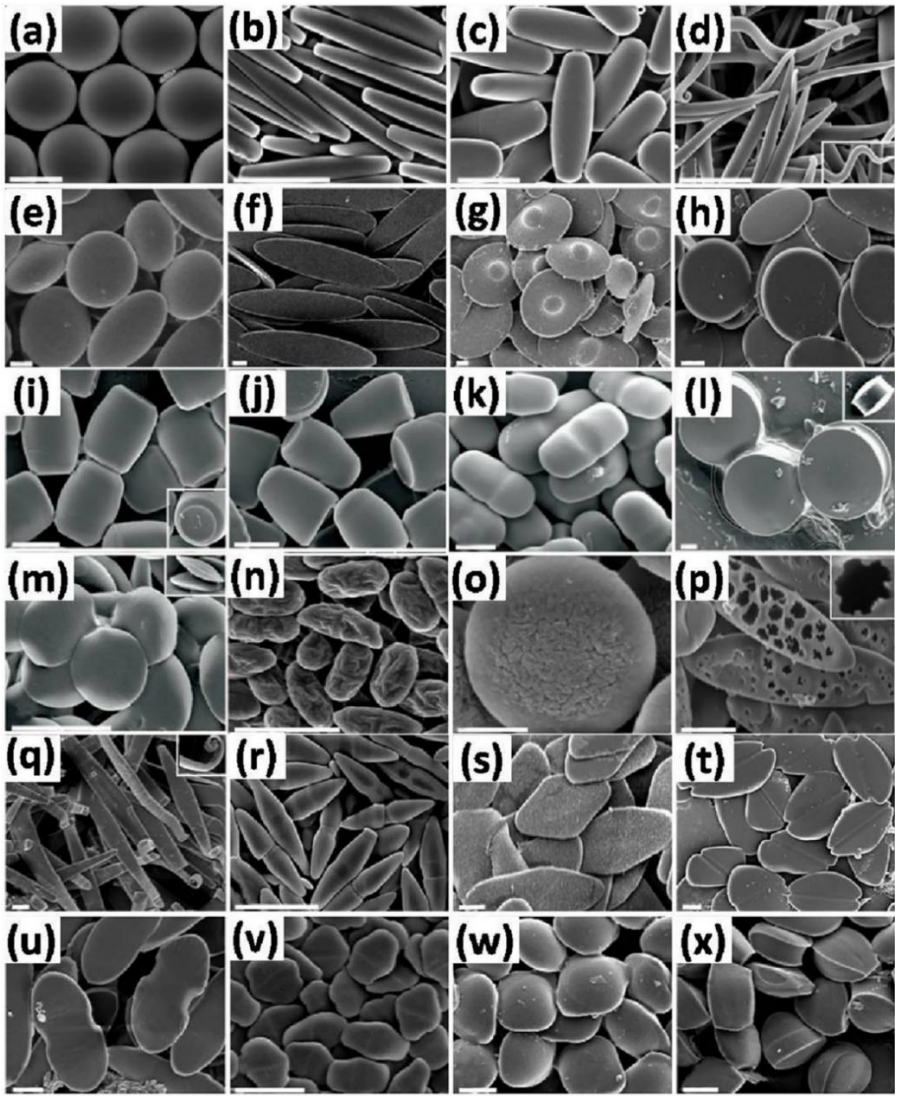


Figure 2 : Image des particules polymères anisotropes obtenues par étirement de film, observés en MEB. Un chauffage concomitant à l'étirement permet l'obtention de (a) sphères, (b) parallélépipèdes rectangles, (c) cylindres, (d) filoparticules, (e) ovoïdes, (f) disques ellipsoïdes, (g) soucoupes, et (h) disques. Un chauffage postérieur à l'étirement à froid permet l'obtention de (i) tonneaux, (j) balles, (k) « gélules », (l) poulies, et (m) lentilles biconvexes. Divers autres protocoles d'étirement ont été suivis pour l'obtention des (n) ellipsoïdes plissés, (o) ovoïdes aplatis plissés, (p) disques ellipsoïdes poreux, (q) rubans bouclés, (r) bicônes, (s) disques en diamant, (t) disques échancrés, (u) « gélules plates », (v) disques hexagonaux allongés, (w) raviolis, et (x) tacos. Les barres d'échelle représentent 2 µm, sauf pour (o), où elle représente 400 nm (figure adaptée de Champion *et al.* [23] par Yu *et al.* [20]).

2.2. Polymérisation au sein d'un matériau poreux

Une méthode analogue à la méthode de la cire perdue, notamment utilisée en fonderie d'art, peut être utilisée pour faire des nanoparticules anisotropes. Des nanoparticules de silice sphériques sont déposées sur un substrat pour former un cristal colloïdal. Ce substrat est ensuite plongé dans une solution de méthacrylate de méthyle ou de styrène, et la polymérisation est alors initiée dans les espaces interparticulaires du cristal colloïde. La dégradation des nanoparticules de silice par de l'acide fluorhydrique laisse alors des cavités, formant ainsi un matériau poreux, pouvant servir de moule pour former de nouvelles nanoparticules. Les pores peuvent avoir des tailles allant de 50 à 400 nm, notamment en fonction de la taille des particules de silice utilisées, de la viscosité de la solution de monomère (qui va conditionner sa pénétration dans le cristal colloïde), et de la tendance du polymère à se contracter au séchage [28]. Le matériau poreux obtenu peut alors être déformé (par pression notamment) pour donner aux porosités une forme ellipsoïde. La structure peut alors être remplie d'une solution de pyrrole afin de produire des nanocapsules ellipsoïdes de polypyrrole au sein des pores déformés. Des particules métalliques peuvent aussi être produites par cette méthode. La récupération des particules néoformées se fait alors par la destruction du moule poreux, en le dissolvant ou en le chauffant [29].

2.3. Démouillage d'une phase liquide non miscible

Il est aussi possible de mettre à profit le phénomène de démouillage d'un polymère par un solvant pour déformer des particules sphériques souvent de taille micrométrique. Ce phénomène met en jeu la notion de *Upper Critical Solution Temperature* (UCST) d'un couple solvant-polymère. Cette température est celle au-dessus de laquelle un polymère est soluble en toute proportion dans le solvant étudié [30]. Certains auteurs suspendent des particules de polystyrène de 3 µm dans un mélange méthanol-eau. Du décane, immiscible à la phase continue, est ensuite ajouté au mélange. La température est alors augmentée à 60°C : l'UCST du couple décane-polystyrène étant dépassée, les particules se gonflent alors du décane, tout en restant sphériques. Puis l'échantillon est refroidi, entraînant la séparation de phase entre le décane et le mélange méthanol-eau, et des gouttelettes de décane se forment en surface des particules de polystyrène. La température de transition vitreuse du polystyrène est de 29°C en présence de décane, soit bien en-dessous de 60°C. Le démouillage progressif permet donc la déformation de la particule, qui se fige dans un état déformé une fois tout le décane extrait [31,32]

(Figure 3). La marque laissée par le décane est un creux, de largeur différente selon les paliers de température choisis au cours du procédé. Une autre équipe passe par la préparation d'une émulsion multiple eau-dans-phase organique-dans-eau pour générer des irrégularités en surface de particules sphériques de polylactide. Brièvement, le polymère contenu dans la phase organique précipite à l'évaporation de celle-ci, formant des particules de plus de 20 µm. Au cours de cette évaporation, les gouttelettes internes d'eau se placent en périphérie de la particule nouvellement formée, par démouillage partiel. Elles déforment ainsi la surface et génèrent plus d'une dizaine de surélévations par particules, donnant à ces dernières un aspect bosselé [33].

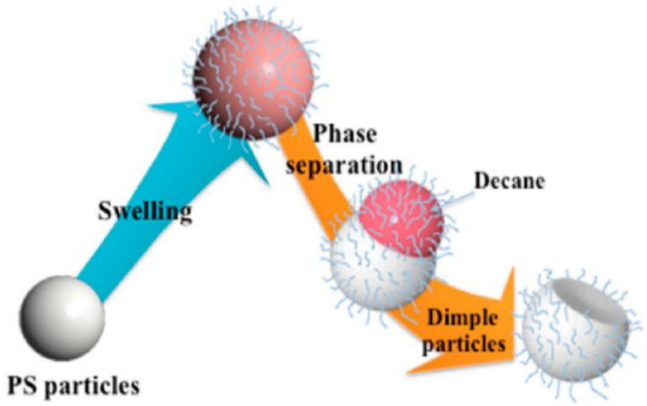


Figure 3 : Représentation schématique de la formation d'une particule creusée par gonflement d'une microsphère de PS, suivi d'une séparation de phase entre polystyrène et décane (figure issue de Kim *et al.* [32]).

2.4. Agrégation de particules sphériques

Une autre méthode pour former de particules polymères anisotropes consiste simplement à agréger des particules sphériques entre elles, de façon contrôlée. Des particules de polystyrène ont par exemple été piégées dans des pores de taille calibrée, puis chauffées au-dessus de la température de transition vitreuse du polymère. Les particules ont ainsi été solidarisées, donnant des agrégats de 2 à 7 lobes, et d'une taille totale de 1 ou 2 µm [34]. Il est aussi possible d'agréger des nanogels sphériques entre eux, en déclenchant leur réticulation chimique. Hasegawa *et al.* ont ainsi mis à profit la réaction de Michael pour générer des particules en forme de framboise d'une centaine de nanomètres à partir de nanogels sphériques de 18 nm [35].

Ces structures agrégées peuvent être utilisées telles qu'elles ou modifiées après agrégation, pour obtenir des formes plus complexes encore. Par exemple, certains auteurs forment des agrégats micrométriques de deux à sept particules de silice sphériques avant d'initier la polymérisation radicalaire de méthacrylate de 3-triméthoxysilylpropyle autour de ces agrégats. Le retrait des particules sphériques donne alors des particules à cavités multiples (Figure 4) [36]. Cette méthode a aussi été utilisée pour produire des particules de polystyrène en étoile [37].

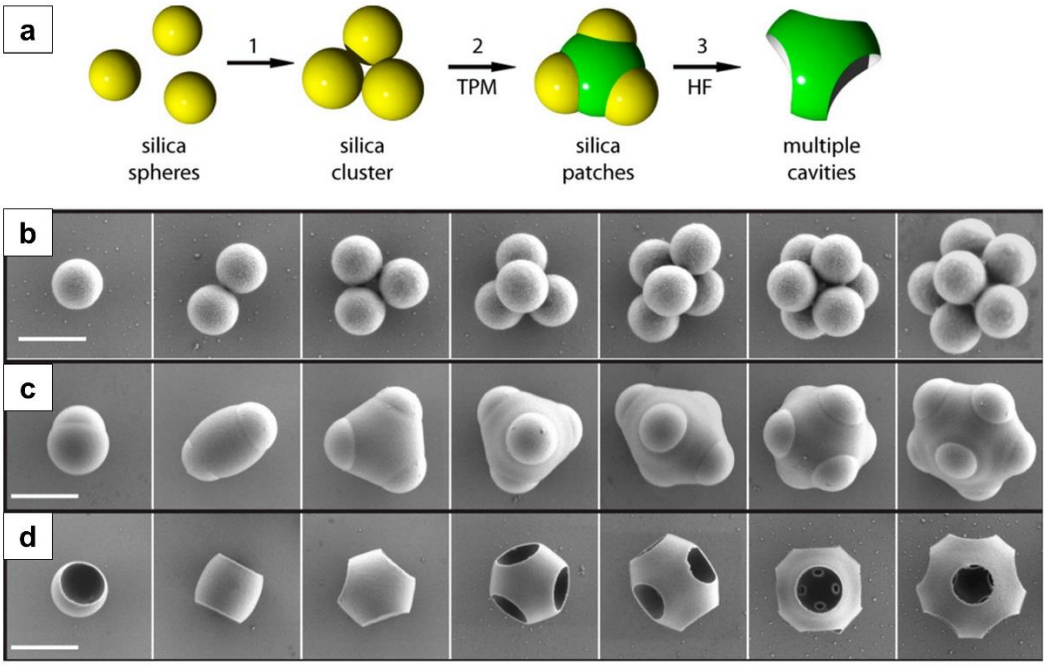


Figure 4 : Préparation de particules à cavités multiples. (a) Une particule à trois cavités est donnée en exemple pour détailler le procédé : 1 - l'agrégat de trois particules de silice est formé par émulsion-encapsulation ; 2 - L'agrégat est partiellement encapsulé par polymérisation de méthacrylate de 3-triméthoxysilylpropyle (TPM) ; 3 - Les particules de silice sont retirées par traitement) l'acide fluorhydrique. Les images de MEB sont montrées pour (b) les agrégats de silices, (c) les mêmes agrégats partiellement encapsulés après polymérisation du TPM, et (d) les particules anisotropes finales, à cavités multiples. Barres d'échelle : 1 µm (figure adaptée de Wang *et al.* [36]).

Une méthode relativement similaire et particulièrement élégante, avec deux niveaux d'agrégation, est proposée par Pine et Weck. De petits agrégats de particules sphériques de polystyrène sont d'abord formés, et gonflés de styrène. La polymérisation du styrène est alors initiée, et contrôlée jusqu'à générer des structures similaires à celles présentées en Figure 4c. Les parties émergées des particules de polystyrène sont alors recouvertes d'ADN monobrin (lié à la surface par un système biotine-streptavidine), formant ainsi des

zones d'attache pour d'autres particules portant des ADN monobrin complémentaires. Les auteurs sont ainsi capables de faire agréger des particules, avec une spécificité de liaison (seul des brins complémentaires peuvent interagir) et une spécificité de direction (seules les zones fonctionnalisées avec de l'ADN peuvent interagir). Il leur est alors possible de construire des structures de formes variées, en empilant simplement les blocs [38].

2.5. Polymérisation assistée par ensemencement

Dans la littérature, plusieurs méthodes de polymérisation assistée par ensemencement (c'est-à-dire initiée sur des particules solides préformées) conduisant à des particules anisotropes sont décrites. La méthode la plus largement employée, souvent appelée « méthode de gonflement dynamique », a été décrite en 1990 par Sheu *et al.* [39], avec la polymérisation radicalaire conventionnelle de styrène sur des particules sphériques de polystyrène de 5 µm. Dans une suspension aqueuse de particules polymères, le monomère liquide est ajouté. A température ambiante, les particules se gonflent de monomères jusqu'à atteindre un équilibre. Elles sont alors encore sphériques. La température est alors augmentée, jusqu'à dépasser la *Lower Critical Solution Temperature* (LCST) du couple polymère-monomère. Brièvement, de nombreux mélanges polymère-polymère ou solvant-polymère présentent une LCST à la place ou en plus de l'UCST [40]. Au-dessus de cette température critique, le mélange des deux composants n'est plus possible en toute proportion [30]. Ainsi, le potentiel chimique du monomère liquide (se comportant donc comme un solvant) dans la particule est positif, et induit le démélange du monomère et du polymère, avec une contraction des chaînes polymères. Ces dernières expulsent en périphérie de la particule un nucléus densément concentré en monomère, au sein duquel la polymérisation est initiée par la haute température. Un flux continu de monomère s'établit alors vers le nucléus, qui grossit jusqu'à donner un deuxième lobe de polymère à la particule. Les couples monomère/polymère utilisables pour l'application de ce procédé sont rassemblés dans le Tableau 1. Les particules d'ensemencement peuvent être des nanoparticules (100-400 nm) [41–45] ou des microparticules (1-7 µm) [46–51], et les nucléi formés sont en général du même ordre de grandeur que particule qui les porte.

Tableau 1 : Matériaux utilisés dans la préparation de particules polymères anisotropes par polymérisation assistée par ensemencement

Polymère composant les particules d'ensemencement	**Monomère utilisé pour gonfler les particules**	**Initiateur de la polymérisation radicalaire**	**Référence**
Polystyrène	Styrène + Divinylbenzène (réticulant)	Peroxyde de benzoyle	[46]
Polystyrène	Méthacrylate de n-butyle	2,2-azobisisobutyronitrile	[47]
Polystyrène	3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane	Persulfate de potassium	[41]
Polystyrène	Méthacrylate d'hexyle Méthacrylate de 2-éthylhexyle Méthacrylate de lauryle	2,2-azobisisobutyronitrile	[48]
Polystyrène réticulé par le divinylbenzène	Styrène	Pas de polymérisation	[49]
Polystyrène réticulé par le divinylbenzène	Styrène Divinylbenzène Méthacrylate de méthyle Méthacrylate d'éthyle Méthacrylate de butyle	Pas de polymérisation	[50]
Core : polystyrène Shell : poly(styrène-*co*-acrylate de triméthoxysilylpropyle)	Styrène + 4-vinylbenzenesulfonate (réticulant)	2,2-azobisisobutyronitrile	[42]
Core : polystyrène réticulé par le divinylbenzène Shell : poly(acétate de vinyle) ou poly(acide acrylique)	Styrène	2,2-azobisisobutyronitrile	[43]
Poly(méthacrylate de méthyle)	Styrène	2,2-azobisisobutyronitrile	[51]
Poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle-*co*-méthacrylate de méthyle)	Styrène + Méthacrylate de glycidyle	Dichlohydrate de 2,2'-azobis(2-amidinopropane)	[44]
Poly(fluorure de vinylidène)	4-vinylpyridine	Persulfate de potassium	[45]

Lorsque tous les lobes composant la particule sont composés du même polymère, on obtient des particules anisotropes, mais chimiquement homogènes. Notons qu'il est cependant difficile d'obtenir une anisotropie importante dans de telles conditions, car le nucléus de monomère mouille relativement bien la particule sphérique d'ensemencement [43]. Mock *et al.* sont cependant parvenus à réaliser des particules en haltère avec deux lobes de polystyrène bien définis. La particule d'ensemencement devait pour cela subir un enrobage préalable avec un polymère hydrophile, modifiant complètement la nature chimique de sa surface. L'angle de contact entre la particule d'ensemencement et le nucléus de monomère est ainsi augmenté, générant un deuxième lobe plus détaché de la particule initiale (Figure 5) [43]. De fait, lorsque les particules d'ensemencement et les lobes nouvellement formés sont de polarité différente, on obtient alors des particules Janus avec bien souvent des lobes très démarqués. L'ajout de tensioactifs dans la phase continue peut aussi affecter les tensions interfaciales intervenant dans le système, et donc le mouillage du nucléus sur la particule d'ensemencement. Okubo *et al.* montrent ainsi que la présence d'alcool polyvinylique (un polymère plutôt hydrophile) dans le milieu augmente l'angle de contact entre un nucléus de styrène et une particule de polystyrène réticulée par du divinylbenzène. La forme finale de la particule en est impactée, donnant des lobes mieux séparés [50]. La densité de réticulation des particules d'ensemencement, qui conditionne notamment leurs propriétés de gonflement, a aussi une influence sur l'angle de contact entre le nucléus et la particule. En effet, des particules de polystyrène réticulé avec des concentrations croissantes en divinylbenzène gonflent de moins en moins en présence de styrène. Les particules les plus réticulées donnent alors un nucléus de monomère plus volumineux, avec un angle de contact plus élevé, même sans augmentation de température [49].

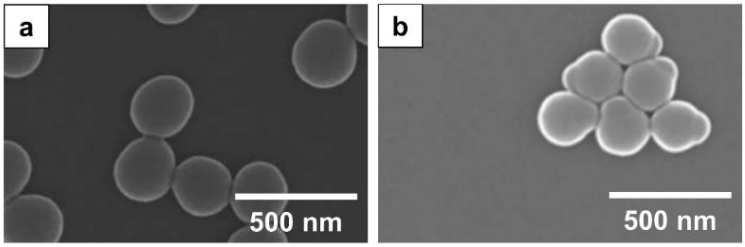


Figure 5 : Images de MEB de nanoparticules de polystyrène après gonflement-polymérisation de styrène, (a) sans modification préalable de la particule sphérique de polystyrène, et (b) avec un enrobage préalable de la particule sphérique par du poly(acétate de vinyle) (figure adaptée de Mock *et al.* [43]).

D'autres paramètres intervenant dans le procédé de préparation peuvent aussi influencer la forme finale des particules. Ainsi, des concentrations croissantes en monomères conduisent à l'augmentation du volume de ce lobe, voire à l'apparition simultanée de plusieurs lobes [46]. Le nombre de lobes finaux peut aussi être affectés par la vitesse d'agitation du milieu de polymérisation. Selon Yan *et al.*, une forte agitation mécanique (250 rpm) favoriserait le flux de monomère vers les nucléi, rendant ces derniers moins visqueux donc plus mobiles et plus susceptibles de fusionner entre eux. Ces conditions permettent la formation de particules à deux lobes (en forme d'haltères si les lobes sont de taille similaire, ou de bonhomme de neige si les lobes sont de taille différente). A l'inverse, une faible agitation mécanique (150 rpm) ne permettrait pas aux nucléi de fusionner, donnant des particules à trois lobes appelés « cylindre triple » [45].

En dehors des particules en haltère ou en bonhomme de neige, qui sont les formes les plus souvent décrites avec la méthode de gonflement dynamique, il est possible d'obtenir des formes plus complexes, par exemple en répétant l'opération plusieurs fois pour obtenir de multiples lobes. A noter que la densité de réticulation relative entre les deux premiers lobes affecte l'orientation du troisième lobe. Ainsi, si les deux lobes d'une particule en haltère ont la même densité de réticulation, les forces élastiques pousseront le troisième lobe à se former entre les deux premiers lors de l'expulsion du nucléus de monomère, formant ainsi un trèfle. En revanche, si l'un des deux premiers lobes est plus réticulé que l'autre, alors l'expulsion des monomères se fait dans l'axe de l'haltère, donnant lieu à un « cylindre triple » (Figure 6) [52].

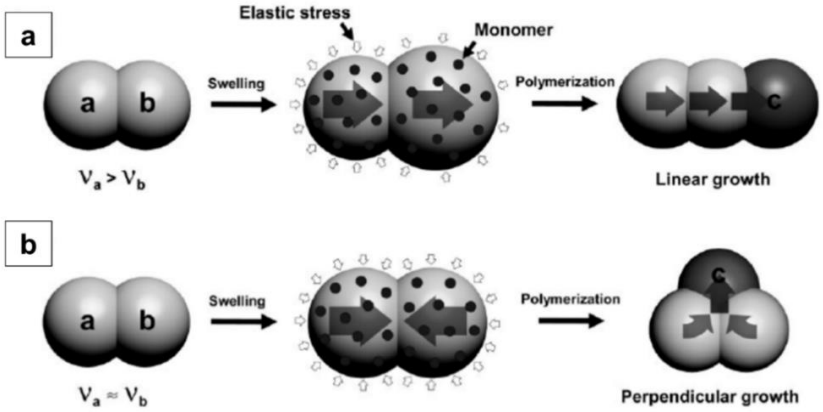


Figure 6 : Les particules à trois lobes sont préparées après la formation de particules en haltère par polymérisation assistée par ensemencement : (a) Croissance linéaire du lobe c lorsque le lobe a possède un taux de réticulation *v* supérieur à celui de b ; (b) Croissance perpendiculaire du lobe c lorsque les lobes a et b ont des taux de réticulation similaires (figure adaptée de Kim *et al.* [52]).

Certains auteurs proposent aussi d'ajouter des gouttelettes de solvant organique au système pour obtenir des formes originales. Par exemple, Okubo *et al.* ont formé des particules de polystyrène en forme de disque en ajoutant des gouttelettes de dodécane en plus du méthacrylate de lauryle (monomère). Ce solvant, en pénétrant les particules sphériques de polystyrène, agit comme un plastifiant en abaissant la température de transition vitreuse. Ainsi, lors du chauffage entraînant l'expulsion des nucléi et leur polymérisation, la température de transition du polystyrène est dépassée, permettant la déformation des particules d'ensemencement sous la contrainte imposée par les nucléi. Le retrait ultérieur du dodécane et des lobes néoformés donne des particules en forme de disque (Figure 7a) [48,53]. Dans le même groupe de recherche, des particules de poly(méthacrylate de méthyle) en forme de balle de golf ont été produites en ajoutant des gouttelettes de décaline au système. La décaline pénètre dans les particules sphériques à température ambiante, tout comme le monomère de styrène utilisé dans cette étude. Lorsque la température est augmentée, de nombreux nucléi contenant styrène et décaline sont expulsés tout autour de la particule. L'évaporation de la décaline entraîne alors un dépôt de polystyrène à la surface des particules. Ce dépôt, de la taille des nucléi de décaline/styrène, leur confére une rugosité importante et une apparence de balle de golf (Figure 7b) [51].

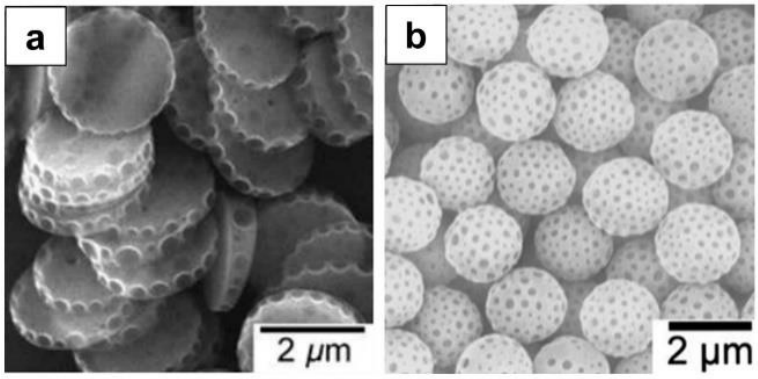


Figure 7 : Images de microscopie électronique à balayage de : (a) particules composites de Polystyrène (PS)/Poly(méthacrylate de lauryle) (PLMA) produites en présence de dodécane à partir de particules de PS discoïdes ; (b) particules composites de Poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA)/PS produites en présence de gouttelettes de décaline à partir de particules de PMMA (figure adaptée de Okubo *et al.* [48,51]).

Si la polymérisation par ensemencement passe bien souvent par la méthode de gonflement dynamique pour produire des particules polymères anisotropes, d'autres méthodes existent. Par exemple, une méthode relativement élégante proposée par Cong

et al. débouche sur la formation de particules creusées. Elle consiste à gonfler des particules de polystyrène avec du divinylbenzène, et de laisser ce dernier réticuler le polystyrène localement. Cette réticulation génère une zone unique à la surface des particules de polystyrène, très réticulée et donc plus résistante mécaniquement que le reste de la surface. La température est alors augmentée, en présence de styrène, afin d'initier la croissance des particules de polystyrène. Cependant, la croissance se faisant plus rapidement au niveau des parties molles que de la partie réticulée par le divinylbenzène, les particules finales, d'environ 1 µm de diamètre, ne sont pas sphériques mais creusées (Figure 8) [54].

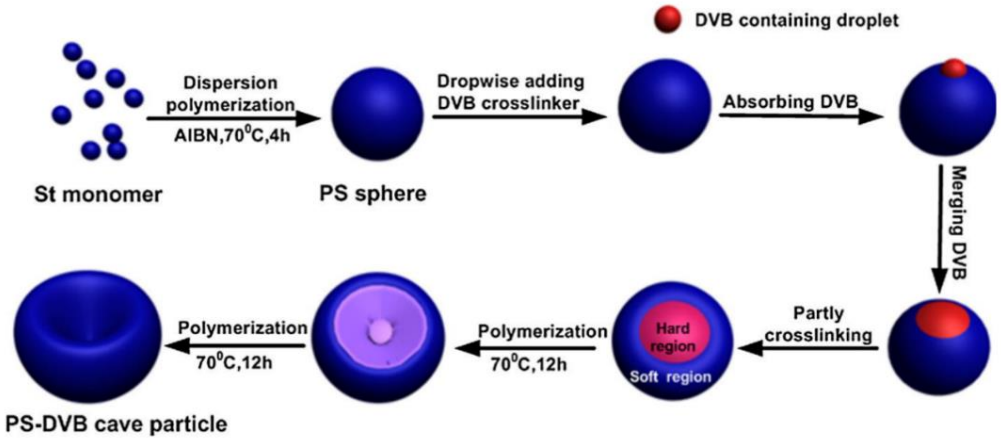


Figure 8 : Représentation schématique de la préparation de particules creusées de PS-DVB (St : Stryène ; PS : Polystyrène ; DVB : Dininylbenzène) (figure issue de [54]).

D'autre part, Weijgertze *et al.* proposent une méthode pour préparer des particules en forme de framboise (Figure 9). Des particules de polystyrène de 800 nm sont suspendues dans une solution de monomères, le méthacrylate de 3-(triméthoxysilyl)propyle. Ce dernier subit alors une réaction sol-gel débouchant sur une hétéronucléation à la surface des particules de polystyrène, *via* ses groupements silanols. La polymérisation radicalaire des groupements méthacrylates permet ensuite la stabilisation et la solidification de ces nucléi, d'une taille comprise entre 4 et 20 nm selon la quantité de 3-(triméthoxysilyl)propyle en jeu dans la réaction [55].

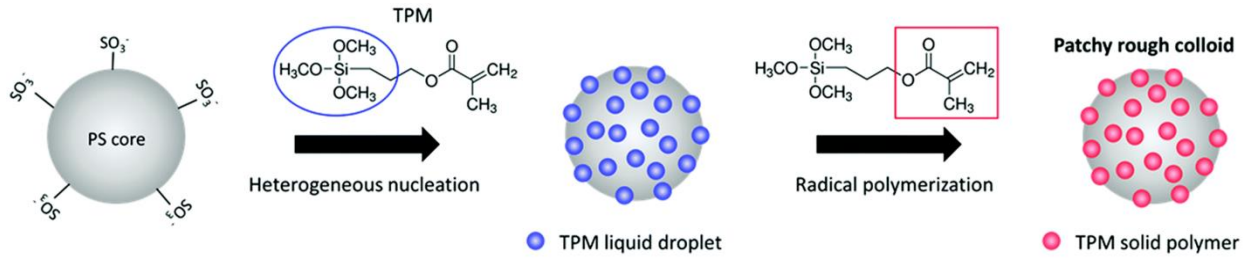


Figure 9 : Représentation schématique de la préparation de particules en forme de framboise, par hétéronucléation et polymérisation de méthacrylate de 3-(triméthoxysilyl)propyle (TPM) sur une particule de polystyrène (PS) (figure issue de Weijgertze *et al.* [55]).

Enfin, la polymérisation assistée par ensemencement permet aussi la production de particules en forme de champignons. Tanaka *et al.* ont initié une polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle par ensemencement avec des particules Janus dont l'un des hémisphères possédait une surface riche en brome (servant d'amorceur à la polymérisation). Une coque de poly(méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) est ainsi générée sur l'hémisphère bromé, donnant aux particules Janus d'environ 5 µm la forme de champignons [56].

3. Préparation de particules polymères anisotropes *de novo*

3.1. Auto-assemblage induit par la polymérisation (PISA)

La méthode la plus simple pour préparer des particules anisotropes *de novo* est l'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles au cours de leur polymérisation (une méthode appelée en anglais *Polymerisation-Induced Self-Assembly*, soit en abrégé PISA). Cette méthode consiste à synthétiser l'un des blocs sur un macro-initiateur, qui est en fait l'autre bloc, préformé. Les copolymères, qui ont tendance à s'auto-assembler en micelles, subissent une modification progressive de leur paramètre d'empilement tout au long de la synthèse. Ce paramètre, qui décrit la conformation du polymère en question, permet de prédire comment ce dernier s'organise lorsqu'il se retrouve en solution (Figure 10). En fonction de la masse molaire du bloc synthétisé, les copolymères peuvent ainsi s'assembler en sphères, en vésicules ou en particules allongées de type cylindre/filoparticule [57]. De nombreuses autres formes peuvent être produites, bien que plus rares, comme des croix ou des disques [58]. Cette méthode conduit la plupart du temps à des nanoparticules d'une ou plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre

pour les sphères, à quelques centaines de nanomètres de long pour les particules allongées. Les images des particules semblent suggérer que cette méthode est probablement celle qui permet l'obtention des rapports d'aspect les plus élevés, bien qu'ils soient rarement calculés.

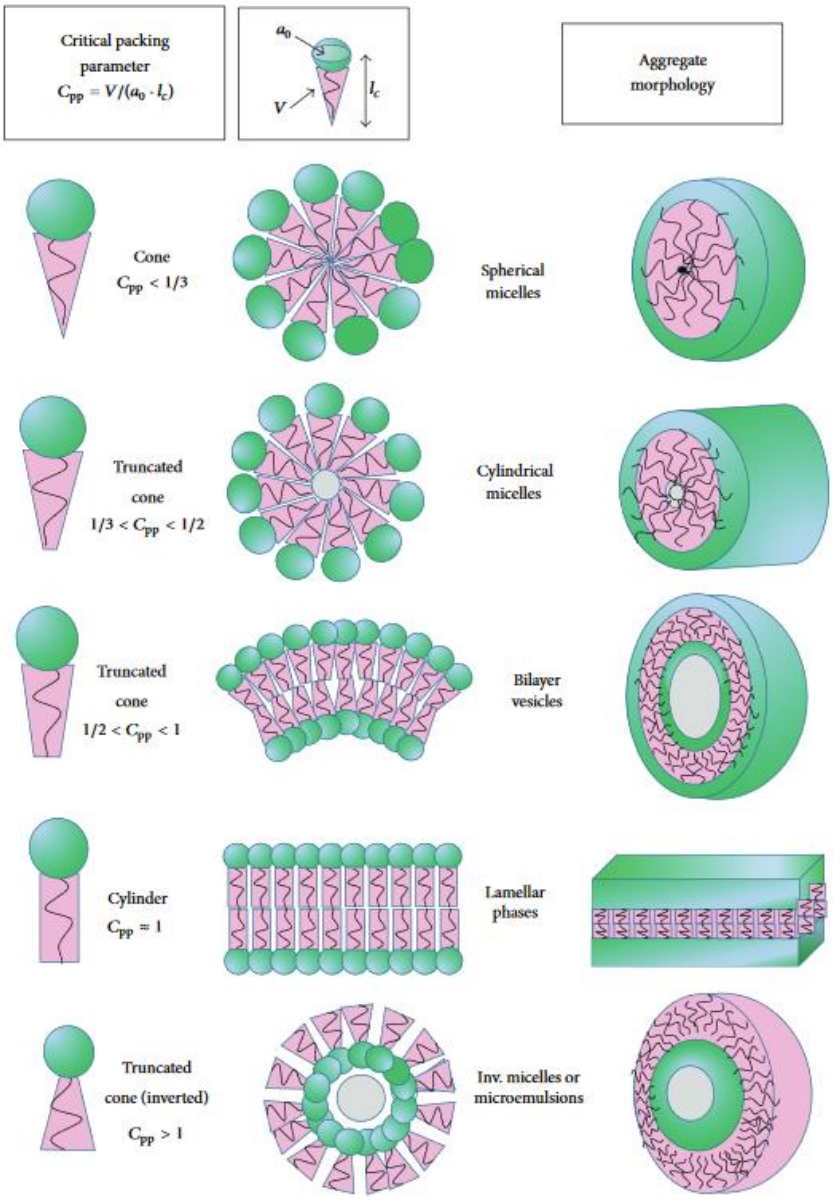


Figure 10 : Relation entre le paramètre d'empilement des molécules amphiphiles et la forme de leur assemblage (figure issue de Lombardo *et al.* [59]).

Blanazs *et al.* ont préparé des polymères diblocs en réalisant une polymérisation RAFT (Transfert Réversible par Addition-Fragmentation) de méthacrylate de 2-hydroxypropyle

sur une chaîne de poly(méthacrylate de glycérol) dans l'eau. La longueur du bloc poly (méthacrylate de 2-hydroxypropyle) détermine alors la forme des particules obtenues en fin de polymérisation : en augmentant progressivement la longueur de ce bloc, on obtient successivement des sphères, des filoparticules, et des vésicules sphériques. A noter que la forme peut aussi varier en fonction de la température, et ce de façon réversible. Ainsi, des filoparticules à 21°C peuvent devenir sphériques à 4°C, du fait d'une hydratation des fonctions méthyle donnant une courbure plus importante à l'interface [60]. Une étude similaire, réalisée par Fielding *et al.*, porte sur un polymère dibloc de poly(méthacrylate de lauryle)-*bloc*-poly(méthacrylate de benzyle). A l'issue de la polymérisation du méthacrylate de benzyle sur le bloc poly(méthacrylate de lauryle), le polymère s'auto-assemble, donnant des sphères pour les degrés de polymérisation les plus bas, des filoparticules ou des vésicules pour les degrés de polymérisation les plus hauts. Là encore, un changement de température induit une transition filoparticules-sphères. Cependant, cette transition se fait cette fois-ci en augmentant la température : cette augmentation permettrait la solvatation des parties les plus externes du cœur de poly(méthacrylate de benzyle), augmentant la courbure et générant des sphères. Cette solvatation température-dépendante serait due, selon les auteurs, à la LCST du polymère. Cette transition de forme serait par ailleurs réversible, mais seulement dans le cas de suspensions très concentrées en particules (20% w/w). La probabilité de rencontre entre deux sphères, supérieure dans une solution concentrée, serait à l'origine de cette réversibilité [57]. La transition réversible de filoparticules à sphères en fonction de la température a par ailleurs été observée avec des particules de polystyrène-*block*-polyisoprène, et certains auteurs suspectent la température de transition vitreuse de jouer un rôle dans cette dernière. Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée expérimentalement par les auteurs [61].

3.2. Précipitation de polymères préformés

Des particules anisotropes peuvent aussi être préparées par précipitation de copolymères préformés, souvent à l'issue d'un procédé d'émulsion-évaporation. Le polystyrène-*bloc*-poly(4-vinylpyridine) par exemple, tend à s'organiser en pile de disques, alternant les couches de polystyrène et de poly(4-vinylpyridine). La suspension de ces particules dans l'éthanol, un solvant sélectif du bloc poly(4-vinylpyridine), permet le désassemblage forcé de ces piles et l'obtention de disques Janus de 100 nm de diamètre pour 20 nm d'épaisseur [62]. Jeon *et al.* utilisent des polymères diblocs de

polystyrène-*bloc*-polybutadiène qui s'organisent en oignons, avec des couches concentriques alternant polystyrène et polybutadiène, dans un ordre contrôlé par la nature du tensioactif utilisé. En effet, si le tensioactif est un poly(éthylène glycol)-*bloc*-polybutadiène, alors la couche la plus externe des particules est une couche de polybutadiène. Inversement, si le tensioactif est un poly(éthylène glycol)-*bloc*-polystyrène, la couche la plus externe est faite de polystyrène. Mais quel que soit l'ordre, les particules sont sphériques et de taille comprise entre 500 nm et 1 µm. En revanche, en mélangeant ces deux tensioactifs, les particules obtenues sont des ellipsoïdes dont les couches ne sont plus concentriques, mais superposées (Figure 11) [63].

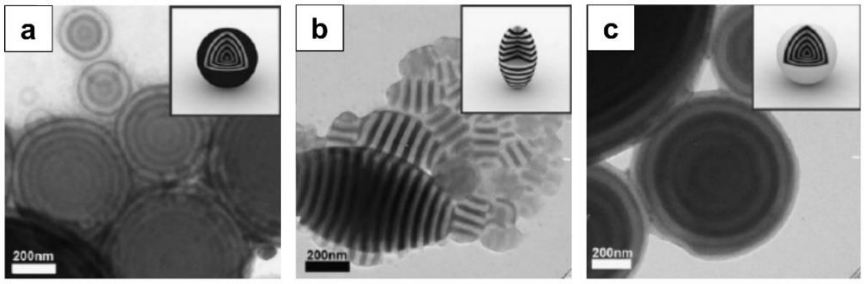


Figure 11 : Images de MEB montrant (a) des particules en oignon préparées avec le poly(éthylène glycol)-*bloc*-polybutadiène comme tensioactif ; (b) des particules ellipsoïdes rayées préparées avec un mélange de tensioactif de 54% poly(éthylène glycol)-*bloc*-polybutadiène pour 46% de poly(éthylène glycol)-*bloc*-polystyrène ; (c) des particules en oignon préparées avec le poly(éthylène glycol)-*bloc*-polystyrène comme tensioactifs. Les images dans les inserts sont des schémas représentant la particule en 3D (figure adaptée de Jeon *et al.* [63]).

D'autres auteurs utilisent le poly(lactide-*co*-glycolide)-*bloc*-poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGE) pour préparer des particules sphériques ou ellipsoïdes. Le rapport d'aspect augmenterait ainsi à mesure que le ratio PEG/PLGA augmente. En effet, un bloc poly(éthylène glycol) long augmenterait l'encombrement et les répulsions en surface des particules, et donc forcerait l'augmentation de l'aire interfaciale en formant des ellipsoïdes [64]. Une méthode différente de l'émulsion-évaporation, nommée « évaporation de co-solvant », a aussi permis de préparer un mélange de particules sphériques et de filoparticules de polylactide-*block*-poly(éthylène glycol) [65], ou encore de poly(ε-caprolactone)-*bloc*-poly(éthylène glycol) [66]. Ces filoparticules de plusieurs centaines de nanomètres de long sont cependant très sensibles à l'hydrolyse du bloc poly(ε-caprolactone), qui modifie le paramètre d'empilement du polymère et

donc la forme des particules. Cela conduit à l'obtention spontanée et irréversible de sphères de quelques dizaines de nanomètres, après 200 h à 37°C [66].

Enfin, outre les polymères à blocs décrits jusqu'à présent, certains copolymères à distribution aléatoire ont aussi la capacité de former des particules anisotropes. C'est notamment le cas du PLGA qui permet d'obtenir des particules ellipsoïdes de 4 µm de large pour 25 µm de long en moyenne (avec un rapport d'aspect pouvant aller jusqu'à 13), par un simple procédé d'émulsion-évaporation. L'obtention de particules allongées, assez inhabituelle avec un tel procédé, serait due à un ensemble de conditions favorables, selon Heslinga *et al.* La concentration en tensioactif et la vitesse d'agitation permettraient notamment la déformation des gouttelettes d'émulsions sans les rompre. L'évaporation du solvant depuis des gouttelettes allongées produirait alors des particules allongées [67]. L'homopolymère poly(γ-benzyl-L-glutamate) peut, quant à lui, conduire à l'obtention de particules sphérocylindriques de rapport d'aspect compris entre 1 et 4 par un procédé de nanoprécipitation. Ce polymère a pour propriété une conformation en hélice α, dont l'assemblage tendrait à former des particules cylindriques d'une centaine de nanomètres de long. L'étude de Cauchois *et al.* montre notamment qu'il est possible de contrôler rapport d'aspect des particules en augmentant la masse molaire du polymère [68].

3.3. Procédés microfluidiques

Des particules polymères non sphériques peuvent aussi être produites *de novo* par des procédés microfluidiques. Ces procédés permettent notamment de réaliser des opérations de mélange liquide-liquide et/ou d'émulsification au sein de canaux dont le diamètre interne est compris entre 50 et 500 µm [69,70]. Les deux voies principales utilisées pour produire des particules polymères anisotropes en microfluidique sont (i) la polymérisation/réticulation en émulsion, et (ii) la lithographie en flux. Ces deux méthodes génèrent des particules de taille comparable à la largeur des canaux, de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres.

Dans le cas de la polymérisation/réticulation en émulsion, c'est la forme des gouttelettes formant la phase dispersée qui détermine la forme des particules finales. Ainsi, Gregoritza *et al.* ont produit des gouttelettes aqueuses plus grosses que les canaux microfluidiques, qui sont déformées lors de leur circulation dans les canaux, leur donnant une forme sphérocylindriques. Ces gouttelettes, parfois appelées *plugs* [71],

contiennent du poly(éthylène glycol) (PEG) fonctionnalisé avec du norbornène : elles peuvent donc réticuler en présence de dithiothréitol après photoinitiation de la réaction. Les gouttelettes sont ainsi figées pour donner des microgels sphérocylindriques larges de presque 400 µm, pour une longueur variant jusqu'à 2 mm [72]. De la même façon, l'utilisation de canaux microfluidiques plats permet de former des gouttelettes discoïdes : la photoréticulation aux rayons ultraviolets (UV) du PEG-diacrylate présent dans ces gouttelettes donne des microgels en forme de disque [73]. Dans des canaux cylindriques plus classiques, des microgels Janus en haltère peuvent être préparés par photopolymérisation aux UV de deux gouttelettes sphériques accolées contenant chacune des monomères différents [73]. Des particules hémisphériques peuvent aussi être produites, en générant des gouttelettes Janus dont seulement un hémisphère contient un monomère photopolymérisable (diacrylate de 1,6-hexanediol). L'hémisphère inerte, composé d'huile de paraffine, est retiré après l'exposition aux UV, ne laissant en suspension que l'hémisphère polymérisé [74].

La deuxième méthode utilisée pour produire des particules polymères anisotropes en microfluidique est la lithographie en flux. Cette méthode consiste à faire s'écouler une solution de monomère (ou de polymère) dans un canal microfluidique, et l'illuminer à travers un masque de la géométrie désirée, pour initier la photopolymérisation (ou la photoréticulation) selon une forme donnée. Dendukuri *et al.* ont ainsi produit des cubes, des cylindres, des disques, des triangles, et d'autres formes encore, en illuminant une solution de PEG-diacrylate en écoulement continu [75]. D'autres travaux proposent même d'illuminer un ensemble de flux s'écoulant dans le même sens, mais de compositions différentes. L'utilisation d'un masque rectangulaire perpendiculaire aux flux permet alors de former des particules « code-barre » (Figure 12) [75–77]. A noter que dans ces articles, le flux n'est pas continu, mais alternatif : l'illumination se fait pendant de courtes séquences pendant lesquelles le flux est arrêté. Cela permet notamment une meilleure résolution de la lithographie, ainsi qu'une amélioration du rendement de production. En effet, une étude de Dendukuri *et al.* indique que cette technique en flux alternatif pourrait permettre la production de 10^6 particules par secondes pour un canal de 1 cm de longueur sur 1000 µm de large et 40 µm de haut. A titre indicatif, la plupart des techniques microfluidiques (lithographie ou polymérisation/réticulation en émulsion) dépasseraient difficilement les 10^4 particules par min [78]. Le rendement en microfluidique est réputé relativement faible, comparé à d'autres techniques [79], bien qu'il soit possible de multiplier les puces pour augmenter la production.

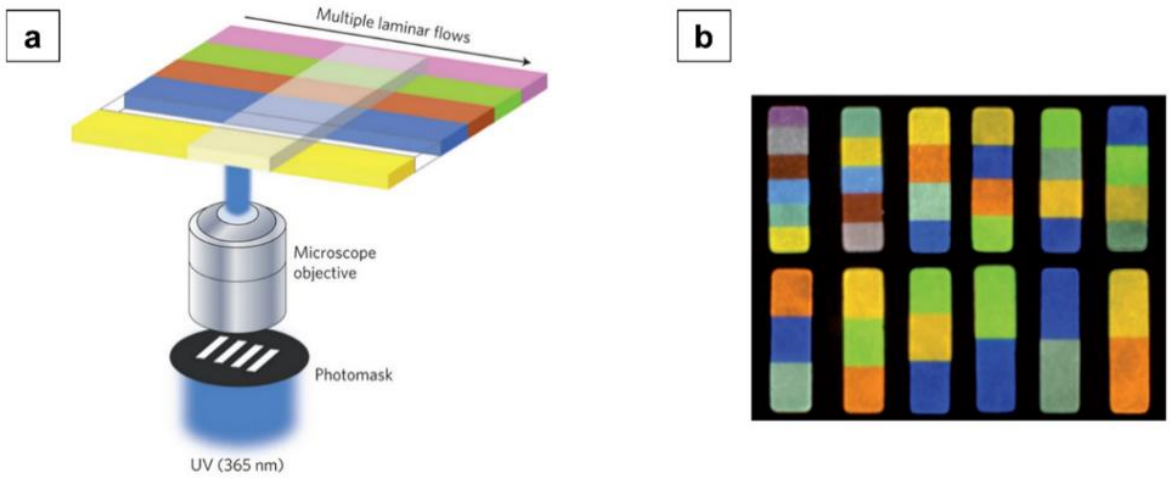


Figure 12 : (a) Principe de la préparation des particules « code-barre » en photolithographie sur un flux alternatif de solution polymérique (b) Particules de poly(uréthane acrylate) luminescentes (figure adaptée de Lee *et al.* [77]).

3.4. Procédés électrodynamiques

Parmi les autres méthodes utilisées pour préparer des particules polymères anisotropes, on peut citer les techniques électrohydrodynamiques. Brièvement, une solution de polymère est acheminée vers une buse, et soumise à une tension électrique. Cette tension ionise le liquide, qui s'étire alors sous l'effet des répulsions électrostatiques, suffisantes pour contrer la tension interfaciale. Lorsque les forces de cohésion maintiennent l'intégrité de la fibre produite, on parle de technique d'*electrospinning*. En revanche, si le jet se rompt, on parle plutôt d'*electrospraying*. Les objets produits par ces méthodes sont principalement des fibres ou des particules sphériques, de quelques micromètres à plusieurs dizaines de micromètres [80–83]. Lahann *et al.* sont les principaux auteurs utilisant ces techniques pour réaliser des particules anisotropes, souvent en poly(lactide-*co*-glycolide). En injectant deux solutions de polymères côte-à-côte, ils génèrent un jet biphasique, et donc offrent la possibilité d'obtenir des particules Janus [84]. Selon la concentration en polymère, la vitesse du jet, et les solvants utilisés, les auteurs décrivent l'obtention de fibres, de particules sphériques, de disques, ou encore de cylindres dont les compartiments suivent l'axe radial de la particule (chaque extrémité fait alors partie d'un compartiment différent) [85]. Ils proposent aussi une méthode pour préparer des cylindres dont les compartiments suivent l'axe longitudinal, en découpant des fibres Janus en tronçons de 20 à 80 µm à l'aide d'un cryotome (Figure

13) [86]. Cette méthode a par ailleurs été adaptée et utilisée pour préparer des particules cylindriques de poly(lactide)-*bloc*-poly(éthylène glycol) plus classiques, sans injection parallèle de deux liquides [87]. Enfin, une utilisation originale de l'*electrospinning* peut être notée. Décrite par Herrmann *et al.*, elle consiste en l'injection d'une suspension de nanoparticules polymères sphériques qui, sous l'effet du cisaillement à l'embouchure de la buse, voient leur forme s'allonger pour donner des ellipsoïdes. Cette méthode a notamment fait ses preuves sur des nanosphères de polystyrène et des nanocapsules de poly(méthacrylate de méthyle) [88].

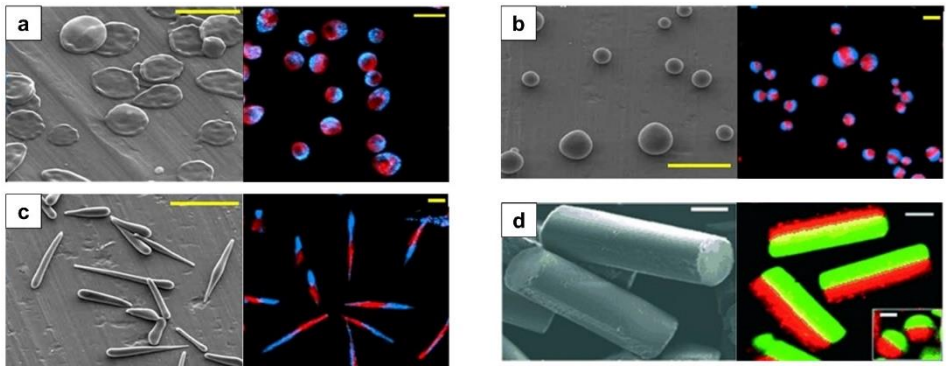


Figure 13 : Images de MEB (à gauche) et de microscopie confocale à balayage laser (à droite) de particules Janus en forme (a) de disques, (b) de sphères, (c) de cylindres à compartiments suivant l'axe radial de la particule, et (d) de cylindres à compartiments suivant l'axe longitudinal de la particule. Les barres d'échelle représentent (a) 5 µm pour les deux images ; (b) 20 µm pour la MEB et 10 pour la microscopie confocale ; (c) 10µm pour la MEB et 5 µm pour la microscopie confocale ; et (d) 10 µm pour les deux images (figure adaptée de Bhaskar *et al.* [85,86]).

4. Matériaux utilisés dans la préparation de particules polymères anisotropes

Si de nombreuses méthodes sont proposées pour produire des particules polymères anisotropes, il convient de remettre cette revue bibliographique dans le contexte du projet de thèse. En effet, ce dernier a pour objectif de comprendre les mécanismes de stabilisation des émulsions de Pickering et à mettre en évidence l'influence certains paramètres clés (dont la forme des particules stabilisantes), afin de faciliter le développement ultérieur d'émulsions de Pickering dans le domaine pharmaceutique. Cette section est donc l'occasion de revenir sur chacun des polymères mentionnés, afin de définir la pertinence de leur utilisation pour des émulsions pharmaceutiques.

Les matériaux utilisés pour produire des particules stabilisantes doivent en effet être biocompatibles, et si possible biodégradables. La biocompatibilité est, selon la définition de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), la capacité d'un polymère à être en contact avec un organisme vivant sans entraîner d'effets secondaires [89]. Précisons que si le matériau en question est dégradable, ses produits de dégradation ne doivent eux non plus entraîner d'effets indésirables. La biodégradabilité quant à elle, est la capacité d'un polymère à se dégrader, par réduction de sa masse molaire, sous l'effet d'une activité biologique (souvent enzymatique) issue de cellules [89]. On peut ajouter à la voie de dégradation enzymatique les réactions d'hydrolyse, qui sont souvent recherchées lors de la conception de polymères synthétiques dégradables *in vivo*.

Certaines grandes familles de polymères sont reconnues de façon unanime pour être utilisables dans le domaine biomédical : c'est notamment le cas des polyesters. Dans cette catégorie, les polylactides, polyglycolides, et leur copolymère aléatoire poly(lactide-*co*-glycolide) font office de référence indiscutable. Ils sont en effet reconnus pour être hydrolysables, avec pour produit final l'acide lactique (un produit de la glycolyse naturellement présent dans de nombreux organismes) et/ou l'acide glycolique [90]. Il est possible d'adapter le temps de dégradation de ces polymères, en fonction de leur usage, grâce à une offre commerciale très variée en termes de masse molaire, de terminaisons, et de ratio lactide/glycolide (pour les copolymères). Par exemple, le temps de dégradation est plus long lorsque la masse molaire est plus importante [91]. Le taux de lactide dans le polymère peut aussi augmenter le temps de dégradation en limitant l'entrée de l'eau dans la matrice, de par son hydrophobie [91,92]. Ces trois polymères peuvent être utilisés dans de nombreuses applications biomédicales : pour fabriquer des implants dentaires temporaires, des sutures résorbables [90], des implants matriciels [93] ou des nanoparticules [94] pour l'administration de substances actives, *etc*. Le poly(ε-caprolactone) est un autre polyester, pouvant lui aussi être dégradé par des micro-organismes de type *Penicillium* présents dans les sols [95]. Il est aussi sensible à l'hydrolyse, mais sa dégradation est bien plus lente que les polyesters précédemment cités [90]. Elle peut néanmoins être accélérée en conditions acides [96], ce qui en fait un matériau utilisable dans le domaine pharmaceutique [97].

La famille des cyanoacrylates compte aussi parmi les polymères biodégradables. Nous avons notamment cité le poly(cyanoacrylate d'isobutyle), seul représentant de cette famille ayant servi à préparer des particules anisotropes. Ce type de polymères peut suivre deux voies de dégradation *in vivo*. La première, une hydrolyse spontanée par réaction de Knoevenagel, produit des esters alkylcyanoacétiques, mais surtout du formaldéhyde, d'où une potentielle toxicité Cette toxicité est cependant surtout relevée pour les cyanoacrylates à chaînes alkyles courtes. En effet, pour la plupart des autres cyanoacrylates, la voie de l'hydrolyse enzymatique (par l'action d'estérases) est plus rapide, ne laissant pas le temps à la première voie de s'opérer. Elle consiste en le clivage des chaînes alkyles, donnant des produits aisément éliminables par les urines et non toxiques [98].

Le poly(γ-benzyl-L-glutamate) est un autre polymère cité dans cette revue bibliographique possédant des propriétés de biodégradabilité. C'est un représentant des poly(α-aminoacides), plutôt hydrophobe du fait de son groupement benzyle. La difficulté à contrôler sa dégradation semble cependant limiter son utilisation encore aujourd'hui [99].

En plus des quelques polymères biodégradables, on note aussi l'emploi récurrent de poly(éthylène glycol), comme homopolymère ou dans un copolymère à bloc. S'il n'est pas biodégradable, il reste toutefois très peu toxique, quelle que soit la voie d'administration [100]. Sa biocompatibilité en fait un ingrédient de choix dans de très nombreuses formulations pharmaceutiques [101] et cosmétiques [100].

Au-delà de ces matériaux, tous utilisables dans le domaine pharmaceutique, on note l'utilisation de très nombreux autres polymères non biodégradables dans la préparation de particules anisotropes. Le plus cité est incontestablement le polystyrène. Ce dernier est très rarement utilisé en pharmacie, du fait de la bioaccumulation dont il fait l'objet. En effet, il a été observé que les particules de polystyrène présentes dans l'environnement s'accumulent tout au long de la chaîne alimentaire, se transmettant de proies en prédateurs. Certains poissons adultes peuvent même transmettre des particules à leur progéniture [102]. Cependant, cette accumulation entraîne rarement de toxicité, à notre connaissance. Notons cependant que les plus petites particules (de l'ordre de 40 nm) peuvent s'accumuler dans le cerveau de ces poissons, et causer des troubles du comportement [103].

Les polyacrylates et polyméthacrylates sont aussi très utilisés dans la préparation de particules anisotropes, surtout lorsqu'une étape de polymérisation est nécessaire. Ils sont en effet très pratiques, car leur polymérisation se prête à la photoinitiation, ouvrant des possibilités technologiques importantes. Ils sont cependant encore très peu utilisés dans le domaine pharmaceutique, bien que leur toxicité soit considérée comme relativement faible. Sous forme nanoparticulaires cependant, on note l'apparition d'une toxicité dans le cas des polyacrylates, pour les voies respiratoires par exemple [104]. L'usage de ce matériau ne semble donc pas pertinent dans une perspective d'administration de substances actives par des systèmes particulaires. Les polyméthacrylates sont plus utilisés, bien que des signes de lymphocytose aient pu être observés avec l'acide polyméthacrylique [105].

Conclusion

Ainsi, nous disposons aujourd'hui d'un large panel de méthodes permettant de produire des particules de tailles et de formes variées. Ces méthodes permettent de générer des particules anisotropes *de novo*, ou à partir de particules sphériques préformées. Les procédés de préparation *de novo* par précipitation de polymères préformés semblent aujourd'hui être les plus simples à mettre en œuvre pour réaliser des particules polymères non sphériques. C'est notamment le cas de l'émulsion-évaporation, qui ne nécessite pas de matériel particulier, et dont le principe théorique est relativement simple. De plus, ce procédé a déjà été employé avec des polymères biocompatibles (PLGA [67] ou encore PLGE [64]). Ce procédé est donc celui que nous avons choisi pour préparer les particules anisotropes que nous décrirons au chapitre 4, et qui serviront ensuite à stabiliser des émulsions de Pickering comme décrit au chapitre 5.

Références

[1] J.D. Joannopoulos, S.G. Johnson, J.N. Winn, R.D. Meade, Photonic Crystals: Molding the Flow of Light - Second Edition, REV-Revised, 2, Princeton University Press, 2008. https://doi.org/10.2307/j.ctvcm4gz9.

[2] J.D. Forster, J.-G. Park, M. Mittal, H. Noh, C.F. Schreck, C.S. O'Hern, H. Cao, E.M. Furst, E.R. Dufresne, Assembly of Optical-Scale Dumbbells into Dense Photonic Crystals, ACS Nano. 5 (2011) 6695–6700. https://doi.org/10.1021/nn202227f.

[3] I.D. Hosein, S.H. Lee, C.M. Liddell, Dimer-Based Three-Dimensional Photonic Crystals, Adv. Funct. Mater. 20 (2010) 3085–3091. https://doi.org/10.1002/adfm.201000134.

[4] W. Dong, H.J. Bongard, F. Marlow, New Type of Inverse Opals: Titania With Skeleton Structure, Chem. Mater. 15 (2003) 568–574. https://doi.org/10.1021/cm021299i.

[5] Y. Du, E. Lo, S. Ali, A. Khademhosseini, Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3D tissue constructs, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 9522–9527. https://doi.org/10.1073/pnas.0801866105.

[6] Z. Wang, Z. Wu, J. Liu, W. Zhang, Particle morphology: an important factor affecting drug delivery by nanocarriers into solid tumors, Expert Opin. Drug Deliv. 15 (2018) 379–395. https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1420051.

[7] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, Nano Lett. 6 (2006) 662–668. https://doi.org/10.1021/nl052396o.

[8] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?, Pharm. Res. 26 (2008) 235. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9697-x.

[9] S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 11613–11618. https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105.

[10] Y. Guo, T. Wang, S. Zhao, M. Han, Z. Dong, X. Wang, Y. Wang, Amphiphilic Hybrid Dendritic-Linear Molecules as Nanocarriers for Shape-Dependent Antitumor Drug Delivery, Mol. Pharm. 15 (2018) 2665–2673. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00190.

[11] A.-K. Pada, D. Desai, K. Sun, N. Prakirth Govardhanam, K. Törnquist, J. Zhang, J.M. Rosenholm, Comparison of Polydopamine-Coated Mesoporous Silica Nanorods and Spheres for the Delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Anticancer Drugs, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 3408. https://doi.org/10.3390/ijms20143408.

[12] J.A. Champion, Y.K. Katare, S. Mitragotri, Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers, J. Controlled Release. 121 (2007) 3–9. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.022.

[13] H. Safari, R. Adili, M. Holinstat, O. Eniola-Adefeso, Modified two-step emulsion solvent evaporation technique for fabricating biodegradable rod-shaped particles in the submicron size range, J. Colloid Interface Sci. 518 (2018) 174–183. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.02.030.

[14] J.-B. Fan, Y. Song, H. Li, J.-P. Jia, X. Guo, L. Jiang, Controllable drug release and effective intracellular accumulation highlighted by anisotropic biodegradable PLGE nanoparticles, J Mater Chem B. 2 (2014) 3911–3914. https://doi.org/10.1039/C3TB21726D.

[15] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Shape-Anisotropic Colloids at Interfaces, Langmuir. 35 (2019) 3–20. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01139.

[16] Y. Iwashita, Pickering–Ramsden emulsions stabilized with chemically and morphologically anisotropic particles, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. (2020) S1359029420300492. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.05.004.

[17] B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions, Soft Matter. 5 (2009) 1717. https://doi.org/10.1039/b816680c.

[18] R. Koike, Y. Iwashita, Y. Kimura, Emulsion Droplets Stabilized by Close-Packed Janus Regular Polygonal Particles, Langmuir. 34 (2018) 12394–12400. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02323.

[19] Y. Nonomura, N. Kobayashi, N. Nakagawa, Multiple Pickering Emulsions Stabilized by Microbowls, Langmuir. 27 (2011) 4557–4562. https://doi.org/10.1021/la2003707.

[20] B. Yu, H. Cong, Q. Peng, C. Gu, Q. Tang, X. Xu, C. Tian, F. Zhai, Current status and future developments in preparation and application of nonspherical polymer particles, Adv. Colloid Interface Sci. 256 (2018) 126–151. https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.04.010.

[21] I. Kalashnikova, H. Bizot, P. Bertoncini, B. Cathala, I. Capron, Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions, Soft Matter. 9 (2012) 952–959. https://doi.org/10.1039/C2SM26472B.

[22] C.C. Ho, A. Keller, J.A. Odell, R.H. Ottewill, Preparation of monodisperse ellipsoidal polystyrene particles, Colloid Polym. Sci. 271 (1993) 469–479. https://doi.org/10.1007/BF00657391.

[23] J.A. Champion, Y.K. Katare, S. Mitragotri, Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes, Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007) 11901–11904. https://doi.org/10.1073/pnas.0705326104.

[24] A. Patil, S. Dyawanapelly, P. Dandekar, R. Jain, Fabrication and Characterization of Non-spherical Polymeric Particles, J. Pharm. Innov. (2020). https://doi.org/10.1007/s12247-020-09484-8.

[25] J.J. Crassous, H. Dietsch, P. Pfleiderer, V. Malik, A. Diaz, L.A. Hirshi, M. Drechsler, P. Schurtenberger, Preparation and characterization of ellipsoidal-shaped thermosensitive microgel colloids with tailored aspect ratios, Soft Matter. 8 (2012) 3538–3548. https://doi.org/10.1039/C2SM07257B.

[26] C. Palazzo, G. Ponchel, J.J. Vachon, S. Villebrun, F. Agnely, C. Vauthier, Obtaining nonspherical poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by the stretching method applied with a marketed water-soluble film, Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. 66 (2017) 416–424. https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1233420.

[27] Z. Zhang, P. Pfleiderer, A.B. Schofield, C. Clasen, J. Vermant, Synthesis and Directed Self-Assembly of Patterned Anisometric Polymeric Particles, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 392–395. https://doi.org/10.1021/ja108099r.

[28] P. Jiang, K.S. Hwang, D.M. Mittleman, J.F. Bertone, V.L. Colvin, Template-Directed Preparation of Macroporous Polymers with Oriented and Crystalline Arrays of Voids, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 11630–11637. https://doi.org/10.1021/ja9903476.

[29] P. Jiang, J.F. Bertone, V.L. Colvin, A Lost-Wax Approach to Monodisperse Colloids and Their Crystals, Science. 291 (2001) 453–457. https://doi.org/10.1126/science.291.5503.453.

[30] M. Nič, J. Jirát, B. Košata, A. Jenkins, A. McNaught, eds., upper critical solution temperature, in: IUPAC Compend. Chem. Terminol., 2.1.0, IUPAC, Research Triagle Park, NC, 2009. https://doi.org/10.1351/goldbook.UT07280.

[31] T. Tanaka, Y. Komatsu, T. Fujibayashi, H. Minami, M. Okubo, A Novel Approach for Preparation of Micrometer-sized, Monodisperse Dimple and Hemispherical Polystyrene Particles, Langmuir. 26 (2010) 3848–3853. https://doi.org/10.1021/la903309t.

[32] S.-H. Kim, A.D. Hollingsworth, S. Sacanna, S.-J. Chang, G. Lee, D.J. Pine, G.-R. Yi, Synthesis and Assembly of Colloidal Particles with Sticky Dimples, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 16115–16118. https://doi.org/10.1021/ja305865w.

[33] X. Huang, Q. Qian, Y. Wang, Anisotropic Particles from a One-Pot Double Emulsion Induced by Partial Wetting and Their Triggered Release, Small. 10 (2014) 1412–1420. https://doi.org/10.1002/smll.201302743.

[34] Y. Yin, Y. Xia, Self-Assembly of Monodispersed Spherical Colloids into Complex Aggregates with Well-Defined Sizes, Shapes, and Structures, Adv. Mater. 13 (2001) 267–271. https://doi.org/10.1002/1521-4095(200102)13:4<267::AID-ADMA267>3.0.CO;2-9.

[35] U. Hasegawa, S. Sawada, T. Shimizu, T. Kishida, E. Otsuji, O. Mazda, K. Akiyoshi, Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery, J. Controlled Release. 140 (2009) 312–317. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.025.

[36] Y. Wang, Y. Wang, X. Zheng, G.-R. Yi, S. Sacanna, D.J. Pine, M. Weck, Three-Dimensional Lock and Key Colloids, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 6866–6869. https://doi.org/10.1021/ja502699p.

[37] L. Wang, L. Xia, G. Li, S. Ravaine, X.S. Zhao, Patterning the Surface of Colloidal Microspheres and Fabrication of Nonspherical Particles, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 4725–4728. https://doi.org/10.1002/anie.200801061.

[38] Y. Wang, Y. Wang, D.R. Breed, V.N. Manoharan, L. Feng, A.D. Hollingsworth, M. Weck, D.J. Pine, Colloids with valence and specific directional bonding, Nature. 491 (2012) 51–55. https://doi.org/10.1038/nature11564.

[39] H.R. Sheu, M.S. El-Aasser, J.W. Vanderhoff, Phase separation in polystyrene latex interpenetrating polymer networks, J. Polym. Sci. Part Polym. Chem. 28 (1990) 629–651. https://doi.org/10.1002/pola.1990.080280314.

[40] L.P. McMaster, Aspects of Polymer-Polymer Thermodynamics, Macromolecules. 6 (1973) 760–773. https://doi.org/10.1021/ma60035a024.

[41] C. Tang, C. Zhang, Y. Sun, F. Liang, Q. Wang, J. Li, X. Qu, Z. Yang, Janus Anisotropic Hybrid Particles with Tunable Size from Patchy Composite Spheres, Macromolecules. 46 (2013) 188–193. https://doi.org/10.1021/ma3020883.

[42] J.-G. Park, J.D. Forster, E.R. Dufresne, High-Yield Synthesis of Monodisperse Dumbbell-Shaped Polymer Nanoparticles, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 5960–5961. https://doi.org/10.1021/ja101760q.

[43] E.B. Mock, H. De Bruyn, B.S. Hawkett, R.G. Gilbert, C.F. Zukoski, Synthesis of Anisotropic Nanoparticles by Seeded Emulsion Polymerization, Langmuir. 22 (2006) 4037–4043. https://doi.org/10.1021/la060003a.

[44] Y.-Z. Du, T. Tomohiro, M. Kodaka, Synthesis of Hemispherical Poly(2-hydroxylethyl methacrylate-co-methyl methacrylate)/Poly(styrene-co-glycidyl methacrylate) Composite Particles with Heterobifunctional Groups by Soap-Free Seeded Emulsion Polymerization, Macromolecules. 37 (2004) 803–812. https://doi.org/10.1021/ma030424o.

[45] W. Yan, M. Pan, J. Yuan, G. Liu, L. Cui, G. Zhang, L. Zhu, Raspberry-like patchy particles achieved by decorating carboxylated polystyrene cores with snowman-like poly(vinylidene fluoride)/poly(4-vinylpyridiene) Janus particles, Polymer. 122 (2017) 139–147. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.06.055.

[46] B. Yu, H. Yuan, D. Wang, H. Cong, X. Xu, S. Yang, Fabrication of anisotropic silica hollow microspheres using polymeric protrusion particles as templates, Colloid Polym. Sci. 292 (2014) 2361–2367. https://doi.org/10.1007/s00396-014-3269-x.

[47] M. Okubo, T. Fujibayashi, M. Yamada, H. Minami, Micron-sized, monodisperse, snowman/confetti-shaped polymer particles by seeded dispersion polymerization, Colloid Polym. Sci. 283 (2005) 1041–1045. https://doi.org/10.1007/s00396-004-1240-y.

[48] M. Okubo, T. Fujibayashi, A. Terada, Synthesis of micron-sized, monodisperse polymer particles of disc-like and polyhedral shapes by seeded dispersion polymerization, Colloid Polym. Sci. 283 (2005) 793–798. https://doi.org/10.1007/s00396-004-1210-4.

[49] M. Okubo, H. Minami, Z. Wang, E. Ise, Adsorption of styrene on micron-sized, monodisperse, cross-linked polymer particles in a snowman-shaped state by utilizing the dynamic swelling method, Colloid Polym. Sci. 279 (2001) 976–982. https://doi.org/10.1007/s003960100529.

[50] M. Okubo, Z. Wang, T. Yamashita, E. Ise, H. Minami, Morphology of micron-sized, monomer-adsorbed, crosslinked polymer particles having snowmanlike shapes prepared by the dynamic swelling method, J. Polym. Sci. Part Polym. Chem. 39 (2001) 3106–3111. https://doi.org/10.1002/pola.1291.

[51] M. Okubo, R. Takekoh, A. Suzuki, Preparation of micron-sized, monodisperse poly(methyl methacrylate)/polystyrene composite particles having a large number of dents on their surfaces by seeded dispersion polymerization in the presence of decalin, Colloid Polym. Sci. 280 (2002) 1057–1061. https://doi.org/10.1007/s00396-002-0661-8.

[52] J.-W. Kim, R.J. Larsen, D.A. Weitz, Uniform Nonspherical Colloidal Particles with Tunable Shapes, Adv. Mater. 19 (2007) 2005–2009. https://doi.org/10.1002/adma.200602345.

[53] T. Fujibayashi, M. Okubo, Preparation and Thermodynamic Stability of Micron-Sized, Monodisperse Composite Polymer Particles of Disc-like Shapes by Seeded Dispersion Polymerization, Langmuir. 23 (2007) 7958–7962. https://doi.org/10.1021/la7007842.

[54] H. Cong, J. Wang, B. Yu, J. Tang, W. Cui, Fabrication of monodisperse anisotropic silica hollow microspheres using polymeric cave particles as templates, J. Colloid Interface Sci. 411 (2013) 41–46. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.08.046.

[55] H.M.H. Weijgertze, W.K. Kegel, M. Zanini, Patchy rough colloids as Pickering stabilizers, Soft Matter. 16 (2020) 8002–8012. https://doi.org/10.1039/D0SM00807A.

[56] T. Tanaka, M. Okayama, Y. Kitayama, Y. Kagawa, M. Okubo, Preparation of "Mushroom-like" Janus Particles by Site-Selective Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization in Aqueous Dispersed Systems [†], Langmuir. 26 (2010) 7843–7847. https://doi.org/10.1021/la904701r.

[57] L.A. Fielding, J.A. Lane, M.J. Derry, O.O. Mykhaylyk, S.P. Armes, Thermo-responsive Diblock Copolymer Worm Gels in Non-polar Solvents, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 5790–5798. https://doi.org/10.1021/ja501756h.

[58] U. Tritschler, S. Pearce, J. Gwyther, G.R. Whittell, I. Manners, 50th Anniversary Perspective: Functional Nanoparticles from the Solution Self-Assembly of Block Copolymers, Macromolecules. 50 (2017) 3439–3463. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02767.

[59] D. Lombardo, M.A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches, Adv. Condens. Matter Phys. 2015 (2015) 1–22. https://doi.org/10.1155/2015/151683.

[60] A. Blanazs, R. Verber, O.O. Mykhaylyk, A.J. Ryan, J.Z. Heath, C.W.I. Douglas, S.P. Armes, Sterilizable Gels from Thermoresponsive Block Copolymer Worms, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 9741–9748. https://doi.org/10.1021/ja3024059.

[61] I. LaRue, M. Adam, M. Pitsikalis, N. Hadjichristidis, M. Rubinstein, S.S. Sheiko, Reversible Morphological Transitions of Polystyrene-b-polyisoprene Micelles, Macromolecules. 39 (2006) 309–314. https://doi.org/10.1021/ma051548z.

[62] R. Deng, F. Liang, P. Zhou, C. Zhang, X. Qu, Q. Wang, J. Li, J. Zhu, Z. Yang, Janus Nanodisc of Diblock Copolymers, Adv. Mater. 26 (2014) 4469–4472. https://doi.org/10.1002/adma.201305849.

[63] S.-J. Jeon, G.-R. Yi, S.-M. Yang, Cooperative Assembly of Block Copolymers with Deformable Interfaces: Toward Nanostructured Particles, Adv. Mater. 20 (2008) 4103–4108. https://doi.org/10.1002/adma.200801377.

[64] H. Zhang, J. Bei, S. Wang, Multi-morphological biodegradable PLGE nanoparticles and their drug release behavior, Biomaterials. 30 (2009) 100–107. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.016.

[65] K. Jelonek, S. Li, X. Wu, J. Kasperczyk, A. Marcinkowski, Self-assembled filomicelles prepared from polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers for anticancer drug delivery, Int. J. Pharm. 485 (2015) 357–364. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.032.

[66] Y. Geng, D.E. Discher, Hydrolytic Degradation of Poly(ethylene oxide)-block-Polycaprolactone Worm Micelles, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 12780–12781. https://doi.org/10.1021/ja053902e.

[67] M.J. Heslinga, E.M. Mastria, O. Eniola-Adefeso, Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications, J. Controlled Release. 138 (2009) 235–242. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.020.

[68] O. Cauchois, F. Segura-Sanchez, G. Ponchel, Molecular weight controls the elongation of oblate-shaped degradable poly(γ-benzyl-l-glutamate)nanoparticles, Int. J. Pharm. 452 (2013) 292–299. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.074.

[69] J.-P. Benoît, J. Richard, M.-C. Venier-Julienne, Microencapsulation, Tech. Ing. (2013). http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42611210-j2210.pdf (accessed June 7, 2017).

[70] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, A.P. Lee, Droplet microfluidics, Lab Chip. 8 (2008) 198–220. https://doi.org/10.1039/B715524G.

[71] J.D. Tice, A.D. Lyon, R.F. Ismagilov, Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels, Anal. Chim. Acta. 507 (2004) 73–77. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.024.

[72] M. Gregoritza, K. Abstiens, M. Graf, A.M. Goepferich, Fabrication of antibody-loaded microgels using microfluidics and thiol-ene photoclick chemistry, Eur. J. Pharm. Biopharm. 127 (2018) 194–203. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.024.

[73] B. Yu, H. Cong, X. Liu, Y. Ren, J. Wang, L. Zhang, J. Tang, Y. Ma, T. Akasaka, Preparation of monodisperse PEG hydrogel composite microspheres via microfluidic chip with rounded channels, J. Micromechanics Microengineering. 23 (2013) 095016. https://doi.org/10.1088/0960-1317/23/9/095016.

[74] T. Nisisako, T. Torii, Formation of Biphasic Janus Droplets in a Microfabricated Channel for the Synthesis of Shape-Controlled Polymer Microparticles, Adv. Mater. 19 (2007) 1489–1493. https://doi.org/10.1002/adma.200700272.

[75] D. Dendukuri, D.C. Pregibon, J. Collins, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis, Nat. Mater. 5 (2006) 365–369. https://doi.org/10.1038/nmat1617.

[76] D.C. Appleyard, S.C. Chapin, R.L. Srinivas, P.S. Doyle, Bar-coded hydrogel microparticles for protein detection: synthesis, assay and scanning, Nat. Protoc. 6 (2011) 1761–1774. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.400.

[77] J. Lee, P.W. Bisso, R.L. Srinivas, J.J. Kim, A.J. Swiston, P.S. Doyle, Universal process-inert encoding architecture for polymer microparticles, Nat. Mater. 13 (2014) 524–529. https://doi.org/10.1038/nmat3938.

[78] D. Dendukuri, S.S. Gu, D.C. Pregibon, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Stop-flow lithography in a microfluidic device, Lab. Chip. 7 (2007) 818–828. https://doi.org/10.1039/B703457A.

[79] H.A. Santos, D. Liu, H. Zhang, eds., Microfluidics for pharmaceutical applications: from nano/micro systems fabrication to controlled drug delivery, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2019.

[80] J. Anu Bhushani, C. Anandharamakrishnan, Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications, Trends Food Sci. Technol. 38 (2014) 21–33. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.004.

[81] S. Chakraborty, I.-C. Liao, A. Adler, K.W. Leong, Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems, Adv. Drug Deliv. Rev. 61 (2009) 1043–1054. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.013.

[82] M. Nikolaou, T. Krasia-Christoforou, Electrohydrodynamic methods for the development of pulmonary drug delivery systems, Eur. J. Pharm. Sci. 113 (2018) 29–40. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.032.

[83] C. Zhang, F. Feng, H. Zhang, Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects, Trends Food Sci. Technol. 80 (2018) 175–186. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.005.

[84] K.-H. Roh, D.C. Martin, J. Lahann, Biphasic Janus particles with nanoscale anisotropy, Nat. Mater. 4 (2005) 759–763. https://doi.org/10.1038/nmat1486.

[85] S. Bhaskar, K.M. Pollock, M. Yoshida, J. Lahann, Towards Designer Microparticles: Simultaneous Control of Anisotropy, Shape, and Size, Small. 6 (2010) 404–411. https://doi.org/10.1002/smll.200901306.

[86] S. Bhaskar, J. Hitt, S.-W.L. Chang, J. Lahann, Multicompartmental Microcylinders, Angew. Chem. Int. Ed. 48 (2009) 4589–4593. https://doi.org/10.1002/anie.200806241.

[87] M. Thieme, S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, Electrospinning and cutting of ultrafine bioerodible poly(lactide-co-ethylene oxide) tri- and multiblock copolymer fibers for inhalation applications, Polym. Adv. Technol. 22 (2011) 1335–1344. https://doi.org/10.1002/pat.1617.

[88] C. Herrmann, A. Turshatov, D. Crespy, Fabrication of Polymer Ellipsoids by the Electrospinning of Swollen Nanoparticles, ACS Macro Lett. 1 (2012) 907–909. https://doi.org/10.1021/mz300245b.

[89] H. Pun, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), Pure Appl Chem. 84 (2012) 377–410.

[90] T. Casalini, G. Perale, 1 - Types of bioresorbable polymers for medical applications, in: M. Jenkins, A. Stamboulis (Eds.), Durab. Reliab. Med. Polym., Woodhead Publishing, 2012: pp. 3–29. https://doi.org/10.1533/9780857096517.1.3.

[91] X.S. Wu, N. Wang, Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12 (2001) 21–34. https://doi.org/10.1163/156856201744425.

[92] Y. Xu, C.-S. Kim, D.M. Saylor, D. Koo, Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 105 (2017) 1692–1716. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33648.

[93] J.A.D. Sequeira, A.C. Santos, J. Serra, F. Veiga, A.J. Ribeiro, Chapter 10 - Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants, in: A.M. Grumezescu (Ed.), Nanostructures Eng. Cells Tissues Organs, William Andrew Publishing, 2018: pp. 375–402. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00010-7.

[94] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers. 3 (2011) 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377.

[95] Y. Tokiwa, B.P. Calabia, Biodegradability and Biodegradation of Polyesters, J. Polym. Environ. 15 (2007) 259–267. https://doi.org/10.1007/s10924-007-0066-3.

[96] G.L. Siparsky, K.J. Voorhees, F. Miao, Hydrolysis of Polylactic Acid (PLA) and Polycaprolactone (PCL) in Aqueous Acetonitrile Solutions: Autocatalysis, J. Environ. Polym. Degrad. 6 (1998) 31–41. https://doi.org/10.1023/A:1022826528673.

[97] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery, Int. J. Pharm. 531 (2017) 134–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.065.

[98] C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, P. Couvreur, Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 519–548. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00041-3.

[99] J. Guo, Y. Huang, X. Jing, X. Chen, Synthesis and characterization of functional poly(γ-benzyl-l-glutamate) (PBLG) as a hydrophobic precursor, Polymer. 50 (2009) 2847–2855. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.04.016.

[100] C. Fruijtier-Pölloth, Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products, Toxicology. 214 (2005) 1–38. https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.001.

[101] A.A. D'souza, R. Shegokar, Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications, Expert Opin. Drug Deliv. 13 (2016) 1257–1275. https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485.

[102] K. Kik, B. Bukowska, P. Sicińska, Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms, Environ. Pollut. 262 (2020) 114297. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114297.

[103] J.A. Pitt, R. Trevisan, A. Massarsky, J.S. Kozal, E.D. Levin, R.T. Di Giulio, Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (Danio rerio): A case study with nanopolystyrene, Sci. Total Environ. 643 (2018) 324–334. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.186.

[104] Y. Song, X. Li, X. Du, Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma, Eur. Respir. J. 34 (2009) 559–567. https://doi.org/10.1183/09031936.00178308.

[105] S. Ormai, M. Palkovits, Lymphocytosis induced by polymethacrylic acid. Dose-effect and toxicity, Blut. 31 (1975) 239–246. https://doi.org/10.1007/BF01633507.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 3

Morphologie des émulsions de Pickering stabilisées par des nanoparticules biodégradables de PLGA:

Influence des caractéristiques du PLGA sur les propriétés des émulsions

Introduction - résumé

Au sein de l'institut Galien Paris-Saclay, l'équipe « Physique Pharmaceutique » travaille en collaboration avec l'équipe « Ingénierie particulaire et cellulaire à visée thérapeutique » depuis plusieurs années sur le développement d'émulsions de Pickering à usage pharmaceutique, dans l'objectif notamment d'une co-encapsulation de deux actifs pour la voie topique. Les matériaux utilisés sont donc tous biocompatibles. L'huile utilisée est le Miglyol 812N, un mélange de triglycérides à chaînes moyennes listé par les pharmacopées européenne, américaine et japonaise comme utilisable dans le secteur pharmaceutique. Quant aux nanoparticules (NP) stabilisantes, elles sont composées majoritairement de poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA), un polymère hydrolysable souvent utilisé pour encapsuler des substances actives pharmaceutiques [1]. Selon le procédé de préparation de ces nanoparticules, elles peuvent aussi être recouvertes d'alcool polyvinylique, un polymère lui aussi biocompatible [2,3].

Une étude antérieure, réalisée par Claire Albert lors de sa thèse de doctorat sur des nanoparticules de PLGA 756 S (Evonik, Germany), a démontré la faisabilité d'émulsions H/E stabilisées par des NP de PLGA préparées avec PVA par émulsion-évaporation (NP PLGA-PVA), ou sans PVA par nanoprécipitation (NP PLGA) [4]. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les propriétés des émulsions de Pickering peuvent être influencées par une multitude de paramètres de formulation et de procédé. Ainsi, Claire Albert a montré que les émulsions stabilisées par des NP PLGA étaient plus stables, avec une hauteur de crème plus importante qu'avec les NP PLGA-PVA. La structure microscopique différait aussi, puisque les NP PLGA stabilisaient des émulsions multiples E/H/E quand les NP PLGA-PVA stabilisaient plutôt des émulsions simples H/E dans les conditions de l'expérience. Ces différences majeures étaient expliquées par la présence résiduelle de chaînes de PVA à la surface des particules, qui rendait les particules plus hydrophiles, et diminuait la tension interfaciale de façon plus importante.

Des études préliminaires également réalisées dans le cadre de la thèse de Claire Albert suggéraient que le type de PLGA utilisé pour préparer les NP impactait les propriétés des émulsions de Pickering de façon significative. Cependant, ce phénomène restait largement incompris. L'objectif de ce chapitre est d'expliquer comment la masse molaire et la terminaison de différents PLGA influencent les caractéristiques physico-chimiques

des nanoparticules, qui ont elles-mêmes un impact majeur sur les propriétés des émulsions finales. Cette étude est le fruit de nombreuses collaborations au sein de l'Institut Galien Paris-Saclay : avec Laurence Moine et Nicolas Tsapis de l'équipe 5 « Ingénierie particulaire et cellulaire à visée thérapeutique », respectivement pour la résonance magnétique nucléaire et la chromatographie d'exclusion stérique, et pour la préparation des nanoparticules ; avec François-Xavier Legrand de l'équipe 2 « Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés » pour la calorimétrie à balayage différentiel ; avec Sandrine Geiger de notre équipe pour la microscopie à force atomique. Des collaborations extérieures ont aussi été construites, notamment avec Valérie Nicolas de l'UMS 3679 pour la microscopie confocale, et Michaël Trichet et Alexis Canette de l'Institut de Biologie Paris-Seine pour la cryo-microscopie à balayage. Rédigé en anglais, ce chapitre est présenté sous la forme d'un article tel qu'il a été soumis à une revue à comité de lecture.

Au cours de cette étude, nous avons préparé des nanoparticules polymères partir de quatre PLGA différents, de masses molaires (14 000 et 32 000 g/mol) et de terminaisons (acide ou ester d'alkyle) différentes. Les particules étaient couvertes ou non de PVA, selon leur procédé de préparation. Les émulsions ont été préparées en mélangeant des ratios variés de suspension aqueuse de NP avec du Miglyol 812N, par un procédé simple de type rotor-stator. Les émulsions produites avec ces différents types de particules étaient très différentes, notamment en termes de morphologie. Cela s'explique principalement par l'influence majeure de la terminaison du PLGA sur l'angle de contact et la température de transition vitreuse des particules. En effet, les polymères à terminaison ester confèrent aux particules une plus grande hydrophobie, ainsi qu'une température de transition vitreuse plus basse. En outre, une faible masse molaire peut exacerber l'effet de la terminaison, en augmentant leur nombre. Des NP de différentes mouillabilités ont ainsi été produites, et le sens des émulsions qu'elle stabilisaient est parfaitement en accord avec la loi de Finkle : les NP les plus hydrophiles stabilisaient donc plus aisément des émulsions H/E, les plus hydrophobes des émulsions E/H. Cependant, l'effet du type de PLGA pouvait être masqué en présence de PVA . En effet, ce polymère stabilisant régit à lui seul les caractéristiques de surface des nanoparticules, dont leur mouillabilité (rendue ainsi invariablement hydrophile). Enfin, une émulsion de texture très visqueuse, stabilisée par un réseau de débris de NP, a été décrite. La température de transition vitreuse très basse de ces particules est en cause, permettant la déformation et l'agrégation des particules au cours de l'émulsification.

Cette étude montre ainsi qu'il est possible de contrôler les caractéristiques physico-chimiques de NP en changeant les caractéristiques du polymère qui les compose. Cela peut alors être mis à profit pour préparer des émulsions de différents sens (H/E, E/H, E/H/E) et de différentes textures.

PUBLICATION N°1

Tuning morphology of Pickering emulsions stabilised by biodegradable PLGA nanoparticles: how PLGA characteristics influence emulsion properties

Baptiste Robin[1], Claire Albert[1], Mohamed Beladjine[1], François-Xavier Legrand[1], Sandrine Geiger[1], Laurence Moine[1], Valérie Nicolas[2], Alexis Canette[3], Michaël Trichet[3], Nicolas Tsapis[1], Florence Agnely[1†], Nicolas Huang[1†*]

[1] *Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France*

[2] *Microscopy facility (MIPSIT), Ingénierie et Plateformes au Service de l'Innovation Thérapeutique – IPSIT – UMS – US31 – UMS3679 (IPSIT), Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France*

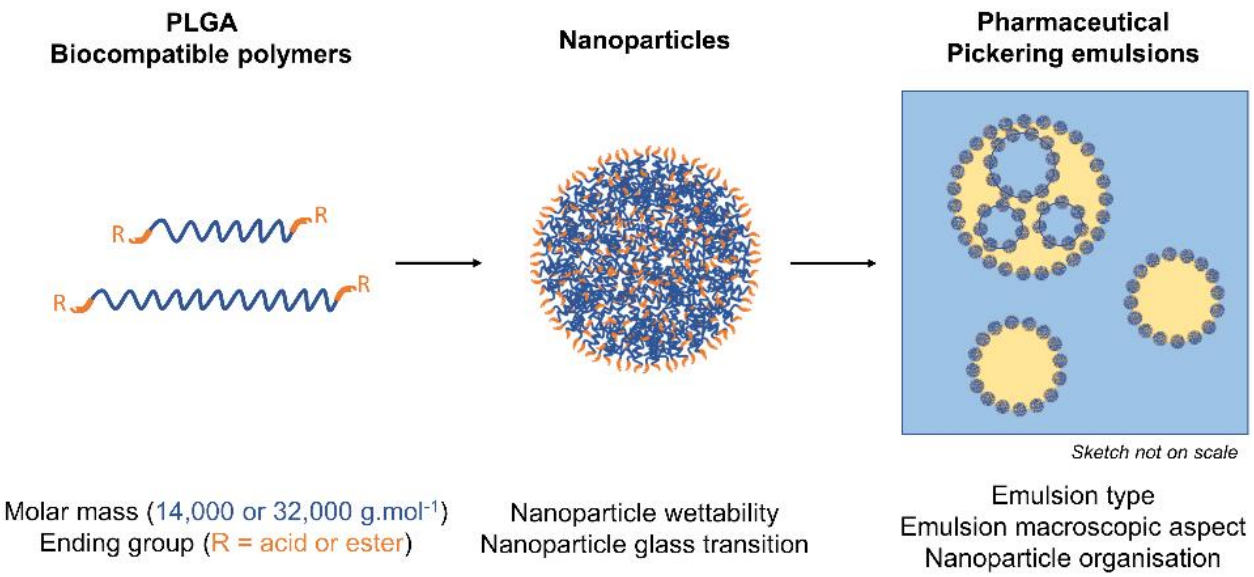
[3] *Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Service de microscopie électronique (IBPS-SME), F-75005, Paris*

[†] *Same contribution*

** Corresponding author: N. Huang, nicolas.huang@universite-paris-saclay.fr*

Abstract

In this study, we proved that the stabilisation of Pickering emulsions by polymer nanoparticles (NP) heavily depends on polymer characteristics. We prepared NP with four poly(lactide-co-glycolide) polymers (PLGA), of different molar masses (14,000 and 32,000 g/mol) and end groups (acid or alkylester). NP were either bare (without stabilising polymer) or covered by polyvinyl alcohol (PVA). Pickering emulsions were prepared by mixing NP aqueous suspensions with various amounts of oil (Miglyol 812N). First, NP wettability was directly affected by PLGA end group: ester-ending PLGA led to more hydrophobic NP, compared to acid-ending PLGA. This effect of the end group could be slightly enhanced with smaller molar mass. Thus, bare PLGA NP stabilised different types of emulsions (W/O/W and W/O), following Finkle's rule. However, the effect of PLGA characteristics was masked when NP were covered by PVA, as PVA drove the stabilisation of O/W emulsions. Secondly, PLGA molar mass and end group also influenced its glass transition temperature (T_g), with spectacular consequences on emulsion formation. Indeed, the shortest ester-ending PLGA exhibited a T_g close to room temperature, when measured in the emulsion. This T_g, easily exceeded during emulsification process, led to a soft solid emulsion, stabilised by a network of NP debris.



Keywords: Pickering emulsions, PLGA, nanoparticles, polymer end group, molar mass, PVA, wettability, glass transition temperature, emulsion type, nanoparticle organisation

1. Introduction

Some types of colloidal particles show great affinity for fluid-fluid interfaces. Partially wetted by the two liquids, they allow the preparation of very stable emulsions (called Pickering emulsions). For large particles equally wetted by water and oil, the energy of attachment can be several orders of magnitude larger than the thermal energy kT. In such a case, the adsorption is considered as irreversible [5,6]. Thus, particles form a physical barrier around the droplets, making the emulsions stable towards coalescence [7]. Besides their stability, Pickering emulsions are of great interest for pharmaceutical purposes, as they allow the reduction of surfactant use. Indeed, surfactants can induce irritations after repeated topical applications [8,9], and alternative solutions must be found to avoid skin toxicity in long-term treatments.

In a previous work, we have demonstrated the interest of using poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles (NP) as stabilisers for Pickering emulsions [10]. PLGA is one of the most attractive polymer for the formulation of biocompatible pharmaceutical systems [1,11]. Various types of drug delivery systems based on PLGA have been formulated such as microparticles [12], nanoparticles [13] or implants [14,15]. They are intended for various applications such as tissue engineering [16], vaccines [17], antitumoral drug delivery [18], protein delivery [19], or siRNA delivery [20]. They allow, for example, to control or sustain the release (from days to weeks), to reduce dosage, to minimize side effects and to protect an encapsulated substance from degradation [21]. Some of them are already on the market, mostly for the controlled release of encapsulated proteins or peptides [22].

PLGA is composed of lactic acid (LA) and glycolic acid (GA) units, linked together by ester bonds that can be hydrolysed, leading to the polymer degradation [23]. The degradation kinetics modulation is a way to control the drug release, and it can be done by tuning the structure of PLGA. Various types of PLGA are available on the market, with very different characteristics. For instance, intermediate LA/GA ratios [24,25] and racemic forms of PLGA [26] promotes the amorphous state of the matrix, increasing its degradation rate. Conversely, the degradation time can be extended by using high molar mass PLGA [27] or hydrophobic PLGA with a high content of LA [24,27].

However, if changing the PLGA characteristics is interesting to control its degradation, it can also impact the physico-chemical properties of PLGA NP. This, in turn, can alter the

behaviour of Pickering emulsions stabilised by these NP. Indeed, many studies have enlightened the influence of the NP surface properties on the emulsion morphology and stability [28]. Silica NP are probably the most studied particles [29–33], but many other tuneable materials have also been studied such as clays [32,34], solid lipid NP [35], polymeric NP [36], etc. However, the influence of the PLGA characteristics on NP properties has rarely been described. To the best of our knowledge, only the impact of PLGA molar mass on Pickering emulsion stability has been assessed [37]. The influence of the PLGA end group or the influence of the stabilizing polymer has never been investigated.

Therefore, we designed a thorough study of the influence of PLGA molar mass and end group, as well as PVA-coverage, on the NP properties. Four different PLGA polymers with two different molar masses (14,000 and 32,000 g/mol) and two different end groups (acid or ester) were used. Depending on the preparation process, the resulting NP were either bare (PLGA NP) or covered by polyvinyl alcohol (PLGA-PVA NP). Five different types of NP were obtained and characterised in size, zeta potential, and glass transition temperature (T_g). Their wettability was also evaluated by the sessile drop method, performed on PLGA films and NP tablets. Then, the particles were used to prepare emulsions with water and Miglyol 812N, a pharmaceutical oil (Miglyol 812N). The resulting Pickering emulsions were characterised at both macroscopic and microscopic scales, in terms of emulsion type and NP interfacial organisation. The characterisation of the NP allowed us to explain the mechanisms of emulsion stabilisation, highlighting the great influence of the PLGA molar mass and end group, as well as the influence of the PVA-coverage, on the Pickering emulsions properties.

2. Material and methods

2.1. Material

Four types of poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers were obtained from Evonik (Germany), all with a lactic acid:glycolic acid ratio (LA:GA) of 75:25: Resomer® RG 753 S (batch 1044590), 753 H (batch D170100503), 752 S (batch R140400507) and 752 H (batch D150800567). PLGA-rhodamine B conjugate (LA:GA ratio of 50:50, M_w = 10,000–30,000 g/mol) was purchased from Akina Inc. (USA). Poly(vinyl alcohol) (PVA, M_w = 30,000–70,000 g/mol, 87–90% hydrolysed) was provided by Sigma-Aldrich

(Germany). Miglyol 812N (η = 30 mPa.s, Newtonian), a medium chain triglyceride oil, was obtained from Cremer (Netherlands). Calcein and deuterium oxide came from Sigma-Aldrich (Germany). All the solvents (acetonitrile, acetone, dichloromethane, deuterated chloroform) were purchased at the highest grade from Carlo Erba (Italy). Water was purified (resistivity of 18.2 MΩ.cm) using a water system ultrapure MilliQ Direct Type 1 (Millipore, Germany).

2.2. Polymer characterisation

The molar mass of each polymer used to prepare PLGA and PLGA-PVA NP was assessed by size exclusion chromatography (SEC, Tosoh EcoSEC HLC-8320 GPC, Japan) with two columns (PL-gel MIXED-D 300 × 7.5 mm, beads diameter 5 µm; linear part 4×10^2 to 4×10^5 g/mol, from Polymer Laboratories, UK). The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards (Polymer Laboratories, UK). Samples were filtered on a 0.2 µm PTFE filter before being analysed at 35°C in chloroform (HPLC grade) at a flow rate of 1 mL/min. Toluene was used as a flow rate marker.

The LA:GA ratio, as well as the polymer end group, were checked by ^{1}H nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) measurements (Bruker Avance-300 MHz spectrometer, USA). These analyses were performed in 5-mm diameter tubes by dissolving around 20 mg of PLGA in 1 mL of $CDCl_3$. In order to identify the mobile protons, a second measurement was performed on the same sample after the addition of a drop of deuterium oxide.

2.3. NP preparation

Bare PLGA NP (called PLGA NP) were prepared by nanoprecipitation, as described previously [38]. Briefly, 150 mg of PLGA were dissolved in 15 mL of acetonitrile. This organic solution was then added dropwise into 45 mL of water under stirring, thanks to a syringe pump. After polymer nanoprecipitation, the organic solvent, as well as a part of the water, were removed by evaporation under vacuum, with a rotary evaporator. The process was stopped when 6 mL of suspension remained in the flask (NP concentration of 25 mg/mL).

PLGA NP covered with PVA (called PLGA-PVA NP) were prepared by emulsion-evaporation, following a previously described protocol [39]. First, 100 mg of PLGA were dissolved in 5 mL of a mixture of dichloromethane and acetone (50:50). This solution was

pre-emulsified with 20 mL of an aqueous solution of PVA 0.25% w/v by vortex, and then emulsified with a sonication probe. The organic phase was evaporated by waiting 3 h at room temperature under stirring. The NP suspension was finally purified, using an ultracentrifuge (Beckman-Coulter, USA), 1 h at 27,440 g and 4°C. The supernatant was removed and replaced by 4 mL of water (NP concentration of 25 mg/mL). Preliminary results suggested that PLGA-PVA NP had similar characteristics, whatever the PLGA type. Indeed, a previous publication of our group suggested that PVA governs the characteristics of PLGA-PVA NP [10], so it was decided to prepare PLGA-PVA NP with only one PLGA type to reduce the number of studied systems. An ester-ending polymer (PLGA 753 S) was chosen, as it is more hydrophobic, to emphasise the potential effect of the hydrophilic PVA coverage on the characteristics of NP.

2.4. NP characterisation

2.4.1. Size and ζ-potential measurements

The mean hydrodynamic diameter and ζ-potential of NP were measured by Dynamic Light Scattering (DLS), using a Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, France, 633 nm He-Ne laser, Smoluchowski equation) operating at 25°C with a 173° scattering angle. The NP suspension was diluted, until reaching an attenuator value of 6, in MilliQ water or in a 1 mM NaCl aqueous solution respectively for size distribution or zeta potential measurements. Each sample was analysed three times, to determine the ζ-potential, the hydrodynamic diameter ("z-average", obtained by the cumulant fit analysis), and the PdI reflecting the size distribution width. These three parameters were reported as an average value ± standard deviation, calculated with the data of three different samples.

2.4.2. Amount of PVA adsorbed on the surface of NP

The amount of PVA adsorbed at the PLGA-PVA NP surface after purification was indirectly measured by determining the PVA concentration in the supernatant after the centrifugation step of the emulsion-evaporation preparation process. This method, described in a previous publication [10], is based on the formation of a green-coloured complex between PVA and iodine in presence of boric acid. The supernatant was diluted with purified water so that PVA concentrations were within the range of the calibration curve (5 to 50 µg/mL of PVA). Then, 3 mL of a boric acid solution (3.8% w/v) and 0.6 mL of an iodine solution (1.27% w/v of iodine and 2.5% w/v of potassium iodide) were added. The

volume was adjusted to 10 mL with purified water. The absorbance of this solution was measured with a UV spectrophotometer (V530 UV/Vis spectrophotometer, Jasco, Japan), at 650 nm using the mixture of boric acid and aqueous iodine as a reference.

2.4.3. Study of NP wettability

NP wettability was assessed using contact angle measurements by captive drop method on NP tablets, prepared from NP suspensions. First, NP suspensions of each type were frozen by immersion in liquid nitrogen and left in a freezer-drier Alpha 2-4 LD (Christ, Germany) for 24h. The condenser temperature was set at -80°C and the pressure was lower than 1 mbar. Then, 20 mg of freeze-dried NP were deposited in a cylindrical compression die with a diameter of 0.7 cm (die of the Qwik Handi-Press Set, Thermo Electron Corporation, USA). A force of 400 N was applied on top of the compression die at a speed of 0.05 mm/s and hold for 10 s using a TA.XTplus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK) to form a tablet.

The contact angle between the tablet and oil was then measured in oil-saturated water at 18°C (Figure 1). The oil-saturation of water prevented the oil droplet from dissolving in the water, that could interfere with the contact angle measurement. The NP tablet was fixed to a glass cover slip using double-sided tape, and placed upside down at the top of a cuvette. This latter was then filled by oil-saturated water, and a 5-µL drop of oil was gently deposited on the tablet thanks to a drop shape analyser (Tracker, Teclis, France) equipped with a curved needle. Images of the drop were shot with the apparatus software (Windrop). The contact angle was measured using the software Fiji [40] 300 s after drop deposition, to let the drop reach its equilibrium shape. For each type of substrate, ten measurements were performed, on ten different films and tablets.

The significance of the differences observed between each type of NP was tested statistically using the software Prism 5 (GraphPad Software, USA). For each type of NP, the ten contact angle values were considered, as Grubbs tests indicated the absence of outliers. A D'Agostino-Pearson test was performed first to verify the normality of the distribution, for each set of ten values. Once the normality attested, a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was performed, to assess the significance of the differences between each set of data one by one.

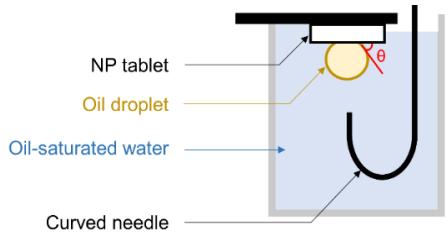


Figure 1: Setup for the contact angle measurements between a captive drop of oil and a NP tablet, in oil-saturated water at 18°C.

2.5. Emulsion preparation

Emulsions (5 g) with different water/oil ratios, from 95/5 to 30/70 were prepared. NP concentration in aqueous phase was set at 25 mg/mL. Both NP suspension and Miglyol 812N were placed together in a vial and emulsified with a 5 G dispersing tool, set on an Ultra-turrax (IKA T10 basic), at 20,000 rpm for 2 min. Room temperature was set at 18°C.

2.6. Emulsion characterisation

2.6.1. Macroscopic aspect

The emulsion aspect has been observed after a period of storage of 7 days, at 18°C and protected from light.

2.6.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

The microscopic structure of the emulsions was assessed for each type of NP with CLSM, using an inverted microscope (TCS SP8–gated STED, Leica Microsystems, Germany) equipped with a WLL laser and a HC PL APO 40x/1.10 CORR CS2 water immersion objective lens. The emulsions were observed within the first hour following their preparation. Before collecting the samples, the emulsions were homogenised by inverting the tubes three times. Then the samples were placed in a curved glass slide with a glass cover slip on top. It prevented the deformation of emulsion droplets usually observed when using a flat glass slide. During NP preparation process, NP were labelled in red by replacing 0.15 mg of PLGA by a PLGA-rhodamine B conjugate. The aqueous phase was labelled in green with calcein (0.08 mg/mL). A 563-nm excitation wavelength was used, and bandwidth detection was set between 600 and 710 nm to collect the corresponding "red" fluorescence emission. A 488-nm excitation wavelength was used, and bandwidth detection was set between 500 and 535 nm to collect the corresponding

"green" fluorescence emission. To avoid reflection, a hybrid detector under gated mode (0.3-6.5 ns) was used. Green and red fluorescence emissions were collected under a sequential mode with the pinhole set at 1.0 Airy unit giving a 1.27 µm optical slice thickness. Twelve-bit images were acquired with a definition of 1024 x 1024 pixels.

2.6.3. Scanning Electron Cryo-Microscopy (CryoSEM)

A sample of each emulsion was gently deposited in a gold-plated copper cupule with dome shaped indentation of 1.4 mm central diameter. Samples were then quickly frozen without any cryoprotectant by plunge in liquid ethane with a Leica CPC apparatus (Leica microsystems, Austria) without cryoprotectant. They were transferred to a Leica ACE 600 fracturing/coating apparatus, thanks to a Leica VCT 100 loading station and shuttle (Leica microsystems, Austria). They were freeze-fractured at -150°C (high vacuum around 4×10^{-6} mbar), with a blade or a scalpel and then coated by sputtering with 3 nm of Iridium (at 8×10^{-3} mbar and 80 mA upon Argon).

Finally, observations were performed at -150°C in a Field Emission SEM Gemini 500 (Zeiss) operating at 790 V under high vacuum in the observation chamber, around 1×10^{-6} mbar. The objective aperture diameter was set at 15 µm and the working distance was between 2.2 and 2.8 mm. Secondary electrons were collected with the in-lens detector. Images were acquired with a definition of 1024 x 768 pixels. Scan speed and line or drift compensation frame integrations were adjusted during observations.

2.6.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC experiments were carried out using a Perkin-Elmer DSC Diamond apparatus equipped with an Intracooler 2P cooling device and connected to a Pyris Thermal Analysis Software System 9.1. The calorimeter was calibrated according to IUPAC recommendations, for both temperature and enthalpy [41]. The polymers, in the range of 2 to 6 mg, were accurately weighed and sealed within 50-µL aluminium pans (pan with holes, part BO143019 and cover, part BO143003); an empty pan was used as a reference. Samples were cooled from 55 to −5°C at a constant rate, $|dT/dt| = 5°C.min^{-1}$ and heated from −5 to 55°C at different rates, dT/dt = 5, 10, 15 and $20°C.min^{-1}$. The first scan was preceded by a 10-min isotherm at 25°C to allow the samples to reach thermal equilibrium. All the transitions were found to be reversible and reproducible in the repeated scans. To eliminate the effects of the heating rate on the T_g, the value was

extrapolated to zero rate by linear regression. This value, called $T_{g(0)}$, was the one we used to compare the samples.

To evaluate PLGA behaviour in presence of oil and water, emulsions were prepared with each type of NP, following the usual procedure described earlier (see Section 2.5). The water/oil ratio was set at 90/10 (w/w). A sample of emulsion, in the range of 14 to 17 mg, were accurately weighed and hermetically sealed within 50-µL aluminium pans (pan part BO143017 and cover part BO143003); an empty pan was used as a reference. The cooling parameters were like those used for the polymer. Only one heating step was done, at a rate of dT/dt = 20°C.min^{-1}. Indeed, performing analyses at smaller rates resulted in very weak signals. The scan was still preceded by a 10-min isotherm at 25°C. The extrapolation to obtain the T_g at zero rate was done thanks to the linear regression obtained with the polymer.

3. Results and discussion

3.1. Polymer and NP characterisation

Prior to NP preparation, the various PLGA polymers used in this study were fully characterised in terms of chemical structure and molar mass (Table 1). ^{1}H NMR analysis confirmed that all the PLGA were composed of 75% of LA and 25% of GA, in good agreement with provider's specification (Supporting Material 1). The end group of PLGA 752 H and PLGA 753 H was a carboxylic acid, while PLGA 752 S and PLGA 753 S ended by an ester group (respectively containing 10 and 8 carbons). Concerning the mass-averaged molar masses M_w, determined by SEC relative to PMMA standards, they were twice higher for PLGA 753 than for PLGA 752 ($M_w \approx 32{,}000$ g/mol for PLGA 753 versus $M_w \approx 14{,}000$ g/mol for PLGA 752).

PLGA NP were then successfully prepared by a nanoprecipitation method in purified water. Their size distribution and ζ-potential, studied by DLS, are reported in Table 1. PLGA molar mass seemed to have no or little influence on the NP size and ζ-potential, in the range of molar masses studied. However, acid-ending PLGA (752 H and 753 H) led to a higher ζ-potential in absolute value (around -50 mV) compared to ester-ending PLGA (752 S and 753 S, around -30 mV), because of the exposure of ionised acid end groups at the NP surface [42] (Supporting Material 2). Also, NP prepared with an ester-ending

polymer (752 S and 753 S, around 220 nm) were larger than those prepared with an acid-ending polymer (752 H and 753 H, around 160 nm), as described in literature [43] (further discussed in Supporting Material 2). Thus, NP average size was mainly influenced by the PLGA ending, even if the size variation remained modest.

PLGA-PVA NP were prepared with PLGA 753 S by the emulsion-evaporation method using PVA, a neutral polymer, as a stabilizer for the emulsification step. The resulting NP had a size in the same range as NP made by nanoprecipitation but differed in terms of ζ-potential. The almost neutral ζ-potential of the PLGA-PVA NP can be explained by the presence of residual PVA chains anchored at the NP surface (estimated at 9 mg/100 mg of PLGA), shielding the surface charges of PLGA [10,42].

Table 1: Characteristics of PLGA (in chloroform by ^{1}H NMR and SEC), and NP (by DLS). Size analysis was performed in purified water, and ζ-potential in NaCl 1 mM.

Studied NP	Polymer characteristics			NP characteristics		
	LA/GA ratio	End group	M_w (g/mol)	Hydrodynamic diameter (nm)	PdI	ζ-potential (mV)
PLGA-PVA 753S	75/25	ester C10	33,000	202 ± 1	0.07 ± 0.03	-4.1 ± 0.4
PLGA 752 H	75/25	acid	14,000	162 ± 3	0.08 ± 0.01	-53 ± 3
PLGA 753 H	75/25	acid	32,000	155 ± 5	0.07 ± 0.01	-52 ± 3
PLGA 753 S	75/25	ester C10	33,000	213 ± 18	0.07 ± 0.01	-34 ± 2
PLGA 752 S	75/25	ester C8	14,000	238 ± 18	0.07 ± 0.02	-26 ± 3

To conclude, all the NP produced had a narrow size distribution (PdI ≈ 0.07), and the PLGA influence on the average size was quite low, all the NP exhibiting a size around 200 nm whatever their composition and preparation process. They mainly differed by their ζ-potential, suggesting differences in their surface properties.

3.2. PLGA characteristics influence the emulsion properties

3.2.1. Influence of NP wettability

The surface properties of NP have a major influence on their wettability, which impacts Pickering emulsion morphology and stability [44]. It is therefore essential, in order to

understand the behaviour of NP in the emulsions, to assess their wettability by measuring their contact angle in the three-phase system [8]. Thus, we measured the contact angle between a drop of oil and a PLGA solid substrate, in water.

Most of the time, the substrate is a PLGA film, produced by drop casting [45–47]. Preliminary experiments, consisting in contact angle measurements between a water drop and PLGA films in air showed the possibility to discriminate the PLGA types based on their wettability by water (Supporting Material 3). However, this substrate might not be the most suitable one. First, it is difficult to reproduce the PVA coverage on a film, with the same amount of PVA and the same organisation as on the PLGA-PVA NP. Also, the drop of water deposited for the contact angle measurement could dissolve the PVA film, biasing the result. Besides, the PLGA conformation during a simple drop casting process (film/air interface) may be different from the polymer conformation during the nanoprecipitation process (NP/water interface). This could induce a difference in the surface structure between films and NP, which might have some consequences on the contact angle. For these reasons, we used tablets composed of the NP themselves as a solid substrate, to be as representative as possible from the materials used in the emulsions (Supporting Material 3). It might be noted that contact angle measurements on particle tablets have already been performed for other types of materials, such as clays [48], metal oxides [49], nitrocellulose [50], or silica [51]. The necessary compression force, though, was much lower in our case, as PLGA and PLGA-PVA NP are quite soft [10] and appeared to be cohesive. It should be noted that the roughness of the tablet surface (ranging between 37 and 121 nm, as determined from AFM measurements) was very low, so it likely had no influence on the contact angle (Supporting Material 4).

After assessing the relevance of using NP tablets for contact angle measurement in air (Supporting Material 3), the experiment was performed in the three-phase system modelling an emulsion, *i.e.* by depositing a drop of oil on a NP tablet surrounded by water (Table 2). It appears that PLGA characteristics influenced the contact angle. Two groups can be distinguished: NP made of PLGA 753 S and 752 S showed a contact angle between 83 and 99°, whereas NP composed of PLGA 753 H and 752 H were more hydrophilic with a contact angle of 65 and 69°. Statistic tests confirmed the significance of the difference between ester-ending and acid-ending polymers (p-value ≤ 0.001). This shows that the polymer end group had a major influence on NP wettability. This is in good agreement with the ζ-potential values discussed previously, which confirms an

exposure of the acid moieties at the NP surface. Also, a slight effect of the PLGA molar mass can be observed: PLGA 752 S NP were a little more hydrophobic than PLGA 753 S NP (p-value ≤ 0.001). This minor effect could be due to a higher polymer chains content in PLGA 752 S NP (low molar mass) than in PLGA 753 S NP (high molar mass), for an equivalent mass. This results in a higher number of end groups at the NP surface for PLGA 752 S NP than PLGA 753 S NP, which would modulate the surface hydrophobicity. It should be noted that this phenomenon was not observed with acid-ending PLGA (p-value > 0.05). Also, these contact angle measurements allowed us to confirm the influence of the PVA coverage of the NP properties. The high contact angle of PLGA 753 S NP (θ = 83°), one of the most hydrophobic type of NP in this study, was dramatically decreased when PVA (a hydrophilic polymer) was adsorbed at their surface, making them far more hydrophilic (θ = 43°). This means that the coverage of the PLGA NP surface by PVA masked PLGA influence, as suggested by the ζ-potential values.

Table 2: NP surface wettability, represented by (i) the contact angle between a drop of Miglyol 812N and different NP tablets in oil-saturated water at 18°C, after 300 s of contact, and (ii) the oil amount necessary to obtain phase inversion from O/W to W/O for emulsions prepared with each type of NP.

NP studied	Contact angle between NP tablet and oil, in water (°)	Oil% for phase inversion (w/w)
PLGA-PVA 753S	43 ± 5	60-70 %
PLGA 752 H	69 ± 4	30-35 %
PLGA 753 H	65 ± 3	20-25 %
PLGA 753 S	83 ± 5	15-20 %
PLGA 752 S	99 ± 9	5-10 %

After studying the wettability of the different types of NP, emulsions were prepared to analyse the NP influence on the emulsion behaviour. For all types of NP, several emulsions were prepared with increasing amounts of oil, until reaching the catastrophic phase inversion from O/W emulsions to W/O emulsions [52] (Supporting Material 5). The oil amount added to obtain this inversion is reported in Table 2. Interestingly, the more hydrophilic the NP, the more oil was necessary to reach the catastrophic phase inversion. This behaviour apparently matched with Finkle's rule: the most hydrophilic NP preferably stabilised O/W emulsions, and conversely for the most hydrophobic NP [53,54].

However, this should be discussed more in detail, in the context of the literature. A major review of Aveyard *et al.* gathers contact angle values and preferred emulsion types for a wide range of particles [55]. For a water/oil ratio of 50/50, the authors set a clear distinction between hydrophobic NP ($\theta \geq 90°$), that stabilise W/O emulsions, and hydrophilic NP ($\theta \leq 90°$), that stabilise O/W emulsions (some exception are observed between 80 and 90°, with particles that can stabilise both types of emulsions depending on the conditions). In our case, this rule was strictly respected for very hydrophilic PVA-covered NP ($\theta = 43°$, O/W emulsion with 50% of oil) and hydrophobic bare NP made of ester-ending PLGA ($\theta = 83$ and 99°, W/O emulsion with 50% of oil). However, the behaviour of bare PLGA 752 H and 753 H NP was quite unusual, as they were hydrophilic ($\theta = 69$ and 65° respectively) but led to a W/O emulsion with 50% of oil. This atypical behaviour can be explained by a set of experimental conditions, that favoured a catastrophic phase inversion despite the hydrophilicity of the NP. Indeed, the high emulsification speed [56,57], the long emulsification time [56,58,31], as well as the high concentration of particles [58] could have forced the phase inversion at low oil percentages. However, this forced phase inversion does not invalidate the previous assertion: the more hydrophilic the NP, the more oil was necessary to reach the catastrophic phase inversion.

Then, the difference of emulsion behaviour was analysed at the microscopic scale, on emulsions prepared with the five different types of NP in the same conditions, at a fixed water/oil ratio of 90/10 (w/w). CLSM observations were performed few minutes after the preparation of these emulsions, in order to visualise their microscopic features (Figure 2). First, we observed that red-labelled NP were adsorbed at the interfaces between water and oil, for all types of NP, as expected for Pickering emulsions. This could be directly visualised on the CLSM images for the bare NP, as these latter formed a yellow or red ring at the interface of the droplets (Figure 2b-e). For PVA-covered NP, this ring was less obvious, but fluorescence intensity measurements performed at the interface highlighted the presence of a thin layer of particles (Supporting Material 6). Secondly, a gradual variation of the emulsion structure as a function of NP wettability could be observed. At this water/oil ratio, very hydrophilic NP (covered by PVA) stabilised a simple O/W emulsion (Figure 2a). In the same conditions, hydrophobic PLGA 752 S NP stabilised a simple W/O emulsion (Figure 2e), even if the oil amount was very low (10%). This is a spectacular effect of the hydrophobicity of these NP. Moreover, this image suggests the formation of a network of PLGA 752 S NP, stabilising the water droplets.

The three other types of NP with intermediate wettability (PLGA 752 H NP, PLGA 753 H NP and PLGA 753 S NP, respectively Figure 2b-d) stabilised multiple W/O/W emulsions. It is interesting to notice the formation of both W/O and O/W interfaces by a single-step process, when multiple emulsions are usually prepared in two steps, with classical surfactants [59] as well as with solid particles [60]. This has already been described with PLGA NP, in a previous study by our group [10]. We assume this behaviour might be due to the contribution of a set of favourable conditions, such as: (i) a sufficient oil amount to promote coalescence during the process, which induced the inclusion of continuous phase in the oil droplets [58,61]; (ii) an excess of NP, that were available to stabilise the surface of inner droplets [58]; (iii) an intermediate wettability of all [31] or part of the NP [62] in the three-phase system, which allowed them to stabilise both water-in-oil and oil-in-water interfaces; and finally (iv) a short emulsification time, not sufficient to reach the potential phase inversion usually following the formation of multiple emulsion [63] (Supporting Material 5). The preparation of multiple Pickering emulsions in one step has already been described in literature, even if their obtention is more common when NP are pre-suspended in the oil phase [64].

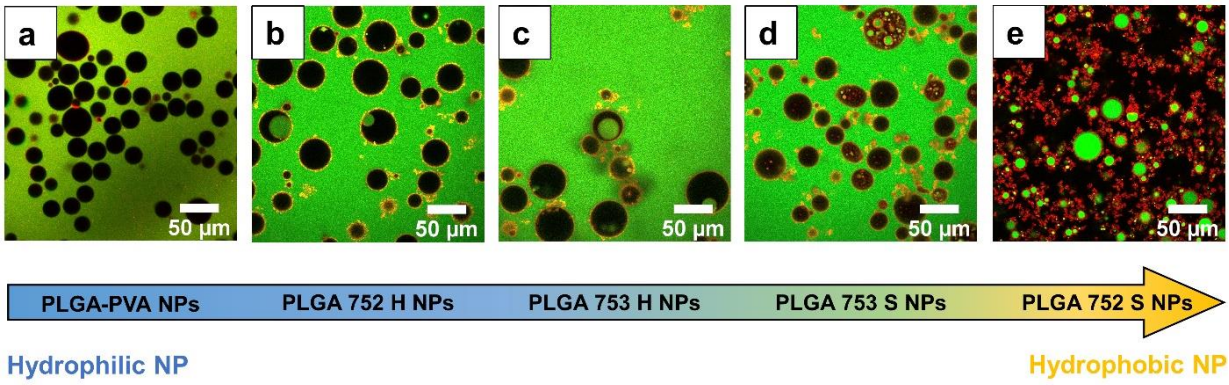


Figure 2: CLSM images of emulsions with a water/oil ratio of 90/10 (w/w), prepared few minutes before the observation, and stabilised by: a) PLGA-PVA 753 S NP, b) PLGA 752 H NP, c) PLGA 753 H NP, d) PLGA 753 S NP, e) PLGA 752 S NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

NP wettability had also some consequences on the macroscopic aspect of the emulsions. Some macroscopic pictures of the five emulsions microscopically studied previously were taken after seven days of storage (Figure 3). All these emulsions were quite fluid, allowing droplets to form a cream layer, topping the excess of water phase. First,

variation of the cream thickness could be observed: PVA-covered NP (Figure 3a) led to a thin cream layer (20% of the total height of the emulsion), whereas PLGA 752 H NP, PLGA 753 H NP and PLGA 753 S NP (Figure 3b-d) stabilised a very thick cream layer (50% of the total height of the emulsion). This thick layer is the macroscopic consequence of the presence of multiple droplets, as observed with CLSM (Figure 2). The thickness of the cream stabilised by PLGA 752 S NP could not be assessed precisely, due to its very unusual aspect (Figure 3e), discussed in the next section. Macroscopic observations also provided information about the affinity of NP for the interphase. For the emulsions stabilised by PLGA-PVA 753 S NP, PLGA 752 H NP, and PLGA 753 H NP (Figure 3a-c), the aqueous phase was almost as cloudy as the initial NP suspension before emulsification. This was due to the excess of NP that remained in the water phase after emulsification, since these NP were hydrophilic. For the two other emulsions, stabilised by hydrophobic PLGA 753 S NP, and PLGA 752 S NP (Figure 3d-e), the aqueous phase was logically transparent, as NP did not have a great affinity for water. Finally, the stability of the emulsions could be evaluated. Indeed, the Figure 3a showed a beginning of coalescence at the top of the cream, while the other emulsions were stable (Supporting Material 7). This can be attributed to the high hydrophilicity of the PVA-covered NP, favouring their presence in the aqueous phase rather than at the oil/water interface [31,34,37].

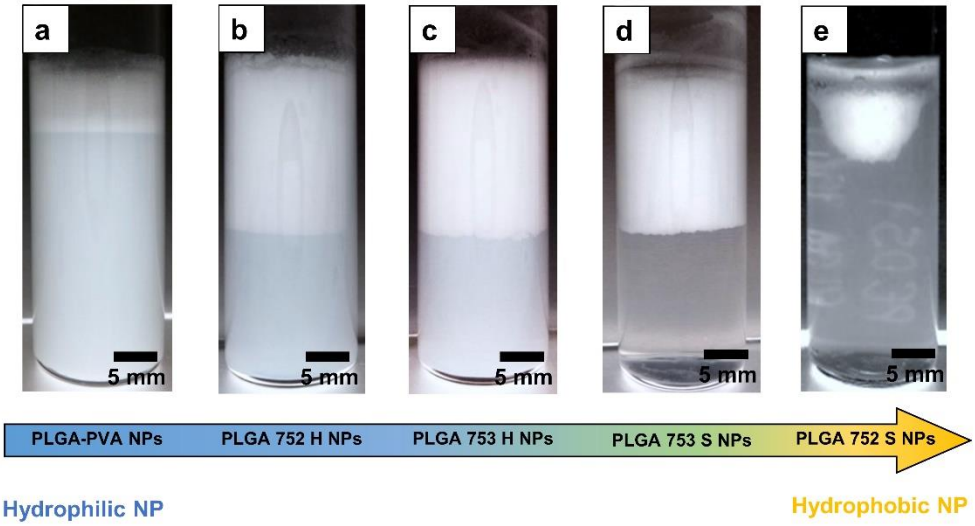


Figure 3: Macroscopic aspect of emulsions at day 7 prepared with a water/oil ratio of 90/10 (w/w) and stabilised by: a) PLGA-PVA 753 S NP, b) PLGA 752 H NP, c) PLGA 753 H NP, d) PLGA 753 S NP, e) PLGA 752 S NP.

3.2.2. Influence of the glass transition

Besides wettability, the second key parameter studied to understand the behaviour of the emulsions was the $T_{g(0)}$ of PLGA. Its graphical determination is explained in Supporting Information 8. As shown in Table 3, the ester-ending polymers had lower $T_{g(0)}$ than the acid-ending ones. It has been well described that $T_{g(0)}$ decreases when the mobility of the polymer chains increases. Yet, Flory and Fox showed that end chain units exhibited excess of free volume compared to units within the chain [65], so it is more likely to influence the polymer mobility. Thus, a modification of the end group induces a change of the $T_{g(0)}$ of the polymer. One can assume that the presence of ionized carboxyl end groups generates electrostatic interactions that forces the organisation of the polymer chains, reducing their mobility. Ester end groups do not display charges, hence a better mobility, and a lower $T_{g(0)}$. Besides, as expected, a shorter chain induced a lower $T_{g(0)}$: 44.5°C and 34.3°C for the PLGA 752 H and S respectively, versus 47.7°C and 45.1°C for the PLGA 753 H and S. Indeed, as explained in Section 3.2.1, for a given mass, the shorter the chains, the more numerous the end groups and hence the lower the $T_{g(0)}$ [65,66]. This is consistent with observations made by other groups on PLGA [67]. These trends, observed on the polymers, were confirmed by the results in the emulsions. Nevertheless, when NP were in contact with oily and aqueous phases, the $T_{g(0)}$ of the polymer decreased dramatically, compared to the dry polymer. The liquid phases acted as plasticisers, by penetrating NP structure and creating some additional free volume [68]. Some results obtained on NP suspensions tend to prove that water was the main plasticiser, oil having a minor effect on the $T_{g(0)}$ values (data not shown). Some other studies also highlighted the decrease of $T_{g(0)}$ of PLGA in presence of water [69,70]. Finally, PVA-covered PLGA 753 S NP exhibited a slightly higher $T_{g(0)}$ (39.7°C) compared to the bare ones (37.2°C). This is in good agreement with the results of Bouissou *et al.* [71], but remains unexplained.

The $T_{g(0)}$ value of PLGA 752 S in the emulsion (24.8°C) particularly attracted our attention. Indeed, it was very close to the room temperature, which could influence the behaviour of NP during the emulsification process. This will be further discussed in the next paragraph, as cryoSEM observations allowed us to understand the mechanism of stabilisation of the emulsions.

Table 3: $T_{g(0)}$ of dry PLGA and, $T_{g(0)}$ of PLGA NP in the emulsions with a water/oil ratio of 90/10 (w/w), obtained by DSC.

NP studied	$T_{g(0)}$ of PLGA polymer (°C)	$T_{g(0)}$ of NP in emulsions (°C)
PLGA-PVA 753S	45.1 ± 0.3	39.7 ± 0.6
PLGA 752 H	44.5 ± 0.2	32.7 ± 0.2
PLGA 753 H	47.7 ± 0.2	37.6 ± 0.2
PLGA 753 S	45.1 ± 0.3	37.2 ± 0.4
PLGA 752 S	34.3 ± 0.6	24.8 ± 0.6

CryoSEM images showed the microscopic internal structure of all the emulsions described above (Figure 4). The Figure 4a-d and corresponding cropped images showed NP adsorbed at the interface between oil and water interface, as previously observed in CLSM images (Figure 2 and Supporting Material 6). PVA-covered NP stabilised a simple O/W emulsion by forming a loosely packed monolayer (Figure 4a and corresponding cropped image). The wide space between the NP could be explained by the PVA-coverage, generating steric hindrance between particles at the interface. It could also be explained by the high hydrophilicity of the PVA-covered NP, not favouring their presence at the oil/water interface, hence a poor coverage. This might be the reason of the relative instability of this emulsion (Supporting Information 7). For PLGA 753 H, PLGA 753 S and PLGA 752 H NP, the particles were still visible, and formed an irregular layer, surrounded by flocs (Figure 4b-d and corresponding cropped images). If flocs have already been described with fumed silica [58], in our case the ζ-potential of NP (higher than -30 mV, Table 1) should prevent aggregation. Also, these flocs were not present in the initial NP suspension, as shown by the particle size analysis (Table 1). Their formation, only happening close to the oil-water interface, remains unexplained. Besides, these three emulsions also presented some inner droplets of water, in good agreement with the CLSM images showing W/O/W emulsions. These inner droplets were covered by NP monolayers as well, ensuring their stability and preventing them from escaping from the oil droplets [58] (Supporting Material 5). Finally, the image of the emulsion stabilised by PLGA 752 S NP (Figure 4e) surprisingly showed no NP at the interface. Instead of spherical NP, undefined and irregular structures were observed. Our hypothesis is that, performing the emulsification at 18°C with a high shear rate during 2 min, the temperature locally increased until exceeding the $T_{g(0)}$ value of PLGA 752 S ($T_{g(0)}$ =

24.8°C). The rubbery state of NP allowed them to unfold under shear, and agglomerate. This would result in the formation of a network of NP debris. This hypothesis is supported by the presence of an irregular network in the oil phase observed on CLSM image (Figure 2e). This led to a material that could still be considered as a Pickering emulsion, but with a very unusual aspect and texture (Figure 3e). So, the PLGA end group and molar mass would have an indirect influence on the emulsion morphology, by influencing the T_g of PLGA.

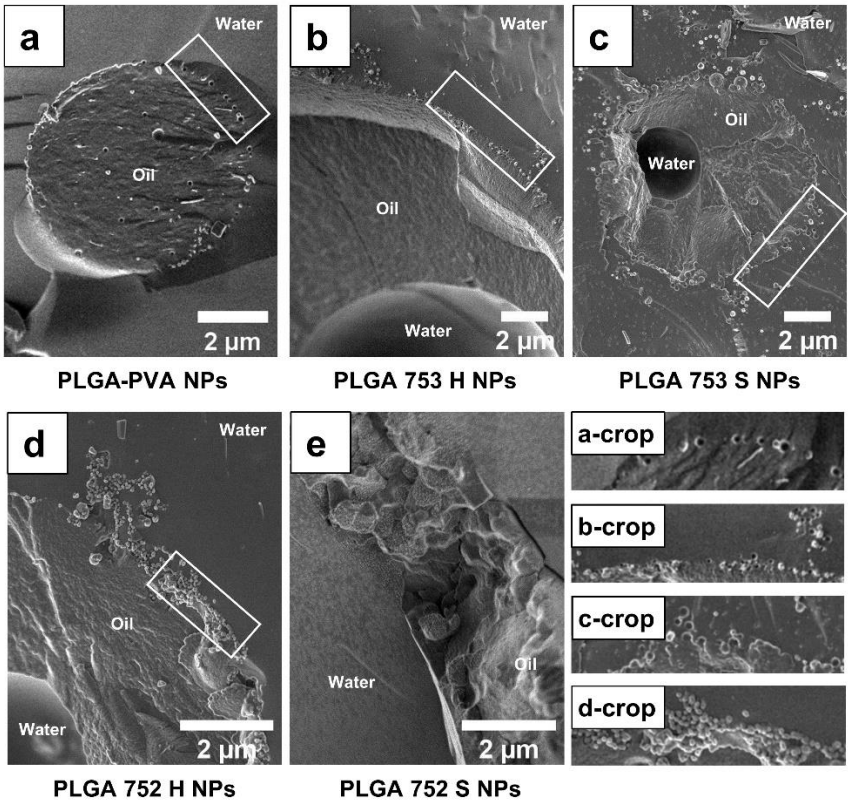


Figure 4: CryoSEM images revealing the internal structure of frozen-fixed and fractured emulsions prepared with a water/oil ratio of 90/10 (w/w), prepared a few minutes before the observation, and stabilised by: a) PLGA-PVA 753 S NP, b) PLGA 753 H NP, c) PLGA 753 S NP, d) PLGA 752 H NP, e) PLGA 752 S NP. Lower right cropped images show the NP organisation in the outlined regions.

4. Conclusion

This study demonstrated that the physico-chemical properties of PLGA constituting NP, and hence NP properties, were of the utmost importance to control the structure of the

final Pickering emulsions. The molar mass and the end group of the PLGA directly affected the NP wettability and glass transition temperature. Indeed, ester-ending polymers provided a higher hydrophobicity and a lower T_g, compared to acid-ending polymers. Also, a smaller molar mass could also slightly exacerbate the effect of the end groups, as the number of these latter increase. NP of various wettability were produced and used to stabilise different types of emulsions in accordance with Finkle's rule. However, producing NP in presence of a stabilising polymer (such as PVA) masked the effect of the PLGA characteristics, as PVA-coverage drove the emulsion stabilisation. Finally, an unusual solid emulsion, stabilised by a network of NP debris, was described. Due to the low T_g value of the concerned PLGA, a solid network was formed during the emulsification, leading to this unusual structure.

To conclude, by changing the initial characteristics of the polymer, we could tune NP characteristics and hence the emulsion structure (O/W, W/O, multiple emulsions) and texture (fluid or solid emulsions). This is particularly attractive for drug delivery purposes, as a versatile formulation platform enabling the encapsulation of both hydrophilic and hydrophobic active substances.

Acknowledgements

N. Huang acknowledges the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for its support through a Young Researchers grant (ANR-16-CE09-0003). We also thank one of the reviewers for suggesting improvements in our contact angle measurement method.

Supporting Material

Supporting Material 1: Polymer characterisation

The characteristics of the PLGA polymers used here to prepare NP are summarized in the commercial product name, made of three digits and one letter. The first two digits represent the fraction of lactic acid monomer in the polymer chain. In our case, it is 75 as all our polymers are composed of 75% of lactic acid and 25% of glycolic acid. The third digit corresponds to the molar mass of the PLGA: the higher this digit, the longer the polymer chain. However, the company did not give any information about the molar

mass of the polymer but provided values of inherent viscosity instead. Finally, the letter at the end of the PLGA denomination indicates its ending group. The letter H stands for acid end group, while the letter S stands for ester end group.

We characterised all the polymers we used to confirm the information provided by the company. First, each PLGA polymer was characterised by nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) (Figure S1.1). These spectra provided information about their LA/GA ratio and end group (Table S1.1). For all the PLGA polymers, the integration value for the d peak (corresponding to the CH moiety in the LA) was set at 1. As expected, this resulted in an integration value of 3,14 ± 0.11 for the c peak (corresponding to the CH_3 moiety of LA). On all spectra, a value of 0.70 ± 0.01 was found for the e peak (corresponding to the CH_2 moiety of GA): this is consistent with a 75/25 LA/GA ratio, as given by the supplier. In the case of ester-ending PLGA, two peaks, a and b, were identified, corresponding respectively to the CH_3 and the CH_2 moieties of the ester end group. Through their integration, the number of carbons composing the ester was evaluated at 8 (for PLGA 753 S) and 10 (for PLGA 752 S). In the case of acid-ending PLGA, the ester peaks were not present, but a broad peak (a') corresponding to the mobile proton of the acid end group was observed (assignment confirmed by the addition of deuterium oxide, data not shown).

Number-averaged molar mass (M_n), mass-averaged molar mass (M_w) and molar-mass dispersity ($Đ_M$, defined as the ratio of M_w to M_n) of the polymers were determined by steric exclusion chromatography (SEC) relative to PMMA standards (Table SM1.1). Whatever the polymer end group, the molar masses were two to three times higher for PLGA 753 than for PLGA 752, whether it be the number-averaged ($M_n \approx 8{,}000$ g/mol for PLGA 752 versus $M_n \approx 24{,}000$ g/mol for PLGA 753) or the weight-averaged molar masses ($M_w \approx 14{,}000$ g/mol for PLGA 752 versus $M_w \approx 32{,}000$ g/mol for PLGA 753). This was consistent with the inherent viscosity provided by the supplier, that followed the same trend.

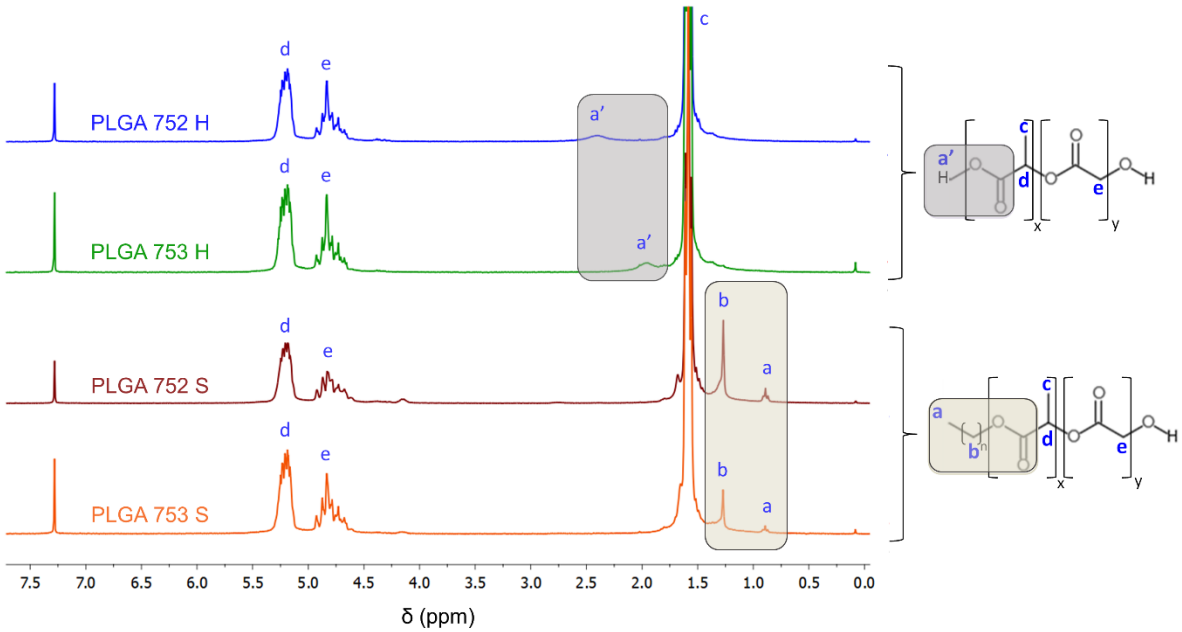


Figure SM1.1: ^{1}H NMR spectra of PLGA polymers of different molar mass and end group

Table SM1.4: Characteristics of polymers, analysed by ^{1}H NMR and SEC

Studied polymer	LA/GA ratio	End group	Inherent viscosity* (dL/g) 25°C, 0.1% $CHCl_3$	Molar mass		
				M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	$Đ_M$
PLGA 752 H	75/25	acid	0.14-0.22	7,000	14,000	2
PLGA 753 H	75/25	acid	0.32-0.44	23,000	32,000	1.4
PLGA 753 S	75/25	ester C8	0.32-0.44	25,000	33,000	1.3
PLGA 752 S	75/25	ester C10	0.16-0.24	8,000	14,000	1.8

*information provided by the supplier.

Supporting Material 2: NP characterisation

Precisions must be given about the variations of size distribution and ζ-potential of NP (section 3.1 of the main article). The ζ-potential values varied depending on the PLGA composition. NP made of acid-ending PLGA (752 H and 753 H) led to a very negative ζ-potential (-50 mV) because of the exposure of the acid end groups at the NP surface. Indeed, the pK_a of lactic acid and glycolic acid are both around 3.8 [72]. The pH of the NP suspensions was comprised between 3.5 and 5 (depending on the NP type) which promotes the presence of carboxylate forms, providing a very negative ζ-potential to the NP [42].

PLGA end group also influenced NP size. The fact that ester-ending PLGA (752 S and 753 S) led to larger NP compared to acid-ending PLGA (752 H and 753 H) is explained in literature [43]. Indeed, the nucleation-growth mechanism driving the nanoprecipitation is influenced by the presence of charged groups. These latter favour the presence of polymer chains at the interface, reducing the interfacial tension. As low interfacial tension increases nucleation rates and decreases growth and aggregation rates, this led to the formation of more NP, of smaller size, compared to ester groups. Thus, acid-ending PLGA NP being more negatively charged, they are smaller.

Supporting Material 3: Contact angle measurement on NP tablets versus PLGA films

To determine the most suitable solid substrate for the assessment of NP wettability, we performed contact angle measurement of a water droplet on both PLGA films and NP tablets, in air. This contact angle was measured by sessile drop method (Figure SM3.1). The film preparation was adapted from methods previously used by other teams to characterise PLGA wettability [45,46]. Glass slides were thoroughly cleaned with detergent and rinsed with purified water, and acetone. Then, a PLGA solution in dichloromethane was prepared with a concentration of 5 mg/mL, and 25 µL were deposited on a dry slide. This solution was left to dry 15 min at 18°C, and then 24 h at 70°C.

Besides, NP tablets were prepared from NP suspensions. First, NP suspensions of each type were frozen by immersion in liquid nitrogen and left in a freezer-drier Alpha 2-4 LD (Christ, Germany) for 24h. The condenser temperature was set at -80°C and the pressure was lower than 1 mbar. Then, 20 mg of freeze-dried NP were deposited in a cylindrical compression die with a diameter of 0.7 cm (die of the Qwik Handi-Press Set, Thermo Electron Corporation, USA). A force of 400 N was applied on top of the compression die at a speed of 0.05 mm/s and hold for 10 s using a TA.XTplus Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK) to form a tablet.

The contact angle was measured with a drop shape analyser (Tracker, Teclis, France) in air at 18°C, by drop shape analysis with the apparatus software (Windrop). A 5-µL drop of water was gently deposited at the surface of the PLGA film or NP tablet. The value was taken 5 s after drop deposition, to let the drop reach its equilibrium shape. This equilibrium took place in a short period of time as there was no imbibition, neither on

the films nor on the tablets. For each type of substrate, ten measurements were performed, on ten different films and tablets. The significance of the differences observed between each type of NP was tested statistically using the software Prism 5 (GraphPad Software, USA). For each type of NP, the ten contact angle values were considered, as Grubbs tests indicated the absence of outliers. A D'Agostino-Pearson test was performed first to verify the normality of the distribution, for each set of ten values. Once the normality attested, a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was performed, to assess the significance of the differences between each set of data one by one.

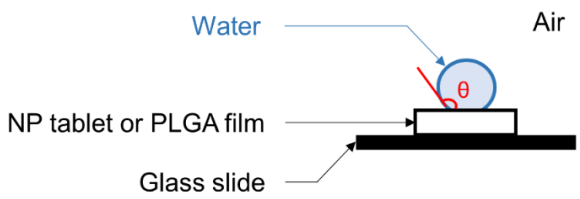


Figure SM3.1: Setup for the contact angle measurements between a sessile drop of water and a PLGA substrate (PLGA film or NP tablet), in air at 18°C.

The first results were obtained on PLGA films (Table SM3.1). All the contact angle values were comprised between 67 and 78°, which matches with results described in literature for various types of PLGA (usually around 75°, using dichloromethane as solvent) [45–47].Still, it appears that PLGA characteristics influenced the contact angle. Two groups can be distinguished: films made of PLGA 753 S and 752 S showed a contact angle between 74 and 78°, whereas films composed of PLGA 753 H and 752 H were more hydrophilic with a contact angle of 67°. Statistic tests confirmed the significance of the difference between ester-ending and acid-ending polymers (p-value ≤ 0.001). This shows that the polymer end group had a major influence on NP wettability. This is in good agreement with the ζ-potential values discussed previously, which confirms an exposure of the acid moieties at the NP surface. Also, a slight effect of the PLGA molar mass can be noticed: PLGA 752 S films were a little more hydrophobic than PLGA 753 S films (p-value ≤ 0.001). This minor effect could be due to a higher polymer chains content in PLGA 752 S films (low molar mass) than in PLGA 753 S films (high molar mass), for an equivalent mass. This results in a higher number of end groups at the

surface for PLGA 752 S than PLGA 753 S, which would modulate the surface hydrophobicity. It should be noted that this phenomenon was not observed with acid-ending PLGA (p-value > 0.05).

A similar method was used to measure the contact angle on NP tablets. Globally, the results obtained with this substrate were comparable to the ones obtained on PLGA films: ester-ending PLGA NP (753 S and 752 S) were more hydrophobic than NP composed of acid-ending PLGA (753 H and 752 H), with a p-value lower than 0.001. The molar mass also had a slight impact on the wettability of ester-ending PLGA NP (p-value ≤ 0.05). However, the wettability measurements on NP tablets also provided new information. First, the range of contact angle values was broader when measured on tablets (from 82 to 109°, for bare PLGA NP) compared to the films (from 67 to 78°). This suggests a different polymer conformation at the film surface compared to the NP surface, which was not surprising, as they are both obtained by very different processes. As it was composed of NP, the surface of tablets appeared to be more representative of the real NP surface than the surface of model films. Thus, contact angles measurements on NP tablets should be favoured, as it reflects the wettability of the PLGA NP by water in the conditions of its use in emulsions. Also, this method allowed us to study the wettability of PVA-covered NP, which was not the case with films (NA in Table SM3.1). Indeed, it is difficult to reproduce the PVA coverage on a film, with the same amount of PVA and the same organisation as on the PLGA-PVA NP. Also, the drop of water deposited for the contact angle measurement could dissolve the adsorbed PVA film, biasing the result (whereas the PVA covering the NP is anchored in the NP surface, so it cannot be desorbed [10]). The measurements performed on NP tablets showed that the high contact angle of hydrophobic PLGA 753 S NP (θ = 102°) was dramatically decreased when PVA, a hydrophilic polymer, was adsorbed at the surface, making NP surface far more hydrophilic (θ = 40°). This means that the coverage of the PLGA NP surface by PVA masked PLGA influence.

Thus, NP tablets were more representative of the real NP surface than the surface of model films, and they allowed us to demonstrate rigorously the influence of PVA coverage. In the main article, we decided to use NP tablets instead of films to evaluate the wettability of NP.

Table SM3.1: NP surface wettability, represented by (i) the contact angle between a drop of water and different PLGA substrates (PLGA films or NP tablets) after 5 s of contact, and (ii) the oil amount necessary to obtain phase inversion from O/W to W/O for emulsions prepared with each type of NP

NP studied	Contact angle with water, in air (°)	
	On PLGA films	On NP tablets
PLGA-PVA 753S	NA	39 ± 7
PLGA 752 H	67 ± 3	82 ± 6
PLGA 753 H	67 ± 2	88 ± 5
PLGA 753 S	74 ± 3	102 ± 6
PLGA 752 S	78 ± 2	109 ± 4

NA: Not Applicable

Supporting Material 4: Analysis of the tablet surface by AFM

Atomic force microscopy (AFM) pictures of NP tablets were collected in air at room temperature (22°C) using a commercial Multimode-8 equipped with a NanoScope V controller from Bruker manufacturer (Bruker, AXS, France). Tablets (prepared as described in section 2.4.3 of the main article) were fixed on magnetic disks directly mounted on top of the AFM scanner. Topographic properties were imaged using the Peak Force quantitative nano mechanical (QNM) property mode with a nanoindentation frequency of 2 kHz. PeakForce mode worked with small controlled load forces (around 0.1 nN) and with deformation depths as small as 1 nm, so damage to the probe or sample was kept minimal. MPP-21100-10 cantilevers (Bruker) were used, with a spring constant of 3 N/m and a tip radius between 8 and 10 nm. The scan rate was adjusted in the range of 0.5 to 1 Hz over selected areas (5.0 µm x 5.0 µm and 10.0 µm x 10.0 µm). Data processing was performed with the WSxM and Bruker softwares. The roughness was characterised using R_a parameter (calculated from the Bruker software), which is one of the most commonly used roughness statistics. R_a is the arithmetic average of the absolute values of the surface height deviations measured from the mean plan. The mean calculated values corresponded to the average of three values, taken from three images for each type of NP tablets.

Some examples of AFM images of NP tablets are shown in Figure SM4.1. The shape of the NP remained distinguishable, although they seemed flattened. This allowed us to assume that the tablet surface kept the molecular organization of freeze-dried NP, making it a representative model to study the surface hydrophobicity of NP. Moreover, we did not

observe deep cracks, or major irregularities of the topography. This was quantified by the R_a (Table SM4.1). The average roughness was not higher than the diameter of a NP, as it was comprised between 37 and 121 nm. This low roughness probably did not have influence on the contact angle measured on the NP tablets. In other words, we considered that contact angles measured on NP tablets followed ideal Young's law and did not need to be modelled by Wenzel or Cassie-Baxter equations. Thus, contact angles measured on NP tablets were assumed to be directly related to the chemical composition of the NP surface.

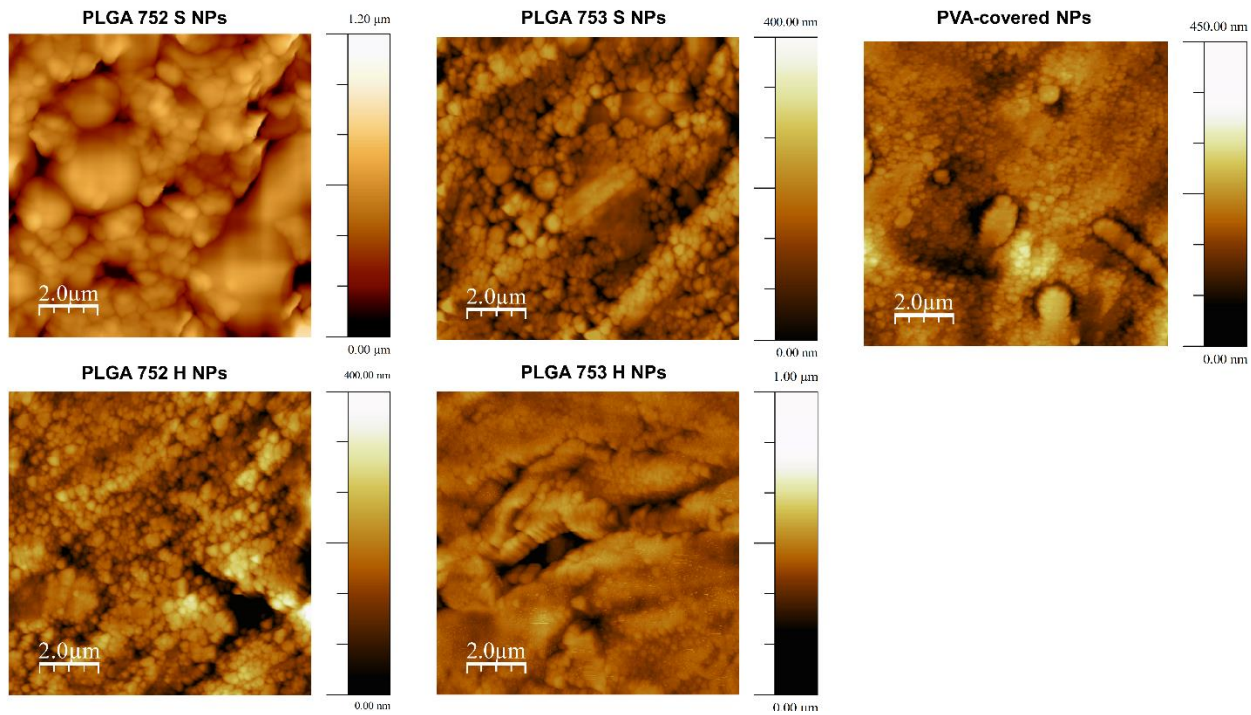


Figure SM4.1: AFM images of the surface of NP tablets, used to measure the contact angle between NP and a drop of water in air

Table SM4.1: Average roughness of the surface of NP tablets, measured in AFM

NP studied	R_a (nm)
PLGA-PVA 753S	100 ± 107
PLGA 752 H	37 ± 11
PLGA 753 H	50 ± 26
PLGA 753 S	83 ± 56
PLGA 752 S	121 ± 14

Supporting Material 5: Phase inversion and multiple emulsions

To determine the oil amount necessary to the phase inversion of emulsions, 5-g emulsions with different water/oil ratios were prepared and characterised as described in the sections 2.5 and 2.6 of the main article. The resulting pictures allowed us to build phase diagrams showed in Figures SM5.1 to SM5.5. The data shown in Table 2 of the main article were extracted from these diagrams. Apart the value of the oil amount necessary to induce the phase inversion, this study showed that all the NP studied were able to stabilise multiple W/O/W emulsions. According to the literature, several experimental conditions could have favoured that fact.

First, Groeneweg *et al.* suggested that the formation of inner droplets (called "inclusions") was due to the enclosure of a small volume of continuous phase during the coalescence of two droplets under high shear rate. However, the amount of dispersed phase (here, Miglyol 812N) had to be high enough to allow collision and coalescence between these two droplets [63]. Indeed, we can observe simple O/W emulsions with 10% of oil, for PLGA-PVA NP (Figure SM5.1). Multiple W/O/W emulsions started to form with higher amount of oil, for this type of NP.

After their formation, inclusions can escape from the drops. If the escape rate of inclusions is higher than the formation rate, multiple emulsions might never be observed. To limit the escape of the inclusions, they might be stabilised. In our case, inclusions observed in the multiple emulsions made with PLGA 752 H NP, PLGA 753 H NP and PLGA 753 S NP with 10% of oil are covered by a NP layer, as

revealed in cryoSEM (Figure SM5.6), which explains their stability even after the end of the emulsification. This coverage is possible for two main reasons, according to the literature: (i) contact angles might be close to 90° in the three phase system, to stabilise both O/W and W/O interfaces [31]; and (ii) there is a large excess of NP available to stabilise the new interface formed during the inclusion [58]. It should be noted that cryoSEM observation of stabilised inclusions could not be done for PLGA-PVA NP and PLGA 752 S NP, because the oil amount of the observed emulsions was set at 10%. However, these NP are able to form multiple emulsions at other oil amounts, as shown in Figures SM5.1 and SM5.5. Some cryoSEM observations could be performed on these multiple emulsions to check if the inclusions they contain were also covered by NP.

Finally, the formation of multiple emulsions can be a short step preceding the phase inversion to a W/O emulsion. According to Groeneweg *et al.*, a W/O/W emulsion with a fixed composition under constant shear can evolve towards a W/O emulsion. Indeed, if coalescence occurs constantly while inclusions are stabilised and do not escape, an accumulation of inclusions occurs, increasing the effective volume fraction of disperse phase. Up to a critical volume fraction, the dispersed phase becomes the continuous phase: this is the phase inversion [63]. So, the emulsification time is an important parameter governing the production of multiple W/O/W emulsions or W/O emulsions. This assumption was validated for PLGA 753 S, as shown in Figure SM5.7. Indeed, with an oil amount of 20%, we usually observed a W/O emulsion after 2 min of emulsification. But the reduction of the emulsification time to 75 s prevented the system from inverting, leading to the observation of W/O/W emulsions. Thus, we assumed that the multiple W/O/W emulsions formed under the conditions of our experiments with all the types of NP studied (Figures SM5.1 to SM5.5) could be observed because the emulsification time was not higher than 2 min. With longer times, it could have been inverted.

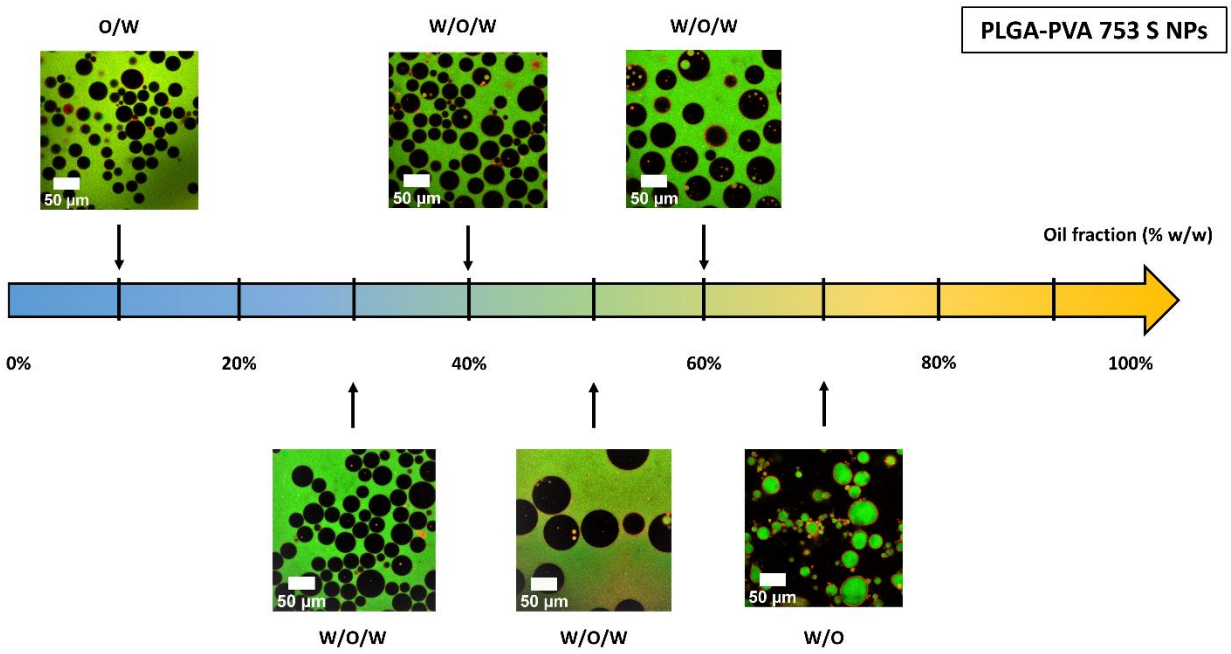


Figure SM5.1: CLSM images of emulsions with various water/oil ratio (w/w), stabilised by PLGA-PVA 753 S NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

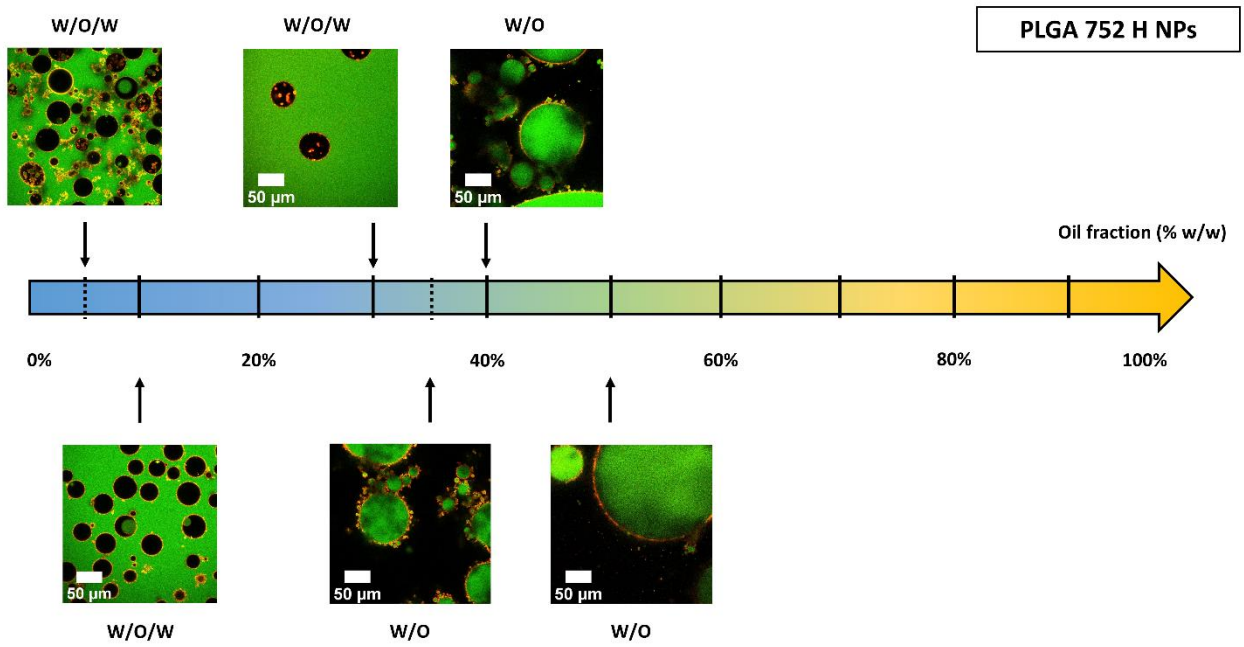


Figure SM5.2: CLSM images of emulsions with various water/oil ratio (w/w), stabilised by PLGA 752 H NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

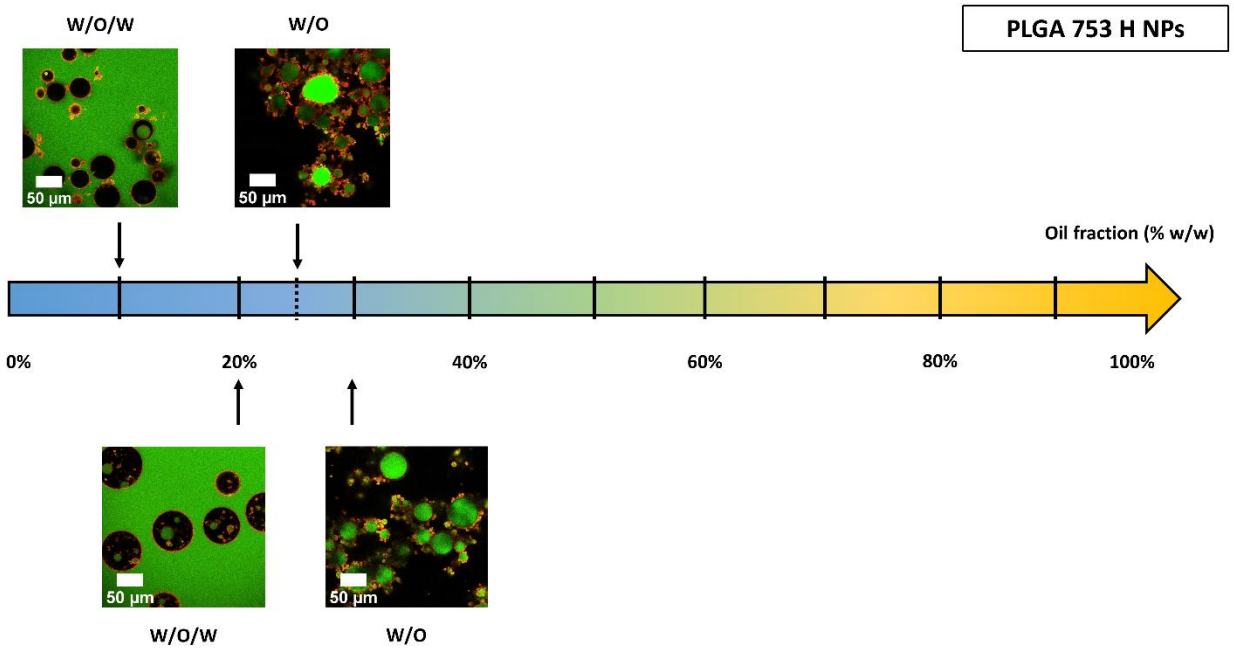


Figure SM5.3: CLSM images of emulsions with various water/oil ratio (w/w), stabilised by PLGA 753 H NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

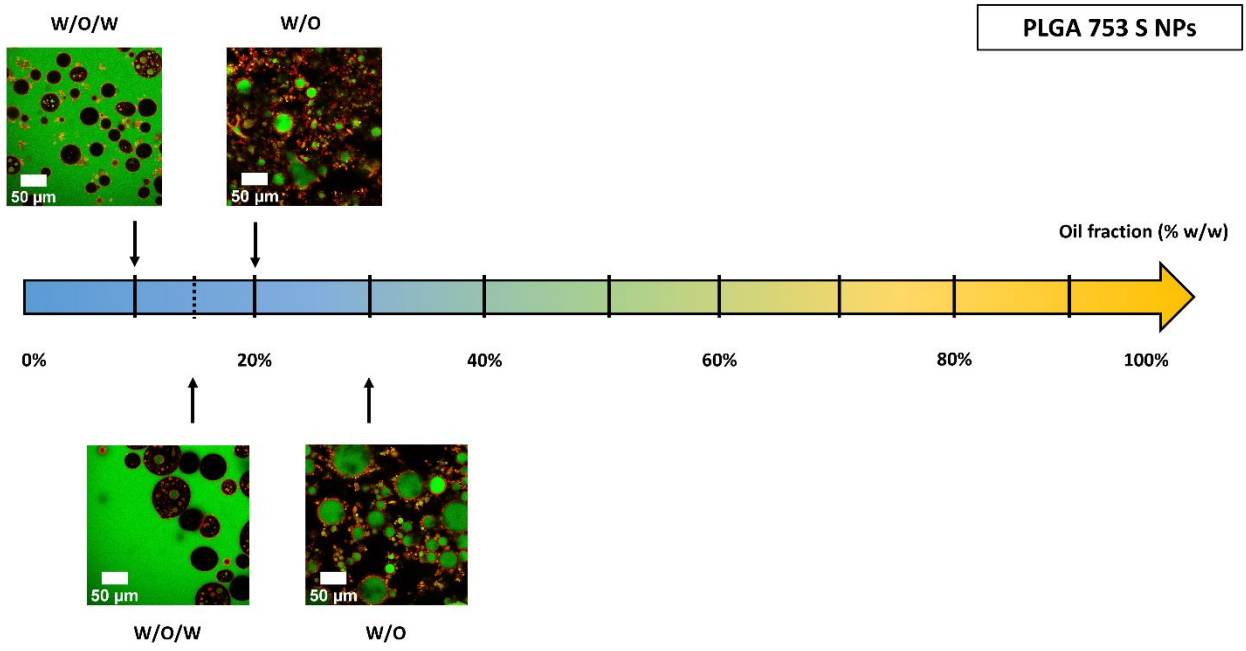


Figure SM5.4: CLSM images of emulsions with various water/oil ratio (w/w), stabilised by PLGA 753 S NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

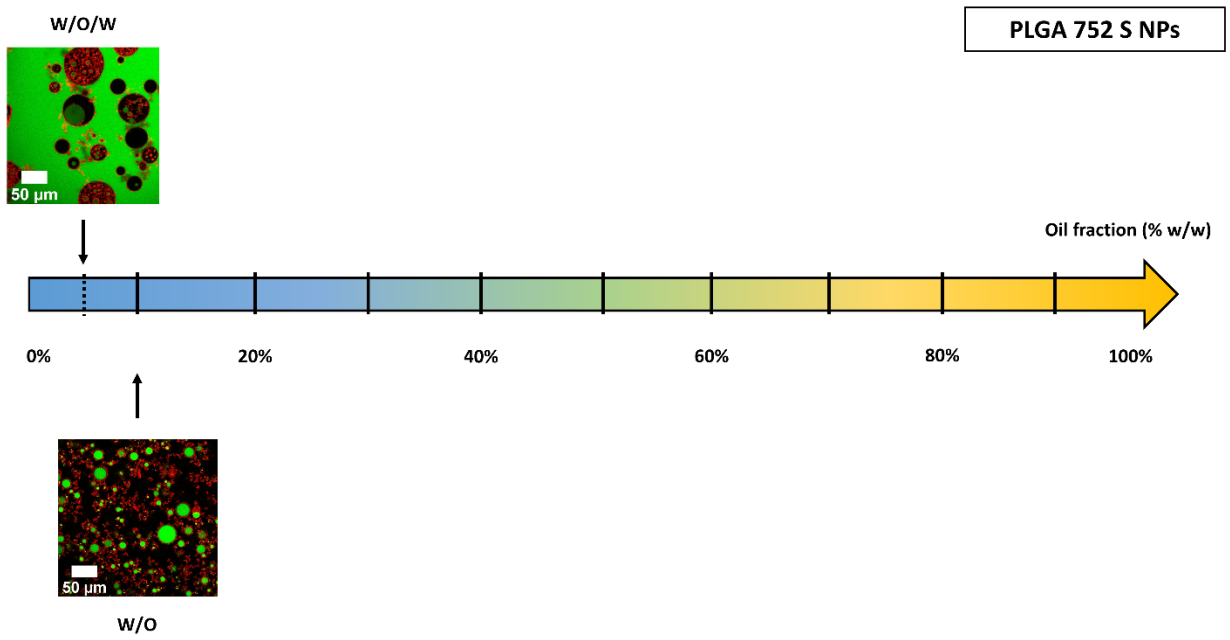


Figure SM5.5: CLSM images of emulsions with various water/oil ratio (w/w), stabilised by PLGA 752 S NP. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

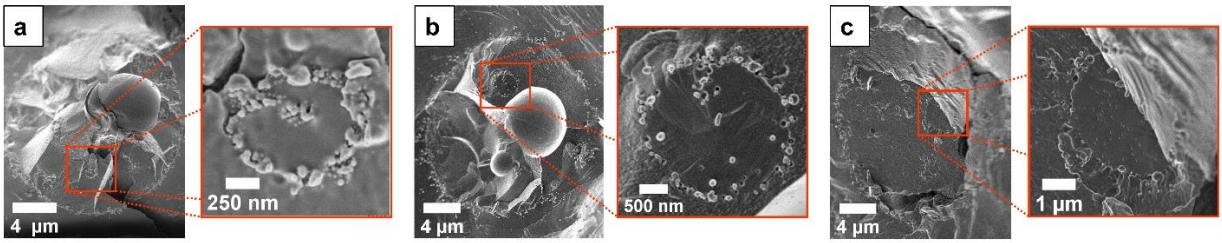


Figure SM5.6: CryoSEM images showing the NP coverage of inner droplets in multiple emulsions prepared with a water/oil ratio of 90/10 (w/w), few minutes before freezing for observation, and stabilised by: a) PLGA 752 H NP, b) PLGA 753 H NP and c) PLGA 753 S NP

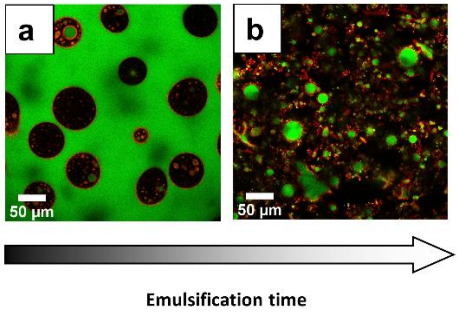


Figure SM5.7: CLSM images of emulsions with a water/oil ratio of 80/20 (w/w), prepared few minutes before the observation, and stabilised by PLGA 753 S NP. The emulsification time was set at a) 75 s and b) 2 min. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

Supporting Material 6: Evidence of NP adsorption on CLSM images

Beside the microstructure of the emulsions, CLSM allowed to highlight the adsorption of NP at the oil-water interfaces. As described in the main article, emulsions were prepared with the five different types of red-labelled NP, green-labelled water (calcein at a concentration of 0.08 mg/mL), and regular Miglyol 812N. The emulsion process was similar for all the types of NP, with a NP concentration of 25 mg/mL in water, and a fixed water/oil ratio of 90/10 (w/w). CLSM images were shot few minutes after the preparation of these emulsions. Thanks to the software Fiji [40], the fluorescence intensity was measured along a droplet section, for both red and green channels. This image treatment was performed on one drop for each type of emulsion (Figure SM6.1).

For all types of NP, the fluorescence intensity profile showed two peaks at the interface of the droplet in the red channel, corresponding to the NP adsorbed at the interface. It might be noted that this red fluorescence increase was quite low for PVA-covered NP, relative to the red fluorescence of the aqueous phase, suggesting both a high amount of NP remaining in the aqueous phase, and a low aggregation of NP at the interface. The high hydrophilicity of these NP (Table 2 of the main article) could explain their affinity for the aqueous phase, hence a poor adsorption at the interface. This low adsorption was confirmed by the cryoSEM images, that showed a loosely packed monolayer of NP (figure 4 of the main article).

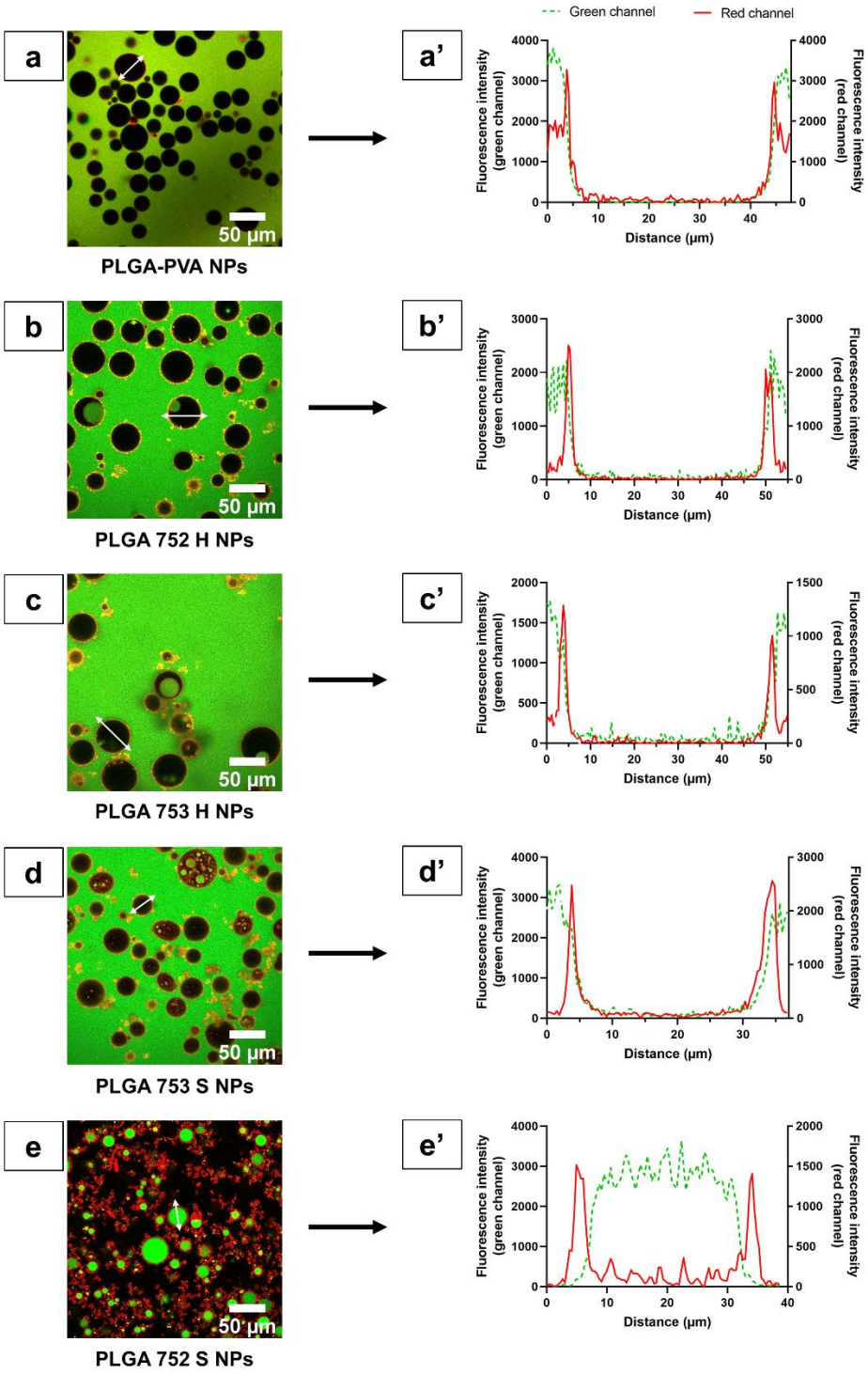


Figure SM6.1: (a-e) CLSM images of emulsions with a water/oil ratio of 90/10 (w/w), prepared few minutes before the observation, and stabilised by: a) PLGA-PVA 753 S NP, b) PLGA 752 H NP, c) PLGA 753 H NP, d) PLGA 753 S NP, e) PLGA 752 S NP. (a'-e') Fluorescence intensity profile of a droplet determined along the white line on the corresponding CLSM image, for both red and green channels. The NP are red-labelled by PLGA-rhodamine, while the water is green-labelled by calcein.

Supporting Material 7: Emulsion stability

To evaluate emulsion stability, emulsions were prepared with each type of NP, following the usual procedure described in the section 2.5 of the main article. The water/oil ratio was set at 90/10 (w/w). The emulsions were stored during 55 days at 20°C and protected from light. The destabilization phenomena (creaming, sedimentation, flocculation, and coalescence) were monitored using Turbiscan Classic MA 2000 apparatus (Formulaction, France) at different times of the study. The different evolution stages of the emulsion were identified thanks to the profile of the Turbiscan curves [73,74].

The stability was also evaluated at the droplet scale during the 7 first days of the stability study. The droplet size was evaluated overtime by flow imaging microscopy, using Flowcell FC200S+HR apparatus (Occhio, Belgium). Before each analysis, a background calibration was performed on MilliQ water. Emulsions were inverted three times to homogenise them. A fraction of emulsion was collected in the middle of the emulsion and diluted in purified water. For emulsion stabilised by PLGA NP, 300 µL of sample were diluted in 700 µL of water. Emulsions stabilised with PLGA-PVA NP contained more droplets, and these latter were less aggregated so 50 µL of emulsion, diluted in 950 µL of water, were enough to obtain statistically good results. The diluted sample was then deposited on the top of the 100-µm-thick cell. Flowing through the cell at constant rate, several pictures of the sample (magnified 6 times) were shot. From these pictures, size and shape information were calculated by the software Callisto (Occhio, Belgium). As the droplets were spherical, the "inner diameter" was chosen as a representative diameter. It is defined as the diameter of the largest inscribed circle. Droplet flocs and small unidentified items (< 1 µm) were removed from the analysed particles, filtering them by their inner diameter. Blur droplets in the background of the pictures were removed too, using a "Luminance RSD" filter. This analysis was performed over 7 days at different times (5 minutes, 2 hours, 2 days, 7 days). The selected parameters to monitor the evolution of the droplet size were the number-weighed d_{50} (median of the number-weighed size distribution) and the uniformity coefficient (or Hazen coefficient, representing the dispersity of the size distribution). This latter is defined as the ratio d_{60}/d_{10}, measured on the number-weighed size distribution.

First, a diagram, presented in Figure SM7.1, summarises the macroscopic evolution of the five emulsions studied by Turbiscan. As they were all quite fluid (except the one made with PLGA 752 S NP), they all underwent a first step of creaming, lasting between

1.5 to 48 h. Creaming is a reversible instability, only consisting in the migration of the oil droplets upwards, as their density is lower than the density of water. This first result was in good agreement with the microscopic study of emulsions, showing no significant change in the droplet size (Figure SM7.2). Droplets stabilised by bare PLGA NP remained between 30 to 40 µm, while droplets stabilised by PVA-covered NP remained around 20 µm. The uniformity coefficient was around 2 during all this creaming step, suggesting a polydisperse distribution (as 2 is the threshold above which an emulsion is considered polydisperse).

After the creaming steps, different behaviours were observed. On one hand, emulsions stabilised by bare PLGA 752 H NP, PLGA 753 H NP or PLGA 753 S NP showed no macroscopic evolution until the end of the study (55 days). This result is corroborated by the microscopic study over the 7 first days, showing no evolution of the droplet size between the end of the creaming steps and the seventh day. So, these emulsions were very stable.

On the other hand, the emulsion stabilised by PVA-covered NP was very different. Indeed, after a 90-min creaming phase, the droplets started to coalesce. An oil phase was observed on top of the emulsions, as an obvious witness of the instability of this emulsion. However, we did not observe any evolution in microscopic behaviour of this emulsion. Droplet size and uniformity coefficient obtained from flow imaging remained stable. We assume that this might be an artefact due to our preparation procedure. After homogenising the emulsion, the large coalesced droplets likely migrated faster towards the top of the emulsion, making them difficult to collect, hence their absence in the analysed samples. Some similar cases were described with Pickering emulsions characterised by laser diffraction for example [35]. This shows how careful we should be when we analyse stability data. Multiscale analysis is necessary to understand the emulsion behaviour in a global way, and to avoid wrong conclusions based on unsuitable technics.

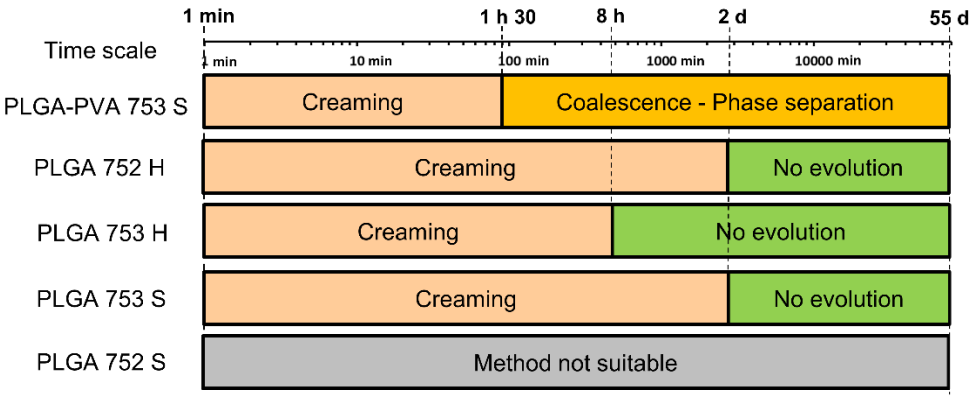


Figure SM7.1: Diagram summarising the evolution of the emulsions as determined by Turbiscan analysis for emulsions stabilised by PLGA-PVA 753 S NP, PLGA 752 H NP, 753 H NP, 753 S NP or 752 S NP

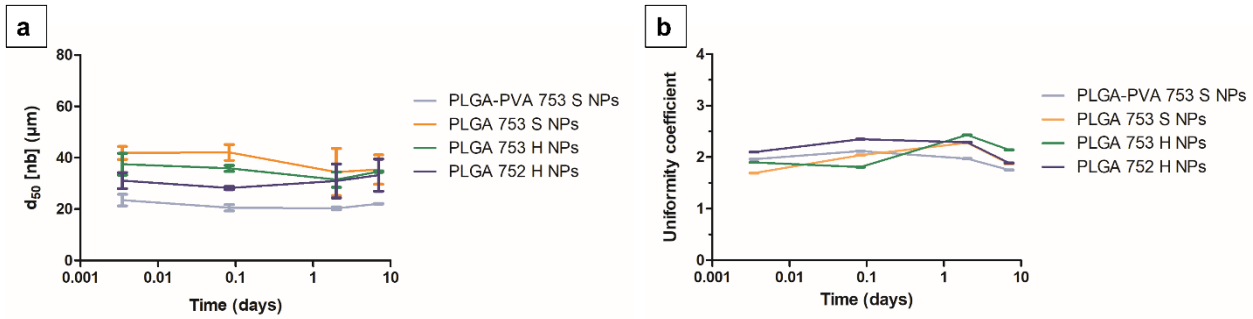


Figure SM7.2: Evolution of the droplet granulometry overtime, for emulsions stabilised by PLGA-PVA 753 S NP (in grey), PLGA 753 S NP (in orange), PLGA 753 H NP (in green), PLGA 752 H NP (in dark blue). The studied parameters were a) the d_{50} of the number-weighed distribution, b) the uniformity coefficient.

A comment should be given on the emulsion stabilised by PLGA 752 S bare NP, that remained an exception. Unlike all the other emulsions, this one could not be analysed by Turbiscan and flow imaging microscopy, because of its texture and opacity. The droplet mean diameter was estimated after 7 days, by a manual measurement on 300 droplets on images of CLSM, using the software Fiji [40]. The estimated size was around 17 µm after 7 days, with a uniformity coefficient of 2.25, which meant the emulsion was polydisperse. However, this result must be considered with caution, as it is measured on images of CLSM. Indeed, this technic allows the imaging of a very thin slice of material. In our conditions, the focal planes do not correspond to the equator of all the drops. So, the result presented here is a simple estimation, and the actual drop size might have been underestimated. A Z-stacking followed by a Maximum Intensity Projection are

necessary to measure it correctly. Finally, a visual control of the emulsion over 55 days did not show any evolution: the emulsion seemed to remain stable. As discussed previously, a multiscale analysis should be performed to assess the stability. A microscopic monitoring of the droplet size would be better to conclude with certainty about the stability of this emulsion. However, images obtained by optical microscopy are difficult to analyse, as the solid emulsion is not transparent.

Supporting Material 8: Graphical determination of $T_{g(0)}$

An example of thermogram is given in Figure SM8.1, for PLGA 753 S. The three dash lines represent the tangent lines of the curve at the baseline (before and after the glass transition) and at the inflection point of the glass transition step. The first crossover point defines the onset of the glass transition (T_g onset), while the second one defines its end (T_g end). The midpoint is midway between these two crossover points, and the corresponding temperature is the "T_g midpoint". This T_g midpoint was measured at several scan rate, and an extrapolation by linear regression led to the T_g midpoint at zero rate, as described in the section 2.6.4 of the main article. This value, called $T_{g(0)}$, was the one we used to compare the samples.

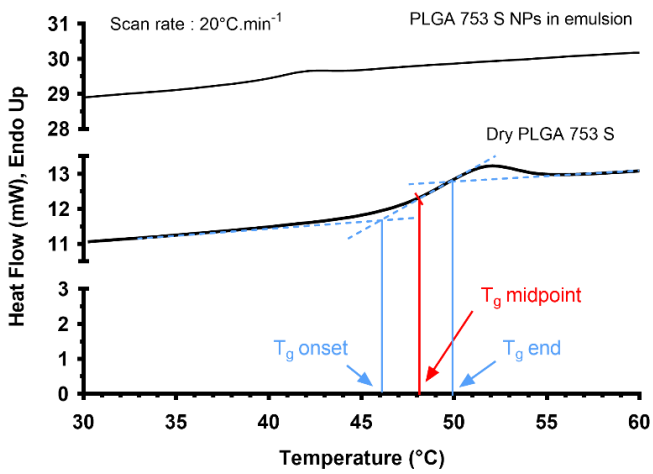


Figure SM8.1: Example of thermograms of PLGA 753 S, obtained at a scan rate of 20°C.min^{-1}, in two different conditions: the lower curve corresponds to the dry PLGA, the upper curve corresponds to the PLGA NP in the emulsion. The dash lines on the lower curve are the tangent lines of the curve at the baseline (before and after the glass transition) and at the inflection point of the glass transition step, and are used to determine the midpoint T_g (glass transition temperature at the scan rate 20°C.min^{-1}).

Besides, it can be noticed that the glass transition signal was weaker for PLGA NP in emulsion, compared to the dry PLGA. This was attributed to the lower PLGA concentration, considering the whole emulsion.

References

[1] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers. 3 (2011) 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377.

[2] R.C. Rowe, ed., Handbook of pharmaceutical excipients, 6. ed, APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, London, 2009.

[3] M. Teodorescu, M. Bercea, S. Morariu, Biomaterials of Poly(vinyl alcohol) and Natural Polymers, Polym. Rev. 58 (2018) 247–287. https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1403928.

[4] C. Albert, Émulsions de Pickering biodégradables stabilisées par des nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique) : étude physico-chimique et potentialité pharmaceutique, These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2017. http://www.theses.fr/2017SACLS491 (accessed January 14, 2021).

[5] B.P. Binks, Particles as surfactants—similarities and differences, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 7 (2002) 21–41. https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00008-0.

[6] J. Xiao, Y. Li, Q. Huang, Recent advances on food-grade particles stabilized Pickering emulsions: Fabrication, characterization and research trends, Trends Food Sci. Technol. 55 (2016) 48–60. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.010.

[7] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, Y. Chevalier, Pickering emulsions with bare silica, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 343 (2009) 70–74. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.01.031.

[8] C. Albert, M. Beladjine, N. Tsapis, E. Fattal, F. Agnely, N. Huang, Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications, J. Controlled Release. 309 (2019) 302–332. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.003.

[9] N. Branco, I. Lee, H. Zhai, H.I. Maibach, Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an in vivo study, Contact Dermatitis. 53 (2005) 278–284. https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00703.x.

[10] C. Albert, N. Huang, N. Tsapis, S. Geiger, V. Rosilio, G. Mekhloufi, D. Chapron, B. Robin, M. Beladjine, V. Nicolas, E. Fattal, F. Agnely, Bare and Sterically Stabilized

PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions, Langmuir. 34 (2018) 13935–13945. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02558.

[11] C.E. Astete, C.M. Sabliov, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 17 (2006) 247–289. https://doi.org/10.1163/156856206775997322.

[12] F.Y. Han, K.J. Thurecht, A.K. Whittaker, M.T. Smith, Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading, Front. Pharmacol. 7 (2016). https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00185.

[13] I. Bala, S. Hariharan, M.R. Kumar, PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art;, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 21 (2004) 387–422. https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.20.

[14] R.E. Eliaz, J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, J. Biomed. Mater. Res. 50 (2000) 388–396. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<388::AID-JBM13>3.0.CO;2-F.

[15] N.H. Shah, A.S. Railkar, F.C. Chen, R. Tarantino, S. Kumar, M. Murjani, D. Palmer, M.H. Infeld, A.W. Malick, A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers, J. Controlled Release. 27 (1993) 139–147. https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90217-S.

[16] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P. Hatton, An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering, Int. J. Mol. Sci. 15 (2014) 3640–3659. https://doi.org/10.3390/ijms15033640.

[17] W. Jiang, R. Gupta, M. Deshpande, S. Schwendeman, Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens, Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (2005) 391–410. https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.003.

[18] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, J. Controlled Release. 161 (2012) 505–522. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043.

[19] A. Taluja, Y.S. Youn, Y.H. Bae, Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins, J. Mater. Chem. 17 (2007) 4002. https://doi.org/10.1039/b706939a.

[20] Z. Xu, D. Wang, Y. Cheng, M. Yang, L.-P. Wu, Polyester based nanovehicles for siRNA delivery, Mater. Sci. Eng. C. 92 (2018) 1006–1015. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.031.

[21] J.-M. Lü, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology, Expert Rev. Mol. Diagn. 9 (2009) 325–341. https://doi.org/10.1586/erm.09.15.

[22] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson, The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review, Int. J. Pharm. 415 (2011) 34–52. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.

[23] A. Pandey, D.S. Jain, Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Copolymer and Its Pharmaceutical Application, in: V.K. Thakur, M.K. Thakur (Eds.), Handb. Polym. Pharm. Technol., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2015: pp. 151–172. https://doi.org/10.1002/9781119041412.ch6.

[24] Y. Xu, C.-S. Kim, D.M. Saylor, D. Koo, Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 105 (2017) 1692–1716. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33648.

[25] D.K. Gilding, A.M. Reed, Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1, Polymer. 20 (1979) 1459–1464. https://doi.org/10.1016/0032-3861(79)90009-0.

[26] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, Biomaterials. 21 (2000) 2475–2490. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0.

[27] X.S. Wu, N. Wang, Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12 (2001) 21–34. https://doi.org/10.1163/156856201744425.

[28] Z. Wang, Y. Wang, Tuning Amphiphilicity of Particles for Controllable Pickering Emulsion, Materials. 9 (2016) 903. https://doi.org/10.3390/ma9110903.

[29] Y. Meng, W. Sun, H. Yang, W. Wang, N. Jin, Y. Zhao, X. Zhang, H. Lü, Fine tuning of surface properties of SiO2 nanoparticles for the regulation of Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 592 (2020) 124603. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124603.

[30] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-Free Emulsions, Langmuir. 16 (2000) 8622–8631. https://doi.org/10.1021/la000189s.

[31] B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, B.L. Holt, P. Beaussoubre, K. Wong, Phase inversion of particle-stabilised perfume oil–water emulsions: experiment and theory, Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (2010) 11954. https://doi.org/10.1039/c0cp00558d.

[32] N. Yan, M.R. Gray, J.H. Masliyah, On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 193 (2001) 97–107. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00748-8.

[33] E. Santini, E. Guzmán, M. Ferrari, L. Liggieri, Emulsions stabilized by the interaction of silica nanoparticles and palmitic acid at the water–hexane interface, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 460 (2014) 333–341. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.054.

[34] W. Li, L. Yu, G. Liu, J. Tan, S. Liu, D. Sun, Oil-in-water emulsions stabilized by Laponite particles modified with short-chain aliphatic amines, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 400 (2012) 44–51. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.044.

[35] H. Lim, M. Jo, C. Ban, Y.J. Choi, Interfacial and colloidal characterization of oil-in-water emulsions stabilized by interface-tunable solid lipid nanoparticles, Food Chem. 306 (2020) 125619. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125619.

[36] K.S. Silmore, C. Gupta, N.R. Washburn, Tunable Pickering emulsions with polymer-grafted lignin nanoparticles (PGLNs), J. Colloid Interface Sci. 466 (2016) 91–100. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.042.

[37] F. Qi, J. Wu, G. Sun, F. Nan, T. Ngai, G. Ma, Systematic studies of Pickering emulsions stabilized by uniform-sized PLGA particles: preparation and stabilization mechanism, J. Mater. Chem. B. 2 (2014) 7605–7611. https://doi.org/10.1039/C4TB01165A.

[38] N. Grabowski, H. Hillaireau, J. Vergnaud, N. Tsapis, M. Pallardy, S. Kerdine-Römer, E. Fattal, Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages, Int. J. Pharm. 482 (2015) 75–83. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.042.

[39] S. Mura, H. Hillaireau, J. Nicolas, B. Le Droumaguet, C. Gueutin, S. Zanna, N. Tsapis, E. Fattal, Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells, Int. J. Nanomedicine. 6 (2011) 2591–2605. https://doi.org/10.2147/IJN.S24552.

[40] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nat. Methods. 9 (2012) 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

[41] G. Della Gatta, M.J. Richardson, S.M. Sarge, S. Stølen, Standards, calibration, and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning

calorimetry (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem. 78 (2006) 1455–1476. https://doi.org/10.1351/pac200678071455.

[42] S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, J. Controlled Release. 82 (2002) 105–114. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00127-X.

[43] A. Reisch, A. Runser, Y. Arntz, Y. Mély, A.S. Klymchenko, Charge-Controlled Nanoprecipitation as a Modular Approach to Ultrasmall Polymer Nanocarriers: Making Bright and Stable Nanoparticles, ACS Nano. 9 (2015) 5104–5116. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00214.

[44] B.P. Binks, J.A. Rodrigues, Types of Phase Inversion of Silica Particle Stabilized Emulsions Containing Triglyceride Oil, Langmuir. 19 (2003) 4905–4912. https://doi.org/10.1021/la020960u.

[45] C.P. Whitby, L.H. Lim, N. Ghouchi Eskandar, S. Simovic, C.A. Prestidge, Poly(lactic-co-glycolic acid) as a particulate emulsifier, J. Colloid Interface Sci. 375 (2012) 142–147. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.02.058.

[46] T.I. Croll, A.J. O'Connor, G.W. Stevens, J.J. Cooper-White, Controllable Surface Modification of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects, Biomacromolecules. 5 (2004) 463–473. https://doi.org/10.1021/bm0343040.

[47] É. Kiss, E.I. Vargha-Butler, Novel method to characterize the hydrolytic decomposition of biopolymer surfaces, Colloids Surf. B Biointerfaces. 15 (1999) 181–193. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00009-6.

[48] C. Jouany, P. Chassin, Determination of the surface energy of clay—organic complexes by contact angle measurements, Colloids Surf. 27 (1987) 289–303. https://doi.org/10.1016/0166-6622(87)80152-X.

[49] H. Elmotasem, H.K. Farag, A.A.A. Salama, In vitro and in vivo evaluation of an oral sustained release hepatoprotective caffeine loaded w/o Pickering emulsion formula – Containing wheat germ oil and stabilized by magnesium oxide nanoparticles, Int. J. Pharm. 547 (2018) 83–96. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.038.

[50] H. Grau, A.Y. Fadeev, "Raincoat for explosives": Surface chemistry approach to control wetting of nitrocellulose with nitroglycerin, J. Colloid Interface Sci. 547 (2019) 145–152. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.03.063.

[51] R. Pichot, Stability and characterisation of emulsions in the presence of colloidal particles and surfactants., d_ph, University of Birmingham, 2012. https://etheses.bham.ac.uk/id/eprint/3271/ (accessed April 11, 2020).

[52] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Catastrophic Phase Inversion of Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Hydrophobic Silica, Langmuir. 16 (2000) 2539–2547. https://doi.org/10.1021/la991081j.

[53] P. Finkle, H.D. Draper, J.H. Hildebrand, The theory of emulsification, J. Am. Chem. Soc. 45 (1923) 2780–2788. https://doi.org/10.1021/ja01665a002.

[54] V. Paunov, O. Cayre, P. Noble, S. Stoyanov, K. Velikov, M. Golding, Emulsions stabilised by food colloid particles: Role of particle adsorption and wettability at the liquid interface, J. Colloid Interface Sci. 312 (2007) 381–389. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.031.

[55] R. Aveyard, B.P. Binks, J.H. Clint, Emulsions stabilised solely by colloidal particles, Adv. Colloid Interface Sci. 100 (2003) 503–546. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00069-6.

[56] D. Zang, P.S. Clegg, Relationship between high internal-phase Pickering emulsions and catastrophic inversion, Soft Matter. 9 (2013) 7042–7048. https://doi.org/10.1039/C3SM00133D.

[57] H.M.H. Weijgertze, W.K. Kegel, M. Zanini, Patchy rough colloids as Pickering stabilizers, Soft Matter. 16 (2020) 8002–8012. https://doi.org/10.1039/D0SM00807A.

[58] C.P. Whitby, R. Parthipan, Influence of particle concentration on multiple droplet formation in Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 554 (2019) 315–323. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.017.

[59] B.F.B. Silva, C. Rodríguez-Abreu, N. Vilanova, Recent advances in multiple emulsions and their application as templates, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 25 (2016) 98–108. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.07.006.

[60] Y. Chevalier, M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 439 (2013) 23–34. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054.

[61] F.M. Fernandes Barros, C. Chassenieux, M.M. de Souza Lima, L. Benyahia, Structure and rheology during catastrophic phase inversion of Pickering emulsions stabilized with fumed silica particles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 593 (2020) 124630. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124630.

[62] M. Tang, T. Wu, X. Xu, L. Zhang, F. Wu, Factors that affect the stability, type and morphology of Pickering emulsion stabilized by silver nanoparticles/graphene oxide nanocomposites, Mater. Res. Bull. 60 (2014) 118–129. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.08.019.

[63] F. Groeneweg, W.G.M. Agterof, P. Jaeger, J.J.M. Janssen, J.A. Wieringa, J.K. Klahn, On the Mechanism of the Inversion of Emulsions, Chem. Eng. Res. Des. 76 (1998) 55–63. https://doi.org/10.1205/026387698524596.

[64] P.S. Clegg, J.W. Tavacoli, P.J. Wilde, One-step production of multiple emulsions: microfluidic, polymer-stabilized and particle-stabilized approaches, Soft Matter. 12 (2016) 998–1008. https://doi.org/10.1039/C5SM01663K.

[65] T.G. Fox, P.J. Flory, The glass temperature and related properties of polystyrene. Influence of molecular weight, J. Polym. Sci. 14 (1954) 315–319. https://doi.org/10.1002/pol.1954.120147514.

[66] Y.H. Lin, Entanglement and the molecular weight dependence of polymer glass transition temperature, Macromolecules. 23 (1990) 5292–5294. https://doi.org/10.1021/ma00227a019.

[67] N. Wang, X.S. Wu, C. Li, M.F. Feng, Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: I. Synthesis and characterization, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 11 (2000) 301–318. https://doi.org/10.1163/156856200743715.

[68] A. Marcilla, M. Beltrán, Mechanisms of plasticizers action, in: G. Wypych (Ed.), Handb. Plast. Third Ed., ChemTec Publishing, 2017: pp. 119–134. https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-97-3.50007-X.

[69] C.G. Pitt, G. Zhong-wei, Modification of the rates of chain cleavage of poly(ϵ-caprolactone) and related polyesters in the solid state, J. Controlled Release. 4 (1987) 283–292. https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90020-4.

[70] S. Lappe, D. Mulac, K. Langer, Polymeric nanoparticles – Influence of the glass transition temperature on drug release, Int. J. Pharm. 517 (2017) 338–347. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.025.

[71] C. Bouissou, J.J. Rouse, R. Price, C.F. van der Walle, The Influence of Surfactant on PLGA Microsphere Glass Transition and Water Sorption: Remodeling the Surface Morphology to Attenuate the Burst Release, Pharm. Res. 23 (2006) 1295–1305. https://doi.org/10.1007/s11095-006-0180-2.

[72] Chemical Rubber Company, ed., CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data, 84th ed, CRC Press, Boca Raton, 2003.

[73] J. Liu, X. Huang, L. Lu, M. Li, J. Xu, H. Deng, Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers, J. Hazard. Mater. 190 (2011) 214–221. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.028.

[74] O. Mengual, G. Meunier, I. Cayré, K. Puech, P. Snabre, TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis, Talanta. 50 (1999) 445–456. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00129-0.

CHAPITRE 4

Préparation de particules polymères non sphériques

Introduction - résumé

Après avoir discuté l'influence de l'hydrophilie et de la température de transition vitreuse de NP sphériques sur les propriétés des émulsions de Pickering qu'elles stabilisent, nous avons étudié l'influence de la forme des NP sur ces émulsions. Comme exposé dans le chapitre 1, section 3, depuis une quinzaine d'années, d'autres équipes s'intéressent à l'adsorption de particules anisotropes aux interfaces, notamment en vue de la stabilisation d'émulsions de Pickering. Une étude de Madivala *et al.* peut faire office d'exemple, en comparant l'efficacité de la stabilisation par des particules ellipsoïdes de différents rapport d'aspect à l'efficacité de stabilisation de particules sphériques [1]. Cette étude conclut notamment sur l'avantage d'utiliser de particules les plus allongées possibles, car ces dernières génèreraient des forces capillaires plus importantes et donc une interface plus stable. Une autre étude, par Kalashnikova *et al.*, mettait aussi en évidence l'intérêt des formes allongées, de par la diversité des mécanismes de stabilisation qu'elles permettent [2].

Ainsi, l'utilisation de particules à haut rapport d'aspect aurait un intérêt pour augmenter la stabilité des émulsions de Pickering. Dans un contexte pharmaceutique, rappelons que la forme allongée a aussi pour intérêt d'augmenter l'efficacité d'encapsulation de certains principes actifs [3,4], d'augmenter le temps de circulation de ces particules dans le système sanguin [5,6], et potentiellement d'augmenter leur internalisation cellulaire [7–9]. Le développement d'émulsions de Pickering stabilisées par des particules allongées serait donc une piste intéressante à plusieurs égards pour l'administration de substances actives pharmaceutiques, d'où le développement de ce projet au sein de notre équipe.

Parmi les matériaux utilisés pour produire des particules allongées, plusieurs ont des potentialités pharmaceutiques. C'est notamment le cas de la cellulose [2,10], mais aussi de l'hématite. Cet oxyde de fer est très utilisé dans les études traitant de l'influence de la forme des particules, jusqu'à être considéré comme un système modèle [11]. Ce statut est probablement dû au fait qu'elles sont très faciles à produire (par simple mélange de chlorure de fer III et de soude à 100°C), et que diverses formes [12] et rapports d'aspect [1] peuvent être obtenus simplement en modifiant les conditions d'ajout des réactifs au

cours de leur préparation. Comme de nombreux oxydes de fer, l'hématite serait peu toxique, ce qui en fait un matériau intéressant dans un contexte pharmaceutique [13,14].

Bien que ces options existent, nous avons fait le choix de travailler avec des particules polymères de polylactide-*bloc*-poly(éthylène glycol) (PLA-*b*-PEG), développées par Nicolas Tsapis de l'équipe 5 « Ingénierie particulaire et cellulaire à visée thérapeutique » de l'Institut Galien Paris-Saclay. Cette collaboration était ainsi l'occasion de proposer une solution supplémentaire dans l'arsenal de particules anisotropes utilisables en émulsions de Pickering. En effet, des résultats préliminaires obtenus par Nadège Grabowski, Ludivine Mousnier et Hung Lê dans d'autres projets démontraient la possibilité de former des particules allongées à partir de PLA-*b*-PEG à terminaison acide carboxylique (PLA-*b*-PEG-COOH), par un procédé simple d'émulsion-évaporation. De plus, l'utilisation de ce polymère est pertinente, car il est reconnu pour sa biocompatibilité, et même pour la biodégradabilité de son bloc PLA [15–17]. Ainsi, au cours de ce chapitre, nous décrivons la préparation de filoparticules (ou FP, c'est-à-dire des particules cylindriques courbes de largeur nanométrique) et expliquons les mécanismes sous-tendant leur formation. Leur potentielle utilisation comme stabilisant pour des émulsions de Pickering sera exposée dans le chapitre 5.

Au cours de cette étude, différents PLA-*b*-PEG-COOH, avec des blocs PLA variant de 13 000 à 80 000 g/mol, ont été utilisés pour produire des NP par un procédé d'émulsion-évaporation. Les suspensions de NP obtenues étaient des mélanges de sphères et de FP, les FP étant en plus grand nombre lorsque le bloc PLA était le plus court. Cet étirement de la surface des particules est induit par un encombrement stérique et des répulsions électrostatiques plus importants au cours de l'étape d'évaporation, dans le cas d'un bloc PLA court. En outre, les FP montraient une instabilité à 37°C, en se divisant progressivement en sphères depuis leurs extrémités. Une étude en micro-calorimétrie à balayage différentiel, réalisée en collaboration avec David Chapron (Equipe 2 « Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés » de l'Institut Galien Paris-Saclay), nous a permis de montrer que cette instabilité est due au dépassement de la température de transition vitreuse du polymère, qui permet l'installation d'une instabilité de Plateau-Rayleigh. Cette instabilité est cependant suffisamment lente pour pouvoir évaluer *in vitro* l'internalisation des FP par des macrophages murins. Cette expérience, réalisée par Ludivine Mousnier, démontre une internalisation significativement supérieure des FP par rapport aux NP sphériques.

PUBLICATION N°2

Worm-like particle formation by tuning electrostatic and steric repulsions

Baptiste Robin[1†], Ludivine Mousnier[1†], Hung Lê[1], Nadège Grabowski[1], David Chapron[1], Ophélie Bellance-Mina[1], Nicolas Huang[1], Florence Agnely[1], Elias Fattal[1], Nicolas Tsapis[1] *

[1] *Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France*

[†] *Same contribution*

** Corresponding author: Nicolas Tsapis, nicolas.tsapis@universite-paris-saclay.fr*

Abstract

Worm-like nanoparticles were produced by a simple emulsion-evaporation process using PLA-*b*-PEG-COOH polymers. This shape was obtained by simply tuning the molar mass of the PLA block. Indeed, the shorter the molar mass of the PLA block, the more elongated the particles. As PLA molar mass decreased from 80,000 g/mol to 13,000 g/mol, the proportion of worm-like NP increased from 0 to 46% (by number). The shape arises from a combination of steric and electrostatic repulsions between PEG chains bearing a carboxylate moiety present at the dichloromethane-water interface during the evaporation process. Worm-like particles turned out to be unstable when incubated at 37°C. Indeed, at this temperature that exceeds the copolymer glass transition temperature, a Plateau-Rayleigh instability occurred, leading to the division of the worm-like NP into spheres. However, this instability was slow enough to allow the assessment of the worm-like NP uptake by murine macrophages. This experiment showed a significantly higher internalisation of worm-like NP, compared to their spherical counterparts.

Keywords: Worm-like nanoparticles, anisotropic particle, PLA-PEG, emulsion-evaporation, self-assembly, glass transition temperature, nanoparticle internalisation

1. Introduction

Since the early work of Bangham on liposomes in the 60s [18], many types of nanoparticles (NP) have been proposed for drug delivery. The materials composing these NP are very diverse, ranging from lipids [19,20], synthetic or natural [21,22] or even inorganic materials [23]. However, despite this variety of materials, mostly spherical particles have been considered for drug delivery purposes. Indeed, the mechanism of particle formation often implies interfacial tension phenomena, which favour the spherical shape, due to the minimisation of surface energy.

For several years now, some studies have highlighted the possible advantages of anisotropic polymer particles, in particular with elongated shapes such as rod-like (which are straight rigid cylinders) or worm-like particles (which are winding flexible cylinders) [5]. Difference between elongated and spherical particles are notably shown in terms of drug loading, targeting, and drug release [24]. Indeed, the drug encapsulation efficiency is higher with elongated particles, as their volume is higher than spherical particles for a given mass and surface [3,4]. The shape of the particles also impacts their *in vivo* behaviour, for example by influencing their circulation in the bloodstream. When particles circulate in blood vessels, their behaviour mainly depends on the balance between margination forces (buoyancy, van der Waals forces, *etc*), driving particles to drift laterally and get closer to the walls, and hydrodynamic dislodging forces, forcing the alignment of particles along the bloodstream [25]. In these conditions, Zhou *et al.* showed that rigid nanorods with a length inferior to a critical value of 500 nm exhibit a blood circulation time three-fold higher than spheres or long nanorods [5]. Geng *et al.* observed a similar behaviour with worm-like particles, remaining ten times longer in the bloodstream compared to spheres [6]. Another *in vivo* phenomenon that can be influenced by the shape of particles is their cellular uptake. Nevertheless this influence is far from being elucidated, as results are inconsistent : some authors showed elongated particles are internalised faster than spheres [7–9], while others showed the opposite [26]. The conditions of the experiments seem to play a great role in this mechanism, and more studies are necessary to decouple the influence of the particle shape from the other parameters. Finally, anisotropic particles exhibit different drug release kinetics compared to spherical particles [27]. Indeed, for a given particle volume, anisotropic particles release the drug faster than spherical ones, because of their high surface area [28]. However, this observation is not always confirmed, as some teams show no

difference between the two types of particles [3,8]. Yet, comparisons are not always relevant, above all when no information about the particle volume is given. Some authors even showed that using elongated particles slows down the release rate and prevents drug burst release [29], although these results remain controversial [28].

Since the possible advantages of non-spherical particles were shown, many methods have emerged to produce them. For examples, rod-like gel microparticles were produced by a microfluidic process: after a solution of poly(ethylene glycol)-norbornene was emulsified to obtain aqueous droplets, these were deformed by the wall of the microfluidic channel and cross-linked by green-light exposure in the presence of dithiothreitol. The microgels produced by this method were 400-µm wide, and 2-mm long [30]. Lahann *et al.* also demonstrated the possibility to use electrospinning techniques to produce rod-like particles. Indeed, injecting a poly(lactide-*co*-glycolide) solution through a needle under high voltage counteracted the surface tension and the droplets were stretched to form rods, but also microfibres or discoidal particles depending on the polymer concentration, injection speed and solvent [31]. When fibres are produced, it is possible to cut them into short rods of 20 to 80 µm using a cryotome [32]. However, microfluidic and electrospinning techniques do not allow to produce particles of a nanometric size. For pharmaceutical use, nanosized vehicles are preferred as they can be safely injected intravenously and are more efficiently internalised by cells [7,33].

Other methods allow the formation of elongated particles, at the nanoscale. The film stretching method is one of them, that can be used on many types of polymer materials. Briefly, spherical nanoparticles are first included in a polymer film, often made of polyvinyl alcohol. This film is then heated up in an oil bath, to exceed the glass transition temperature of both the film and the particles, so they can be deformed by stretching [34]. This method was notably applied to biocompatible poly(lactide-*co*-glycolide-*block*-ethylene glycol-*block*-lactide-*co*-glycolide) particles, to obtain nanorods with a width of around 100 nm for a length comprised between 300 and 600 nm [29]. Elongated particles in the same order of magnitude were produced with poly(alkylcyanoacrylate) [35]. Another method is the polymerised-induced self-assembly (also called PISA) of block copolymers. Indeed, some copolymers can self-assemble when they are polymerising in solution. They can form spheres or vesicles, but also elongated micelles, based on the packing parameter of the polymer [36–39]. Finally, a simple co-solvent

evaporation process can be applied on preformed polymers to prepare elongated nanoparticles. This method, particularly interesting because of the simplicity of its execution, has been used on a few biocompatible polymers, like poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) [40] or poly(γ-benzyl-L-glutamate) [41].

The present study aims to propose an additional preparation platform of elongated polymer particles for pharmaceutical use, based on an emulsion-evaporation method. Close to the co-solvent evaporation method, it has never been used to produce nanometric particles [42]. We prepared worm-like particles with biocompatible and partially biodegradable polylactide-*b*-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) copolymers bearing a carboxylate moiety at the PEG extremity [15–17]. The mechanism inducing the formation of these worm-like particles was first elucidated, notably by studying the influence of both the molar mass of the PLA block and the ending of the PEG block. The thermal stability of these particles was then assessed, prior to experiments in biological conditions. Morphology changes occurring at 37°C were discussed and an original hypothesis was proposed to explain this phenomenon. Finally, *in vitro* cellular uptake of worm-like particles was assessed on macrophages, as a preliminary study before the use of these particles as actual vehicles for intracellular drug delivery.

2. Material and methods

2.1. Materials

D,L–Lactide was purchased from Biovalley, Polysciences Inc. (USA) and was used directly without purification. α-hydroxy-ω-carboxy-poly(ethylene glycol) (noted as HO-PEG$_{5000}$-COOH, M_n = 4847 g/mol) and α-hydroxy-ω-methoxy-poly(ethylene glycol) (noted as HO-PEG$_{5000}$-OCH$_3$, M_n = 5056 g/mol) were purchased from Iris Biotech GmbH (Germany). Stannous 2-ethyl-hexanoate (stannous octoate, 95%), deuterated chloroform, toluene (anhydrous 99.8%), and sodium cholate were provided by Sigma-Aldrich (USA). Chloroform and dichloromethane were purchased from Carlo-Erba Reagents (Italy). Diethyl ether and tetrahydrofuran were provided by VWR Chemicals (USA). PLGA-rhodamine B conjugate (LA:GA ratio of 50:50, M_w = 10,000–30,000 g/mol) was purchased from Akina Inc. (USA). Sodium dihydrogen phosphate was provided by Rectapur (USA), while citric acid was provided by Fluka (USA). Water was purified (resistivity of 18.2 MΩ.cm) using a using a MilliQ Direct Type 1 Ultrapure water system

(Merck Millipore, Germany). RAW 264.7 murine macrophages cell line was supplied by the *American Type Culture Collection* (USA). DMEM growth medium, penicillin/streptomycin mixture, and fetal bovine serum were purchased from Lonza (Switzerland).

2.2. PLA-*b*-PEG-COOH synthesis and characterisation

In a two-neck round-bottom flask previously flame-dried and under a flow of inert gas, D,L-lactide, HO-PEG_{5000}-COOH (or HO-PEG_{5000}-OCH_3) and stannous octoate (1.5 mol PEG/mol stannous octoate) were dissolved into 10 to 12 mL of anhydrous toluene, and placed into an oil bath at 125 °C (precise amounts in Table 1). The ring opening polymerisation using HO-PEG_{5000} as a macro initiator was carried out under stirring for 55 to 107 min, depending on the required final molar mass. The reaction was stopped by simply dipping the flask into cold water. After evaporation of toluene under vacuum, the polymer was dissolved into chloroform and precipitated into cold diethyl ether. Once filtered out of the diethyl ether, the polymer was dissolved into tetrahydrofuran and precipitated into water. Then, the polymer was filtered out of water, fast frozen by immersion in liquid nitrogen and left in a freezer-drier Alpha 2-4 LD (Christ, Germany) for 24h. The condenser temperature was set at -80°C and the pressure was lower than 1 mbar. After drying, the polymer was stored in sealed vials at -20°C.

Table 1 : Quantities of reagents and reaction time for the synthesis of different PLA-*b*-PEG copolymers.

Sample ID	Lactide (mg)	PEG_{5000}-COOH (mg)	PEG_{5000}-OCH_3 (mg)	$Sn(Oct)_2$ (mg)	Toluene (mL)	Reaction time (min)
1	7,500	1,886	0	101.9	10	55
2	7,500	550	0	30.0	10	55
3	8,832	452	0	25.6	12	107
4	7,500	0	1,886	101.9	10	55

The number-averaged molar mass M_n of the polymers was assessed by ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) measurements (Bruker Avance-300 MHz spectrometer, USA). Analyses were performed in 5-mm diameter tubes at a concentration of 20 mg/mL in deuterated chloroform. The molar mass M_n of PLA was calculated based on the molar mass M_n of the PEG block provided by the supplier. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm): 5.10-5.28 (C*H*CH_3COO), 3.64 (OCH_2CH_2), 1.52-1.61 (CHCH_3COO).

The dispersity of the PLA-*b*-PEG polymers was assessed by size exclusion chromatography (SEC, EcoSEC HLC-8320 GPC, from Tosoh, Japan) with two columns (PL-gel MIXED-D 300 × 7.5 mm, beads diameter 5 µm; linear part 4×10^2 to 4×10^5 g/mol, from Polymer Laboratories, UK). The detection was performed thanks to a differential refractometer (RI-150 SpectraSYSTEM, from Thermo Electron Corp, USA). The calibration curve was based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) standards (Polymer Laboratories, UK). Samples were filtered on a 0.2 µm PTFE filter before being analysed at 35°C in chloroform (HPLC grade) at a flow rate of 1 mL/min. Toluene was used as a flow rate marker.

2.3. NP preparation

PLA-*b*-PEG was dissolved into 2 mL of dichloromethane. This organic solution was then emulsified into 10 mL of 1.5% w/v sodium cholate aqueous solution using a vortex for 1 min, followed by sonication for 1 min using a sonication probe at an output power of 300W (Digital Sonifier 250, Branson). dichloromethane was then evaporated under magnetic stirring at 300 rpm for about 3 h at 20°C. The surfactant was removed performing an ultracentrifugation cycle of 1h at 50,000 g at 4°C (LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter OptimaTM). This purification method has already been assessed by our team in the case of sodium cholate removal, with very good results [43]. The final pellet of particles was resuspended in water.

For internalisation studies, NP were fluorescently labelled, by replacing 5% w/w of the total amount of PLA-*b*-PEG-COOH with poly(lactide-co-glycolide) copolymer conjugated to rhodamine-B (PLGA-Rhodamine B, M_W = ~30,000 g/mol, Akina Inc., USA). Labelled NP were prepared following the same protocol as unlabelled NP, except that the sample had to be protected from light.

2.4. NP characterisation

2.4.1. Transmission Electron Microscopy (TEM)

NP were observed in the few days following their preparation, using a JEOL 1400 electron microscope (Jeol Ltd, Japan) operating at 80 kV fitted with a SC1000 Orius camera (Gatan Inc, USA). A copper grid coated with a carbonated formvar film was plasma processed, making its surface hydrophilic. A 5-µL drop of particle suspension (0.2

to 0.5 mg/mL depending on formulations) was deposited on it, and left for 30 s before blotting it with a filter paper. Then a 5-µL drop of phosphotungstic acid solution (2% w/v) was deposited on the grid, and left for 10 s, before blotting. The phosphotungstic acid deposition was performed twice, to ensure a sufficient negative staining of the particles.

NP size and shape were determined by measuring manually a hundred of particles on the TEM images, using Fiji software [44]. NP were mainly characterised by their diameter for spheres, their length and width for worm-like particles, and their aspect ratio (length/width ratio). For spherical particles, the aspect ratio must be 1.

2.4.2. Micro-Differential Scanning Calorimetry (Micro-DSC)

Measurements were performed using a MicroCal VP-DSC instrument (Malvern Panalytical, USA) at a scan rate of 60 K/h from 10°C to 60°C under approximately 25 psi positive cell pressure. Prior to sample analysis and after cell cleaning, six heating/cooling cycles with water in both sample and reference cells were performed. All these six heating cycles were found to be reproducible, so the suspension of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH 18k NP could be analysed. The NP concentration of 50 mg/mL allowed to identify thermal transitions of the sample. A total of three heating/cooling cycles were recorded and the third heating scan was found to be representative. The feedback mode/gain was set on high. Thermograms were analysed using the MicroCal Origin software (version 7) to yield the glass transition temperature by the tangent method.

2.5. Evaluation of NP internalisation

2.5.1. Cell culture

The RAW 264.7 murine macrophages were cultured at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere, in DMEM growth medium, supplemented with 50 U/mL of penicillin, 50 U/mL of streptomycin, and 10% of foetal bovine serum (Lonza). Cells were divided twice a week at a ratio between 1/6 and 1/8 after detachment by scraping. After thawing, cells were used for experiments from passage 6 to 15.

2.5.2. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

First, 30,000 cells suspended in 300 µL medium were seeded on 8-well IBIDI µ-Slides (IBIDI GmbH, Germany). After 24 h, the supernatants were discarded, replaced by NP (PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH spherical NP or PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP) suspended in fresh medium at a concentration of 0.1 mg/mL, and incubated at 37 °C. After 4 h and 24 h of incubation with particles, the µ-Slides were imaged with an inverted microscope (TCS SP8–gated STED, Leica Microsystems, Germany) equipped with a WLL laser and a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil immersion objective lens. A 552-nm excitation wavelength was used, and bandwidth detection was set between 580 and 640 nm to collect the corresponding "red" fluorescence emission of rhodamine B. The sample was excited at a wavelength of 552 nm. To avoid reflection, a hybrid detector under gated mode (0.5-6.5 ns) was used for the fluorescence images, collected with the pinhole set at 1.0 Airy unit. A classical detector was used for the transmission images. Twelve-bit numerical images were acquired with a definition of 1024 x 1024 pixels, by mean of Leica SP8 LAS AF software (Version 3.6; Leica, Germany).

2.5.3. Flow cytometry

A sample of 500,000 cells suspended in 1 mL medium were seeded in 12-well plates. After 24 h, the supernatants were discarded, replaced by NP (PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH spherical NP or PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP) suspended in fresh medium at a concentration of 0.1 mg/mL, and incubated at 37°C. After 4 h and 24 h of incubation, the supernatants were discarded, and the wells were rinsed twice with 0.5 mL of PBS. Cells were then harvested by scraping and collected in tubes.

The uptake kinetic profiles of particles were assessed using a flow cytometer Accuri C6 (BD Biosciences, USA). The Mean Fluorescence Intensity (MFI) was recorded on FL-2 channel. Results are presented as the difference of the mean fluorescence intensity between a sample and untreated cells, corrected by the relative fluorescence between spherical NP and worm-like NP. Experiments were performed 4 times in triplicate. The four average values obtained in each conditions were used to perform Mann-Whitney tests, to compare the internalisation of PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH and PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP at each time.

3. Results

3.1. Polymer characterisation

Four PLA-*b*-PEG copolymers of different molar mass and end-groups were obtained by ring-opening polymerisation of lactide using OH-PEG as macroinitiators. Their denomination and characteristics are gathered in Table 2. We observed molar masses of 18,000, 52,000 and 86,000 g/mol: the difference between these values (only due to the PLA block molar mass) is significant, as PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH has a degree of polymerisation of PLA (DP_{PLA}) four-fold lower than PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH, and six-fold lower than PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH. The dispersity (Đ) of the polymers was low, with values comprised between 1.15 and 1.2. Other publications describing the impact of the molar mass of diblock polymers on the shape of particles use polymers in the same range of degree of polymerisation[40], so different particle shapes were expected with these three polymers. Also, we obtained two polymers with equivalent molar masses (18,000 g/mol) but different end groups.

Table 2 : Characteristics of the synthesised copolymers and their corresponding particles.

Sample ID	Copolymer denomination	Copolymer characteristics			
		M_n (g/mol) *by ^1H NMR*	DP_{PLA}	M_n (PLA)/M_n (total)	Đ *by SEC*
1	PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH	17,900	181	0.73	1.15
2	PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH	51,500	648	0.90	1.18
3	PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH	85,600	1122	0.94	1.20
4	PLA_{13}-*b*-PEG_5-OCH_3	18,500	187	0.72	NM

NM : Not Measured

3.2. Parameters influencing the NP shape

The three acid-ending polymers with different molar masses were used to prepare NP by emulsion-evaporation. NP were observed by TEM (Figure 1a-c) and characterised by their size and average aspect ratio (Table 3). First, the sample corresponding to PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH contained worm-like NP and spheres in comparable proportions, 46 and 54%, respectively. The average aspect ratio of these NP was 1.61. PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH

also produced a blend of spheres and worm-like NP, but mostly composed of spheres (7%), leading to an average aspect ratio of 1.18. Finally, PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH only led to spheres, with an aspect ratio close to 1. Thus, the shorter the PLA block, the more numerous the worm-like NP.

Besides, the average diameter of the spheres was similar to the width of the worm-like NP (between 40 and 50 nm), suggesting that spheres could derive from worm-like NP (or the other way around). But PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH was the only polymer providing a narrow distribution of sphere diameters (49 ± 7 nm). For PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH and PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH, the average diameter was close to 50 nm also, but the distribution was wide, with standard errors around 20 nm.

Another interesting feature of worm-like NP was their undulations and almost spherical extremities, similar to a Plateau-Rayleigh instability (Figure 1a-crop). Jain *et al.* suggest that some polymer molar mass and dispersity ranges could favour the sensitivity of the NP to these undulations, but the mechanism driving the formation of these undulations remains unexplained [45].

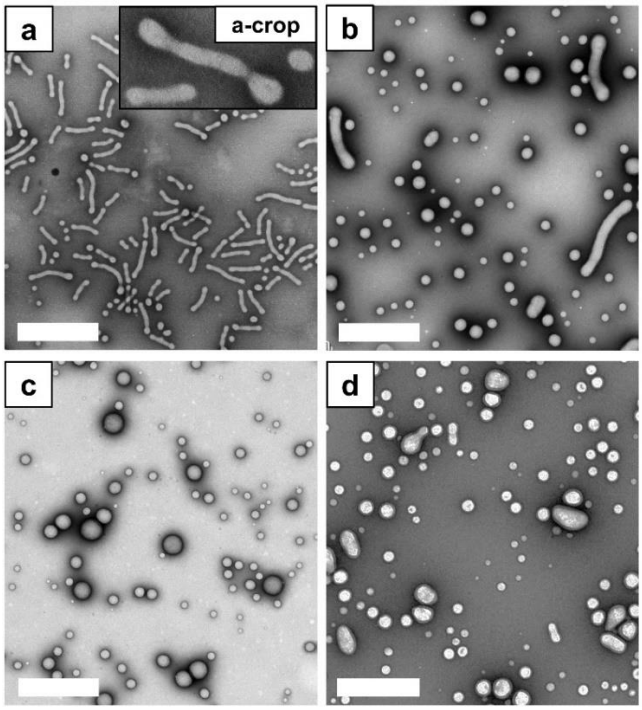


Figure 1: TEM images of NP obtained with acid-ending copolymers of different molar mass: (a) PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH, (b) PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH, (c) PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH and (d) PLA_{13}-*b*-PEG_5-OCH_3 (Scale bar: 500 nm). A cropped image of (a) shows the undulations of a worm-like NP.

Table 3: Morphological characteristics of the NP obtained with the different copolymers, assessed on TEM pictures.

NP	Spherical NP	Worm-like NP		Average aspect ratio		% worm-like NP in the blend
	Diameter (nm)	Width (nm)	Length (nm)	All NP	Worm-like NP only	
PLA_{13}-b-PEG_5-COOH NP	49 ± 7	38 ± 5	157 ± 69	1.61	4.1	46 %
PLA_{47}-b-PEG_5-COOH NP	55 ± 18	59 ± 9	201 ± 107	1.18	3.4	7 %
PLA_{81}-b-PEG_5-COOH NP	51 ± 21	NA	NA	1,10	NA	0 %
PLA_{13}-b-PEG_5-OCH_3 NP	59 ± 14	66 ± 20	140 ± 36	1,20	2.1	10 %

NA: Not Applicable

If the molar mass of the PLA block had a dramatic effect on the particle shape, the charge of the end group was also an interesting parameter to study. Indeed, replacing the COOH end group of the PEG block by OCH_3 on PLA_{13}-*b*-PEG_5 allowed the formation of very short unregular rods, instead of the long worm-like NP observed earlier (Figure 1d). This might be due to a difference of charge between the two copolymers : the COOH end groups underwent a deprotonation at pH = 7.2, leading to negatively charged carboxylates whereas OCH_3 end groups remained uncharged. This was confirmed by preparing NP of PLA_{13}-b-PEG_5-COOH NP at different pH values. Indeed, we observed that the higher the pH, the longer the worm-like NP (Supplementary Material 1).

3.3. Thermal stability of worm-like NP

Thermal stability of worm-like NP obtained with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH was assessed by incubating suspensions at either 4, 20, 37 and 60°C. The average aspect ratio was calculated overtime for each suspension (Figure 2). First, we observed a very good stability of the particle shape at 4 and 20°C, as the average aspect ratio remained around 1.8. At 37°C, however, we observed a fast and irreversible decrease of the average aspect ratio, reaching the value of 1.1 after 24 h. Indeed, the TEM pictures showed a very large majority of spherical NP, with only few short worm-like NP remaining. The worm-like NP seemed to divide into spheres from their extremities. The diameter of these newly formed spheres was similar to the width of the worm-like NP, exactly like the spherical NP initially present in the suspension. Finally, NP incubated at 60°C also showed a very

fast division into spheres, maybe even faster than the ones at 37°C as no remaining worm-like NP were observed on TEM images. However, no aspect ratio measurements could be done after 3 days on the suspension at 60°C, because of an aggregation of all NP, associated with a fast degradation of the copolymer, which molar mass dropped to 13,000 g/mol after 24 h (Supplementary Material 2).

Even if high temperatures seemed to trigger a division of the elongated NP, we emphasize that this phenomenon only occurred when the centrifugation step was performed before heating the sample (Supporting Material 3). In other words, the division of worm-like NP is impossible at high concentrations of sodium cholate.

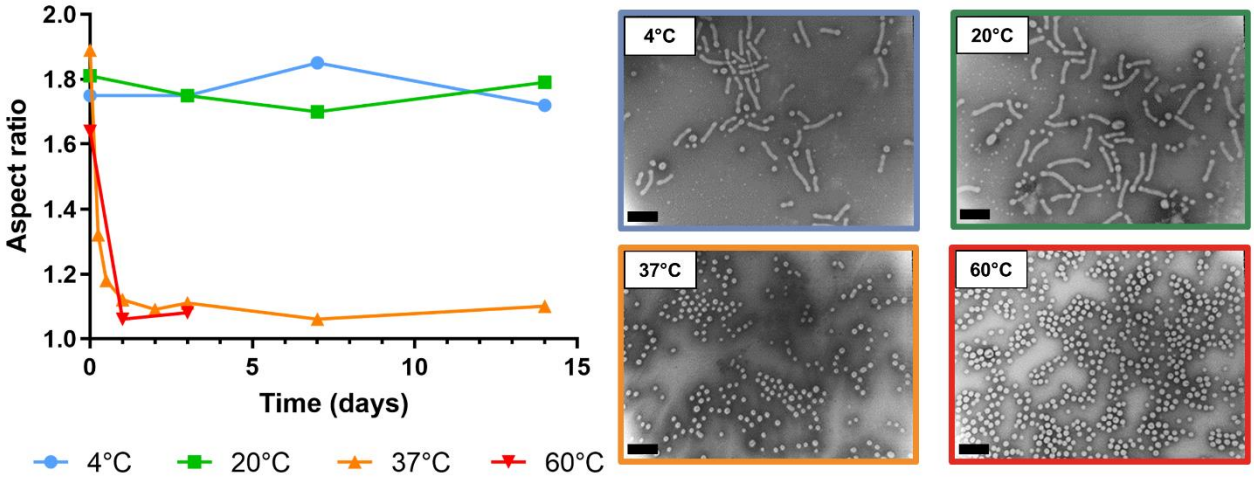


Figure 2: Evolution of the average aspect ratio of the PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP overtime, at 4°C (blue), 20°C (green), 37°C (orange) and 60°C (red), determined on TEM images. Examples of these images are given, after storing the suspension 3 days, at the corresponding temperatures (Scale bar: 200 nm).

Finally, we performed micro-DSC on PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP suspended either in sodium cholate 1.5% or water. The typical thermogram of a glass transition (T_g) was observed at 34.5°C in both media (Supporting Material 4).

3.4. Cellular uptake of worm-like NP

After producing and characterising worm-like NP, the influence of NP shape on the cellular uptake was assessed. Rhodamine-labelled worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP and spherical PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH NP were first prepared, and no change was observed compared to non-labelled NP. They were incubated with murine macrophages for 24 h, before measuring the fluorescence of the cells (Figure 3). First, CLSM photos clearly

showed an uptake of NP by macrophages, with an increase of the fluorescence overtime (Figure 3a). This trend was confirmed by flow cytometry, with an average MFI of 364 ± 44 and 514 ± 51 respectively for spherical PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH NP and worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP after 4 h , and an average MFI of 732 ± 122 and 1092 ± 280 after 24 h (Figure 3b). The internalisation of worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH was significantly higher than spherical PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH NP after 4 h (p-value = 0,029), but no more after 24 h (p-value = 0,057). This absence of significance after 24 h could be due to a wider distribution of the values.

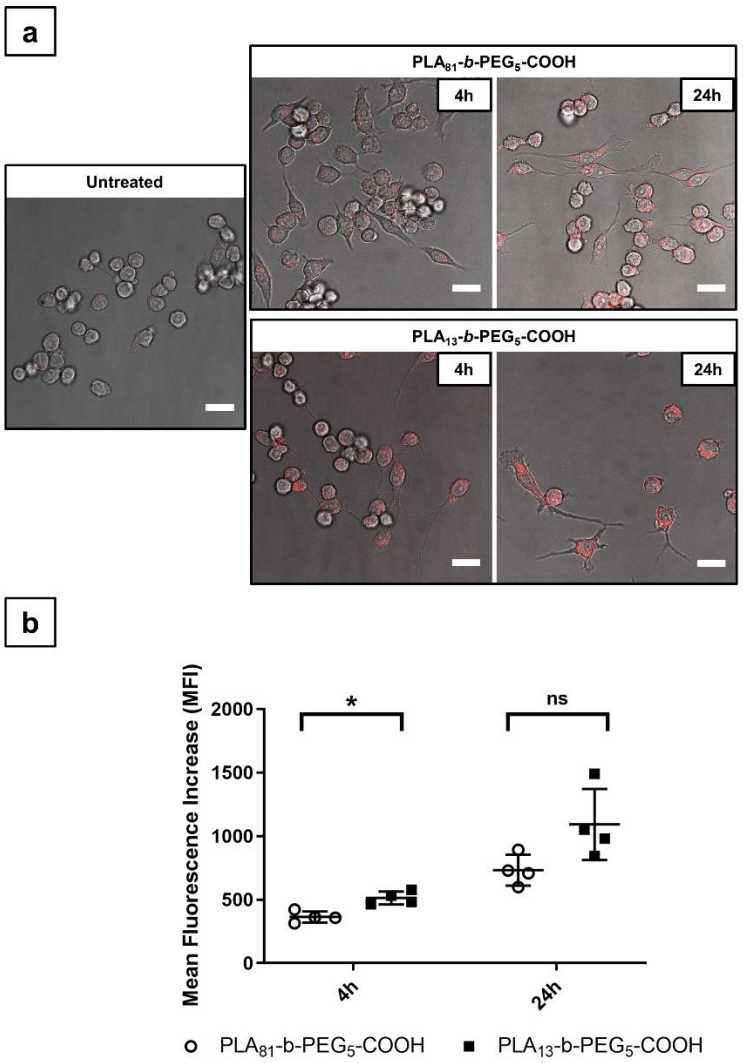


Figure 3: Internalisation of rhodamine-B-labelled PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP and PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH spherical NP by RAW 264.7 cells, after 4 and 24 h, assessed by : (a) CLSM images (Scale bar : 20 µm), and (b) Flow cytometry (*: p-value < 0.05; ns: p-value > 0.05).

4. Discussion

4.1. Formation and division of worm-like NP

The data resulting from these experiments allowed us to propose a mechanism to explain the formation of worm-like NP. The one-dimensional aggregation of monomer-swollen spheres proposed by Armes *et al.* was first considered [46,47]. In these studies, the NP are formed by PISA : the copolymers were prepared by aqueous dispersion polymerisation, and self-assembled in structures of different shapes throughout the polymerisation process, based on their packing parameter. When the block oriented towards the core of the particles was short, the copolymers self-assembled into spheres. The continuation of the polymerisation led to a molecular frustration of the inner block in its spherical organisation, leading to the aggregation and fusion of spherical NP, forming worm-like NP. The authors underlined that the width of the worm-like particles was similar to the diameter of the spheres to support this hypothesis [46]. While the polymerisation went on, another reorganisation finally occurred to form vesicles.

Despite the accuracy of this hypothesis to explain the shape of NP in the case of PISA, it did not seem to fit with our results. Indeed, we did observe a similarity between the sphere diameter and the worm width, but several points remained very different from Armes' experiments. First, the fusion of Armes' spherical NP resulted from the increase of the copolymer molar mass, while polymerisation was still ongoing. In our case, the worm-like NP could not be the result of the merging of spheres, because a preformed copolymer was used. So, our worm-like particles were formed in one step, spontaneously. A second difference with Armes' system is that PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH did not organise following its packing parameter. Usually, a hydrophobic block with a high volume leads to cylindrical or vesicular organisations, as it cannot pack densely into a sphere [48]. In our case, the trend was reversed: short hydrophobic PLA blocks form worm-like NP, while spheres were obtained with longer PLA blocks.

Thus, another mechanism might be proposed to explain this unusual formation of worm-like NP by emulsion-evaporation process (Figure 4a-d). First, both blocks of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH were fully dissolved in dichloromethane droplets (Figure 4a). Indeed, dichloromethane is often used to prepare PLA particles [49], and it is also known to be a better solvent for PEG than water [50]. Then dichloromethane was evaporated slowly, increasing the concentration of copolymer in the droplets until reaching its solubility

limit. At this point, PEG block was expelled from the dichloromethane droplets to be exposed to water, as it was energetically more favourable than mixing PEG with PLA in the final solid particles (Figure 4b) [51]. These PEG chains suddenly exposed to the aqueous medium generated sterical hindrance at the surface, above all for PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH as the relative PEG content is higher in this copolymer [52]. Also, in the case of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH, the number of chains is higher than with PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH, for a given concentration. This might explain why PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH needed more surface to accommodate all the PEG chains. However, this surface increase had to be done at constant volume, so the spherical droplets underwent an elongation, leading to cylinders [53] (Figure 4c). This elongation was further favoured by the electrostatic repulsions generated by the carboxylate end group of PEG (which was not the case with methoxy end groups. These elongated droplets were not perfectly cylindrical but displayed undulations similar to a Plateau-Rayleigh instability [45]. Shortly, any tiny perturbation in a long liquid cylinder can spread and grow, leading to a sinusoidal undulation of the cylinder surface. If the wavelength of this undulation is higher that π times the diameter, then the modulated cylinder is more stable than a regular cylinder and the system reaches an equilibrium. But if the undulation wavelength is lower than this critical value, the modulated cylinder is unstable, and breaks out into small spherical droplets following Laplace-Young equation [54,55]. Thus, we assume that the cylindrical droplets of dichloromethane underwent this Plateau-Rayleigh instability, leading to the formation of undulations and a division into spheres, hence the presence of spheres with a diameter similar to the width of the worm-like NP. Finally, as the dichloromethane finished to evaporate, the elongated particles froze before the end of their complete division, leading to a blend of spheres and worm-like NP (Figure 4d).

In addition, we observed that this division into spheres could be triggered again, even after the complete evaporation of dichloromethane, by increasing the temperature to 37°C above polymer T_g (34.5°C) (Figure 4). The heat did not induce a degradation of the polymer (Supplementary information 2), but favoured the mobility of the polymer chains, making the peristaltic movements characterising Plateau-Rayleigh instability possible again. This spontaneous phenomenon has already been observed on solid polystyrene strips, undergoing Plateau-Rayleigh instability until their division into spheres just by annealing them above their T_g [56]. Nevertheless, the rubbery NP might be more difficult to break than dichloromethane-containing droplets, so a high interfacial tension between the NP and the medium was necessary, hence the absence of division in

presence of high concentration of sodium cholate. Thus, heating the worm-like NP above 34.5°C in purified water leads to their total and irreversible division. Similar temperature-dependant shape modifications were already described in the literature. Geng *et al.* showed the division of worm-like NP made of poly(ethylene oxide)-*b*-(ε-caprolactone) in spherical NP at 37°C. However, the mechanism was different, because it involved a reorganisation of the copolymer following its degradation. Indeed, shortening the poly(ε-caprolactone) block modified the packing parameter of the copolymer, hence the curvature modification of the self-assembled structures [57]. Armes' team also observed a division of poly(lauryl methacrylate)-poly(benzyl methacrylate) worm-like NP by heating it up. The mechanism proposed was based on a better solvation of the core at high temperatures, leading to a modification of the curvature. This mechanism did not suit to our system, because it should be reversible at a concentration of 5% w/w, which was not the case [36].

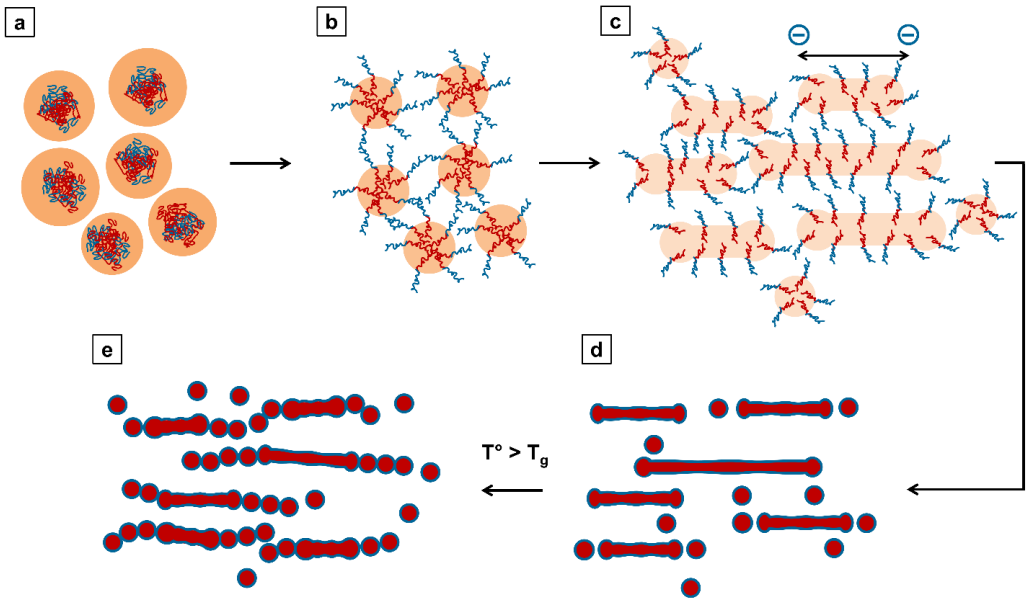


Figure 4: Scheme illustrating the formation and the evolution of the worm-like NP morphology composed of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH. (a) The two blocks of the copolymer were dissolved in dichloromethane droplets. (b) The progressive evaporation of dichloromethane increased the PEG concentration inside the droplets, forcing the expulsion of this latter towards water. (c) The sudden presence of numerous charged PEG blocks at the interface induced sterical hindrance and electrostatic repulsions, hence the surface increase and droplet elongation. This elongation caused a Plateau-Rayleigh instability, leading to the development of undulations and a division of the cylindrical droplets from their extremities into smaller spherical droplets. (d) The total evaporation of dichloromethane froze the system, hence the existence of both worm-like and spherical NP. (e) The heat could reactivate the Plateau-Rayleigh instability if the temperature exceeded the T_g of the polymer, progressively leading to the complete division of the worm-like NP.

Besides, the wide distribution of sphere diameters with PLA_{47}-*b*-PEG_5-COOH and PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH could mean that only a part of the spheres resulted from the division of elongated droplets, containing the shortest polymers of the distribution. The biggest spheres might have formed in one step, with the longest polymers.

4.2. Cellular uptake of worm-like NP

The study comparing the cellular uptake of spherical PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH NP and worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP showed a significant difference after 4 h of incubation, but no more difference after 24 h. This is was a surprising result, that could not be discussed without studying the thermal stability of worm-like NP. Indeed, we discussed earlier the division mechanism occurring with worm-like NP when the temperature exceeds the T_g of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH. Given that the incubation of NP with cells was performed at 37°C, in absence of sodium cholate, we assume worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP underwent a division into spheres as described earlier. Thus, the results of this internalisation study must be discussed cautiously.

First, the significant difference of cell MFI between the PLA_{81}-*b*-PEG_5-COOH NP and the PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP after 4 h of incubation could be due to the presence of worm-like NP. Indeed, if both samples contained spherical NP of similar diameter (around 50 nm), some worm-like PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP remained undivided after 4h of incubation, as the average aspect ratio was still around 1.6 (Figure 2). Thus, worm-like shape could have slightly increased the uptake by murine macrophages.

Then, if this trend seemed to be confirmed after 24 h of incubation (the average MFI was still higher with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP), the difference between the two samples was not significant anymore. Indeed, the proportion of worm-like NP decreasing very fast at 37°C, both samples contained only spheres after 24 h (Figure 2). The uptake rate of the two samples probably tended to converge, hence the MFI difference could not increase overtime.

Thus, the elongated NP shape allowed a slight increase of the cell MFI during the first four hours, so a higher volume of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP was internalised as long as worm-like NP were present in the sample. This is in good agreement with several studies [7,8,58,59]. One in particular showed a better internalisation for elongated particles, in comparison with their spherical counterparts with a similar hydrodynamic diameter [58].

This result has been verified by other authors, independently of rod and sphere dimensions [59]. The usual explanations concerning the higher uptake are related to the particle surface. Indeed, Xue *et al.* argued that at a given hydrodynamic diameter, the surface area of a cylinder is lower than the surface area of a sphere, hence a faster wrapping of the NP by the cell [58]. Besides, Gratton *et al.* did not compare particles of similar size and explained that the higher surface area of cylinders increases the interactions with cell membranes, hence a better internalisation [7]. Other authors do not discuss the surface area, but the internalisation pathway. Indeed, nanoparticles which size is lower than 500 nm would actually be internalised by receptor-mediated endocytosis (unlike larger particles, undergoing phagocytosis). [60]. Zhen *et al.* showed spheres and nanorods are not internalised by Caco-2 cells at the same rate because they do not bind to the same receptors. Indeed, their spherical NP would undergo clathrin-mediated endocytosis, while nanorods would undergo caveolae-mediated endocytosis [59]. Thus, several mechanisms were reported in the literature to explain a better uptake of elongated particles.

However, results of different studies must be compared and analysed with caution, as the conditions of the experiments are often very different. Indeed, the compared particles can have the same hydrodynamic diameter, the same maximum or minimum size, the same volume, *etc*. Depending on the parameter arbitrary set, the results can change dramatically. Also, Cong *et al.* emphasized that uptake results depend on the cell line used for the *in vitro* test [61]. One should also remember that uptake experiments were performed under static conditions and that hydrodynamic flow of the bloodstream may modify completely the interactions with cells and therefore uptake [62]. Finally, the physical parameter used to compare spherical and elongated particles should be the same for all the studies. While most of the studies compared the cellular uptake of the different NP based on the MFI, Chithrani *et al.* concluded based on the number of NP [26,63]. This is noteworthy as these studies are among the rare ones to claim a lower uptake of nanorods compared to spherical NP. Thus, more studies are necessary, and a special care should be taken to design these studies following a standard model, making the future studies comparable with each other.

5. Conclusion

We have shown the ability of PLA-*b*-PEG-COOH to form worm-like NP by an emulsion-evaporation process, under specific conditions. First, a short PLA block (13,000 g/mol) increased the content of PEG at the interface, inducing sterical hindrance. This led to an increase of the particle surface to accommodate all the PEG chains, hence the elongation of the NP into worm-like NP during the solvent evaporation. Also, the deprotonation of the carboxyl end group of the PEG block ensured electrostatic repulsions, increasing the length of the worm-like NP. However, as any fluid cylinder, the worm-like NP underwent a Plateau-Rayleigh instability, generating undulations at their surface and leading to their division into spherical droplets, from the worm extremities. At the end of the solvent evaporation, the structures were frozen, explaining the mixture of spherical and worm-like NP. This instability could however be recovered by increasing the temperature above the copolymer T_g, after purifying the NP suspension from surfactants. This led to a complete division of the worm-like NP into spheres after 24 h at 37°C. Finally, the interest of worm-like NP for drug delivery purposes was demonstrated, as they were significantly more internalised by murine macrophage cells in the first four hours of incubation.

To conclude, we propose a new polymer platform to produce biocompatible anisotropic NP for drug delivery. These NP were produced with a simple technique and showed first encouraging results in terms of cellular uptake. However, more studies are necessary to make worm-like NP more stable at physiological temperature, and to better assess the actual benefit of using worm-like NP for intracellular drug-delivery.

Acknowledgement

N. Huang acknowledges the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for its support through a Young Researchers grant (ANR-16-CE09-0003), that funded the PhD of Baptiste Robin and the internship of Ophélie Bellance-Mina. Ludivine Mousnier's salary was supported by Laboratory of Excellence LERMIT, through a grant from ANR (ANR-10-LABX-33). Authors acknowledge financial support from ANR (Investissements d'Avenir, Nanobiotechnologies, nUCA project ANR-10-NANO-06). The present work has also benefited from Imagerie-Gif core facilities (http://www.i2bc.paris-saclay.fr), member of IBiSA (http://www.ibisa.net), supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-

EQPX-0029/Morphoscope, ANR-10-INBS-04/FranceBioImaging ; ANR-11-IDEX-0003-02/ Saclay Plant Sciences), with the precious help of Cynthia Gillet and Claire Boulogne. Finally, we acknowledge Valérie Nicolas (Microscopy facility (MIPSIT), UMS3679 (IPSIT), Université Paris-Saclay) for her help on the LCSM experiments.

Supporting Material

Supporting Material 1: Influence of pH on NP shape

Electrostatic repulsions seemed to play a role in the formation of worm-like NP. To confirm this assumption, we assessed the influence of the charge brought by the COOH end group of the PEG block, by varying the pH. To do so, the aqueous phase was modified: sodium cholate was dissolved in a buffer containing sodium dihydrogen phosphate (10 mM) and citric acid (5 mM), instead of water. Two suspensions of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH NP were prepared in this aqueous medium after addition of sodium hydroxide 10 M to adjust pH respectively at pH = 7.2 (same pH than the pure sodium cholate solution without buffer) and pH = 11.2. Acidic conditions could not be studied as cholic acid, the acid form of sodium cholate, was not soluble in water. For both pH, TEM images showed a blend of worm-like NP and spheres, as observed with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH in sodium cholate solution without buffer (Figure SM1.1). However, a higher elongation of the worm-like NP was observed at pH = 11.2: the average aspect ratio of worm-like NP only was of 5.0, compared to 3.6 for pH 7.2.

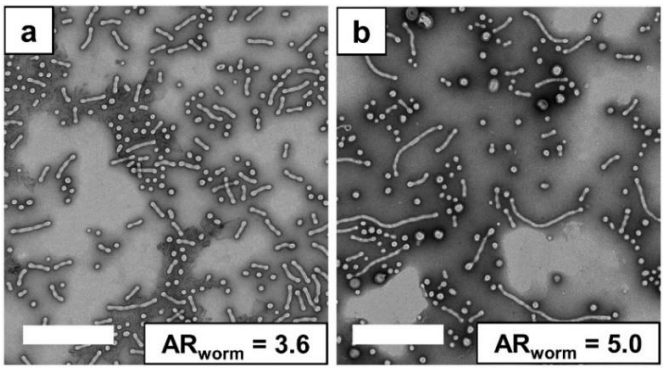


Figure SM1.1: Effect of buffer and pH on the morphology of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP: (a) sodium cholate 1.5% in a Phosphate 10 mM/Citrate 5 mM buffer pH = 7.2, (b) sodium cholate 1.5% in a Phosphate 10 mM/Citrate 5 mM buffer pH = 11.2 (Scale bar: 500 nm). The NP elongation was assessed by the aspect ratio of the worm-like NP (AR_{worm} = length/width).

Supporting Material 2: Degradation of the PLA block during the division of worm-like NP

When stored at 37°C and above after their preparation and centrifugation, worm-like NP tended to divide into smaller spheres as described in the main article. To prove this behaviour was not due to the hydrolysis of the PLA block, we performed some measurements of the PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH molar mass overtime. The number-averaged molar masses M_w were determined by SEC relative to PMMA standards (Figure SM2.1).

First, the initial molar mass of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH determined by SEC was 23,000 g/mol instead of 18,000 g/mol. This is not surprising, as this measurement is relative to PMMA standards, and not absolute as the measurement made by ^{1}H NMR. Then, we observed the great stability of PLA at both 4 and 37°C over 4 days. This means that the division observed on worm-like NP after 24 h at 37°C was not due the hydrolysis of the PLA block.

The measurements performed on the sample stored at 60°C showed a fast degradation of the copolymer, as its molar mass decreased to 18,000 g/mol in 24 h. It even divided in two oligomers of 12,000 and 3,000 g/mol, after 4 days. This degradation could be related to the macroscopic behaviour of the NP suspension stored at 60°C, that seemed cloudier than the others after 7 days. This observation was in line with an absence of individual nanoparticles on TEM images, showing only unregular aggregates (Figure SM2.2).

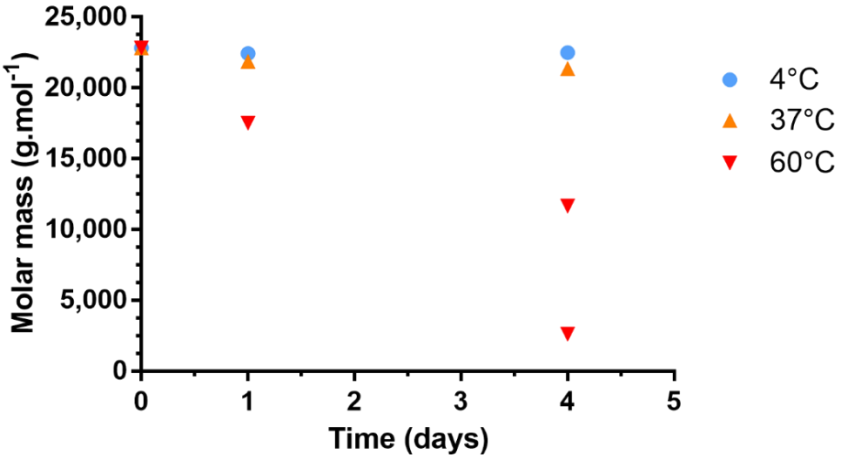


Figure SM2.1: Evolution of the molar mass of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH contained in a suspension of worm-like NP stored at different temperature, assessed by SEC relative to poly(methylmethacrylate) standards.

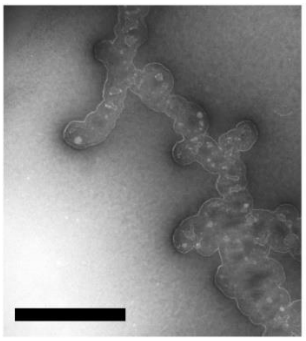
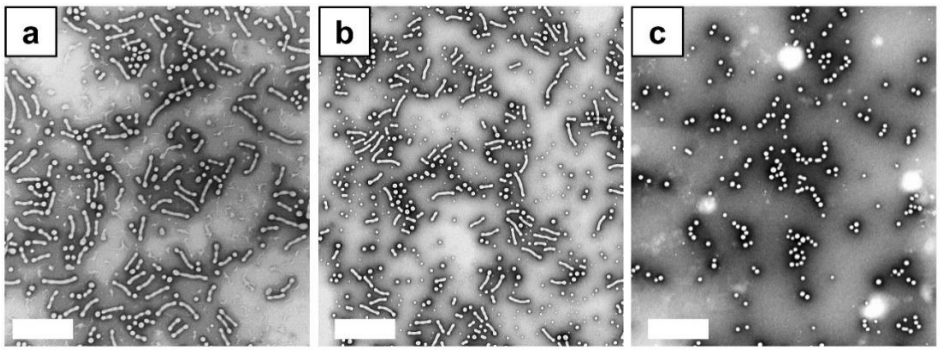


Figure SM2.2: TEM image of particles obtained with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH after 4 days at 60°C in water (Scale bar: 500 nm).

Supporting Material 3: Effect of the presence of cholate sodium on the division of the worm-like NP

Worm-like NP prepared with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH were prepared as described in the main article. A half of this sample was stored in a heat chamber at 45°C for 24h . The second half of the sample was centrifuged to remove the sodium cholate prior to the storage at 45°C during 24 h. It must be noted that the efficiency of the sodium cholate removal by centrifugation has already been verified by our team, in a previous work [43]. TEM was then performed to observe the morphology of the worm-like NP at the end of this treatment (Figure SM3.1). The presence of sodium cholate in the NP suspension had a dramatic influence on the division phenomenon. Indeed, the presence of cholate in the worm-like NP suspension seemed to inhibit the division. Surfactant removal was a necessary condition to allow the Plateau-Rayleigh-instability-induced division at temperatures above T_g.



FigureSM3.1: TEM images of particles obtained with PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH (a) at the end of the preparation process, (b) after 24 h at 45°C in a solution of sodium cholate 1.5% w/v and (c) after 24 h at 45°C in water (Scale bar: 500 nm).

Supporting Material 4: Graphical determination of the glass transition temperature of PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP suspended in water

An example of thermogram is given in Figure SM4.1, for PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH worm-like NP. The three dashed lines represent the tangent lines of the curve at the baseline (before and after the glass transition) and at the inflection point of the glass transition step. The first crossover point defines the onset of the glass transition (T_g onset), while the second one defines its end (T_g end). The midpoint is midway between these two crossover points, and the corresponding temperature is the "T_g midpoint". This T_g midpoint was measured at a scan rate of 60°C/h, and was equal to 34.5°C.

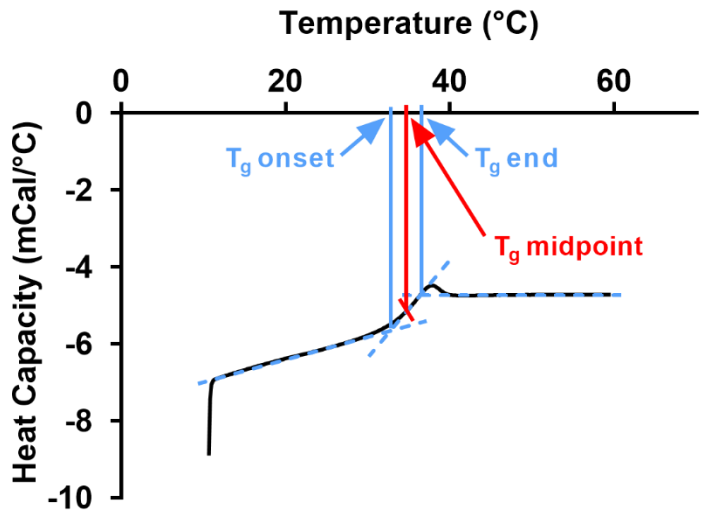


Figure SM4.1: Thermogram of worm-like NP suspended in water (50 mg/mL), performed at a heating of 60°C/h.

References

[1] B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions, Soft Matter. 5 (2009) 1717. https://doi.org/10.1039/b816680c.

[2] I. Kalashnikova, H. Bizot, P. Bertoncini, B. Cathala, I. Capron, Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions, Soft Matter. 9 (2012) 952–959. https://doi.org/10.1039/C2SM26472B.

[3] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E.M. Lima, D.E. Discher, Micelles of Different Morphologies—Advantages of Worm-like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery, Pharm. Res. 24 (2007) 2099–2109. https://doi.org/10.1007/s11095-007-9335-z.

[4] F. Gharebaghi, N. Dalali, E. Ahmadi, H. Danafar, Preparation of wormlike polymeric nanoparticles coated with silica for delivery of methotrexate and evaluation of anticancer activity against MCF7 cells, J. Biomater. Appl. 31 (2017) 1305–1316. https://doi.org/10.1177/0885328217698063.

[5] Z. Zhou, X. Ma, E. Jin, J. Tang, M. Sui, Y. Shen, E.A. Van Kirk, W.J. Murdoch, M. Radosz, Linear-dendritic drug conjugates forming long-circulating nanorods for cancer-drug delivery, Biomaterials. 34 (2013) 5722–5735. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.012.

[6] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 249–255. https://doi.org/10.1038/nnano.2007.70.

[7] S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 11613–11618. https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105.

[8] Y. Guo, T. Wang, S. Zhao, M. Han, Z. Dong, X. Wang, Y. Wang, Amphiphilic Hybrid Dendritic-Linear Molecules as Nanocarriers for Shape-Dependent Antitumor Drug Delivery, Mol. Pharm. 15 (2018) 2665–2673. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00190.

[9] A.-K. Pada, D. Desai, K. Sun, N. Prakirth Govardhanam, K. Törnquist, J. Zhang, J.M. Rosenholm, Comparison of Polydopamine-Coated Mesoporous Silica Nanorods and Spheres for the Delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Anticancer Drugs, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 3408. https://doi.org/10.3390/ijms20143408.

[10] I. Capron, B. Cathala, Surfactant-Free High Internal Phase Emulsions Stabilized by Cellulose Nanocrystals, Biomacromolecules. 14 (2013) 291–296. https://doi.org/10.1021/bm301871k.

[11] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Shape-Anisotropic Colloids at Interfaces, Langmuir. 35 (2019) 3–20. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01139.

[12] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, General destabilization mechanism of pH-responsive Pickering emulsions, Phys. Chem. Chem. Phys. 19 (2017) 30790–30797. https://doi.org/10.1039/C7CP04665K.

[13] P. Sangaiya, R. Jayaprakash, A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications, J. Supercond. Nov. Magn. 31 (2018) 3397–3413. https://doi.org/10.1007/s10948-018-4841-2.

[14] R.C. Rowe, ed., Handbook of pharmaceutical excipients, 6. ed, APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, London, 2009.

[15] A. Pandey, D.S. Jain, Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Copolymer and Its Pharmaceutical Application, in: V.K. Thakur, M.K. Thakur (Eds.), Handb. Polym. Pharm. Technol., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2015: pp. 151–172. https://doi.org/10.1002/9781119041412.ch6.

[16] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers. 3 (2011) 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377.

[17] T. Casalini, G. Perale, 1 - Types of bioresorbable polymers for medical applications, in: M. Jenkins, A. Stamboulis (Eds.), Durab. Reliab. Med. Polym., Woodhead Publishing, 2012: pp. 3–29. https://doi.org/10.1533/9780857096517.1.3.

[18] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol. 13 (1965) 238-IN27. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6.

[19] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, Int. J. Pharm. 366 (2009) 170–184. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.

[20] M. Lorscheider, N. Tsapis, M. ur-Rehman, F. Gaudin, I. Stolfa, S. Abreu, S. Mura, P. Chaminade, M. Espeli, E. Fattal, Dexamethasone palmitate nanoparticles: An efficient treatment for rheumatoid arthritis, J. Controlled Release. 296 (2019) 179–189. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.015.

[21] C.E. Astete, C.M. Sabliov, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 17 (2006) 247–289. https://doi.org/10.1163/156856206775997322.

[22] S. Asgari, A.H. Saberi, D.J. McClements, M. Lin, Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles, Trends Food Sci. Technol. 86 (2019) 118–130. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.008.

[23] P.G. Jamkhande, N.W. Ghule, A.H. Bamer, M.G. Kalaskar, Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 53 (2019) 101174. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174.

[24] J. Chen, N.E. Clay, No-hyung Park, H. Kong, Non-spherical particles for targeted drug delivery, Chem. Eng. Sci. 125 (2015) 20–24. https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.10.022.

[25] Z. Wang, Z. Wu, J. Liu, W. Zhang, Particle morphology: an important factor affecting drug delivery by nanocarriers into solid tumors, Expert Opin. Drug Deliv. 15 (2018) 379–395. https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1420051.

[26] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, Nano Lett. 6 (2006) 662–668. https://doi.org/10.1021/nl052396o.

[27] J.A. Champion, Y.K. Katare, S. Mitragotri, Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers, J. Controlled Release. 121 (2007) 3–9. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.022.

[28] H. Safari, R. Adili, M. Holinstat, O. Eniola-Adefeso, Modified two-step emulsion solvent evaporation technique for fabricating biodegradable rod-shaped particles in the submicron size range, J. Colloid Interface Sci. 518 (2018) 174–183. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.02.030.

[29] J.-B. Fan, Y. Song, H. Li, J.-P. Jia, X. Guo, L. Jiang, Controllable drug release and effective intracellular accumulation highlighted by anisotropic biodegradable PLGE nanoparticles, J Mater Chem B. 2 (2014) 3911–3914. https://doi.org/10.1039/C3TB21726D.

[30] M. Gregoritza, K. Abstiens, M. Graf, A.M. Goepferich, Fabrication of antibody-loaded microgels using microfluidics and thiol-ene photoclick chemistry, Eur. J. Pharm. Biopharm. 127 (2018) 194–203. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.024.

[31] S. Bhaskar, K.M. Pollock, M. Yoshida, J. Lahann, Towards Designer Microparticles: Simultaneous Control of Anisotropy, Shape, and Size, Small. 6 (2010) 404–411. https://doi.org/10.1002/smll.200901306.

[32] S. Bhaskar, J. Hitt, S.-W.L. Chang, J. Lahann, Multicompartmental Microcylinders, Angew. Chem. Int. Ed. 48 (2009) 4589–4593. https://doi.org/10.1002/anie.200806241.

[33] M. Zheng, J. Yu, The effect of particle shape and size on cellular uptake, Drug Deliv. Transl. Res. 6 (2016) 67–72. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0270-y.

[34] C.C. Ho, A. Keller, J.A. Odell, R.H. Ottewill, Preparation of monodisperse ellipsoidal polystyrene particles, Colloid Polym. Sci. 271 (1993) 469–479. https://doi.org/10.1007/BF00657391.

[35] C. Palazzo, G. Ponchel, J.J. Vachon, S. Villebrun, F. Agnely, C. Vauthier, Obtaining nonspherical poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by the stretching method applied with a marketed water-soluble film, Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. 66 (2017) 416–424. https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1233420.

[36] L.A. Fielding, J.A. Lane, M.J. Derry, O.O. Mykhaylyk, S.P. Armes, Thermo-responsive Diblock Copolymer Worm Gels in Non-polar Solvents, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 5790–5798. https://doi.org/10.1021/ja501756h.

[37] A. Blanazs, R. Verber, O.O. Mykhaylyk, A.J. Ryan, J.Z. Heath, C.W.I. Douglas, S.P. Armes, Sterilizable Gels from Thermoresponsive Block Copolymer Worms, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 9741–9748. https://doi.org/10.1021/ja3024059.

[38] I. LaRue, M. Adam, M. Pitsikalis, N. Hadjichristidis, M. Rubinstein, S.S. Sheiko, Reversible Morphological Transitions of Polystyrene-b-polyisoprene Micelles, Macromolecules. 39 (2006) 309–314. https://doi.org/10.1021/ma051548z.

[39] X. Zhang, S. Boissé, W. Zhang, P. Beaunier, F. D'Agosto, J. Rieger, B. Charleux, Well-Defined Amphiphilic Block Copolymers and Nano-objects Formed in Situ via RAFT-Mediated Aqueous Emulsion Polymerization, Macromolecules. 44 (2011) 4149–4158. https://doi.org/10.1021/ma2005926.

[40] K. Jelonek, S. Li, X. Wu, J. Kasperczyk, A. Marcinkowski, Self-assembled filomicelles prepared from polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers for anticancer drug delivery, Int. J. Pharm. 485 (2015) 357–364. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.032.

[41] O. Cauchois, F. Segura-Sanchez, G. Ponchel, Molecular weight controls the elongation of oblate-shaped degradable poly(γ-benzyl-l-glutamate)nanoparticles, Int. J. Pharm. 452 (2013) 292–299. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.074.

[42] M.J. Heslinga, E.M. Mastria, O. Eniola-Adefeso, Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications, J. Controlled Release. 138 (2009) 235–242. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.020.

[43] O. Diou, N. Tsapis, C. Giraudeau, J. Valette, C. Gueutin, F. Bourasset, S. Zanna, C. Vauthier, E. Fattal, Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI, Biomaterials. 33 (2012) 5593–5602. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.037.

[44] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nat. Methods. 9 (2012) 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

[45] S. Jain, F.S. Bates, Consequences of Nonergodicity in Aqueous Binary PEO−PB Micellar Dispersions, Macromolecules. 37 (2004) 1511–1523. https://doi.org/10.1021/ma035467j.

[46] L.A. Fielding, M.J. Derry, V. Ladmiral, J. Rosselgong, A.M. Rodrigues, L.P.D. Ratcliffe, S. Sugihara, S.P. Armes, RAFT dispersion polymerization in non-polar solvents: facile production of block copolymer spheres, worms and vesicles in n-alkanes, Chem. Sci. 4 (2013) 2081. https://doi.org/10.1039/c3sc50305d.

[47] A. Blanazs, J. Madsen, G. Battaglia, A.J. Ryan, S.P. Armes, Mechanistic Insights for Block Copolymer Morphologies: How Do Worms Form Vesicles?, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 16581–16587. https://doi.org/10.1021/ja206301a.

[48] J.N. Israelachvili, Intermolecular and surface forces, Third edition, Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2011.

[49] M.V. C. Mallard J. Coudane, I. Rault, In vitro delivery of a sparingly water soluble compound from PLA50 microparticles, J. Microencapsul. 17 (2000) 13–28. https://doi.org/10.1080/026520400288526.

[50] K. Tomaszewski, A. Szymanski, Z. Lukaszewski, Separation of poly(ethylene glycols) into fractions by sequential liquid–liquid extraction, Talanta. 50 (1999) 299–306. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00024-7.

[51] E. Pisani, C. Ringard, V. Nicolas, E. Raphaël, V. Rosilio, L. Moine, E. Fattal, N. Tsapis, Tuning microcapsules surface morphology using blends of homo- and copolymers of PLGA and PLGA-PEG, Soft Matter. 5 (2009) 3054. https://doi.org/10.1039/b902042j.

[52] H. Zhang, J. Bei, S. Wang, Multi-morphological biodegradable PLGE nanoparticles and their drug release behavior, Biomaterials. 30 (2009) 100–107. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.016.

[53] M. Daoud, C. Williams, La juste argile, Les Ed. de physique, Les Ulis, 1995.

[54] Lord Rayleigh, On The Instability Of Jets, Proc. Lond. Math. Soc. s1-10 (1878) 4–13. https://doi.org/10.1112/plms/s1-10.1.4.

[55] J. Eggers, Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows, Rev. Mod. Phys. 69 (1997) 865–930. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.69.865.

[56] J. Park, K.Y. Suh, S. Seo, H.H. Lee, Anisotropic rupture of polymer strips driven by Rayleigh instability, J. Chem. Phys. 124 (2006) 214710. https://doi.org/10.1063/1.2206580.

[57] Y. Geng, D.E. Discher, Hydrolytic Degradation of Poly(ethylene oxide)-block-Polycaprolactone Worm Micelles, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 12780–12781. https://doi.org/10.1021/ja053902e.

[58] J. Xue, Z. Guan, X. Zhu, J. Lin, C. Cai, X. Jin, Y. Li, Z. Ye, W. Zhang, X. Jiang, Cellular internalization of polypeptide-based nanoparticles: effects of size, shape and surface morphology, Biomater. Sci. 6 (2018) 3251–3261. https://doi.org/10.1039/C8BM01163J.

[59] N. Zheng, J. Li, C. Xu, L. Xu, S. Li, L. Xu, Mesoporous silica nanorods for improved oral drug absorption, Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol. (2017). http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21691401.2017.1362414 (accessed November 15, 2020).

[60] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?, Pharm. Res. 26 (2008) 235. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9697-x.

[61] V.T. Cong, K. Gaus, R.D. Tilley, J.J. Gooding, Rod-shaped mesoporous silica nanoparticles for nanomedicine: recent progress and perspectives, Expert Opin. Drug Deliv. 15 (2018) 881–892. https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1517748.

[62] T. Kang, Y. Cho, C. Park, S.-D. Kim, E. Oh, J.-H. Cui, Q.-R. Cao, B.-J. Lee, Effect of biomimetic shear stress on intracellular uptake and cell-killing efficiency of doxorubicin in a free and liposomal formulation, Int. J. Pharm. 510 (2016) 42–47. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.017.

[63] B.D. Chithrani, W.C.W. Chan, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, Nano Lett. 7 (2007) 1542–1550. https://doi.org/10.1021/nl070363y.

CHAPITRE 5

Emulsions de Pickering stabilisées par des nanoparticules biocompatibles de PLA-*b*-PEG :

Influence de la forme des nanoparticules sur les propriétés des émulsions

1. Introduction

Au cours du chapitre précédent, nous avons démontré qu'il était possible de préparer des NP à haut rapport d'aspect (que nous appellerons filoparticules en français, ou FP) à partir de PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH, un copolymère biocompatible. Ce matériau a déjà été utilisé pour stabiliser des émulsions de Pickering par Laredj-Bourezg *et al.* [1]. Cependant, les NP étaient alors préparées par un procédé d'émulsification spontanée, et avaient donc une forme sphérique. Ce nouveau chapitre aura donc pour objectif de démontrer l'intérêt des FP par rapport à des NP sphériques pour stabiliser des émulsions de Pickering.

Comme discuté dans le chapitre 1, section 3, l'existence d'une anisotropie pose systématiquement la question de l'orientation des particules une fois adsorbée [2–6], mais aussi de la déformation de l'interface autour des particules. En effet, les particules adsorbées à une interface tendent à déformer cette dernière en suivant la loi de Laplace. Or, l'équation de Young impose que l'angle de contact entre une particule et les deux fluides composant l'interface soit constant autour de la particule : la déformation de l'interface autour de particules anisotropes est donc hétérogène. Cela génère un comportement interfacial différent de particules sphériques, avec notamment l'apparition d'interactions capillaires sélectives qui régissent l'organisation interfaciale des particules et leur agrégation [7]. Ces phénomènes ont été étudiés dans le cas de particules cuboïdes [8], ellipsoïdes [9], cylindriques [10], ou encore de nanofibres [11].

Si une grande majorité de ces études ont été réalisées sur des interfaces planes, plus aisées à étudier, quelques-unes ont aussi été réalisées en émulsion. Ainsi, Kalashnikova *et al.* se sont intéressés à l'influence du rapport d'aspect de nanofibres de cellulose sur les mécanismes de stabilisation d'émulsions de Pickering. Ils démontrèrent notamment que la couverture de l'interface était meilleure avec des NP relativement courtes (rapport d'aspect de 13), conduisant à des émulsions très stables. Cependant, les NP les plus longues (rapport d'aspect de 160) conduisaient tout de même à une bonne stabilité, en favorisant les phénomènes de pontage (c'est-à-dire l'adsorption d'une même NP à la surface de plusieurs gouttelettes) [12]. Koike *et al.* ont, quant à eux, étudié l'influence de la forme de microplaquettes Janus de résine SU-8 sur la couverture des gouttelettes, et ont démontré la possibilité de stabiliser des gouttelettes polyédriques

[13]. Enfin, on peut citer le travail de Nonomura *et al.* qui ont étudié l'influence de la forme « microbols » sur le sens des émulsions de Pickering. La cavité de ces particules permettait notamment la capture d'une fraction de milieu de dispersion, et donc la préparation d'émulsions E/H ou H/E en changeant simplement le milieu de dispersion initiale [14].

Ces études mettent donc en lumière l'influence de la forme des particules, de leur rapport d'aspect, ou de la présence d'une cavité sur les caractéristiques des émulsions finales. Cependant, les comparaisons systématiques entre particules anisotropes et particules sphériques sont encore rares. C'est tout de même le cas de l'étude de Madivala *et al.*, qui compare l'efficacité de la stabilisation par des particules ellipsoïdes de différents rapport d'aspect à l'efficacité de stabilisation de particules sphériques, à concentration massique constante [15]. Cette étude conclut notamment sur l'intérêt d'utiliser de particules les plus allongées possibles, car ces dernières génèreraient des forces capillaires plus importantes et donc une interface plus stable.

Notre objectif au cours de la présente étude était donc d'étudier de façon systématique les différences entre des émulsions préparées avec des nanoparticules sphériques (abrégé SP pour *spherical particles*) ou avec un mélange de FP et de SP (noté FP/SP). Pour ce faire, deux types de suspensions ont été préparées : une première suspension contenant un mélange FP/SP, par le procédé d'émulsion-évaporation développé dans le chapitre 4 ; et une deuxième suspension ne contenant que des SP, par chauffage à 37°C pendant 24 h d'une suspension FP/SP. Ces suspensions ont ensuite fait l'objet d'une purification poussée, afin de retirer le tensioactif (cholate de sodium). En effet, ce dernier est nécessaire à leur préparation, mais ses propriétés tensioactives risquent d'influencer la stabilité des émulsions finales, masquant l'effet de la forme des NP. Enfin, des émulsions de Pickering ont pu être préparées avec les deux types de suspension et en l'absence de tensioactif, afin d'observer l'influence de la présence de FP sur les caractéristiques des émulsions.

2. Matériel et méthodes

Matériel

Le copolymère PLA_{14}-*b*-PEG_5-COOH a été synthétisé et caractérisé selon le protocole détaillé dans le chapitre 4, section 2.2. La masse molaire de ce nouveau lot diffère légèrement du lot décrit dans le précédent chapitre, avec un bloc PLA de 14 000 g/mol au lieu de 13 000 g/mol. Le dichlorométhane a été fourni par Carlo-Erba Reagents (Italie). Le Miglyol 812N (η = 30 mPa.s, liquide newtonien) a été fourni par Cremer (Netherlands). L'eau a été purifiée (résistivité de 18.2 MΩ.cm) à l'aide d'un système de purification MilliQ Direct Type 1 Ultrapure (Merck Millipore, Allemagne).

Préparation et purification des NP

Le PLA_{14}-*b*-PEG_5-COOH a été dissous dans 2 mL de dichlorométhane. Cette solution organique a été dispersée dans 10 mL d'une solution de cholate de sodium 1,5% m/v au vortex pendant 1 min, puis par sonication pendant 1 min (Digital Sonifier 250, Branson). Le dichlorométhane a ensuite été évaporé sous agitation magnétique à 300 tr/min pendant environ 3 h à 18°C. Pour obtenir une suspension composée uniquement de SP (notée « suspension SP »), une suspension FP/SP était placée à 37°C pendant 24 h après avoir été purifiée par ultracentrifugation.

Si cette purification était nécessaire pour permettre la division des FP en SP à 37°C (comme décrit dans le chapitre 4), elle devait aussi servir à s'affranchir du cholate de sodium avant de préparer les émulsions de Pickering. En effet, les propriétés tensioactives de cette molécule risquaient de masquer l'influence de la forme des NP sur les caractéristiques des émulsions, d'où la nécessité d'en retirer le plus possible. Pour cela, quatre conditions de purification par ultracentrifugation ont été testées, en variant notamment le nombre de cycles (entre 1 et 4). Le déroulement d'un cycle est décrit en Figure 1. La centrifugation était réalisée sur une suspension contenant le cholate à retirer, avec une accélération de 50 000 g à une température de 4°C, pendant un temps donné dans le Tableau 1 (en fonction du nombre de cycles réalisés). A l'issue de l'étape de centrifugation, le surnageant contenant le cholate de sodium était retiré, et remplacé par de l'eau (8 mL si l'échantillon est destiné à être centrifugé à nouveau, 2 mL s'il est destiné à être utilisé à une concentration de 25 mg de NP/mL). Le sédiment était alors laissé à réhydrater à 4°C pendant 3 à 4 h, avant d'être redispersé aux ultrasons pendant

quelques secondes. Le cycle était alors répété jusqu'à 4 fois. A noter que plus le nombre de cycles était important, plus la sédimentation des particules était difficile à obtenir. Ainsi, dans le cas d'une purification à 1 ou 2 cycles d'ultracentrifugation, chaque cycle durait 1 h ; au-delà de deux cycles, la centrifugation devait durer 2 h pour permettre la sédimentation de toutes les particules (Tableau 1).

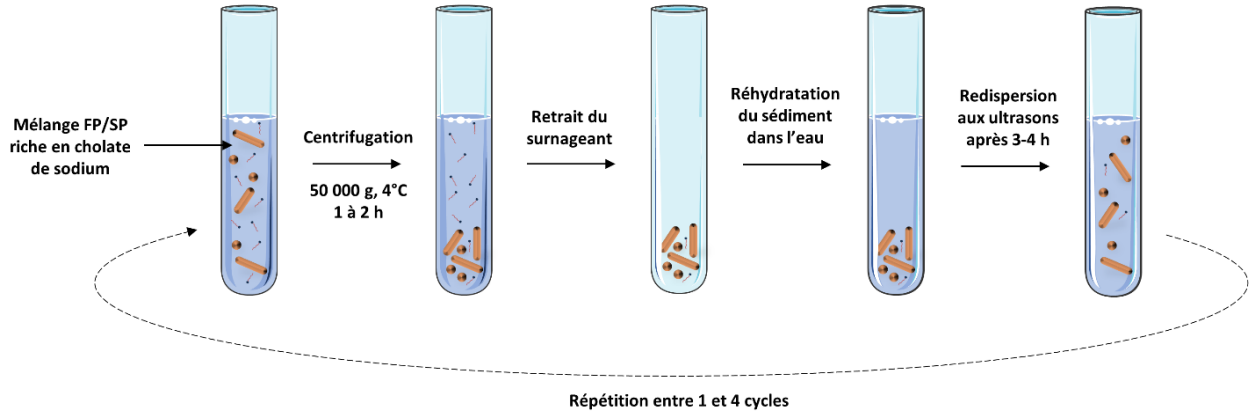


Figure 1 : Représentation schématique du procédé de purification des NP

Tableau 1 : Conditions des centrifugations appliquées au cours de l'étude.

Nombre de	1er cycle	2e cycle	3e cycle	4e cycle
1	1 h			
2	1 h	1 h		
3	1 h	1 h	2 h	
4	1 h	1 h	2 h	2 h

Caractérisation des NP

2.1.1. Intégrité des NP après purification

L'aspect général des NP après purification a été évalué par microscopie électronique à transmission (MET), comme décrit au cours du chapitre 4, section 2.4.1.

2.1.2. Efficacité de la purification

a) Dosage colorimétrique du cholate de sodium

La méthode de dosage utilisée au cours de cette étude a été décrite précédemment par Diou *et al.* [16]. Brièvement, une solution mère de cholate de sodium 12,5 mg/mL a subi

des dilutions successives dans de l'acide sulfurique 65% m/v pour obtenir des solutions étalon allant de 25 mg/mL à 5 µg/mL. L'absorbance de ces solutions à la longueur d'onde λ = 320 nm a été mesurée sur un spectrophotomètre UV-Visible (V530 UV/Vis spectrophotometer, Jasco, Japan), avec l'acide sulfurique 65% m/v pour blanc. La courbe étalon obtenue avait pour équation y = 0,0275x + 0,0171, avec R^2 = 0,9999.

Le cholate de sodium a ensuite été dosé avant et après centrifugation, après dilution d'une fraction aliquote de l'échantillon dans l'acide sulfurique 65% m/v (Figure 2). Le volume d'échantillon à diluer pour le dosage était de 25 µL pour la suspension avant centrifugation (10 mg NP/mL), 25 µL pour le surnageant après centrifugation, et 1,5 mL de suspension de NP après centrifugation (50 mg NP/mL). Le volume total après dilution dans l'acide sulfurique était de 20 mL. L'absorbance de ces solutions étaient mesurée à 320 nm, et reportée sur la droite étalon pour déduire la concentration, et donc la masse de cholate de sodium avant et après centrifugation. Ces mesures ont été réalisées trois fois, chacune sur une suspension de NP différentes.

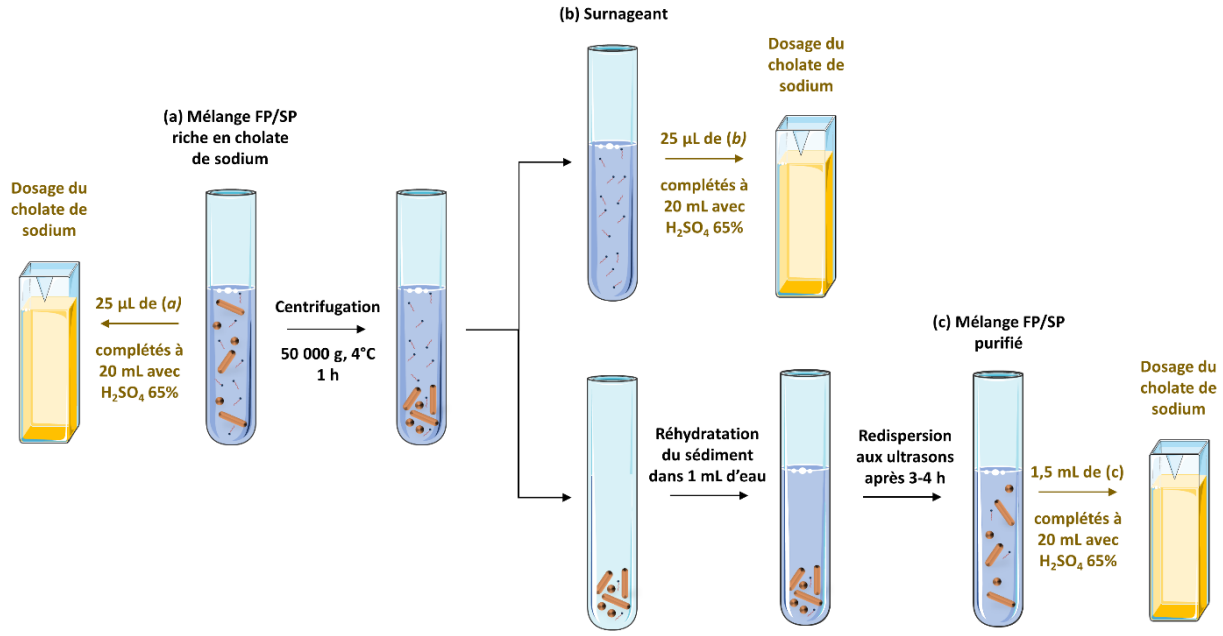


Figure 2 : Représentation schématique d'un cycle de purification, comprenant les trois étapes-clés auxquelles sont réalisés des dosages colorimétriques du cholate de sodium : (a) la suspension avant centrifugation (10 mg NP/mL), (b) le surnageant après centrifugation, et (c) la suspension de NP après centrifugation (50 mg NP/mL).

b) Mesure de tension interfaciale

Un tensiomètre à goutte pendante (Tracker, Teclis, France) a été utilisé pour mesurer la tension interfaciale γ entre divers milieux à 18°C. Une première série de mesure a consisté à mesurer la tension interfaciale entre du Miglyol 812N et une goutte de 30 µL de phase aqueuse (eau purifiée, solution de cholate de sodium 0,8 mg/mL ou suspension FP/SP 25 mg/mL centrifugées une fois) pendant 12 h. Cette première expérience n'a été effectuée qu'une seule fois.

Dans une deuxième expérience, les propriétés tensioactives du cholate de sodium présent dans les surnageants de centrifugation ont été mesurées. En pratique, la tension interfaciale entre l'air et une goutte de surnageant issu de la purification des NP par 1 à 4 cycles de centrifugation a été mesurée pendant 30 min. Pour chaque condition de purification, les mesures ont été répétées sur les surnageants de trois échantillons différents.

Préparation des émulsions

Des émulsions de 4 g ont été préparées à différents ratio eau/huile, allant de 90/10 à 10/90. La concentration en NP dans la phase aqueuse était de 25 mg/mL pour toutes les émulsions. La suspension aqueuse de NP (suspension FP/SP ou suspension SP) était pesée la première dans un flacon, puis l'huile était ajoutée et pesée dans le même flacon. L'émulsion était alors réalisée selon un procédé rotor-stator à l'aide d'un Ultra-turrax (IKA T10 basic, 5 G dispersing tool) à 20 000 rpm pendant 30 s, à une température de 18°C.

Caractérisation des émulsions

2.1.3. Sens des émulsions

Le sens des émulsions a été évalué par la méthode des colorants. Deux gouttes d'émulsion ont été déposées séparément sur une lame de verre. Dans l'une a été ajoutée une solution aqueuse de bleu de méthylène, dans l'autre une solution huileuse de Rouge Soudan. La miscibilité ou non des colorants à la phase continue de l'émulsion a permis de déterminer le sens de l'émulsion.

2.1.4. Aspect et taille des gouttelettes

Les gouttelettes ont été observées à l'aide d'un microscope optique Olympus BX-60 couplé à une caméra Olympus EP-50 (Japon). Les images ont été obtenues à un grossissement x40 (oculaire x10 et objectif x4). Le cas échéant, le diamètre des gouttelettes a été mesuré manuellement sur au moins 100 gouttelettes, grâce au logiciel Fiji [17].

2.1.5. Adsorption des NP à l'interface eau-huile

L'adsorption des NP à l'interface eau-huile a été vérifiée par cryo-microscopie électronique à balayage (CryoMEB), selon un protocole très similaire à celui décrit au cours du chapitre 3, section 2.6.3. Notons seulement que le métal utilisé pour recouvrir les échantillons cryofracturés était ici du platine (au lieu de l'iridium dans le chapitre 3), mais cela n'a aucune influence sur les clichés obtenus. De plus, la distance de travail variait ici entre 3,9 et 4,1 mm.

3. Résultats et discussion

Le polymère utilisé dans cette étude est le PLA_{14}-*b*-PEG_5-COOH, et les suspensions de NP (FP/SP et SP) produites avec lui ont des caractéristiques proches de celles présentées dans le Chapitre 4. La suspension obtenue est un mélange d'environ 30% de FP (pourcentage en nombre) et de 70% SP (mélange noté « suspension FP/SP »). Il convient de noter que ces proportions diffèrent du mélange présenté dans le chapitre 4. Cela peut s'expliquer par un changement de lot du polymère, avec un bloc PLA de masse molaire légèrement plus élevée.

En outre, la préparation d'émulsions de Pickering à partir de ces NP a dans un premier temps nécessité une purification efficace. En effet, le cholate de sodium risquait de stabiliser les émulsions en lieu et place des NP, d'où l'importance de s'assurer de son élimination afin d'étudier l'effet propre des NP et de leur forme.

Purification des NP et effet sur les émulsions

3.1.1. Purification par centrifugation unique

Dans un premier temps, une suspension FP/SP a été produite et centrifugée une fois pendant 1 h, de façon analogue à l'étude présentée dans le Chapitre 4. Un dosage colorimétrique a alors permis de déterminer la quantité de cholate de sodium éliminée par cette opération de purification (Figure 3). La quantité initiale de cholate de sodium, théoriquement de 300 mg pour 200 mg de NP, a été mesurée expérimentalement à 326 ± 25 mg pour 200 mg de NP. Après centrifugation, 301 ± 31 mg ont été retrouvés dans le surnageant, pour 6 ± 2 mg dans le culot. Cette étape de purification simple a donc permis de réduire d'environ 98% la quantité de cholate de sodium présente dans la suspension FP/SP, ce qui est en accord avec d'autres exemples de la littérature [16].

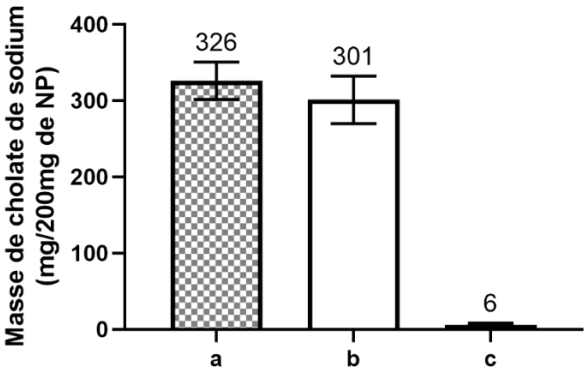


Figure 3 : Masse de cholate de sodium présente dans l'échantillon à chaque étape du procédé de fabrication, obtenue par dosage colorimétrique par ajout d'acide sulfurique 65%. Les systèmes étudiés sont les suivants : (a) Suspension FP/SP à l'issue de l'émulsion-évaporation avant centrifugation, (b) Surnageant obtenu après centrifugation et (c) Culot FP/SP obtenu après centrifugation.

Cependant, cette purification n'étant pas complète, il convenait alors d'évaluer l'influence potentielle de cette faible quantité de tensioactif résiduelle sur la tension interfaciale eau-huile, dans les conditions de préparation d'une émulsion (Figure 4). La tension interfaciale entre l'eau purifiée et le Miglyol 812N est de 26 $mN.m^{-1}$; lorsque la phase aqueuse est une suspension FP/SP à 25 mg NP/mL purifiée par une étape de centrifugation, la tension interfaciale est proche de 13 $mN.m^{-1}$. Pour déterminer l'origine de cette diminution significative, la tension interfaciale entre le Miglyol 812N et une solution de cholate de sodium 0,8 mg/mL (ce qui représente la concentration résiduelle

contenue dans la suspension FP/SP à 25 mg/mL après centrifugation) a été mesurée. Une valeur de 18 mN.m^{-1} a été relevée, traduisant un abaissement significatif de la tension interfaciale en présence de cette faible concentration de cholate de sodium. Cette quantité résiduelle peut ainsi s'adsorber à l'interface en quantités non négligeables, et stabiliser les gouttelettes à la place des particules.

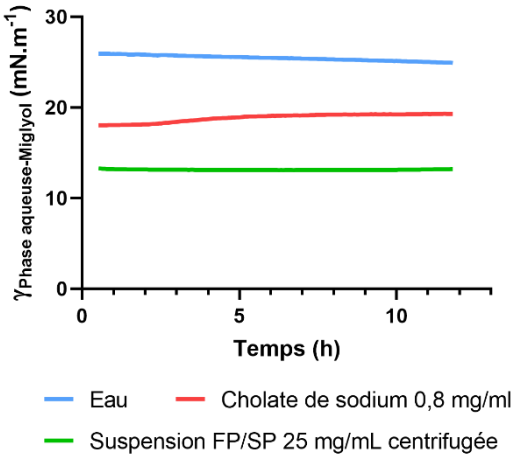


Figure 4 : Tension interfaciale $\gamma_{\text{Phase aqueuse-Huile}}$ mesurée par la méthode de la goutte pendante en fonction du temps. Les phases aqueuses utilisées sont l'eau purifiées (en bleu), une solution de cholate de sodium à 0,8 mg/mL (en rouge) et une suspension FP/SP à 25 mg/mL purifiée par centrifugation (en vert) (n = 1). Une solution de cholate de sodium 0,8 mg/mL représente la concentration résiduelle contenue dans la suspension FP/SP à 25 mg/mL après centrifugation.

Dans le but d'observer l'influence effective de cette quantité résiduelle de tensioactif sur la stabilisation des gouttelettes, des émulsions ont été produites à des ratios eau/huile allant de 10/90 à 90/10, avec pour phase aqueuse une suspension FP/SP ou SP à 25 mg NP/mL, ou la solution de cholate de sodium à 0,8 mg/mL (concentration résiduelle après une étape de centrifugation) (Figure 5). Tout d'abord, on note que les émulsions étaient macroscopiquement similaires d'un stabilisant à l'autre après 4 jours, du ratio eau/huile 90/10 au ratio 30/70 : les émulsions étaient toutes de type H/E, stables, et la couche de crème était comparable pour un ratio donné. Pour le ratio eau/huile 20/80 en revanche, l'émulsion stabilisée par des FP/SP était de type H/E, alors que les émulsions stabilisées par des sphères ou du cholate de sodium étaient de type E/H. Cependant, en répétant la production de ces trois émulsions, il a été démontré que leur sens pouvait alterner, car ce ratio eau/huile apparaît comme le point critique menant à l'inversion de phases. Enfin, une proportion de 90% d'huile menait

invariablement à des émulsions E/H dans le cas de la suspension FP/SP comme dans le cas de la solution de cholate de sodium. Notons qu'aucune émulsion n'a été préparée à ce ratio pour la suspension SP, par manque de suspension SP au moment de l'expérience. Cela n'a cependant que peu d'impact sur l'analyse. La seule différence observée entre les différents stabilisants est la relative stabilité des émulsions E/H au ratio 10/90 sur 4 jours lorsqu'elles sont stabilisées par du cholate de sodium seul, alors que ces émulsions ne sont pas stables en présence de NP (les deux phases apparaissant alors séparées et translucides).

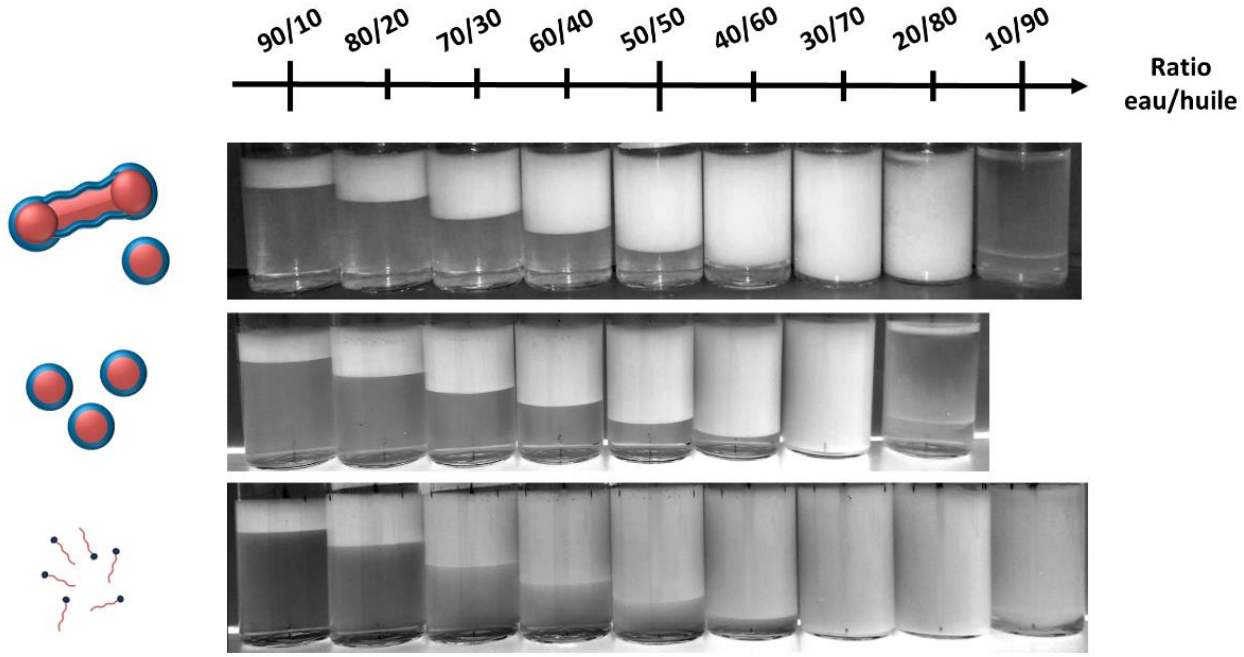


Figure 5 : Emulsions stabilisées par une suspension FP/SP 25 mg NP/mL (en haut), une suspension SP 25 mg NP/mL (au milieu) et du cholate de sodium 0,8 mg/mL (en bas) après 4 jours à 18°C (n = 1 sauf pour le ratio 20/80, pour lequel n = 2). Les ratios eau/huile utilisés allaient de 90/10 à 10/90, avec un pas de 10% entre chaque vial.

Ainsi, les trois types de stabilisants conduisent à des émulsions très similaires, tant en termes de sens d'émulsion que de stabilité. La taille des gouttelettes a aussi été comparée pour les émulsions de ratio 50/50, et donnait des valeurs similaires (entre 15 et 22 µm, Annexe 1). Les NP conservent pourtant leur intégrité au cours du procédé d'émulsification (Annexe 2), mais leur présence ne semble pas (ou très peu) modifier les caractéristiques des émulsions présentées. Cela conforte l'hypothèse formulée précédemment, à savoir que la quantité résiduelle de cholate de sodium soit suffisante

pour contrôler ces caractéristiques, aux dépens des NP. Cela peut notamment s'expliquer par une cinétique d'adsorption des tensioactifs aux interfaces plus rapide que celle des particules solides, du fait de leur faible taille [18]. Cela permettrait une saturation rapide de l'interface par le cholate de sodium, d'où l'absence d'influence des NP.

3.1.2. Purification par centrifugations répétées

La purification des NP par un unique cycle de centrifugation n'étant pas suffisante pour limiter l'impact du tensioactif résiduel sur l'émulsion, l'étape de centrifugation a été répétée. Dans le but de déterminer le nombre de cycles suffisant pour limiter l'influence du cholate de sodium, il nous fallait dans un premier temps déterminer la concentration en cholate de sodium à atteindre dans nos suspensions (c'est-à-dire la concentration en-dessous de laquelle le cholate ne suffit plus à lui-seul à stabiliser les émulsions). Une série d'émulsions a donc été réalisée avec pour seul stabilisant du cholate de sodium, à des concentrations décroissantes (données non montrées). Il a été observé qu'en-dessous d'une concentration critique de $1{,}5.10^{-3}$ mg/mL, un déphasage de l'émulsion était systématiquement observé au moment du prélèvement pour observation microscopique : en-dessous de cette concentration, le cholate de sodium n'était donc plus capable de stabiliser seul les émulsions. La purification devait donc avoir pour objectif d'atteindre une concentration en cholate de sodium égale ou inférieure à $1{,}5.10^{-3}$ mg/mL.

Cependant, cette concentration était inférieure à la limite de quantification de la méthode de dosage colorimétrique utilisée précédemment, estimée à 2.10^{-3} mg/mL selon la méthode ICH basée sur la pente et l'écart-type de la courbe étalon (limite de quantification $LQ = 10\sigma/S$ où σ est l'écart-type des ordonnées de la courbe étalon, et S sa pente) [19]. Cette limite de quantification, trop élevée, rend le dosage du tensioactif après plusieurs cycles de centrifugation impossible par cette technique. Une méthode de dosage colorimétrique des sels biliaires totaux, à l'aide d'un kit enzymatique commercial (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), a alors été essayée [20]. Cependant, les doses mesurées semblaient incohérentes : un paramètre opératoire était probablement mal contrôlé, au point de faire varier les résultats sans logique apparente au cours des répétitions (données non montrées). Faute de temps suite à la crise sanitaire de la Covid19, nous avons abandonné la recherche des causes de ces variations et opté pour une méthode plus rapide à mettre en œuvre pour suivre la purification des suspensions de NP.

En effet, l'efficacité de chaque cycle de centrifugation a été estimée en mesurant la tension superficielle entre l'air et le surnageant issu de la centrifugation (Figure 6a). Après chaque cycle, la tension superficielle $\gamma_{Surnageant\text{-}Air}$ augmentait pour se rapprocher de la valeur obtenue classiquement avec de l'eau pure (environ 72 $mN.m^{-1}$, et matérialisée par la droite rouge). Cependant, même après quatre cycles, le surnageant n'avait pas atteint cette valeur, ce qui signifie qu'il restait du cholate de sodium dans le culot issu du troisième cycle. Il aurait donc fallu, en théorie, poursuivre les cycles de centrifugation au-delà de quatre.

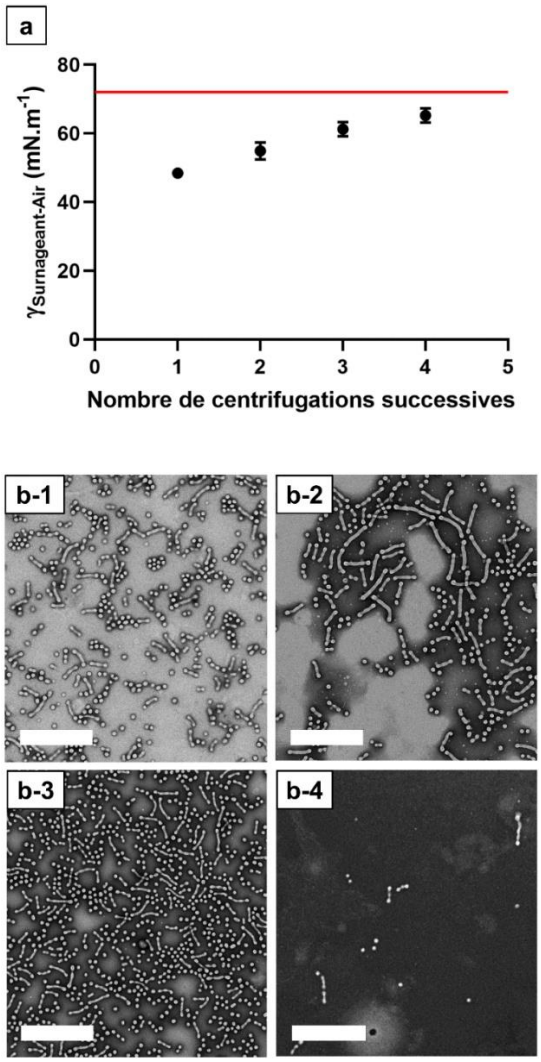


Figure 6 : Influence du nombre de centrifugations sur (a) la tension interfaciale $\gamma_{Surnageant\text{-}Air}$ mesurée par la méthode de la goutte pendante après 30 min (n = 3 ; la droite en rouge représente la tension interfaciale $\gamma_{Eau\text{-}Air}$ = 72 $mN.m^{-1}$) et sur (b) la forme des NP, observées en MET sur une suspension FP/SP après (b-1) 1 centrifugation, (b-2) 2 centrifugations, (b-3) 3 centrifugations, et (b-4) 4 centrifugations à 50 000 g (Barre d'échelle : 500 nm).

Cependant, une observation en MET des culots issus de chaque cycle (Figure 6b-1 à b-4) a montré que le quatrième cycle entraînait une diminution drastique du nombre de NP (Figure 6b-4). Notons que cet appauvrissement de la suspension n'était pas accompagné de modifications notables des caractéristiques morphologiques des NP, avec toujours 30% de FP pour 70% de SP, quel que soit le nombre de centrifugations. Cette diminution du nombre de NP semblait liée uniquement au nombre de cycles, et pas du tout au temps : quelle qu'ait été la durée des cycles (des essais ont été réalisés entre 1 à 4 h par cycle), le nombre de NP était systématiquement diminué après la quatrième centrifugation (données non montrées). Le retrait du cholate de sodium en-dessous d'une valeur critique pourrait donc être à l'origine d'une dégradation des NP, bien que ce phénomène reste inexpliqué. Quoiqu'il en soit, il était impossible de purifier la suspension par plus de trois cycles de centrifugations sous peine de perdre les NP. Une purification en deux ou trois cycles devait être préférée, alors même que les mesures interfaciales montraient qu'il restait vraisemblablement des quantités non négligeables de cholate de sodium.

Afin d'évaluer l'influence du cholate de sodium résiduel après une à trois centrifugations, des émulsions ont été préparées à partir de solutions FP/SP centrifugées une, deux ou trois fois, avec un ratio eau/huile de 50/50. Ces émulsions ont d'abord été observées en microscopie optique (Figure 7a-c). Les images ont montré une différence évidente entre chaque échantillon, notamment en termes de taille des gouttelettes. En effet, plus les NP étaient purifiées, plus les gouttelettes étaient grosses, variant d'une vingtaine de micromètres en moyenne après une centrifugation à une centaine de micromètres après trois centrifugations. De plus, si toutes les émulsions avaient la phase aqueuse pour phase continue, on note la formation de gouttelettes multiples E/H/E après deux et trois cycles. En outre, des images de la surface des gouttelettes, obtenues en CryoMEB (Figure 7d-e) ont montré des organisations très différentes entre les trois échantillons. En effet, ces images n'ont montré presque aucune NP à l'interface lorsque la purification était effectuée en un seul cycle. Lorsque les NP étaient purifiées en deux cycles, quelques NP venaient s'adsorber, alors que trois centrifugations ont permis d'obtenir une couche dense de NP à l'interface.

Ainsi, plus les NP sont purifiées, plus elles semblent s'adsorber à l'interface. L'élimination progressive du tensioactif (Figure 6a) n'entraîne plus de saturation de l'interface par le tensioactif et favorise l'adsorption des NP. Cela explique la couche dense de NP

observées en CryoMEB, mais aussi les différences de taille de gouttelettes observées en microscopie optique. En effet, la tension interfaciale entre l'eau et l'huile est peu à peu augmentée du fait d'une concentration décroissante en tensioactif, rendant la rupture des gouttes moins aisée. De plus, les NP s'absorbant moins vite à l'interface que le cholate de sodium, une coalescence a pu s'installer avant le recouvrement complet des gouttelettes, augmentant ainsi leur taille moyenne. Cela a donc conduit à des gouttelettes plus grosses lorsqu'elles étaient stabilisées par les NP (après trois centrifugations, Figure 7c et f), comparées à des gouttelettes stabilisées par des tensioactifs (après une seule centrifugation, Figure 7a et d). Cette expérience a ainsi permis de déterminer qu'une purification en trois cycles permettait de retirer suffisamment de cholate pour laisser les NP s'adsorber densément aux interfaces au cours de l'émulsification, et donc de contrôler les caractéristiques des émulsions.

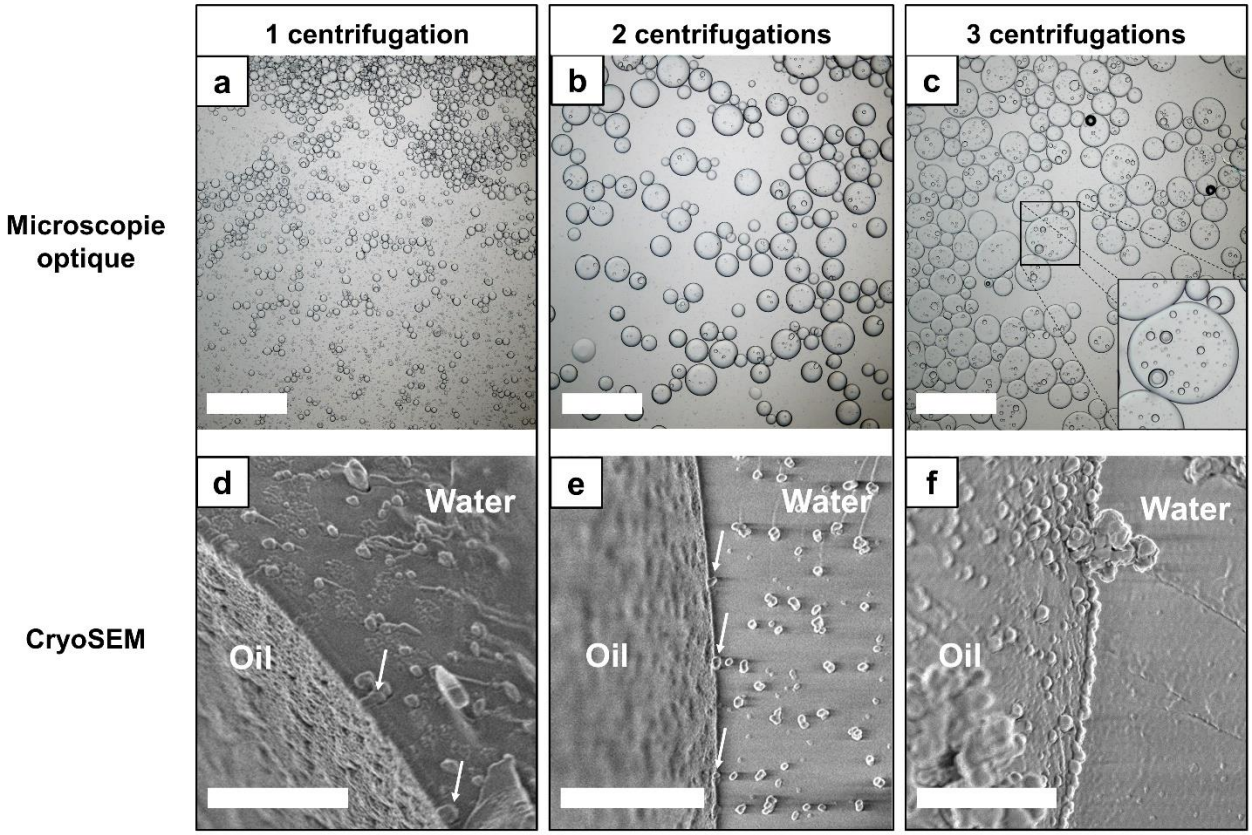


Figure 7 : Images de microscopie optique (a-c) et de CryoMEB (d-e) d'émulsions préparées avec un ratio eau/huile de 50/50 (m/m) dans les 3 h précédant l'observation. Les émulsions sont stabilisées par une suspension FP/SP purifiée par (a, d) 1 centrifugation, (b, e) 2 centrifugations, et (c, f) 3 centrifugations à 50 000 g (Barres d'échelle : 500 µm pour a-c, 2 µm pour d-f). Les flèches blanches montrent des NP sporadiquement adsorbées à l'interface.

Influence de la forme des particules sur les caractéristiques des émulsions

Une fois les suspensions FP/SP et SP purifiées par trois cycles de centrifugation, une émulsion de ratio eau/huile 50/50 m/m a été préparée avec chaque suspension, et suivie pendant plusieurs heures. A l'issue de leur préparation (J0), les deux émulsions étaient de type H/E : ce résultat est en accord avec la loi de Finkle, du fait de l'hydrophilie des NP recouvertes de PEG [21]. Macroscopiquement, les deux émulsions subissaient un crémage, donnant chacune une couche d'émulsion de hauteurs comparables (Figure 8). Des mesures sur images de microscopie optique confirment cette observation, avec une taille de 131 ± 37 µm pour le mélange FP/SP, et 114 ± 32 µm pour les SP seules. Cependant, les deux émulsions ont évolué de façon très différente dans les premières heures suivant leur préparation. En effet, les photos macroscopiques montrent après 24 h (J1) une coalescence très importante de l'émulsion stabilisée seulement par des SP, alors que l'émulsion contenant des FP était stable. Cette tendance s'est confirmée sur les 21 jours qu'ont duré l'expérience. Ainsi, la présence de FP, même en mélange avec des SP, semble garantir une bonne stabilité des émulsions.

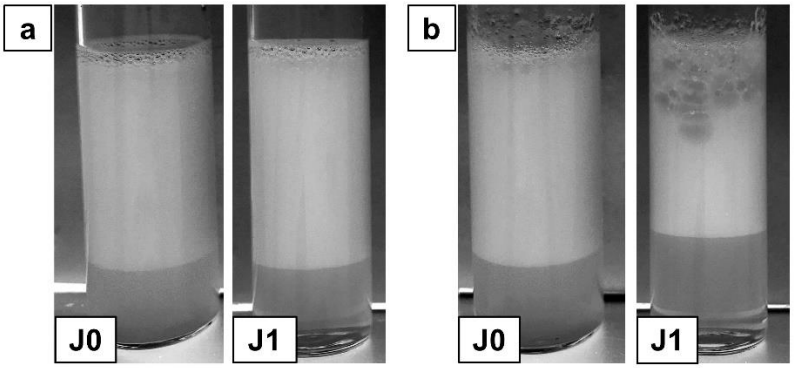


Figure 8 : Photographies d'émulsions préparées avec un ratio eau/huile de 50/50 (m/m) stabilisées par (a) un mélange FP/SP à 25 mg NP/mL et (b) des SP à 25 mg NP/mL, prises à l'issue de l'émulsification (J0) et après 1 jour à 18°C (J1).

Pour expliquer l'efficacité de la stabilisation en présence de FP, il convient d'abord de rappeler que la suspension de SP seules est issue d'une suspension FP/SP chauffée à 37°C, ce qui entraîne la division d'une FP en plusieurs SP. Ainsi, la suspension de SP seules compte un nombre plus grand de NP que la suspension FP/SP, mais la surface totale théorique qu'elles peuvent effectivement recouvrir est relativement similaire. Etant faites exactement du même matériau, l'angle de contact est aussi supposé équivalent d'une forme à l'autre. La différence de stabilité des émulsions vient donc exclusivement

de la forme des NP, et des conséquences de cette forme sur l'organisation particulaire à l'interface.

Une étude de Madivala *et. al.* montre l'influence du rapport d'aspect de particules ellipsoïdes d'hématite sur la stabilité des émulsions de Pickering [15]. Les résultats montraient clairement que seules les particules ayant un rapport d'aspect supérieur à la valeur critique de 4,6 pouvaient stabiliser des émulsions sur plusieurs mois. Cette efficacité de stabilisation des particules les plus anisotropes était attribuée à la forte déformation qu'elles impriment à l'interface. En effet, l'équation de Young impose que l'angle de contact soit le même tout autour d'une particule. Pour les particules anisotropes, cela implique une déformation hétérogène de l'interface, générant creux et élévations en fonction notamment de la courbure locale autour de la particule. Lewandowski et al. montrent par exemple sur une image de MEB environnementale qu'une particule cylindrique de résine époxy génère une déformation quadripolaire de l'interface qui l'entoure, avec une élévation à chaque extrémité, et un creux sur chaque côté (Figure 9). De façon générale, cette déformation de l'interface serait d'autant plus importante que le rapport d'aspect de la particule est important [7]. Or, cette déformation génère une force attractive dite « capillaire », qui pousse les particules à s'organiser en réseau et augmente l'élasticité de l'interface. Ainsi, plus les particules sont allongées, plus l'élasticité interfaciale est augmentée, limitant la coalescence et donc l'instabilité des gouttelettes [15]. Kalashnikova *et. al.* précisent cependant que l'augmentation du rapport d'aspect ne doit pas se faire au détriment de la couverture de l'interface [12]. En effet, des nanofibres de cellulose flexibles (capables donc d'épouser la courbure de l'interface) avec un rapport d'aspect de 13 permettraient une couverture optimale, quand des nanofibres avec un rapport d'aspect de 160 ne permettrait de recouvrir que 40% de la surface des gouttelettes. Dans ce dernier cas, la stabilité des gouttelettes est garantie par pontage entre deux gouttelettes par les fibres qui sont assez longues pour s'adsorber à deux interfaces différentes, immobilisant ainsi les gouttelettes qui ne peuvent pas coalescer. Dans le cas de nos FP, leur rapport d'aspect moyen varie de 3,6 à 4,1 selon les lots (valeurs tirées du chapitre 4), ce qui laisse penser que les particules sont potentiellement assez longues pour générer des forces de capillarité importantes (et donc une interface élastique), tout en garantissant une bonne couverture des gouttelettes. Aucun pontage n'a été observé en cryoMEB, mais l'importante hétérogénéité de longueur des FP (observable sur les clichés de TEM) pourrait tout de même permettre aux quelques particules les plus longues de s'adsorber

à l'interface de deux gouttelettes différentes. L'efficacité des suspensions FP/SP à stabiliser des émulsions pourraient donc être due à plusieurs mécanismes ayant cours simultanément.

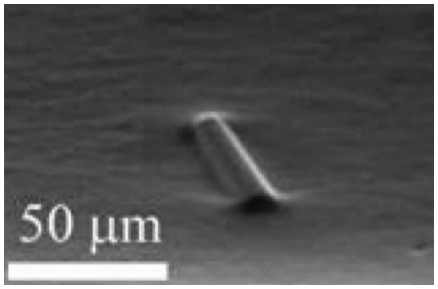


Figure 9 : Image de MEB environnementale montrant une particule cylindrique de résine époxy SU-8 à une interface fluide. L'anisotropie de la particule entraîne une déformation quadripolaire de l'interface, avec des élévations aux extrémités, et des creux sur les côtés du cylindre (figure de Lewandowski *et al.* [10]).

4. Conclusion

Ainsi, nous avons démontré que le cholate de sodium nécessaire à la préparation de filoparticules polymères pouvait stabiliser des émulsions, même à des concentrations faibles. Le procédé de purification des NP a donc été optimisé afin de retirer un maximum de ce tensioactif sans nuire à l'intégrité des NP. Un procédé en trois cycles de centrifugation a donné un résultat satisfaisant, la concentration résiduelle de cholate de sodium n'empêchant pas les NP de s'adsorber densément à l'interface. Ce procédé a alors été appliqué à deux suspensions différentes : l'une contenant un mélange de 30% de filoparticules et 70% de particules sphériques, l'autre ne contenant que des particules sphériques. Les suspensions ainsi purifiées ont alors servi à préparer des émulsions, dont le suivi dans le temps a mis en lumière des différences importantes en termes de stabilité. En effet, l'émulsion stabilisée uniquement par des sphères a fait l'objet d'une coalescence importante, visible macroscopiquement au bout de 24 h. L'émulsion stabilisée par un mélange de sphères et de filoparticules est en revanche restée parfaitement stable pendant au moins 21 jours. L'amélioration de la stabilité par l'utilisation de particules anisotropes a été attribuée aux forces capillaires attirant les particules les unes aux autres, et augmentant ainsi l'élasticité de l'interface. Ce phénomène était probablement consolidé par une bonne couverture des gouttelettes, et à un éventuel pontage sporadique entre les gouttelettes. Ces résultats ouvrent les portes

à la préparation d'émulsions biocompatibles stables, adaptées notamment à l'administration d'un ou de plusieurs principes actifs pharmaceutiques. Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour vérifier les hypothèses proposées concernant le mécanisme de stabilisation par les filoparticules, notamment une étude de la rhéologie interfaciale de ces systèmes.

Annexes

Annexe 1 : Influence de la concentration résiduelle en cholate de sodium après un cycle de centrifugation sur la taille des gouttelettes

Les émulsions obtenues avec des NP centrifugées une fois ont été comparées à une émulsion stabilisée par une solution de cholate de sodium 0,8 mg/mL (concentration résiduelle de tensioactif après une centrifugation), en termes de tailles de gouttelettes. Les mesures ont été réalisées par traitement manuel d'images obtenues en microscopie optique (Figure Annexe 1.1), grâce au logiciel Fiji. Les tailles de gouttes s'avèrent comparables, avec des valeurs moyennes de 15 ± 17 µm pour la suspension FP/SP, 22 ± 14 µm pour la suspension SP, et 19 ± 20 µm pour la solution de cholate de sodium. Cette similarité semble être un argument de plus suggérant que les émulsions sont plutôt stabilisées par le tensioactif résiduel, et non par les NP.

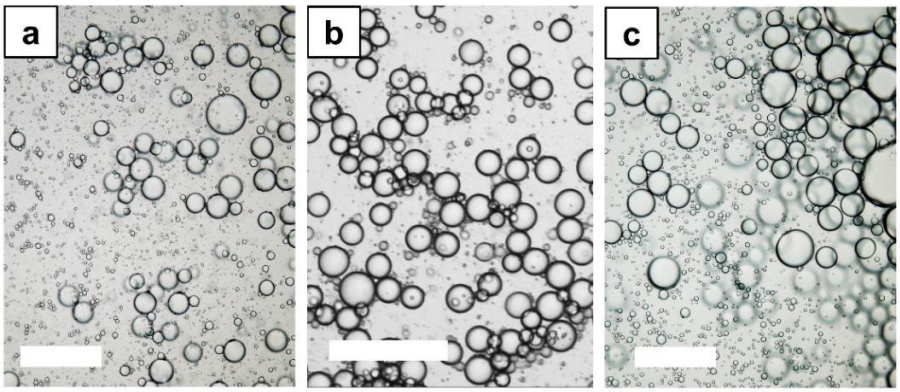


Figure Annexe 1.1 : Images de microscopie optique d'émulsions préparées avec un ratio eau/huile de 50/50 (m/m) après 7 jours de conservation à 18°C, stabilisées par (a) une suspension FP/SP purifiée par 1 cycle centrifugation, (b) une suspension SP purifiée par 1 cycle centrifugation, ou (c) une solution de cholate de sodium 0,8 mg/mL (Barres d'échelle : 200 µm).

Annexe 2 : Influence du procédé d'émulsification sur l'intégrité des NP

Une suspension FP/SP purifiée par un cycle de centrifugation a été observée en MET avant et après avoir subi un cisaillement à l'Ultra-turrax, dans des conditions similaires à celles d'une émulsification, mais sans huile (Figure Annexe 2.1). Les NP n'ont pas semblé endommagées après cette opération, ce qui garantit la présence de NP dans les émulsions. De plus, les proportions entre SP et FP sont toujours de l'ordre de 70 et 30% respectivement.

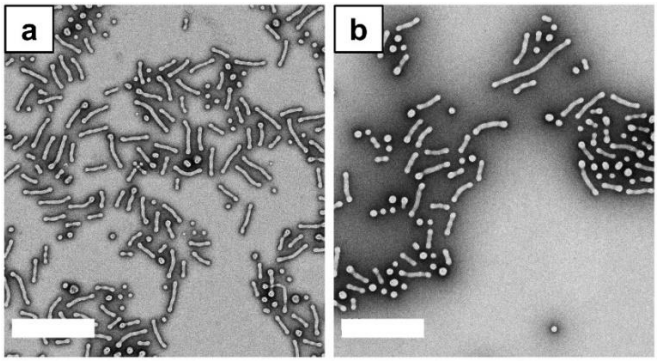


Figure Annexe 2.1 : Images de MET montrant une suspension FP/SP (a) avant et (b) après agitation à l'Ultra-turrax à 20 000 rpm pendant 30 s.

Références

[1] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles for controlled topical drug delivery, Int. J. Pharm. 531 (2017) 134–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.065.

[2] E.P. Lewandowski, P.C. Searson, K.J. Stebe, Orientation of a Nanocylinder at a Fluid Interface, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 4283–4290. https://doi.org/10.1021/jp0563282.

[3] G. Morris, S.J. Neethling, J.J. Cilliers, An investigation of the stable orientations of orthorhombic particles in a thin film and their effect on its critical failure pressure, J. Colloid Interface Sci. 361 (2011) 370–380. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.061.

[4] L. Botto, E.P. Lewandowski, M. Cavallaro, K.J. Stebe, Capillary interactions between anisotropic particles, Soft Matter. 8 (2012) 9957. https://doi.org/10.1039/c2sm25929j.

[5] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Contact angle and detachment energy of shape anisotropic particles at fluid-fluid interfaces, J. Colloid Interface Sci. 478 (2016) 63–71. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.060.

[6] R. Daniello, K. Khan, M. Donnell, J.P. Rothstein, Effect of contact angle on the orientation, stability, and assembly of dense floating cubes, Phys. Rev. E. 89 (2014) 023014. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.023014.

[7] H. Lehle, E. Noruzifar, M. Oettel, Ellipsoidal particles at fluid interfaces, Eur. Phys. J. E. 26 (2008) 151–160. https://doi.org/10.1140/epje/i2007-10314-1.

[8] T.G. Anjali, M.G. Basavaraj, Shape-Induced Deformation, Capillary Bridging, and Self-Assembly of Cuboids at the Fluid–Fluid Interface, Langmuir. 33 (2017) 791–801. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03866.

[9] J.C. Loudet, B. Pouligny, How do mosquito eggs self-assemble on the water surface?, Eur. Phys. J. E. 34 (2011) 76. https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11076-9.

[10] E.P. Lewandowski, M. Cavallaro, L. Botto, J.C. Bernate, V. Garbin, K.J. Stebe, Orientation and Self-Assembly of Cylindrical Particles by Anisotropic Capillary Interactions, Langmuir. 26 (2010) 15142–15154. https://doi.org/10.1021/la1012632.

[11] S. Jordens, L. Isa, I. Usov, R. Mezzenga, Non-equilibrium nature of two-dimensional isotropic and nematic coexistence in amyloid fibrils at liquid interfaces, Nat. Commun. 4 (2013) 1917. https://doi.org/10.1038/ncomms2911.

[12] I. Kalashnikova, H. Bizot, P. Bertoncini, B. Cathala, I. Capron, Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions, Soft Matter. 9 (2012) 952–959. https://doi.org/10.1039/C2SM26472B.

[13] R. Koike, Y. Iwashita, Y. Kimura, Emulsion Droplets Stabilized by Close-Packed Janus Regular Polygonal Particles, Langmuir. 34 (2018) 12394–12400. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02323.

[14] Y. Nonomura, N. Kobayashi, N. Nakagawa, Multiple Pickering Emulsions Stabilized by Microbowls, Langmuir. 27 (2011) 4557–4562. https://doi.org/10.1021/la2003707.

[15] B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions, Soft Matter. 5 (2009) 1717. https://doi.org/10.1039/b816680c.

[16] O. Diou, N. Tsapis, C. Giraudeau, J. Valette, C. Gueutin, F. Bourasset, S. Zanna, C. Vauthier, E. Fattal, Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI, Biomaterials. 33 (2012) 5593–5602. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.037.

[17] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nat. Methods. 9 (2012) 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

[18] S. Tcholakova, N.D. Denkov, A. Lips, Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers, Phys. Chem. Chem. Phys. 10 (2008) 1608. https://doi.org/10.1039/b715933c.

[19] J. Abraham, International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: C. Tietje, A. Brouder (Eds.), Handb. Transnatl. Econ. Gov. Regimes, Brill | Nijhoff, 2010. https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897.

[20] F. Ying, Y. Cai, H.K. Wong, X.Y. Chen, I.B. Huang, P.M. Vanhoutte, Z. Xia, A. Xu, E.H.C. Tang, EP4 emerges as a novel regulator of bile acid synthesis and its activation protects against hypercholesterolemia, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids. 1863 (2018) 1029–1040. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.06.003.

[21] Y. Sheng, Y. Yuan, C. Liu, X. Tao, X. Shan, F. Xu, In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA–PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content, J. Mater. Sci. Mater. Med. 20 (2009) 1881–1891. https://doi.org/10.1007/s10856-009-3746-9.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour but de mettre en lumière l'influence d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques des NP sur les propriétés des émulsions de Pickering qu'elles stabilisent. Cette étude fondamentale devait s'inscrire dans le contexte du développement d'émulsions à usage pharmaceutique, ce qui a notamment imposé un cahier des charges en matière de biocompatibilité des matériaux utilisés. Dans ce contexte, toutes les émulsions de Pickering préparées au cours de cette thèse mettaient en jeu de l'eau et du Miglyol 812N, et étaient stabilisées par des NP sphériques biodégradables (PLGA ou PLA-*b*-PEG-COOH). A noter que la concentration en NP était de 25 mg/mL pour toutes les émulsions, afin de garantir la comparabilité des systèmes entre eux, ainsi qu'avec ceux développés par Claire Albert au cours de sa thèse. Elle avait elle-même choisi cette concentration afin d'avoir un excès de NP par rapport à la surface générée pendant l'émulsification.

Dans une première étude, nos travaux ont porté sur des émulsions de Pickering stabilisées par des NP sphériques biodégradables de PLGA (Chapitre 3). Plus précisément, les NP ont été préparées avec quatre types de PLGA, différant les uns des autres par leur masse molaire et leur terminaison, entraînant des variations significatives en termes d'hydrophilie de surface et de température de transition vitreuse. Ces différences avaient une influence sur le comportement interfacial des NP : les NP les plus hydrophiles (composées de PLGA à terminaison acide) tendaient plutôt à stabiliser des émulsions H/E, tandis que les NP plus hydrophobes (composées de PLGA à terminaison ester) produisaient plutôt des émulsions E/H. De plus, le PLGA à faible masse molaire, et à terminaison ester avait une température de transition vitreuse proche de la température ambiante, entraînant une agrégation des NP au cours de l'émulsification et conférant ainsi à l'émulsion une texture solide.

Dans une deuxième partie du projet, il a été question d'étudier l'influence de la forme des NP sur les émulsions finales. Ainsi, un procédé de préparation de particules anisotropes a été développé, conduisant à la formation d'un mélange de 30% de filoparticules (FP) pour 70% de NP sphériques (SP), à partir de PLA-*b*-PEG-COOH (Chapitre 4). Ces FP ayant la particularité de se diviser en sphères par un simple

chauffage à 37°C pendant 24 h, nous avons pu obtenir à partir du même polymère une suspension contenant 30% de FP, et une autre ne contenant que des sphères. Ces suspensions aqueuses ont alors été mélangées avec du Miglyol 812N pour préparer des émulsions, dont la stabilité était fortement améliorée en présence de FP (Chapitre 5).

En outre, dans les deux parties du projet, nous avons mis en évidence l'influence souvent sous-estimée des quantités résiduelles de tensioactifs utilisés au cours de la préparation des NP. Précédemment, Claire Albert avait montré au cours de sa thèse qu'une fraction du PVA utilisé pour produire des NP de PLGA par émulsion-évaporation restait incluse à la surface de ces dernières. Ces chaînes polymères formaient alors une couronne autour des NP de PLGA, et pouvaient s'adsorber partiellement aux interfaces eau-huile pendant l'émulsification, sans pour autant se détacher des NP (Figure 1) [1]. Nous avons également fait la démonstration de l'influence significative de ce PVA résiduel, qui rendait les NP très hydrophiles. Les émulsions stabilisées par ces NP étaient alors plutôt H/E (même pour des PLGA à terminaison ester), et leur stabilité étaient moins durable qu'en l'absence de PVA. Le cholate de sodium utilisé dans la préparation des NP de PLA-*b*-PEG-COOH, quant à lui, avait une influence différente, du fait de sa structure chimique (Figure 2). En effet, le PVA étant un polymère, il pouvait à la fois s'inclure dans la matrice particulaire, tout en conservant une région libre apte à interagir avec les interfaces. Le cholate de sodium est un sel biliaire dérivé du cholestérol : c'est donc une petite molécule, peu susceptible de dépasser de la couronne de PEG recouvrant les NP de PLA-*b*-PEG-COOH. En revanche, les quantités résiduelles de cholate de sodium libre, dont les propriétés tensioactives sont très importantes, risquaient de saturer l'interface et d'empêcher l'adsorption des NP de PLA-*b*-PEG-COOH. Le retrait du tensioactif a donc fait l'objet d'une étude approfondie, conduisant à un protocole de purification en trois cycles d'ultracentrifugation.

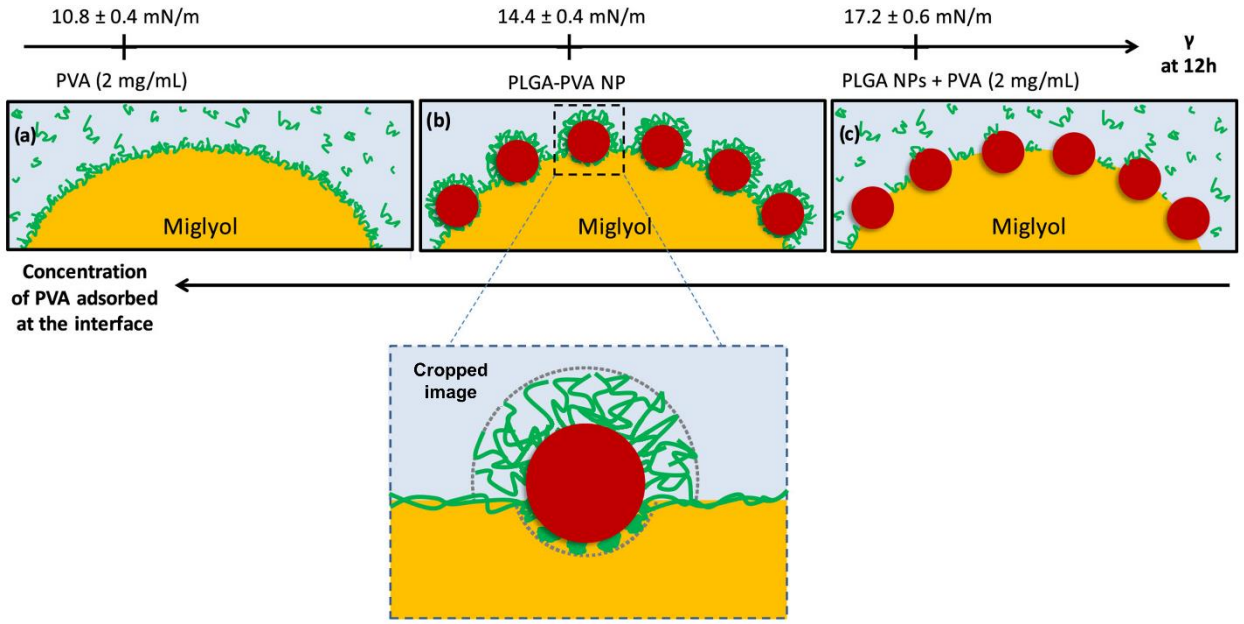


Figure 1 : Représentation schématique d'une interface Miglyol-phase aqueuse, cette dernière contenant : (a) du PVA à une concentration de 2 mg/mL, (b) des NP de PLGA-PVA en suspension à 25 mg/mL (un zoom sur une particule à l'interface est proposé), ou (c) des NP de PLGA-PVA en suspension à 25 mg/mL accompagnées de PVA libre à 2 mg/mL (figure issue de Albert *et al.* [1]).

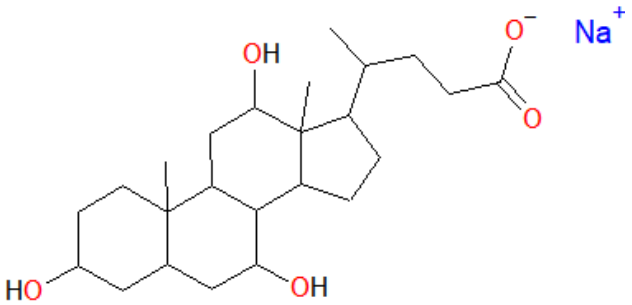


Figure 2 : Structure chimique du cholate de sodium.

Ces résultats ont déjà été exposé indépendamment les uns des autres, et chaque phénomène a déjà été discuté dans le chapitre qui lui est consacré. Cette discussion générale est plutôt l'occasion de mettre nos résultats en perspective les uns par rapport aux autres, dans l'objectif de pouvoir à terme utiliser pertinemment ces nouvelles données fondamentales à des fins applicatives, en particulier dans le domaine pharmaceutique.

1. Influence des différents paramètres étudiés sur les caractéristiques des émulsions de Pickering

Nous avons vu au cours de cette thèse qu'il était possible de modifier les propriétés des émulsions de Pickering en jouant sur un certain nombre de paramètres caractéristiques des NP utilisées, ou sur le procédé (Figure 3). Notons qu'il n'est pas ici question de généraliser à tous les systèmes décrits dans la littérature : si nos résultats seront confrontés à ceux de la littérature, nos conclusions concernent avant tout nos propres systèmes.

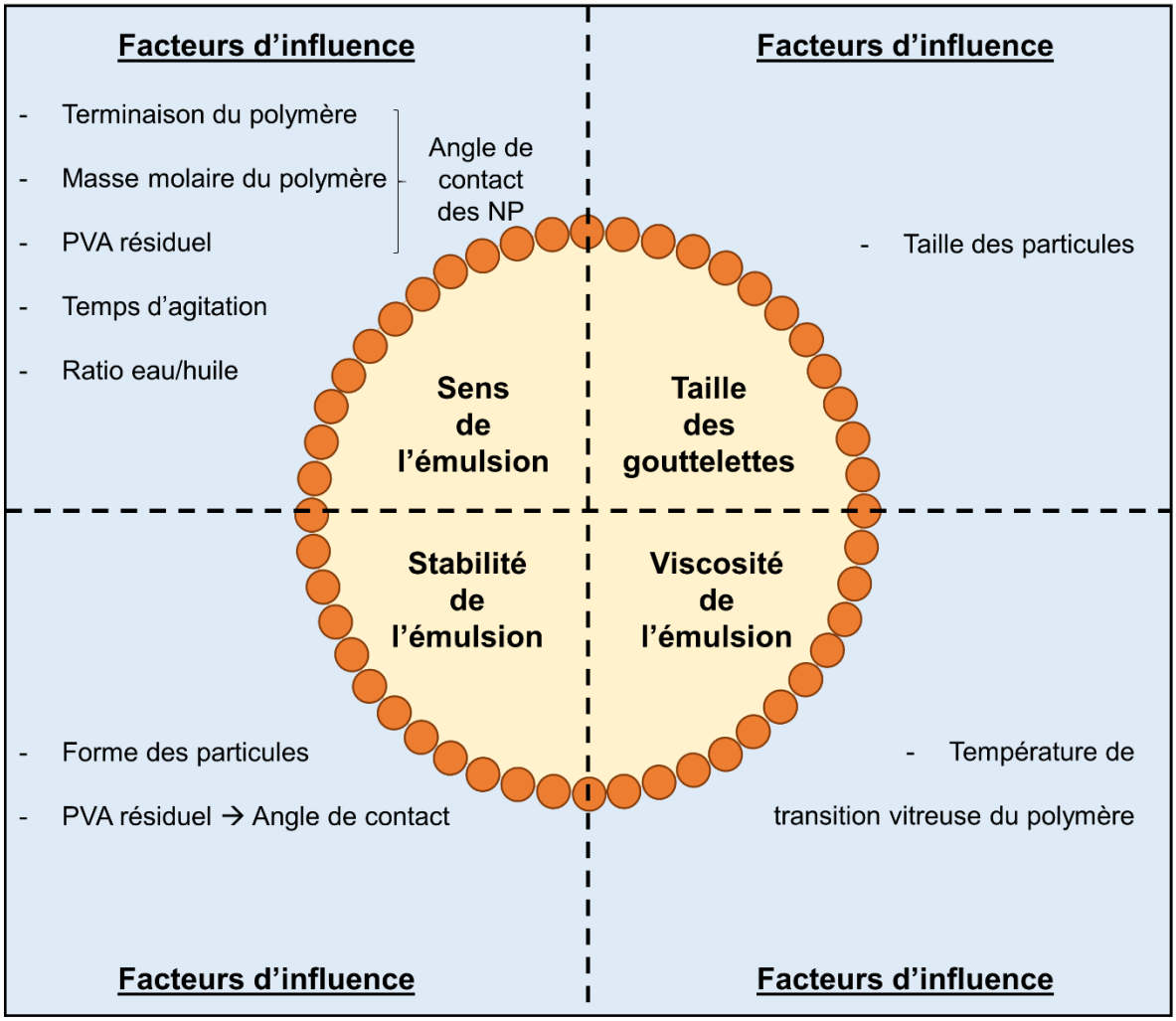


Figure 3 : Représentation schématique de certains paramètres de nos systèmes influençant les propriétés des émulsions de Pickering obtenues.

Ainsi, il nous a d'abord été possible de modifier **le sens** des émulsions de Pickering. Le principal paramètre influent qui ressort notamment de l'analyse faite dans le chapitre 3, est l'hydrophilie de la surface des NP. Pour rappel, dans notre projet, cette hydrophilie était notamment modulée par le type de PLGA composant les NP : un PLGA se terminant par une fonction acide carboxylique donnait lieu à des NP plus hydrophiles que les PLGA se terminant par des esters d'alkyle. De plus, l'utilisation de PLGA de masse molaire faible tendait à exacerber l'effet de cette terminaison, en augmentant le nombre de terminaisons pour une masse donnée de polymère. Quoiqu'il en soit, les NP considérées comme étant les plus hydrophiles après mesure de leur angle de contact avec l'eau tendaient à former plutôt des émulsions H/E, alors que les NP les plus hydrophobes donnaient plus aisément des émulsions E/H. Ces tendances étaient totalement en accord avec la loi empirique de Finkle, qui est parfois l'unique référence sur laquelle les auteurs s'appuient pour discuter du sens de leurs émulsions [2,3]. Cependant, d'autres paramètres indépendants des caractéristiques des NP ont pu avoir une influence sur le sens des émulsions. Ainsi, nous avons observé dans le chapitre 3 la possibilité d'induire une inversion de phases au sein des émulsions. Concrètement, au début du procédé d'émulsification, le sens de l'émulsion tend à suivre la loi de Finkle. Mais en augmentant la proportion de phase dispersée ou en augmentant le temps d'émulsification, on pouvait observer l'apparition d'émulsions multiples (dont nous avons obtenu quelques exemples très stables), voire une inversion de phases dans le sens opposé à la loi de Finkle. On trouve bien des publications mettant en avant l'influence de la proportion de phase dispersée [4–7] et du temps d'agitation [8,9], mais ces paramètres sont tout de même moins souvent pris en compte et discutés par les auteurs. Cela est probablement dû au fait que ces émulsions inversées sont souvent moins stables que les émulsions suivant la loi de Finkle : les particules étant dans la phase dispersée, il leur est difficile de s'organiser régulièrement avec une courbure de l'interface qui leur est défavorable [10]. Cependant, un angle de contact dans le système triphasique proche de 90° pourrait permettre une stabilisation équivalente des deux types d'interfaces [11,12]. Dans ce cas en particulier, on ne peut alors pas considérer seulement la loi de Finkle pour prédire ou discuter le sens des émulsions, et les autres paramètres (temps d'agitation, proportion des deux phases, *etc.*) doivent aussi être pris en compte.

Les résultats présentés dans les chapitres 3 et 5 nous ont par ailleurs permis d'observer qu'il était possible de modifier **la taille des gouttelettes** en modifiant la composition des NP. En effet, des suspensions de NP sphériques à une concentration fixe de 25 mg

de NP/mL ont été émulsifiées selon le même procédé rotor-stator, à la même vitesse, et ont conduit à des tailles de gouttelettes très différentes selon que les NP étaient composées de PLGA (taille médiane pondérée en nombre comprise entre 20 et 40 µm) ou de PLA-*b*-PEG-COOH (taille médiane pondérée en nombre de 106 µm). Cette différence est surprenante, pour deux raisons principales. Premièrement, les NP sphériques de PLA-*b*-PEG-COOH (50 nm) étaient 3 à 4 fois plus petites que les NP PLGA (160-200 nm). Or, pour certains auteurs, il existe une règle empirique conférant aux particules de plus petite taille la capacité de stabiliser de plus petites gouttelettes [13,14]. Deuxièmement, les NP sphériques de PLA-*b*-PEG-COOH étaient environ 25 fois plus nombreuses que les NP PLGA, à la concentration massique de 25 mg/mL (respectivement 5×10^{14} et 2×10^{13} NP/mL, mesurées par *Nanoparticle Tracking*). Or, au vu de leur taille, une NP de PLGA possède une aire projetée seulement 16 fois plus grande qu'une NP PLA-*b*-PEG-COOH. D'un point de vue géométrique, une suspension de NP PLA-*b*-PEG-COOH peut donc couvrir une interface plus grande que les NP PLGA, et donc stabiliser une émulsion plus fine. Ainsi, les caractéristiques des NP PLA-*b*-PEG-COOH portent à croire qu'elles devraient stabiliser des gouttelettes plus petites que les NP PLGA. Pourtant, c'est bel et bien l'inverse qui se produit ici. Deux raisons pourraient expliquer ce phénomène. D'abord, les temps d'émulsification étaient différents entre les deux expériences : il était de 2 min pour les NP PLGA, 30 s pour les NP PLA-*b*-PEG-COOH. Prolonger le cisaillement pourrait permettre de réduire le diamètre des gouttelettes. Deuxièmement, l'adsorption des NP PLA-*b*-PEG-COOH aux interfaces est probablement plus lente que celle des NP PLGA, laissant le temps aux gouttelettes de coalescer avant d'être complètement recouvertes de NP. Un phénomène de coalescence limitée s'installerait donc malgré le large excès de NP à la concentration de 25 mg/mL. Cette cinétique d'adsorption lente pourrait notamment être due à la faible taille de ces NP, qui les rend moins sensibles aux flux convectifs des turbulences générées par l'émulsification par rotor-stator [15]. Les NP étant moins déplacées moins vite, elles ont une probabilité moindre de rencontrer une gouttelette, et donc de s'y absorber. Dans ces conditions, les NP PLGA, plus grosses, verraient leur absorption facilitée. Les gouttelettes seraient alors stabilisées rapidement, sans leur laisser le temps de coalescer, leur conférant une taille finale plus petite [13]. Outre la taille des particules ou le temps d'émulsification, dans la littérature, la taille des gouttelettes est plus souvent contrôlée par une modification de la concentration en NP [16]. Cependant, toutes nos études ont été réalisées à concentration massique fixe. Il serait cependant intéressant dans les

études à venir d'étudier l'influence de la concentration en NP sur la taille des gouttelettes.

En parallèle du sens des émulsions et de la taille des gouttelettes, nous avons démontré la possibilité de moduler la **stabilité** de ces dernières en modifiant les caractéristiques des NP. Le chapitre 3 a été l'occasion de rappeler que des NP PLGA recouvertes de PVA (utilisé comme stabilisant dans certaines méthodes de préparation) donnaient des émulsions beaucoup moins stables que les NP PLGA sans PVA à leur surface. Nous avons attribué cette instabilité à une moindre adsorption des NP recouvertes de PVA, leur hydrophilie favorisant leur présence dans la phase aqueuse plutôt qu'à l'interface. L'étude détaillée dans le chapitre 5 a, quant à elle, démontré que la forme des NP avait un impact fondamental sur la stabilité des émulsions. En effet, alors que les NP de PLA-*b*-PEG-COOH sphériques donnait lieu à une coalescence visible à l'œil nu après seulement 24 h, une autre suspension contenant 30% de FP de PLA-*b*-PEG-COOH et 70% de sphères a démontré sa capacité à stabiliser les émulsions sur au moins trois semaines (l'étude n'ayant pas pu être conduite sur un temps long, il reste difficile de connaître le véritable potentiel de ces émulsions). Ce phénomène, discuté précédemment, pourrait être attribué à une viscosité interfaciale augmentée par les FP en raison des forces attractives capillaires générées par cette anisotropie [17]. Cette hypothèse doit cependant faire l'objet d'une vérification expérimentale sur nos systèmes. A l'avenir, l'intérêt des NP de forme allongée pourrait alors être vérifié avec des NP de PLGA. En effet, Heslinga *et al.* proposent une méthode pour produire des ellipsoïdes de PLGA par un procédé d'émulsion-évaporation [18]. Brièvement, les auteurs attribuent l'étirement de leurs particules à une déformation des gouttelettes pendant l'évaporation sous agitation. Ce mécanisme est différent de celui décrit dans le chapitre 4 du présent manuscrit pour les NP PLA-*b*-PEG-COOH, qui est basé sur l'encombrement stérique et les répulsions électrostatiques générées par le PEG-COOH à la surface des gouttelettes. Cette différence de mécanisme explique probablement que Heslinga *et al.* obtiennent des ellipsoïdes parfaitement droits, aux extrémités aigues, alors que nous obtenons des particules plutôt sphérocylindriques tordus. Leur obtention résulte d'un ensemble de conditions permettant l'étirement des gouttelettes de phase organique. Par exemple, les auteurs proposent d'utiliser le PVA comme stabilisant, à une concentration de 1% m/v, pour permettre non seulement la stabilisation de l'émulsion par diminution de la tension interfaciale, mais aussi l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse continue. Cela aurait pour conséquence (i) de ralentir l'évaporation du solvant organique, laissant le

temps aux gouttelettes de se déformer, et (ii) d'augmenter le cisaillement [19]. Les auteurs proposent aussi de réaliser une émulsion relativement grossière, car les grosses gouttes se déforment plus aisément que les petites. Si cette piste est intéressante, il convient de noter que les NP PLGA obtenues après l'évaporation sont plus grosses que nos NP PLA-*b*-PEG-COOH (largeur moyenne de 4 µm, pour une longueur moyenne de 24 µm) [18], ce qui risque notamment d'influencer la taille des gouttelettes des émulsions de Pickering finales.

Enfin, la **viscosité** des émulsions obtenues a varié en fonction des caractéristiques des émulsions. Ainsi, bien qu'elle n'ait pas fait l'objet d'une quantification par des expériences de rhéologie au cours de cette thèse, la viscosité de l'émulsion stabilisée par des NP de PLGA 752 S était sensiblement supérieure aux autres émulsions, très fluides. En fait, les polymères de faible masse molaire et à terminaison ester ont une température de transition vitreuse T_g proche de la température ambiante. Au cours de l'émulsification, les NP constituées de ce type de PLGA ont atteint des températures supérieures à leur T_g, leur conférant un état caoutchoutique autorisant leur délitement et leur agrégation sous l'effet du cisaillement. Ce phénomène a ainsi conduit à la création d'un réseau solide au sein de la phase continue, lui conférant la texture d'un solide mou.

2. Optimisation de la préparation des filoparticules

Nous avons vu précédemment que l'utilisation de FP permettait d'augmenter la stabilité des émulsions. Cependant, le système présenté dans le chapitre 4, et utilisé dans le chapitre 5 pour stabiliser des émulsions n'est pas une suspension de FP uniquement, mais un mélange de 30% de FP et de 70% de SP. Si cela a permis de démontrer l'intérêt d'utiliser un mélange FP/SP pour augmenter la stabilité des émulsions, il pourrait être intéressant d'étudier le comportement d'émulsions stabilisées uniquement par des FP. En effet, cela permettrait de savoir si la bonne stabilité des émulsions préparées avec le mélange FP/SP est due à la simple présence des FP, ou à une synergie entre les SP et les FP. Pour obtenir une telle suspension, plusieurs stratégies sont possibles, dont certaines ont fait l'objet d'études préliminaires (Figure 4).

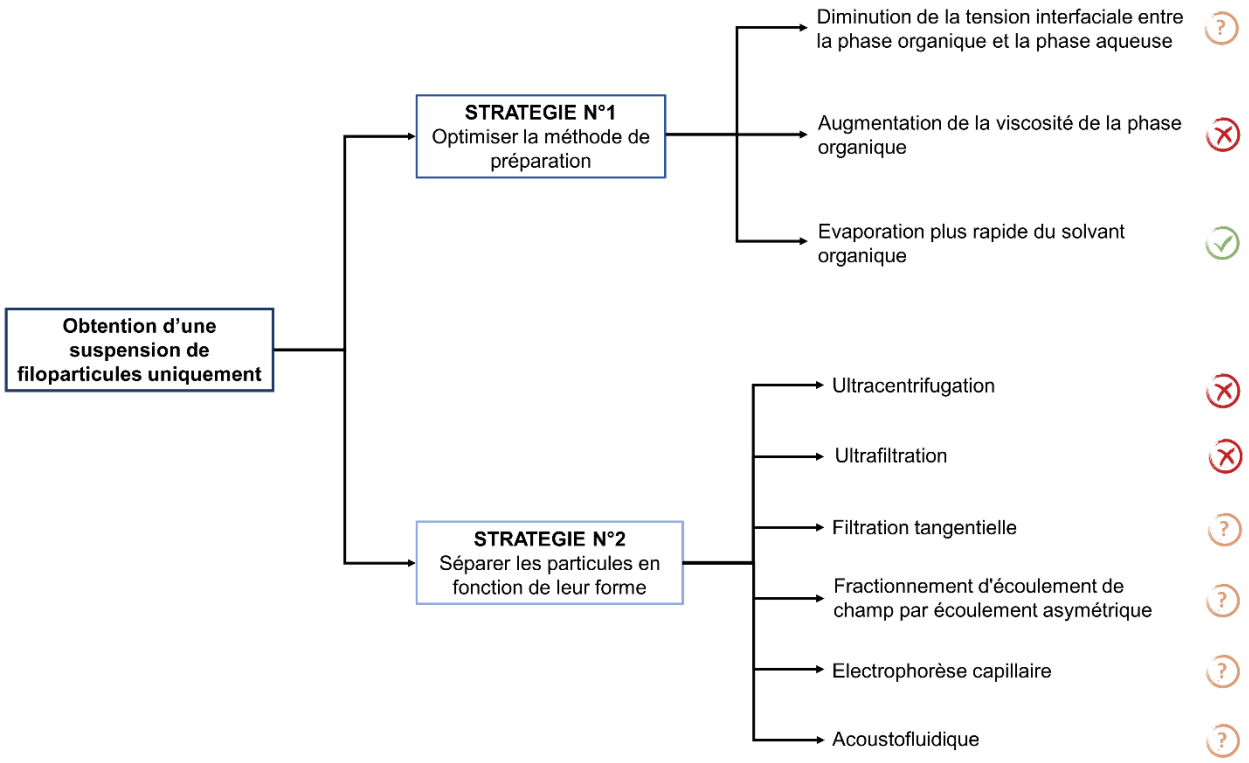


Figure 4 : Représentation schématique des différentes stratégies proposées pour obtenir une suspension uniquement composée de FP. Les probabilités de réussite de chaque stratégie sont symbolisées par un symbole : une croix rouge lorsque la stratégie semble peu convaincante, ou a fait l'objet d'essais infructueux, un point d'interrogation orange lorsque la stratégie est prometteuse mais n'a jamais été appliquée, un tick vert lorsque la stratégie a fait l'objet de tentatives encourageantes.

Pour cela, il conviendrait en premier lieu d'**optimiser la méthode de préparation de ces FP**. Au cours du chapitre 4, nous avons expliqué que les SP présentes à la fin de l'émulsion-évaporation étaient issues de la division des gouttelettes d'émulsion déformées par l'instabilité de Rayleigh-Plateau. Pour limiter la formation de SP, il conviendrait donc de limiter cette instabilité. Cela peut notamment être réalisé en diminuant la tension interfaciale entre les gouttelettes organiques contenant le polymère et la phase continue aqueuse [20]. Pour cela, il faudrait modifier le tensioactif, augmenter sa concentration, ou bien changer de solvant organique. L'instabilité peut aussi être réduite en augmentant la viscosité des gouttelettes [20], en changeant là encore de solvant organique. Notons cependant que la modification de la phase organique pourrait également impacter la solubilité du bloc PEG du copolymère. Or, nous avons supposé dans le chapitre 4 que l'élongation des gouttelettes de dichlorométhane s'initiait après la désolubilisation des blocs PEG, qui s'orientaient alors vers la phase aqueuse et générait un encombrement stérique et des répulsions

électrostatiques. Un changement de phase organique, en modifiant la solubilité du PEG, pourrait donc modifier la cinétique de déformation des gouttelettes. Pour éviter la division des gouttelettes cylindriques, il est aussi possible d'évaporer le solvant plus rapidement, afin de figer les FP avant que l'instabilité de Raleigh-Plateau ne les pousse à se diviser en SP. Ainsi, on pourrait imaginer remplacer le dichlorométhane par un autre solvant organique plus volatile, tout en étant capable de solubiliser le PLA-*b*-PEG-COOH, et en étant non miscible à l'eau. Or, le dichlorométhane possède une pression de vapeur saturante très élevée, de 47 kPa à 20°C [21]. Les autres solvants habituellement employés pour préparer des NP par émulsion-évaporation sont malheureusement moins volatiles : le chloroforme a une pression de vapeur saturante de 26 kPa à 25°C [22], et l'acétate d'éthyle de 10 kPa à 20°C [23]. Une autre voie pour augmenter la vitesse d'évaporation pourrait être d'augmenter la température, et/ou de diminuer la pression environnante. Des essais préliminaires ont été réalisés qui semblaient montrer des résultats encourageants, notamment en augmentant la température à 37°C.

Enfin, dans le cas où des modifications du procédé d'émulsion-évaporation ne permettrait pas d'augmenter la proportion des FP, il conviendrait alors de **séparer les particules en fonction de leur forme**. Quelques essais préliminaires ont été réalisés, avec différentes techniques. Nous avons envisagé de séparer FP et SP par ultracentrifugation, en imaginant que les FP sédimenteraient moins rapidement que les SP, car plus soumises aux frottements du fait de leur plus grande surface. Cependant, durant l'ultracentrifugation, les FP s'orientent dans le sens de la force centrifuge [24]. La surface subissant les frottements est donc seulement à l'extrémité des FP, ce qui représente une surface comparable aux SP. Les forces de frottement sont donc équivalentes quelle que soit la forme des NP, ce qui explique l'inefficacité de l'ultracentrifugation pour cette séparation. Nous avons aussi réalisé des essais d'ultrafiltration : la suspension était déposée sur un filtre de porosité contrôlée, et ultracentrifugée pour forcer le liquide et les particules les plus petites à passer au travers du filtre. Cette méthode ne s'est pas avérée sélective non plus, laissant passer les FP en même temps que les SP, encore du fait de l'orientation des FP dans le sens du flux. En fait, ces deux méthodes ont été inefficaces car la force censée générer la séparation (frottement de l'eau ou rétention par les pores) était parallèle au flux de l'écoulement, et donc à l'axe long des FP. Une méthode utilisant un champ de force perpendiculaire à l'écoulement serait sans doute plus adaptée, comme une filtration tangentielle [25] ou une méthode de fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique

(A4F) [26]. Une méthode d'électrophorèse capillaire a aussi fait ses preuves pour séparer des NP d'or de différentes formes (sphères, sphérocylindres, triangles) [27]. Enfin, nous avons eu l'occasion d'essayer une méthode de séparation originale, en collaboration avec Jean-Luc Aider et Mauricio Hoyos, du laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes (UMR 7636) : l'acoustofluidique, utilisée habituellement pour le tri cellulaire [28]. Brièvement, cette méthode consiste à placer la suspension dans une chambre microfluidique, dans laquelle sont envoyés des ultrasons. Une force de radiation acoustique est alors générée, qui déplace les particules vers des nœuds de pression et les y rassemble. Or, cette force de radiation acoustique est notamment fonction de la taille des particules : il est donc possible de rassembler l'une des populations de NP, et de la récupérer en sortie de chambre. Plutôt adapté à l'observation des cellules, le microscope optique associé à l'appareil n'a pas permis d'observer les NP sans coloration fluorescente. Une mise au point de la coloration des NP est nécessaire avant de poursuivre ces essais, interrompus suite à la crise sanitaire de la Covid19.

3. Intérêt des émulsions étudiées dans le contexte pharmaceutique

Enfin, l'étude physico-chimique des émulsions présentées dans ce manuscrit s'inscrit dans un projet de développement de formes pharmaceutiques innovantes. Ainsi, nous nous attacherons dans cette dernière partie à discuter de la pertinence de nos systèmes dans un contexte d'administration de molécules actives pharmaceutiques.

Tout d'abord, nous avons eu plusieurs fois l'occasion de rappeler tout au long du manuscrit que les matériaux avaient été choisis pour leur **biocompatibilité** aux doses usuelles. Ainsi, les phases liquides sont de l'eau et du Miglyol 812N, une huile couramment utilisée comme excipient dans le développement de spécialités pharmaceutiques [29]. L'utilisation d'une huile complexe (car composée d'un mélange de triglycérides à chaînes moyennes) a pour conséquence de compliquer les études physico-chimiques, en comparaison à des modèles d'huiles synthétiques purs. En effet, certains acides gras contenus dans le Miglyol 812N peuvent établir une cinétique d'adsorption à l'interface, et donc modifier le système au cours du temps. Ces difficultés ne doivent cependant pas interdire l'étude physico-chimique de tels systèmes, qui doivent être bien compris pour permettre leur application dans le domaine

pharmaceutique. D'autre part, les particules utilisées sont composées de polymères réputés pour leur biocompatibilité. Par exemple les PEG, très utilisés dans les secteurs pharmaceutique [30] et cosmétique [31], ont une toxicité extrêmement faible, quelle que soit la voie d'administration [31]. Les PLGA et PLA quant à eux sont non seulement biocompatibles, mais aussi biodégradables, leur hydrolyse produisant de l'acide lactique (un produit de la glycolyse naturellement présent dans notre organisme) et de l'acide glycolique [32].

Ces différents matériaux nous ont permis de préparer différentes émulsions, dont on peut se servir pour **encapsuler de nombreux principes actifs**. En effet, les molécules plutôt hydrophiles peuvent être encapsulées dans les gouttelettes aqueuses d'émulsions E/H (plutôt obtenues dans notre étude avec des NP PLGA 752 S), tandis que les molécules plutôt hydrophobes peuvent être encapsulées dans des gouttelettes huileuses d'émulsions H/E (obtenues avec tous les autres types de particules). L'intérêt des émulsions de Pickering est que les NP peuvent elles-mêmes servir de réservoir : on peut ainsi préparer des systèmes de co-encapsulation de deux ou trois principes actifs (les gouttelettes, les NP et la phase continue pouvant chacun contenir un principe actif différent) (Figure 5). Dans ce cadre, les NP allongées ont un certain avantage puisque certains auteurs ont démontré qu'elles permettaient d'atteindre une efficacité d'encapsulation supérieure à des sphères, à masse fixe [33,34]. Quoiqu'il en soit, une co-encapsulation peut permettre la réduction du nombre de médicaments à prendre pour les patients, et donc améliorer leur observance du traitement. L'intérêt de l'encapsulation dans les NP étant souvent la protection et la libération prolongée de l'actif, notons que celui-ci ne doit pas être trop soluble ni dans l'eau ni dans l'huile, pour éviter une libération trop rapide dans l'une des deux phases de l'émulsion. Enfin, on peut même imaginer encapsuler des molécules actives dans les gouttelettes internes des émulsions multiples E/H/E obtenues avec des ratio eau/huile élevés. La libération de ces molécules pourrait d'abord se faire par diffusion passive à travers deux milieux différents, ce qui peut générer une libération retardée parfois intéressante. Certains auteurs mettent aussi à profit ce type d'émulsion pour encapsuler des molécules qui ne seront libérées que sous le cisaillement généré par une application topique, du fait de la rupture des gouttelettes [35].

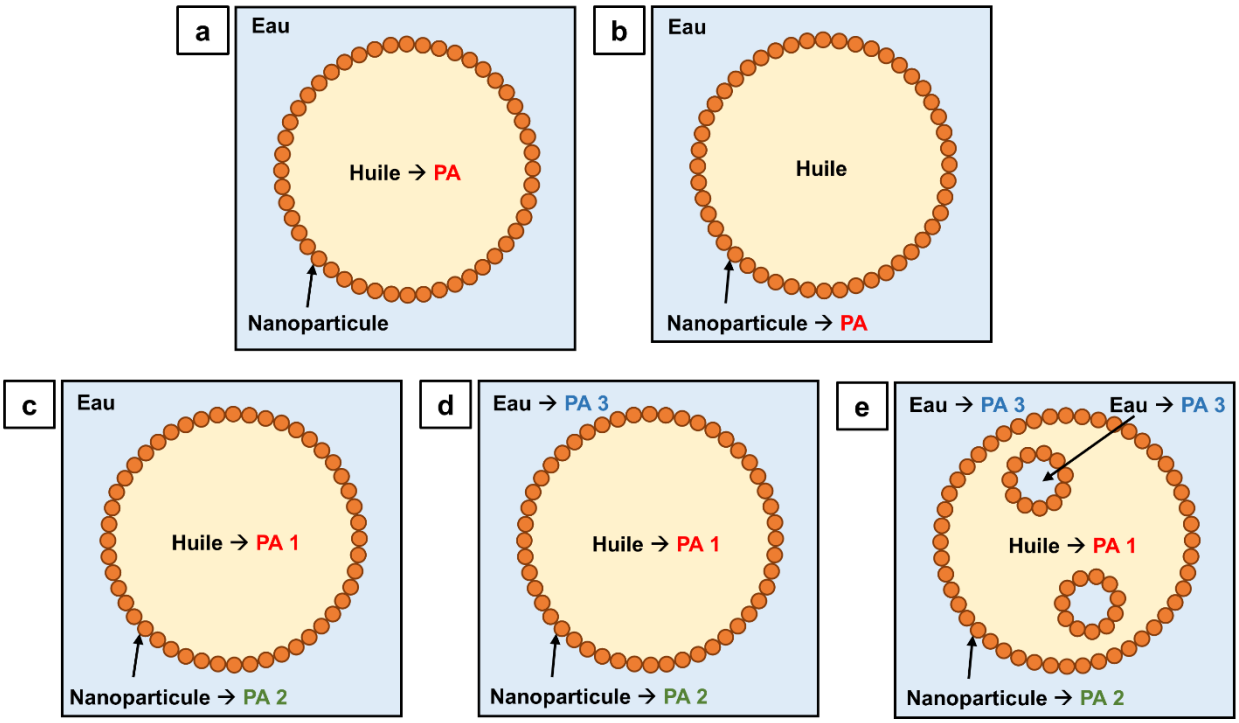


Figure 5 : Représentation schématique des différentes stratégies d'encapsulation (a et b) ou de co-encapsulation (c-e) de principe actif (PA) offertes par les émulsions de Pickering.

Un autre avantage des émulsions de Pickering est la multiplicité des **voies d'administration** qu'elles autorisent. Traditionnellement, les émulsions pharmaceutiques sont plutôt destinées à être appliquées par voie topique, sous la forme d'émulsions fluides ou de visqueuses (crèmes) [36]. Des auteurs proposent ainsi des émulsions à appliquer sur la peau [37,38], dont certaines sont des émulsions de Pickering [39–41]. Le projet élaboré par notre équipe vise d'ailleurs à développer des émulsions de Pickering pour cette voie-ci, avec notamment les travaux réalisés au cours de la thèse de Mohamed Amine Beladjine [42]. Ce dernier a travaillé à l'élaboration d'émulsions de Pickering H/E destinées au traitement de pathologies cutanées chroniques, en co-encapsulant un agent anti-inflammatoire dans les gouttelettes de Miglyol 812N et un agent immunosuppresseur dans les NP de PLGA. Des expériences préliminaires *in vitro* ont laissé entrevoir le potentiel thérapeutique de ces émulsions, démontrant la pertinence de cette forme pharmaceutique dans le cadre de pathologies cutanées. Mais on pourrait aussi imaginer des émulsions pour application buccale [43], nasale [44], vaginale [45], rectale [46], ophtalmique [47,48], bien qu'aucune de ces voies n'ait, à notre connaissance, fait l'objet d'essais avec des émulsions de Pickering. En outre, une administration orale est aussi envisageable, plusieurs articles mentionnant des

émulsions de Pickering conçues pour cette voie. On trouve ainsi des émulsions de Pickering stabilisées par des nanocristaux de silybine, un principe actif utilisé dans certaines maladies chroniques du foie [49]. D'autres exemples existent d'émulsions pharmaceutiques plus classiques, dont la substance active est encapsulée dans la phase dispersée [50,51]. Enfin, le secteur agroalimentaire nous fournit aussi quelques exemples d'émulsions de Pickering comestibles, dont pourrait inspirer le domaine pharmaceutique [52]. En dehors des voies orale et topiques, il existe un certain nombre de voies possible pour l'injection d'émulsions (si tant est qu'elles soient assez fluides pour être injectées), comme les voie intramusculaire [53] et sous-cutanée [54]. La voie intraveineuse est aussi une option, mais dans des conditions bien précise, notamment en termes de taille de gouttelettes. A notre connaissance, il n'y a pas de spécifications officielles en termes de diamètre maximal injectable. La lumière des capillaires pulmonaires avoisine les 6 µm de diamètre, ce qui semble être la taille maximale acceptable pour la taille des gouttelettes d'une émulsion à administration intraveineuse [55]. Une étude évoque des spécifications USP donnant un seuil de 5 µm pour les émulsions H/E, avec tout au plus 0,05% des gouttelettes pouvant dépasser cette valeur (leur déformabilité leur permettant, dans une certaine mesure, de circuler momentanément dans des capillaires plus petits qu'elles) [56]. Dans le cadre de la présente thèse, nous avons préparé des émulsions dont les gouttes allaient en moyenne de 20 à 120 µm, ce qui ne permet absolument pas d'administration intraveineuse. En revanche, ces tailles n'empêchent pas d'envisager les autres voies citées précédemment. Il conviendrait seulement d'adapter la viscosité à la voie d'administration : une administration par la voie cutanée nécessite une viscosité élevée, que l'on peut obtenir en ajoutant des polymères épaississants dans la phase aqueuse continue par exemple [42].

Une fois encapsulés et administrés, les substances actives doivent avoir une **cinétique de libération adaptée** à la pathologie traitée et aux doses thérapeutiques à délivrer. Les émulsions développées au cours de cette thèse sont modulables à bien des égards, de façon notamment à modifier cette cinétique. Par exemple, on a déjà décrit dans le chapitre 3 la grande variété des PLGA disponibles sur le marché, dont les caractéristiques physico-chimiques influencent la vitesse de dégradation [57]. Ainsi, une composition majoritaire en acide lactique ou une masse molaire élevée tendent à allonger le temps de dégradation [58,59]. Les PLA tendent ainsi à se dégrader moins vite que les PLGA, du fait de l'absence totale d'acide glycolique dans leur structure. La matrice polymère des NP s'érodant plus lentement, la libération de la substance active est alors prolongée

(s'étendant parfois sur plusieurs mois) [57]. La libération de molécules actives à partir de NP de PLA-*b*-PEG peut être modulée de façon similaire. En effet, l'état amorphe du cœur des NP lorsque le PLA est composé d'un mélange de D-lactide et de L-lactide favorise une dégradation rapide du PLA, et donc une libération de l'actif plus rapide que lorsque le PLA n'est constitué que de L-lactide [60]. De plus, les PLA les plus longs ont tendance à prolonger la libération [61]. Un autre paramètre à prendre en compte est la température de transition vitreuse T_g. En effet, une fois administrée, l'émulsion est portée à la température corporelle (37°C), ce qui est supérieure à la T_g de certains polymères utilisés pendant cette thèse. C'est notamment le cas du PLGA 752 S (25°C) et 752 H (33°C), ainsi que du PLA_{13}-*b*-PEG_5-COOH (35°C). Or, il a été démontré pour des NP de PLGA et de PLA qu'une température supérieure à la T_g du polymère entraînait une libération accélérée de l'actif encapsulé, en quelques minutes seulement [62]. Si les caractéristiques des polymères constituant les NP sont des paramètres clés dans la libération de l'actif, la forme des NP n'est pas non plus à négliger. En effet, certains auteurs montrent que des particules allongées libéreraient plus vite la substance active qu'elles encapsulent, en comparaison à des NP sphériques, en raison d'un rapport surface/volume plus important [63]. Rappelons cependant que cette observation ne fait pas consensus pour l'instant [33,64]. Aussi, le phénomène de division des FP en SP décrit dans le chapitre 4 pourrait être mis à profit pour obtenir une libération contrôlée d'actifs encapsulés dans les gouttelettes de l'émulsion. En effet, on peut imaginer une émulsion stabilisée par des FP (donc stable au cours du stockage), qui subiraient une division en SP après administration au patient. Cette division entraînerait une déstabilisation des gouttelettes (les émulsions stabilisées par des SP coalesçant en quelques heures seulement), et potentiellement une libération de la substance active encapsulée dans ces dernières.

Enfin, les FP ont un dernier intérêt dans la libération de substances actives, car elles pourraient favoriser leur **libération intracellulaire**. En effet, nos FP semblaient être internalisées légèrement plus vite que les SP, en accord avec certaines publications [64–66]. La libération de l'actif, si elle n'a pas déjà eu lieu à l'extérieur de la cellule, pourrait se dérouler directement dans le cytoplasme, augmentant ainsi sa concentration dans le compartiment cible.

Ainsi, cette thèse nous a permis d'identifier de nombreux paramètres physico-chimiques critiques, qui sont autant de leviers pour adapter les propriétés des émulsions de

Pickering produites. Nous avons ainsi développé une plateforme de formulation d'émulsions de Pickering, adaptables en fonction de la pathologie à traiter, de l'actif à encapsuler, et de la voie d'administration.

Références

[1] C. Albert, N. Huang, N. Tsapis, S. Geiger, V. Rosilio, G. Mekhloufi, D. Chapron, B. Robin, M. Beladjine, V. Nicolas, E. Fattal, F. Agnely, Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions, Langmuir. 34 (2018) 13935–13945. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02558.

[2] P. Finkle, H.D. Draper, J.H. Hildebrand, The theory of emulsification, J. Am. Chem. Soc. 45 (1923) 2780–2788. https://doi.org/10.1021/ja01665a002.

[3] V. Paunov, O. Cayre, P. Noble, S. Stoyanov, K. Velikov, M. Golding, Emulsions stabilised by food colloid particles: Role of particle adsorption and wettability at the liquid interface, J. Colloid Interface Sci. 312 (2007) 381–389. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.031.

[4] B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, B.L. Holt, P. Beaussoubre, K. Wong, Phase inversion of particle-stabilised perfume oil–water emulsions: experiment and theory, Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (2010) 11954. https://doi.org/10.1039/c0cp00558d.

[5] S. Kim, K. Kim, S.Q. Choi, Controllable one-step double emulsion formation via phase inversion, Soft Matter. 14 (2018) 1094–1099. https://doi.org/10.1039/C7SM02134H.

[6] H.M.H. Weijgertze, W.K. Kegel, M. Zanini, Patchy rough colloids as Pickering stabilizers, Soft Matter. 16 (2020) 8002–8012. https://doi.org/10.1039/D0SM00807A.

[7] F.M. Fernandes Barros, C. Chassenieux, M.M. de Souza Lima, L. Benyahia, Structure and rheology during catastrophic phase inversion of Pickering emulsions stabilized with fumed silica particles, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 593 (2020) 124630. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124630.

[8] D. Zang, P.S. Clegg, Relationship between high internal-phase Pickering emulsions and catastrophic inversion, Soft Matter. 9 (2013) 7042–7048. https://doi.org/10.1039/C3SM00133D.

[9] C.P. Whitby, R. Parthipan, Influence of particle concentration on multiple droplet formation in Pickering emulsions, J. Colloid Interface Sci. 554 (2019) 315–323. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.017.

[10] R. Aveyard, B.P. Binks, J.H. Clint, Emulsions stabilised solely by colloidal particles, Adv. Colloid Interface Sci. 100 (2003) 503–546. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00069-6.

[11] Y. Zhu, J. Sun, C. Yi, W. Wei, X. Liu, One-step formation of multiple Pickering emulsions stabilized by self-assembled poly(dodecyl acrylate-co-acrylic acid) nanoparticles, Soft Matter. 12 (2016) 7577–7584. https://doi.org/10.1039/C6SM01263A.

[12] J. Chen, R. Vogel, S. Werner, G. Heinrich, D. Clausse, V. Dutschk, Influence of the particle type on the rheological behavior of Pickering emulsions, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 382 (2011) 238–245. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.02.003.

[13] M. Matos, A. Marefati, R. Bordes, G. Gutiérrez, M. Rayner, Combined emulsifying capacity of polysaccharide particles of different size and shape, Carbohydr. Polym. 169 (2017) 127–138. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.006.

[14] L.E. Low, S.P. Siva, Y.K. Ho, E.S. Chan, B.T. Tey, Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion, Adv. Colloid Interface Sci. 277 (2020) 102117. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102117.

[15] S. Tcholakova, N.D. Denkov, A. Lips, Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers, Phys. Chem. Chem. Phys. 10 (2008) 1608. https://doi.org/10.1039/b715933c.

[16] S. Arditty, C.P. Whitby, B.P. Binks, V. Schmitt, F. Leal-Calderon, Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions, Eur. Phys. J. E. 11 (2003) 273–281. https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10018-6.

[17] B. Madivala, S. Vandebril, J. Fransaer, J. Vermant, Exploiting particle shape in solid stabilized emulsions, Soft Matter. 5 (2009) 1717. https://doi.org/10.1039/b816680c.

[18] M.J. Heslinga, E.M. Mastria, O. Eniola-Adefeso, Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications, J. Controlled Release. 138 (2009) 235–242. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.020.

[19] Y.-F. Maa, C. Hsu, Liquid-liquid emulsification by rotor/stator homogenization, J. Controlled Release. 38 (1996) 219–228. https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00123-9.

[20] E. Castillo-Orozco, A. Davanlou, P.K. Choudhury, R. Kumar, Droplet impact on deep liquid pools: Rayleigh jet to formation of secondary droplets, Phys. Rev. E. 92 (2015) 053022. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.92.053022.

[21] ILO, ICSC 0058 - Dichloromethane, Int. Labour Organ. (n.d.). https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0058 (accessed December 4, 2020).

[22] PubChem, Hazardous Substances Data Bank (HSDB) : 56, PubChem. (n.d.). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/56#section=Environmental-Fate-%26-Exposure (accessed December 4, 2020).

[23] ILO, ICSC 0367 - Ethyl acetate, Int. Labour Organ. (n.d.). https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0367&p_version=2 (accessed December 4, 2020).

[24] V. Sharma, K. Park, M. Srinivasarao, Shape separation of gold nanorods using centrifugation, Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (2009) 4981–4985. https://doi.org/10.1073/pnas.0800599106.

[25] J.D. Robertson, L. Rizzello, M. Avila-Olias, J. Gaitzsch, C. Contini, M.S. Magoń, S.A. Renshaw, G. Battaglia, Purification of Nanoparticles by Size and Shape, Sci. Rep. 6 (2016) 27494. https://doi.org/10.1038/srep27494.

[26] J. Gigault, T.J. Cho, R.I. MacCuspie, V.A. Hackley, Gold nanorod separation and characterization by asymmetric-flow field flow fractionation with UV–Vis detection, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 1191–1202. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6547-9.

[27] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, C. Sönnichsen, Separation of Nanoparticles by Gel Electrophoresis According to Size and Shape, Nano Lett. 7 (2007) 2881–2885. https://doi.org/10.1021/nl071615y.

[28] M. Wu, A. Ozcelik, J. Rufo, Z. Wang, R. Fang, T. Jun Huang, Acoustofluidic separation of cells and particles, Microsyst. Nanoeng. 5 (2019) 1–18. https://doi.org/10.1038/s41378-019-0064-3.

[29] R.C. Rowe, ed., Handbook of pharmaceutical excipients, 6. ed, APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, London, 2009.

[30] A.A. D'souza, R. Shegokar, Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications, Expert Opin. Drug Deliv. 13 (2016) 1257–1275. https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485.

[31] C. Fruijtier-Pölloth, Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products, Toxicology. 214 (2005) 1–38. https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.001.

[32] T. Casalini, G. Perale, 1 - Types of bioresorbable polymers for medical applications, in: M. Jenkins, A. Stamboulis (Eds.), Durab. Reliab. Med. Polym., Woodhead Publishing, 2012: pp. 3–29. https://doi.org/10.1533/9780857096517.1.3.

[33] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E.M. Lima, D.E. Discher, Micelles of Different Morphologies—Advantages of Worm-like Filomicelles of PEO-PCL in Paclitaxel Delivery, Pharm. Res. 24 (2007) 2099–2109. https://doi.org/10.1007/s11095-007-9335-z.

[34] F. Gharebaghi, N. Dalali, E. Ahmadi, H. Danafar, Preparation of wormlike polymeric nanoparticles coated with silica for delivery of methotrexate and evaluation of anticancer activity against MCF7 cells, J. Biomater. Appl. 31 (2017) 1305–1316. https://doi.org/10.1177/0885328217698063.

[35] L. Olivieri, M. Seiller, L. Bromberg, E. Ron, P. Couvreur, J. Grossiord, Study of the breakup under shear of a new thermally reversible water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsion, Pharm. Res. 18 (2001) 689–693. https://doi.org/10.1023/A:1011097713776.

[36] P. Wehrlé, Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique, 2e édition, Maloine, Paris, 2012.

[37] M.A. Schubert, C.C. Muller-Goymann, Novel colloidal delivery systems for dermal application, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 14 (2004) 423–434. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(04)50080-1.

[38] G.W. Lu, P. Gao, Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery, in: V.S. Kulkarni (Ed.), Handb. Non-Invasive Drug Deliv. Syst., William Andrew Publishing, Boston, 2010: pp. 59–94. https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4.

[39] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, J.-P. Valour, H. Mouaziz, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery, Int. J. Pharm. 368 (2009) 7–15. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.057.

[40] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, J.-P. Valour, M.-R. Rovère, B. Smatti, Y. Chevalier, Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles), Int. J. Pharm. 496 (2015) 1034–1046. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.031.

[41] D. Marku, M. Wahlgren, M. Rayner, M. Sjöö, A. Timgren, Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations, Int. J. Pharm. 428 (2012) 1–7. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.031.

[42] M. Beladjine, Co-encapsulation d'un agent immunosuppresseur et d'un agent anti-inflammatoire dans une émulsion de Pickering pour le traitement topique de pathologies cutanées, These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2019. http://www.theses.fr/2019SACLS514 (accessed January 11, 2021).

[43] A. Cossu, M.S. Wang, A. Chaudhari, N. Nitin, Antifungal activity against Candida albicans of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films, Int. J. Pharm. 493 (2015) 233–242. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.065.

[44] R. Mitra, I. Pezron, W.A. Chu, A.K. Mitra, Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin, Int. J. Pharm. 205 (2000) 127–134. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00506-8.

[45] C.M. Caramella, S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, G. Sandri, Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 92 (2015) 39–52. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001.

[46] M. Sznitowska, M. Gajewska, S. Janicki, A. Radwanska, G. Lukowski, Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits, Eur. J. Pharm. Biopharm. 52 (2001) 159–163. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00157-6.

[47] C.C. Peng, L.C. Bengani, H.J. Jung, J. Leclerc, C. Gupta, A. Chauhan, Emulsions and microemulsions for ocular drug delivery, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 21 (2011) 111–121. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50010-3.

[48] S. Tamilvanan, S. Benita, The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 357–368. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.033.

[49] T. Yi, C. Liu, J. Zhang, F. Wang, J. Wang, J. Zhang, A new drug nanocrystal self-stabilized Pickering emulsion for oral delivery of silybin, Eur. J. Pharm. Sci. 96 (2017) 420–427. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.047.

[50] A. Marefati, M. Bertrand, M. Sjöö, P. Dejmek, M. Rayner, Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization, Food Hydrocoll. 63 (2017) 309–320. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.043.

[51] T. Winuprasith, P. Khomein, W. Mitbumrung, M. Suphantharika, A. Nitithamyong, D.J. McClements, Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility, Food Hydrocoll. 83 (2018) 153–164. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.047.

[52] R. Liang, Y. Jiang, W. Yokoyama, C. Yang, G. Cao, F. Zhong, Preparation of Pickering emulsions with short, medium and long chain triacylglycerols stabilized by starch nanocrystals and their in vitro digestion properties, RSC Adv. 6 (2016) 99496–99508. https://doi.org/10.1039/C6RA18468E.

[53] C. Fox, Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery, Molecules. 14 (2009) 3286–3312. https://doi.org/10.3390/molecules14093286.

[54] R. Dubey, Controlled-release injectable microemulsions: recent advances and potential opportunities, Expert Opin. Drug Deliv. 11 (2014) 159–173. https://doi.org/10.1517/17425247.2014.870151.

[55] J. Wong, A. Brugger, A. Khare, M. Chaubal, P. Papadopoulos, B. Rabinow, J. Kipp, J. Ning, Suspensions for intravenous (IV) injection: A review of development, preclinical and clinical aspects, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 939–954. https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.008.

[56] D.F. Driscoll, Lipid Injectable Emulsions: Pharmacopeial and Safety Issues, Pharm. Res. 23 (2006) 1959. https://doi.org/10.1007/s11095-006-9092-4.

[57] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers. 3 (2011) 1377–1397. https://doi.org/10.3390/polym3031377.

[58] Y. Xu, C.-S. Kim, D.M. Saylor, D. Koo, Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug–polymer applications: A review of experiments and theories, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 105 (2017) 1692–1716. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33648.

[59] X.S. Wu, N. Wang, Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12 (2001) 21–34. https://doi.org/10.1163/156856201744425.

[60] K. Jelonek, S. Li, J. Kasperczyk, X. Wu, A. Orchel, Effect of polymer degradation on prolonged release of paclitaxel from filomicelles of polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers, Mater. Sci. Eng. C. 75 (2017) 918–925. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.006.

[61] K. Jelonek, S. Li, X. Wu, J. Kasperczyk, A. Marcinkowski, Self-assembled filomicelles prepared from polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers for anticancer drug delivery, Int. J. Pharm. 485 (2015) 357–364. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.032.

[62] S. Lappe, D. Mulac, K. Langer, Polymeric nanoparticles – Influence of the glass transition temperature on drug release, Int. J. Pharm. 517 (2017) 338–347. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.025.

[63] H. Safari, R. Adili, M. Holinstat, O. Eniola-Adefeso, Modified two-step emulsion solvent evaporation technique for fabricating biodegradable rod-shaped particles in the submicron size range, J. Colloid Interface Sci. 518 (2018) 174–183. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.02.030.

[64] Y. Guo, T. Wang, S. Zhao, M. Han, Z. Dong, X. Wang, Y. Wang, Amphiphilic Hybrid Dendritic-Linear Molecules as Nanocarriers for Shape-Dependent Antitumor Drug Delivery, Mol. Pharm. 15 (2018) 2665–2673. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00190.

[65] S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 11613–11618. https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105.

[66] A.-K. Pada, D. Desai, K. Sun, N. Prakirth Govardhanam, K. Törnquist, J. Zhang, J.M. Rosenholm, Comparison of Polydopamine-Coated Mesoporous Silica Nanorods and Spheres for the Delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Anticancer Drugs, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 3408. https://doi.org/10.3390/ijms20143408.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif des travaux menés au cours de cette thèse était d'étudier l'influence des caractéristiques physico-chimiques de NP biocompatibles sur les propriétés des émulsions de Pickering qu'elles stabilisaient. Les systèmes développés ont été conçus dès le début avec des matériaux utilisés dans domaine pharmaceutique : le Miglyol 812N était utilisé comme phase huileuse, et les NP étaient constituées de PLGA et de PLA-*b*-PEG. Cela permettra, à l'avenir, d'utiliser notre nouvelle compréhension de leur physico-chimie pour concevoir avec ces systèmes une plateforme d'encapsulation de substances actives pour des applications pharmaceutiques.

Le premier système étudié a été stabilisé par des NP sphériques de PLGA. Face à la large gamme de PLGA disponibles sur le marché, nous avons étudié l'influence de la masse molaire et de la terminaison de ce polymère sur les émulsions de Pickering finales. Nous avons démontré que ces deux paramètres avaient un impact important sur l'hydrophilie des NP PLGA, ainsi que sur leur température de transition vitreuse T_g. Ainsi, les polymères terminés par une fonction acide conférent une plus grande hydrophilie et une T_g plus élevée que les polymères terminés par une fonction ester. Une masse molaire basse tendait par ailleurs à exacerber cet effet des terminaisons, en augmentant leur nombre. Ces différents polymères ont permis de produire des NP de mouillabilité variable par un procédé de nanoprécipitation, utilisables pour stabiliser différents types d'émulsions en accord avec la loi de Finkle. Notons cependant que si les NP étaient produites par émulsion-évaporation en présence d'un polymère stabilisant comme le PVA, l'effet du type de PLGA étaient totalement masqué, le PVA hydrophile régissant alors le comportement des NP. Enfin, l'utilisation de PLGA possédant une T_g proche de la température ambiante a permis, au cours de l'émulsification, la formation d'un réseau solide de NP endommagées dans la phase continue, conférant à l'émulsion une texture de solide mou.

Un deuxième système a ensuite été développé, nous permettant d'appréhender l'influence de la forme des NP sur les propriétés des émulsions de Pickering. Ce système était stabilisé par des NP sphériques (SP) ou des filoparticules (FP) de PLA-*b*-PEG-COOH. Une première étude a été menée sur les NP en elles-mêmes, afin de comprendre leur mécanisme de formation et d'instabilité. Préparées par un procédé d'émulsion-

évaporation, des FP se forment lorsque le ratio PLA/PEG est bas, du fait de l'encombrement stérique généré par le bloc PEG qui forcerait l'étirement des gouttelettes de phase organique. La déprotonation des terminaisons carboxyles du PEG accentue ce phénomène, en induisant des répulsions électrostatiques. Cependant, les suspensions de FP obtenues comportaient toujours une fraction de SP. Cela s'explique par le fait que les gouttelettes de phase organique, allongées sous forme de cylindres, subissent l'instabilité de Rayleigh-Plateau, entraînant leur division en sphères, par leurs extrémités. Après l'évaporation du solvant organique, le système est figé, et les FP sont stables à température ambiante. L'instabilité de Rayleigh-Plateau pouvait cependant être ré-activée par un simple chauffage au-dessus de la T_g du polymère, divisant la totalité des FP en SP au bout de 24 h. Cette instabilité a été mise à profit pour préparer des suspensions SP. Une deuxième étude comparant les propriétés stabilisantes des NP en fonction de leur forme a démontré l'intérêt d'utiliser des FP en émulsion, car ces dernières stabilisent les émulsions sur des temps beaucoup plus longs que les SP de PLA-*b*-PEG-COOH, qui coalescent en quelques heures.

Si ces travaux ont permis de progresser dans la compréhension du comportement de ces systèmes à fort potentiel pharmaceutique, d'autres expériences peuvent être envisagées pour étayer certaines hypothèses :

Tout d'abord, il serait intéressant parvenir à préparer des suspensions de FP seules. Comme évoqué dans la discussion générale, cela peut être réalisé soit en optimisant le procédé d'obtention des FP (en accélérant l'évaporation notamment), soit en mettant au point une méthode de tri des particules (par électrophorèse sur gel, par fractionnement d'écoulement de champ ou encore par filtration tangentielle). L'obtention de telles suspensions permettraient d'étudier l'effet de la forme des NP sans interférence possible des SP, et de réaliser des mélanges contrôlés FP/SP.

Aussi, il conviendrait d'explorer expérimentalement les raisons de la meilleure stabilité des émulsions stabilisées par des FP PLA-*b*-PEG-COOH, en réalisant notamment des mesures d'élasticité de l'interface eau-huile en présence de ces NP. Cette expérience pourrait être réalisées sur un rhéomètre interfacial disponible au laboratoire.

Ensuite, nous pourrions vérifier l'intérêt des NP allongées pour la formulation d'émulsions de Pickering avec des NP PLGA. Cela nécessiterait d'abord de préparer des NP allongées de PLGA, en s'inspirant notamment des travaux de Heslinga *et al.*

mentionnés dans la discussion générale. Des émulsions pourraient alors être préparées, pour une comparaison entre NP allongées et NP sphériques sur leur capacité à stabiliser ces émulsions.

Une autre étude intéressante serait de vérifier l'existence d'un phénomène de coalescence limitée dans nos deux systèmes. Pour ce faire, il conviendrait de faire varier la concentration en NP pour un volume de phase dispersée donnée, et de mesurer la taille des gouttelettes à l'issue de l'émulsification. Dans le cas d'une coalescence limitée, la taille des gouttelettes devrait augmenter à mesure que la quantité de particules diminue selon l'une des équations décrites dans le chapitre 1.

Enfin, on peut envisager à l'avenir d'explorer les capacités d'encapsulation des émulsions stabilisées par des NP PLA-*b*-PEG-COOH. Il conviendrait alors de se fixer un cadre thérapeutique (pathologie, substances actives, doses, voie d'administration) dans lequel les émulsions de Pickering représenteraient une option prometteuse. Des essais d'encapsulation voire de co-encapsulation pourraient alors être réalisés, afin de déterminer l'influence potentielle des substances actives sur le système émulsionné, les quantités de substance active encapsulables, les cinétiques de libération, *etc*. Ce travail a par ailleurs déjà été réalisé avec des émulsions stabilisées par des NP PLGA, pour le développement d'un traitement topique contre le psoriasis. Les travaux de thèse de Mohamed Amine Beladjine traitaient notamment de ces études d'encapsulation, de libération, et de toxicité *in vitro*. Des études d'efficacité *in vitro* sont actuellement en cours dans le cadre de la thèse de Maxime Sintès, et des essais sur un modèle *in vivo* de psoriasis sont prévus.

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Émulsions stabilisées par des nanoparticules biocompatibles pour des applications pharmaceutiques : influence de la nature et de la morphologie des nanoparticules

Mots clés : Emulsion de Pickering, Forme, Mouillabilité, Nanoparticules, Transition vitreuse.

Résumé : Les émulsions de Pickering sont stabilisées par des particules solides. Elles sont très stables dans le temps tout en s'affranchissant de l'emploi de tensioactifs (potentiellement toxiques ou irritants). Le potentiel pharmaceutique de ces émulsions pour l'encapsulation et la libération contrôlée de substances actives est considérable.
Au cours de ces travaux, des émulsions composées d'eau et de Miglyol 812N (une huile très utilisée dans le domaine pharmaceutique) ont été stabilisées par des nanoparticules de PLGA ou de PLA-*b*-PEG, des polymères reconnus pour leur biocompatibilité.
Pour produire des nanoparticules de PLGA, quatre polymères avec différentes masses molaires et différentes fonctions terminales ont été utilisées. L'étude a démontré que la mouillabilité des nanoparticules et leur température de transition vitreuses étaient liées à la nature du PLGA utilisé, et que ces deux paramètres avaient une influence fondamentale sur le sens, la stabilité et la texture des émulsions de Pickering.
La deuxième étude portant sur les nanoparticules de PLA-*b*-PEG a montré qu'il était possible de produire des particules non sphériques, de forme allongée. L'utilisation de telles particules augmente significativement la stabilité des émulsions de Pickering, par rapport à des particules sphériques du même matériau.
Ainsi, il est possible de mettre à profit les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules pour contrôler les propriétés des émulsions de Pickering qu'elles stabilisent.

Title : Biocompatible nanoparticle-stabilised emulsions for pharmaceutical applications: influence of the nature and morphology of the nanoparticles

Keywords : Pickering emulsion, Shape, Wettability, Nanoparticles, Glass transition.

Abstract : Pickering emulsions are stabilised by solid particles. They are very stable overtime while avoiding the use of surfactants (potentially toxic or irritating). The pharmaceutical potential of these emulsions for the encapsulation and the controlled release of active substances is considerable.
During this work, emulsions composed of water and Miglyol 812N (an oil that is often used in pharmaceutics) were stabilised by PLGA or PLA-*b*-PEG nanoparticles, polymers that are known for their biocompatibility.
To produce PLGA nanoparticles, four polymers with different molar masses and end-groups were used. The study showed that nanoparticles wettability and glass transition temperature were influenced by the type of PLGA used. These two parameters had a great impact on the emulsion type, stability and texture.
The second study dealt with PLA-*b*-PEG nanoparticles and showed that it was possible to produce non-spherical nanoparticles with an elongated shape. Using these nanoparticles increased dramatically the Pickering emulsion stability, compared to spherical nanoparticles made of the same material.
Thus, it is possible to take advantage of the physico-chemical characteristics of nanoparticles to tune the properties of the Pickering emulsions they stabilise.

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay
2ème étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay
4 avenue des Sciences,
91190 Gif sur Yvette, France