



HAL
open science

Études interfaciales de polymères et surfactants insolubles, caractérisation par tensiométrie et rhéologie bi-dimensionnelle

Amani Germain Brou

► **To cite this version:**

Amani Germain Brou. Études interfaciales de polymères et surfactants insolubles, caractérisation par tensiométrie et rhéologie bi-dimensionnelle. Polymères. Université de Strasbourg; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2020. Français. NNT : 2020STRAF045 . tel-04214119

HAL Id: tel-04214119

<https://theses.hal.science/tel-04214119v1>

Submitted on 21 Sep 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

CNRS 7199 Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives

THÈSE

présentée par :

BROU Amani Germain

soutenue le : **17 Septembre 2020**

pour obtenir le grade de :

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Sciences chimiques

**ÉTUDES INTERFACIALES DE POLYMERES ET
SURFACTANTS INSOLUBLES,
CARACTERISATION PAR TENSIOMETRIE ET
RHEOLOGIE BI-DIMENSIONNELLE**

Thèse dirigée par :

Dr. ANTON Nicolas

Maître de conférences, Université de Strasbourg

CODIRECTEUR :

Pr. GBASSI Komenan Gildas

Professeur, Université Félix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire)

RAPPORTEURS :

BASTIAT Guillaume

Maître de conférences, Université d'Angers

BEDUNEAU Arnaud

Maître de conférences, Université de Franche-Comté

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. AKÉ Michèle

Professeur, Université Félix Houphouët Boigny (Côte d'Ivoire)

Pr. BOA David

Professeur, Université Nangui Abrogué d'Abobo Adjamé (Côte d'Ivoire)

Remerciements

Je souhaite remercier ici des personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse.

En premier lieu je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Un grand merci à Mr Nicolas ANTON pour avoir dirigé mes travaux de thèse et entretenir la flamme du travail bien fait pour les exigences de résultats en rhéologie. Finalement j'avais l'impression que pour une quelconque expérience au Tracker la simple présence de Mr Nicolas ANTON pouvait parfaire le travail. Ce n'est pas qu'une simple croyance ou conviction, quand je me souviens de la méthodologie pour réaliser la réticulation au Tracker. Professeur GBASSI Komenan, en qualité de codirecteur tu as su me faire travailler toutes les fois que ma présence à Abidjan se faisait. Professeur GBASSI, un grand merci ; je me souviens que Professeur Thierry Vandamme fût ton encadreur pour ta thèse et aujourd'hui grâce à ton amour prolongé pour le travail bien fait, tu m'ouvres la voie de faire ma thèse dans le même laboratoire. Merci à Mr BASTIAT Guillaume et Mr BEDUNEAU Arnaud qui ont courageusement accepté d'être les rapporteurs de mon travail. Aux autres membres de jury, professeur AKE Michèle et professeur BOA David, votre présence plus rassurante à mes côtés est vivement souhaitée. De 2002 à 2006, en qualité d'interne des Hôpitaux dans votre service, professeur AKE Michèle vous m'avez inculqué la rigueur du travail bien fait. Demeuré dans cette rigueur m'aide à finaliser mon travail de thèse.

Professeur VANDAMME Thierry en m'ouvrant les portes du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives CNRS 7199, vous m'avez aidé à me sentir en famille. Une très belle famille où vous êtes notre père. Vous voir me redonnait de l'énergie et me rendait plus confiant. J'étais convaincu que vous saviez tout et qu'à vos côtés tout sonnait réussites. Venir d'Abidjan et s'initier aux études de rhéologie bidimensionnelle nécessite de s'armer de patience et d'amour vrai pour le travail. Avec professeur VANDAMME Thierry, la joie de cette famille qui va au-delà de tout défi est restée plus que bénéfique. Merci infiniment professeur

Thierry Vandamme ; si vous voir a été et demeure ma source de motivation. Remercions également INGRID Velasquez qui toujours avec Mr Nicolas ANTON m'ont appris à manipuler le tracker. C'est plus qu'agréable de constater que Mr Nicolas ANTON a formé INGRID Velasquez au Tracker et que je puisse bénéficier du temps de travail de INGRID Velasquez pendant ses manipulations au tracker. J'ai appris énormément de choses pratiques et théoriques sur le Tracker.

Professeur Djeneba KONE BAMBA, doyen de la faculté de pharmacie de l'université Félix Houphouët Boigny, un grand merci. Je me souviens de tes conseils, ton regard pour me dire que le plus important demeure le respect et l'objectif de finaliser ma thèse.

Je remercie mes frères d'armes pour le travail de thèse à finaliser, tous les doctorants du laboratoire qui ont déjà soutenu et ceux qui soutiendront. Justine WALLYN, Mady, Sidy, Alphonse, Aidar, Xinyue, Usama, Riccardo, MZOUGHJI Jihane, c'est la bonne ambiance de travail qui nous accompagne vers la soutenance. Ambiance que chacun à son niveau sait entretenir. Je retiens encore tout le soutien de mes amis et collaborateurs d'Abidjan pendant mes séjours de thèse à Strasbourg (AMICHIA Magloire, Dr KABA et famille, FATIMA, Ouattara Aliman, Koffi Monique, Achi Gwladys, KASSI, Effo Etienne, Endrix).

Je voudrais remercier les personnes de Strasbourg avec qui j'ai eu des relations amicales, fraternelles (madame Thérèse HUSS, Sandrine HUSS, Denise, père BIALECK, HOËHN Suzanne). Un grand merci à ma maman de Strasbourg (HÖEHN Suzanne) ; qui m'a adopté et régulièrement appelait pour avoir mes nouvelles et me soutenir. Je te transmets ici, tous les remerciements de ma famille de Côte d'Ivoire (famille BROU : Lenguê Thérèse, Elise BROU, Laurent BROU, Patrice BROU, Benjamin BROU, Akissi BROU, Clotilde BROU, Denise BROU). Je pense aussi à mon père AMANI BROU Célestin, qui nous a quitté des suites de la crise ivoirienne de 2010-2011. Papa, tu es sorti de la maison et tu n'es plus jamais retourné. Je

retiens que tu voulais à tout prix que je fasse ma thèse en France, merci de m'avoir aidé à garder en tout l'esprit combatif.

J'en viens maintenant à mon épouse ADON Florence, à mes enfants (Ryan, Melvin et ma fille Yasmine), pour votre soutien moral, psychologique si important. Vous m'avez soutenu toutes ses années de thèse, et mon Melvin qui n'avait que six mois quand je quittais Abidjan pour STRASBOURG. Quand je pense à vos appels, sûrement que je puisais la force pour réaliser mes expériences au tracker. Avec des expériences en rhéologies qui duraient un jour, qui exigeait rigueur et continuité dans l'effort ; le soutien familial et des membres de mon équipe de travail m'a été d'une très grande utilité.

BROU Amani Germain

Université de Strasbourg

Septembre 2020

Table des matières

<i>Remerciements</i>	ii
<i>Table des matières</i>	1
<i>Liste des abréviations</i>	5
<i>Résumé de thèse</i>	7
1 Introduction	10
2 Résultats et discussions	11
2.1 Partie 1 – Étude et suivi de la polymérisation à l’interface eau/huile par chimie clic	11
2.2 Partie 2 – Formulation et caractérisation des nanoparticules (NPs) de PCL	13
2.3 Partie 3 – Etude de l’impact du pH sur les monocouches lipidiques à l’interface air/eau	15
3 Conclusion.....	17
4 Références	18
<i>Introduction générale</i>	20
<i>Partie bibliographique</i>	25
1 Interfaces eau/air et eau/huile.....	26
2 Définition des tensioactifs et applications.....	26
3 Rhéologie interfaciale	32
4 Monocouche de Langmuir et études des propriétés interfaciales	37
5 Mesure de la tension de surface	39
6 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules : taille et PDI (indice de polydispersité)	41
7 Références	44
<i>Chapter 2. Study of surfactants cross-linking by click chemistry on a model water/oil interface</i> 48	
1 Introduction	50
2 Materials and methods	51
2.1 Chemicals	51
2.2 Surface tension measurements	52
2.3 Monitoring of the cross-linking reaction at interface.....	53
2.4 Interfacial rheology	54
3 Results and discussion.....	55

3.1	Study of cationic surfactant (compound 1) at the water / oil interface and CMC determination	55
3.2	Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2)	61
3.3	Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2) after washing	66
4	Conclusion.....	69
5	References	70
<i>Chapter 3. Interfacial study of pH-sensitive lipids deposited onto a bubble interface</i>		71
1	Introduction	73
2	Materials and methods	75
2.1	Chemicals	75
2.2	Surface tension measurements	76
2.3	Lipid deposition and monolayer formation.....	76
2.4	Compression experiments	78
2.5	Interfacial rheology	79
3	Results and discussion.....	80
3.1	Impact of the bulk pH on the lipid monolayers at the air / water interface.....	80
3.2	Dilatational properties of the lipid monolayers in function of the bulk pH.....	86
3.3	Comparison with anionic lipid monolayers	89
4	Conclusion.....	95
5	References.....	97
<i>CHAPITRE 4. Étude de la nanoprécipitation à l'interface</i>		101
1	Introduction	101
2	Matériels et méthodes.....	102
2.1	Matériels.....	102
2.2	Méthodes	103
2.2.1	Solubilité maximale du PCL dans le mélange de solvant	103
2.2.2	L'opération de nanoprécipitation	104
2.2.2.1	Opération de nanoprécipitation sans huile (cyclohexane).....	104
2.2.2.2	Opération de nanoprécipitation en présence d'huile (C ₆ H ₁₂).....	105
2.2.2.3	Caractérisation physico-chimique	106

2.2.2.3.1	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	106
2.2.2.3.2	Statistiques.....	107
3	Résultats et discussion.....	107
3.1	Solubilité du PCL dans le solvant THF et le non-solvant C ₆ H ₁₂	107
3.2	Formulation et caractérisation des nanoparticules (NPs).....	108
3.2.1	Caractérisation des nanoparticules sans l'ajout d'huile (cyclohexane).....	108
3.2.2	Caractérisation des nanoparticules en présence d'huile (C ₆ H ₁₂).....	110
3.2.2.1	Diamètre hydrodynamique des nanoparticules.....	110
3.2.2.2	Indice de polydispersité (PDI) des nanocapsules	111
3.2.2.3	Limite de la formulation des nanocapsules par nanoprécipitation	113
4	CONCLUSION	115
5	Références	116
	<i>Chapitre 5. Discussion et perspectives</i>	118
	<i>Liste des publications</i>	122

Liste des abréviations

Liste des abréviations

α -TOS	alpha-tocopheryl succinate		
CHEMS	cholestryl hemisuccinate	ADSA	axisymmetric drop shape analysis
CMC	Concentration Micellaire Critique	KELP	Kolliphor ELP®
CS	Cationic Surfactant ou surfactant	LvdT	Lucassen and van den Tempel
Cyan3CL	Cyanine 3	PCL	Poly- ϵ -caprolactone
DLS	Dynamic light scattering	PDI	Polydispersity Index
		PE	phosphatidyl-ethanolamine
NPs	Nanoparticules	LE	Liquid expanded
THF	Tétrahydrofurane	MDR	multidrug resistance

Résumé de thèse

*Etudes interfaciales de polymères
et surfactants insolubles,
caractérisation par tensiométrie
et rhéologie bi-dimensionnelle*

1 Introduction

La recherche fondamentale sur le développement de nanoparticules (NPs), l'étude des procédés d'encapsulation dans les NPs pour la bio-ingénierie, la nanomédecine et leurs applications thérapeutiques associées, est en plein essor depuis ces dernières décennies [1, 2]. Le but consiste à optimiser l'encapsulation des médicaments et à fabriquer un système de délivrance de médicaments biocompatibles, facile à administrer, sûr, confortable et inerte [9].

Les propriétés des NPs telles que la taille, la forme, la surface, la chimie de surface, la charge de surface, et leur composition, influencent leur biodisponibilité [6] et des modulations peuvent y être apportées dans le but de greffer des systèmes fonctionnels à la surface des particules pour permettre un ciblage de principes actifs et/ou d'agents de contraste. La rhéologie bi-dimensionnelle de l'interface des systèmes dispersés, s'est révélée d'un grand intérêt ces dernières années, notamment parce que cette approche expérimentale permet la caractérisation structurelle des monocouches amphiphiles et la compréhension des phénomènes responsables du réarrangement à l'interface, tout comme le suivi de leur évolution. La base de la technique est l'analyse de la forme d'une goutte ou bulle, équilibrée entre déformation gravitationnelle et forces capillaires, et dont l'analyse du profil donne la tension de surface, dite « axisymmetric drop shape analysis » (ADSA) [3]. Cette technique est considérée comme précise, simple et polyvalente [4]. Durant mon travail de thèse, un projet a été mené sur l'étude de la solidification des interfaces mobiles dans le but de former des nanocapsules pour la formulation de systèmes de délivrances de médicaments.

Une première partie de mon travail a porté sur l'étude d'une réaction de polymérisation interfaciale par chimie clic, étudiant le comportement à l'interface d'un surfactant portant trois fonctions alcynes, qui sera ensuite réticulée par des molécules solubles dans l'eau présentant

deux fonctions réactives azoture, en présence de catalyseurs tels que des ions cuivreux et de l'acide ascorbique.

La seconde partie porte sur l'étude de la nanopréciptation de polymères à l'interface [5]. Un polymère préformé et solubilisé en phase organique est amené à précipiter à l'interface eau/huile suite à une modification des conditions environnementales [7]. L'étude a été menée avec comme polymère la poly- ϵ -caprolactone (PCL) et les solvants tétrahydrofurane (THF) et cyclohexane (C_6H_{12}), d'abord en volume, pour étudier finement les conditions de précipitation, puis à l'interface par la méthode ADSA mentionnée ci-dessus.

La troisième partie expérimentale a porté sur l'étude de molécules insolubles en phase aqueuse, à l'interface eau/air, et notamment des lipides pH-sensibles. Dans le but de comprendre leur stabilité et comportement, nous avons fait des études de leur changement de phase bi-dimensionnelles en établissant les isothermes de Langmuir à la surface des gouttes, i.e. modifiant l'aire interfaciale et en mesurant la pression de surface.

2 Résultats et discussions

2.1 *Partie 1 – Étude et suivi de la polymérisation à l'interface eau/huile par chimie clic*

Dans cette partie du travail de thèse, l'essentiel de nos travaux ont été réalisés par la méthode ADSA, à l'aide d'un tensiomètre à goutte de type Tracker (Teclis, Longessaigne, France). L'agent tensioactif (surfactant cationique, CS), le bromure de 4-(dodécyloxy) benzyltripropargylammonium a été synthétisé selon le protocole de **Zhang** et **Zhao** [10]. La première partie a concerné l'étude du CS seul à l'interface, en tension et en rhéologie interfaciale. Ensuite, nous avons ajouté l'agent réticulant Cyan3CL ($[Cyan3CL] = 1,5[CS]$) en présence de catalyseur, pendant 24H à 40°C, et effectué un suivi en tension de surface et rhéologie (Fig. 1). Enfin, nous avons effectué un renouvellement de la phase aqueuse externe par changement de phase, puis comparé la couche réticulée à celle initiale non réticulée, pour mettre en évidence le changement de structure.

Un modèle rhéologique considérant que la diffusion des molécules à l'interface est le phénomène limitant, le modèle de Lucassen et van den Tempel (LvdT) [8] a servi de référence. Cela a permis de montrer dans quel cas il pouvait effectivement s'appliquer, et ainsi comparer dans ces conditions les propriétés des monocouches (Fig. 2).

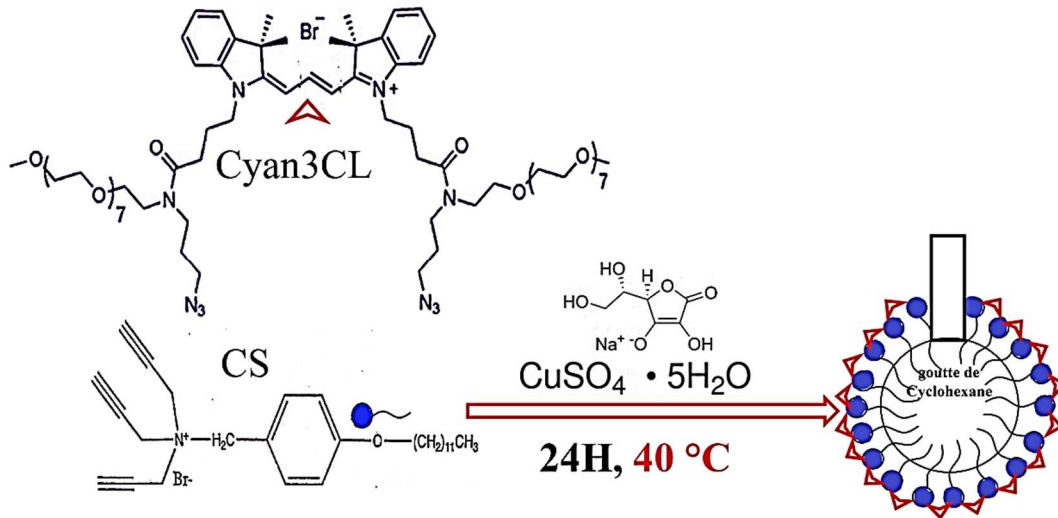


Figure 1 : Représentation schématique de l'expérience de réticulation interfaciale par chimie clic.

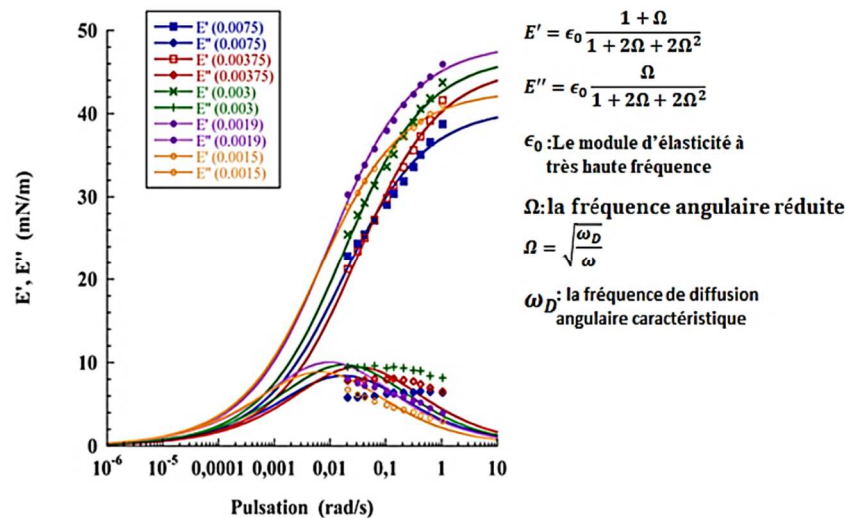


Figure 2. Exemple d'application du modèle de Lucassen et Van Den Tempel, et des limites de son application, sur la monocouche de CS seule à l'interface. Représentation de l'élasticité dynamique E' et du module de perte E'' pour différentes concentrations, en surfactant, autour de sa concentration micellaire critique. Expériences réalisées à $T=25^\circ\text{C}$.

Il est alors intéressant de noter que CS suit le modèle rhéologique de LvdT dans certaines conditions, mais pas dans toutes les conditions expérimentales. A 25°C , la Concentration Micellaire Critique (CMC) de l'agent tensioactif (CS) a été évaluée à $0,005\text{ g/L}$ (détermination

expérimentale). Après réticulation, nous avons montré que l'élasticité de la membrane formée par la réaction clic augmente proportionnellement avec la teneur en agents tensioactifs CS et en agent réticulant Cyan3CL. Aux différentes concentrations (3CMC ; CMC ; 0,1CMC) l'élasticité en présence de l'agent réticulant (Cyan3CL) est supérieure à celle des solutions témoins, et, de même, la tension de surface est mesurée plus basse comparativement aux monocouches formées de CS seules (Fig. 3, 4). Ces résultats mettent en évidence, d'une part, que la réticulation interfaciale est effective, et d'autre part, permettent de comparer l'influence de la concentration interfaciale sur les propriétés des couches formées.

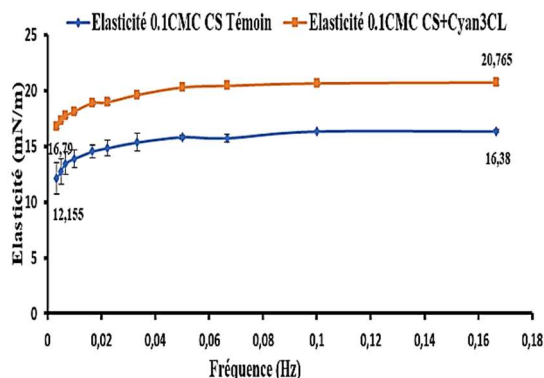


Figure 3 : Élasticité comparative 0,1 CMC CS+Cyan3CL et 0,1 CMC CS Témoïn à 0,1CMC après lavage. Différence significative liée à l'agent réticulant Cyan3CL.

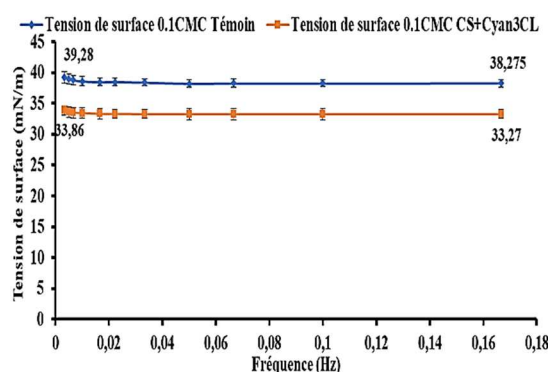


Figure 4 : Tension de surface comparée 0,1 CMC CS+Cyan3CL et 0,1 CMC CS Témoïn après lavage. Différence significative liée à l'agent réticulant Cyan3CL.

2.2 Partie 2 – Formulation et caractérisation des nanoparticules (NPs) de PCL

L'idée fût d'étudier dans un premier temps, la solubilité du polymère (PCL) dans un mélange de solvant (THF) et de non-solvant (C_6H_{12}), pour déterminer les conditions optimales pour réaliser la nanoprécipitation sous la forme de nanocapsules, et en parallèle réaliser le suivi de la précipitation à l'interface modèle sur le tensiomètre à goutte.

Pour déterminer la limite de solubilité du PCL (Fig. 5) dans ce mélange solvants/non-solvant, cette étude expérimentale nous a permis d'étudier le compromis entre la taille des particules

obtenues par nanopréciipitation et la quantité de non-solvant résiduel maximale.

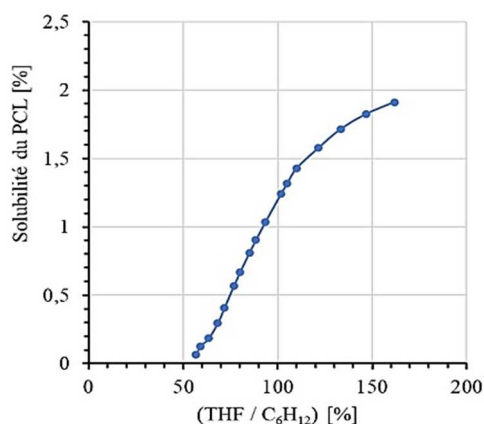


Figure 5 : Limite de solubilité du PCL dans le rapport (THF/ C₆H₁₂) à T= 20°C (100% signifie une quantité égale en solvant, 200% signifie que la quantité de THF est le double de celle de C₆H₁₂).

Le cyclohexane utilisé dans les expérimentations est un modèle (bien entendu non-biocompatible). L'étape suivante sera une étude similaire avec une huile biocompatible. L'objectif de l'expérience est de trouver un compromis entre petite taille des capsules obtenues et rendement d'encapsulation maximal de l'huile non-solvant après nanopréciipitation. Ensuite, ce processus de formulation de ces NPs a été étudié et optimisé, en travaillant sur deux paramètres de formulation : la quantité d'agent tensioactif et le rapport du volume de THF (V_{THF}) et du volume du C₆H₁₂ (V_{C₆H₁₂}). Des essais concluants ont été observés pour un rapport (V_{THF} / V_{C₆H₁₂}) variant de 200 à 500 (soit par exemple des volumes de C₆H₁₂ allant de 2 μ L à 5 μ L pour 1mL THF, contenant 2,5 à 5 mg de PCL).

De plus, l'étude de la variation du diamètre hydrodynamique des NPs de PCL est sensible à la concentration en surfactant non ionique présent dans la phase aqueuse (Kolliphor ELP®), montrant une diminution de la taille des NPs nano-préciipitées avec l'augmentation de la concentration en surfactants (Fig. 6). Cette diminution de taille, décrite dans la littérature [2, 9] vient du fait que la décomposition spinodale qui a lieu lors du transfert de solvant, est bloquée plus ou moins rapidement en fonction de la concentration en surfactants. De là, nous avons pu mettre en évidence une courbe maitresse liée à la variation de non-solvant dans le mélange

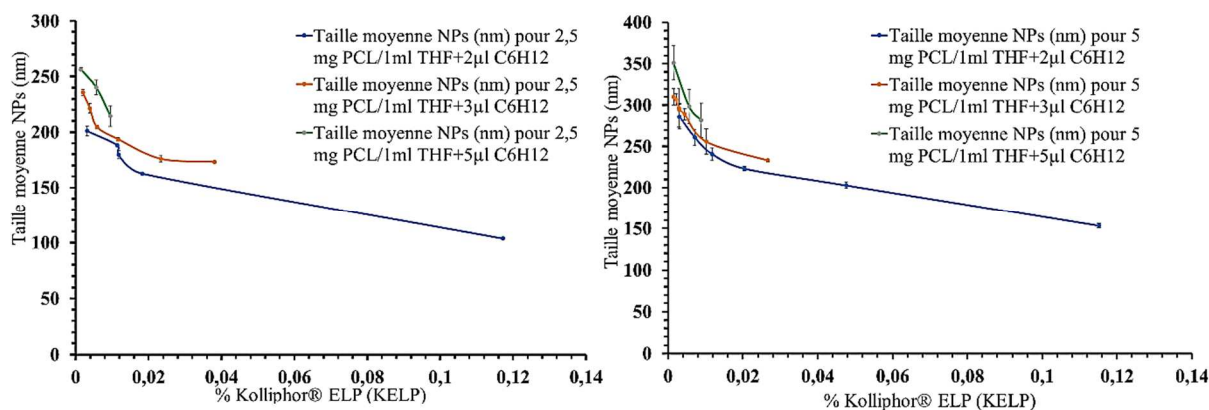


Figure 6 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules de PCL en fonction de la concentration de l'agent tensioactif dans la phase aqueuse (avant l'étape de diffusion du solvant). Deux quantités de PCL sont comparées.

(plus visible pour la plus grande quantité de polymère) et permet de comprendre le phénomène, et de déterminer les conditions pour transposer à l'étude sur interface modèle de tensiomètre. Nous avons également mis en évidence les conditions expérimentales limites à la nanopréciipitation, en termes de volume de non-solvant, et de quantité de polymère.

2.3 *Partie 3 – Etude de l'impact du pH sur les monocouches lipidiques à l'interface air/eau*

Dans cette dernière partie, nous avons appliqué la méthode ADSA à l'étude de monocouches non-solubles, de façon similaire à des isothermes de Langmuir (sur balance de Langmuir) mais cette fois sur une goutte montante. Les surfactants non-solubles étudiés sont construits sur la base d'un phospholipide auquel on a rajouté des groupements ammonium ou acide carboxylique, c'est à dire sensibles au pH. La phase continue aqueuse est connectée à un pHmètre, et le renouvellement des phases est assuré par une pompe péristaltique. Le dispositif est reporté en Fig. 7. Le lipide est d'abord mis sous forme ionisée puis nous avons procédé à des compressions successives à différents pH (protocole décrit en détail dans le manuscrit de thèse). Le résultat a permis de mettre en évidence des comportements de phases, par exemple celui du lipide cationique reporté en Fig. 8, qui présente une zone de liquide expansé à partir de $\text{pH} > 6$. Cet échantillon de résultats que nous avons obtenu montre le potentiel de cette nouvelle

approche expérimentale basée sur l'utilisation du tensiomètre à goutte et qui permet une nouvelle caractérisation des amphiphiles, par exemple pour de types de molécules, le pKa en conditions de monocouches interfaciales.

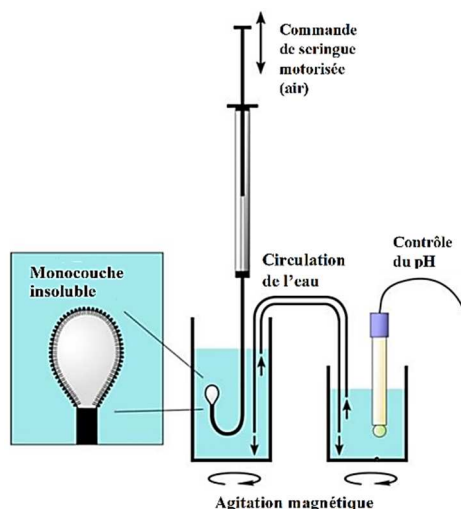


Figure 7 : Représentation schématique du dispositif expérimental pour l'étude de la compression des lipides insolubles, avec dispositif de contrôle du pH de la phase

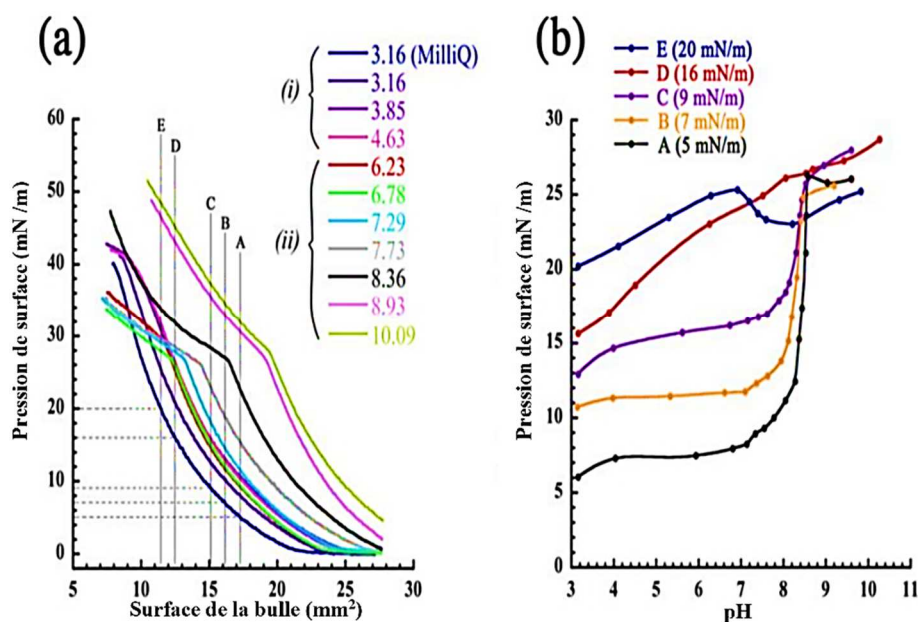


Figure 8 : Étude de monocouches de lipides cationiques à l'interface eau/air en fonction du pH (avec $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$). (a) Expériences de compression, chaque compression est réalisée à pH constant ; (b) valeur des pressions de surface en fonction du pH, à volume de la bulle constant soit pour $\Pi_0 = 5, 7, 9, 16$ ou 20 mN/m (courbes A, B, C, D et E respectivement). Les différents états de compression présentés dans la figure (b) sont représentés dans la figure (a) par des lignes verticales (A, B, C, D, E) montrant l'évolution de la monocouche lorsque seul le pH est modifié.

3 Conclusion

Mon travail de thèse s'est principalement axé sur l'étude des phénomènes interfaciaux, de molécules aux interfaces, et de caractérisation des ces monocouches. Il a abordé la formation in situ de polymères à l'interface, de précipitation de polymères préformés, ainsi que le comportement de molécules insolubles en fonction des conditions environnementales.

Un travail riche en approches expérimentales a été réalisé et supporté par des modèles théoriques pour interpréter de manière précise les résultats complexes qui en découlent.

4 Références

- [1] Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Control Release*, 128, 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>
- [2] Anton, N., Bally, F., Serra, C.A., Ali, A., Arntz, Y., Mely, Y., Zhao, M., Marchioni, E., Jakhmola, A., Vandamme, T.F., 2012. A new microfluidic setup for precise control of the polymer nanoprecipitation process and lipophilic drug encapsulation. *Soft Matter*, 8, 10628-10635. <https://doi.org/10.1039/c2sm25357g>
- [3] Cheng, P., Li, D., Boruvka, L., Rotenberg, Y., Neumann, A.W., 1990. Automation of Axisymmetric Drop Shape Analysis for Measurements of Interfacial Tensions and Contact Angles. *Colloids Surf.*, 43, 151-167. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(90\)80286-D](https://doi.org/10.1016/0166-6622(90)80286-D)
- [4] Del Río, O.I., Neumann, A.W., 1997. Axisymmetric drop shape analysis: Computational methods for the measurement of interfacial properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops. *J. Colloid Interface Sci.*, 196, 136-147. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5214>
- [5] Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.Ph., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, 55, R1- R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- [6] Kumari, A., Yadav, S. K., Yadav, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf., B, Biointerfaces*, 75, 1-18. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- [7] Lepeltier, E., Bourgaux, C., Couvreur, P., 2014. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 71, 86-97. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>
- [8] Lucassen and van den Tempel, 1972; Safran, 1994
- [9] Martinez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. Á., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 532, 66-81. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- [10] Zhang, S., Zhao, Y., 2010. Facile Synthesis of Multivalent Water-Soluble Organic Nanoparticles via “Surface Clicking” of Alkynylated Surfactant Micelles. *Macromolecules*, 43, 4020-4022. <https://doi.org/10.1021/ma100497k>

Introduction générale

Les nanoparticules synthétisées à partir de matériaux biocompatibles, biodégradables se sont révélées très prometteuses en tant que vecteurs d'administration de médicaments. Malgré les avantages liés à leur taille et aux propriétés de surface, les effets pharmacologiques escomptés de leur administration au sein de l'organisme restent sujets à de nombreux obstacles (sensibilité au pH, solubilité en milieu aqueux ou hydrophile,). Par conséquent, l'utilisation de méthode de fonctionnalisation de la surface de ses nanoparticules, ou des études de stabilité de ses nanoparticules, associées à une procédure de fabrication facile, est plus souhaitable.

Pris séparément, une fonctionnalisation des nanoparticules peut être exploitée comme marqueurs dans le domaine du diagnostic des pathologies et ou pour une potentialisation d'activités thérapeutique *in vivo* ou *in vitro*. Avec la particularité que dans certains cas, le pH de l'organe à traiter est utilisé comme un déclencheur de la libération du médicament (thérapeutiques antinéoplasiques). Autant d'éléments qui démontrent l'intérêt à accorder aux études de fonctionnalisations des interfaces (huile/eau, air/eau) ou de stabilité des molécules amphiphiles aux interfaces en fonction des variations de pH. Le choix du support d'étude porté sur les molécules amphiphiles trouve son origine dans leur propriété émulsifiante et leur potentiel changement structurel en fonction du pH, en comparaison aux molécules tensioactives présentes dans l'organisme.

La rhéologie bi-dimensionnelle de l'interface des systèmes dispersés, s'est révélée d'une bonne approche afin de permettre la caractérisation structurelle des monocouches amphiphiles et la compréhension des phénomènes responsables du réarrangement à l'interface, tout comme le suivi de leur évolution.

Ce travail doctoral s'inscrit dans un axe de recherche qui consiste à développer de nouvelles méthodes pour fonctionnaliser une interface eau/huile et optimiser les vecteurs à visée thérapeutiques et ou diagnostics par la maîtrise de leurs changements structurels liés au pH. A

long terme, l'objectif est de synthétiser à base des molécules amphiphiles des structures à haut poids moléculaires ayant un fort ancrage pour les structures hydrophiles et également améliorer la stabilité des monocouches lipidiques. Un objectif subdivisé en trois sous-projets à savoir :

- Synthèse de polymère à l'interface eau/huile par réaction de chimie clic ;
- Étude de monocouches insolubles sensibles aux variations du pH ;
- Étude de nano-précipitation à l'interface eau/huile, parallèle avec la nanoprecipitation en volume.

Ce projet multidisciplinaire nous a permis d'évoluer à l'interface de la physicochimie interfaciale, du domaine des molécules amphiphiles, leur comportement et leur modification chimiques à l'interface.

Ce travail est divisé en cinq principaux chapitres qui sont brièvement décrits ci-dessous :

Le premier chapitre du manuscrit, consacre la description des notions de base concernant la tension de surface, les approches et modèles utilisés, le principe de base de la nanoprecipitation et des notions utiles à la caractérisation des systèmes étudiés.

Dans le deuxième chapitre du manuscrit, nous avons étudié les propriétés rhéologiques interfaciales d'un tensioactif cationique présentant trois alcynes comme partie hydrophile terminale. Nous y avons associé conjointement l'étude rhéologique de la réaction clic avec un agent de réticulation présentant deux fonctions azides et soluble en phase aqueuse (en présence de catalyseurs. La méthode d'analyse axisymétrique de la forme des gouttes (ADSA), a été utilisée pour mesurer la tension superficielle dynamique à l'interface cyclohexane / eau aussi bien pour l'agent tensioactif seul que pendant le déroulement de la réaction de réticulation.

Le troisième chapitre, traite du comportement des monocouches insolubles déposées sur une interface à bulle parallèlement à une variation de pH imposée dans la phase aqueuse. Les monocouches insolubles sont réalisées avec des molécules lipidiques modèles terminées par

des fonctions cationiques et anioniques sensibles au pH. Afin d'étudier l'impact direct de la variation du pH sur les propriétés de la monocouche, les mesures de rhéologie interfaciale ont été effectuées à une compression fixe, et pour différents pH. Dans cette section nous avons également utilisé la méthode d'analyse axisymétrique de la forme des gouttes (ADSA).

Le quatrième chapitre est dédié à l'étude des mécanismes accompagnants la distribution de taille des nanoparticules de polymères au cours du procédé de nanoprecipitation. Nous avons étudié les effets de la concentration en poly- ϵ -caprolactone, du volume d'eau, et de la concentration en tensioactif sur la taille et la distribution de taille des nanoparticules de polymère. Les résultats de la formulation par nanoprecipitation devraient être utilisés pour l'étude rhéologique de la nanoprecipitation avec la méthode de l'ADSA.

Enfin, le cinquième chapitre regroupe les discussions et les perspectives aux différents projets.

Partie bibliographique

1	Interfaces eau/air et eau/huile.....	26
2	Définition des tensioactifs et applications.....	26
2.1	Définition thermodynamique de la tension de surface	26
2.2	Définition de l'excès de surface	27
2.3	Equation de Gibbs	28
2.4	Isotherme d'adsorption de Gibbs	30
3	Rhéologie interfaciale	32
3.1	Rhéologie de surface en dilatation	32
3.1.1	Elasticité de surface.....	32
3.1.2	Mécanisme dissipatif en rhéologie de dilatation	34
3.1.3	Modèles rhéologiques de surface	34
3.1.3.1	Le modèle de Lucassen – Van Den Tempel	34
3.1.3.2	Le modèle de Maxwell et de Voigt	35
4	Monocouche de Langmuir et études des propriétés interfaciales	37
4.1	Isotherme de Langmuir et apparentés	37
4.2	Monocouche de Langmuir et de Gibbs	38
5	Mesures de la tension de surface	39
5.1	Technique de mesure et de suivi de la tension de surface par l'analyse de forme de goutte axisymétrique.....	40
6	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules : taille et PDI (indice de polydispersité) [27]	41
7	Références	44

Partie bibliographique

Résumé : dans cette revue bibliographique, nous introduisons les définitions de base : tensioactif, tension de surface. Une propriété clé des tensioactifs c'est-à-dire la concentration micellaire critique (CMC) est expliquée car ayant été un élément modulateur dans l'étude de réticulation à l'interface eau/huile. En complément à l'interface eau/huile, un accent est mis sur l'interface air/eau pour démontrer le champ d'application élargi des études rhéologiques. Nos projets de thèse ayant permis d'évoluer de l'interface eau/huile à une interface air/eau pour comprendre les phénomènes de réarrangement interfacial. En raison des propriétés physico-chimiques spécifiques observées aux différentes interfaces, le principe de base de la méthode utilisée pour l'étude de rhéologie interfaciale à savoir l'analyse axisymétrique de la forme de la goutte (ADSA) est présenté d'un point de vue mathématique. La caractérisation des nanoparticules avec la notion de taille et d'indice de polydispersité (PDI) est mentionnée comme un complément à l'étude interfaciale des nanoparticules et conditionne leur utilisation dans les systèmes avancés d'administration de médicament.

Mots clés : tensioactif, concentration micellaire critique, rhéologie interfaciale, analyse axisymétrique de la forme de la goutte (ADSA), indice de polydispersité (PDI)

1 Interfaces eau/air et eau/huile

On définit une interface [1] liquide/gaz comme la zone de transition entre une phase liquide et une phase gazeuse. De même l'interface liquide/liquide se définit comme la zone de transition entre deux phases liquides non miscibles.

Dans cette section, nous introduirons les notions de tensioactifs, tension de surface et leur méthode de mesure. Nous aborderons enfin le cas des interfaces courbées et la relation entre courbure et tension de surface.

2 Définition des tensioactifs et applications

Les tensioactifs [2], également appelés surfactants, ou molécules amphiphiles sont des molécules qui comportent une tête hydrophile (polaire ou chargée) et une queue hydrophobe de solubilité beaucoup plus faible dans l'eau.

Grâce à cette double solubilité pour les milieux polaires et apolaires, les tensioactifs s'adsorbent aux interfaces entre ces deux types de milieux, comme les interfaces eau-huile ou eau/air. Les tensioactifs peuvent être utilisés comme détergent (nettoyage), agent de solubilisation, agent moussant, agent mouillant (ils permettent un meilleur étalement d'un liquide sur un solide), agent dispersant (évite la floculation de particules hydrophobes, agent émulsifiant (facilite l'émulsification entre deux liquides non miscibles).

2.1 Définition thermodynamique de la tension de surface [3, 4]

La cohésion des liquides est assurée par les forces intermoléculaires attractives d'origines diverses (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes...) contre lesquelles il faut lutter pour maintenir des molécules à la surface d'un liquide. La création d'une interface entre deux fluides nécessite un apport énergétique car les interfaces ont toujours tendance à minimiser leur aire. Soit un système de volume V composé de deux fluides séparés par une interface d'aire A . Lors

d'une déformation infinitésimale dA de l'interface, la variation de l'énergie libre de Helmholtz dF associée à cette déformation s'écrit :

$$dF = -SdT - PdV + \gamma dA + \mu dN \quad (Eq. 1)$$

où S représente l'entropie du système, T la température, P la pression, V le volume, μ le potentiel chimique des molécules et N leur nombre. En considérant le nombre de moles, la température et le volume constants, la tension de surface est définie comme la variation de l'énergie libre par unité de surface :

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right) \quad (Eq. 2)$$

Ajoutons que l'on peut également définir la tension de surface en fonction de l'enthalpie libre, ou énergie libre de Gibbs, G , en travaillant à température, pression et nombre de moles constantes :

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P,N} \quad (Eq. 3)$$

2.2 Définition de l'excès de surface [3,4]

Soit le système défini par l'interface entre un liquide (l) et un gaz (g) de densité respective ρ_1 et ρ_2 . Entre la phase gazeuse et la phase liquide, la densité varie de ρ_1 à ρ_2 sur une zone de transition d'épaisseur $2e$. Gibbs dans son approche, a remplacé ce système réel par un système idéal. Dans ce système idéal, la zone de transition est remplacée par une surface d'épaisseur nulle appelée surface de séparation. Dans le nouveau système défini, les propriétés des deux fluides sont homogènes dans chaque phase de part et d'autre de la surface de séparation. Toujours dans cette approche Gibbs définit une grandeur extensive $X^{\text{idéal}}$ telle que la concentration, l'énergie libre ou l'entropie est la somme de X_g et X_l (les valeurs de X respectivement dans chacune des deux phases (gaz et liquide)) :

$$X^{idéal} = X_g + X_l \quad (Eq.4)$$

Alors la valeur de X dans le système réel ($X^{réel}$) est définie par la somme de $X^{idéal}$ dans le système idéal et de X^σ , une grandeur d'excès que l'on attribue à l'existence de l'interface. Sur cette base on peut écrire l'énergie interne $U^{réel}$:

$$U^{réel} = U^{idéal} + U^\sigma = U_g + U_l + U^\sigma \quad (Eq.5)$$

De même l'entropie $S^{réel}$:

$$S^{réel} = S^{idéal} + S^\sigma = S_g + S_l + S^\sigma \quad (Eq.6)$$

Le nombre de molécules de composant i dans le système réel ($N^{réel}$) est donné par :

$$N^{réel} = N^{idéal} + N^\sigma = N_g + N_l + N^\sigma \quad (Eq.7)$$

En considérant toujours que la zone de transition a une épaisseur nulle, le volume réel s'écrit :

$$V^{idéal} = V_g + V_l \quad (Eq.8)$$

L'on définit par Γ_i l'excès de surface en composant i, comme la concentration surfacique de molécules i dans la surface de séparation :

$$\Gamma_i = \frac{N_i^\sigma}{A} = \frac{(N_i^{réel} - N_i^{idéal})}{A} \quad (Eq.9)$$

2.3 Equation de Gibbs [3,4]

Soit un système composé d'une phase gazeuse et une phase liquide séparées par une surface infiniment petite d'aire A. Dans ce système, écrivons l'expression de l'énergie interne associée à la surface :

$$U^\sigma = S^\sigma T + \gamma A + \sum_i \mu_i N_i^\sigma \quad (\text{Eq. 10})$$

Cette équation peut être différenciée

$$dU^\sigma = S^\sigma dT + TdS^\sigma + \gamma dA + Ad\gamma + \sum_i \mu_i dN_i^\sigma + \sum_i N_i^\sigma d\mu_i \quad (\text{Eq. 11})$$

La variation d'énergie interne associée à la surface, dU^σ , peut s'écrire par analogie avec l'énergie interne de volume :

$$dU^\sigma = TdS^\sigma + \gamma dA + \sum_i \mu_i dN_i^\sigma \quad (\text{Eq. 12})$$

En combinant les équations (Eq. 11) et (Eq. 12) nous déduisons l'équation de Gibbs-Duhem pour la surface :

$$\begin{aligned} TdS^\sigma + \gamma dA + \sum_i \mu_i dN_i^\sigma &= S^\sigma dT + TdS^\sigma + \gamma dA + Ad\gamma + \sum_i \mu_i dN_i^\sigma + \sum_i N_i^\sigma d\mu_i \\ S^\sigma dT + Ad\gamma + \sum_i N_i^\sigma d\mu_i &= 0 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 13})$$

À température constante et par unité de surface, on en déduit **l'équation de Gibbs** qui relie la variation de tension de surface d'une solution au nombre de molécules adsorbées et à leur potentiel chimique.

$$d\gamma = - \sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (\text{Eq. 14})$$

2.4 Isotherme d'adsorption de Gibbs [3,4]

Considérons une solution de tensioactifs de concentration C_T caractérisée par un excès de surface Γ_T . En effectuant le raisonnement sur la base d'une solution diluée et en considérant que le potentiel chimique du solvant égal à 1, on peut écrire le potentiel chimique du tensioactif par la relation :

$$\mu_T = kT \ln C_T \quad (Eq. 15)$$

Des équations (Eq. 14) et (Eq. 15), l'on déduit aisément l'expression de Γ_T

$$\Gamma_T = \frac{-1}{kT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C_T} \right) \quad (Eq. 16)$$

Avec les tensioactifs chargés, il faut tenir compte du potentiel chimique des tensioactifs (μ_T) et de celui des contre-ions (μ_{CI}). Les équations (Eq.14) et (Eq.15) donnent dans ce cas :

$$d\gamma = -\Gamma_{TS} d\mu_T - \Gamma_{CIS} d\mu_{CI} \quad (Eq. 17)$$

En considérant que le tensioactif et son contre-ion ont la même concentration C_T et le même excès de surface, l'on tire :

$$\Gamma_T = \frac{-1}{2kT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C_T} \right) \quad (Eq. 18)$$

Les équations (Eq. 16) et (Eq. 18) démontrent que lorsque la concentration en tensioactifs augmente dans la solution, la tension de surface diminue théoriquement. Expérimentalement, pour connaître la quantité de tensioactifs adsorbés, on mesure l'isotherme de tension de surface $\gamma = f(\ln C_T)$, c'est-à-dire la variation de la tension de surface de la solution en fonction du logarithme népérien de la concentration en tensioactif. La pente de la courbe $\gamma = f(\ln C_T)$ conduit à la détermination théorique de l'excès de surface (Eq. 16) ou (Eq. 18).

La figure 1 montre un exemple d'isotherme de tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif à une interface eau/huile. L'isotherme de tension de surface d'un tensioactif comprend plusieurs zones, numérotées A, B, C (interface eau/cyclohexane).

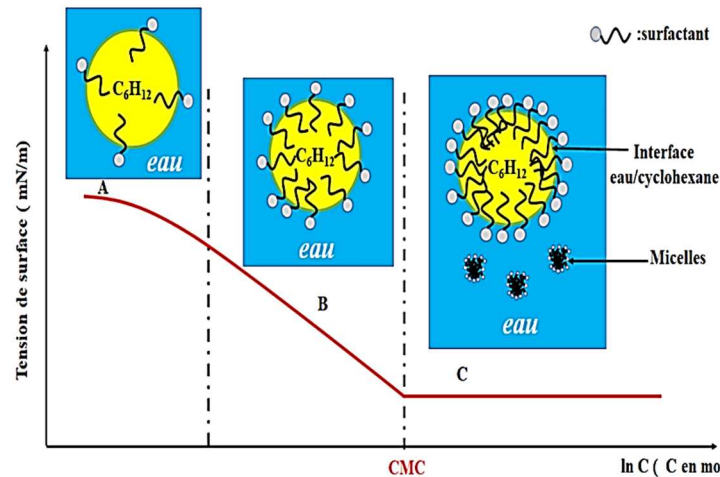


Figure 1 : Isotherme de tension de surface γ ($\ln C$) pour un tensioactif simple.

Dans la zone A, à basse concentration, les tensioactifs sont libres dans le volume et s'adsorbent à la surface. La valeur absolue de la pente de la courbe γ ($\ln C$) augmente, nous sommes donc en présence d'un excès de surface. Dans la zone B, la pente de $\gamma = f(\ln(C))$ est constante, signifiant que le nombre de molécules adsorbées reste théoriquement constant : l'interface est proche de la saturation en tensioactifs. L'augmentation de la concentration en tensioactifs diminue le potentiel chimique des tensioactifs donc la tension de surface. Un changement de pente abrupte de la courbe $\gamma = f(\ln(C))$ se produit au niveau de la CMC (concentration micellaire critique) (Fig. 1). Enfin, au-delà de la CMC, dans la zone C, les tensioactifs commencent à former des micelles en volume et ne modifient plus le potentiel chimique. Seule la forme monomère de l'agent de surface contribue à diminuer son potentiel chimique c'est-à-dire à réduire la tension de surface : la tension de surface atteint une valeur limite.

Un intérêt majeur de la rupture de la pente de l'isotherme de tension de surface d'un tensioactif est la possibilité de déterminer la CMC. Notons qu'au-delà de la CMC, l'équation de Gibbs qui résulte d'une série d'approximations n'est plus valable.

Nos expériences de fonctionnalisation à l'interface eau/cyclohexane par chimie click, ont été réalisées autour de la CMC, soit à $0,1 \times \text{CMC}$, CMC, $3 \times \text{CMC}$.

Conclusion sur la tension de surface

La tension de surface d'un liquide pur dépend de la cohésion entre les molécules qui le composent. Les tensioactifs en solution dans l'eau, s'adsorbent en surface tout en provoquant la diminution de la tension de surface. Ainsi la tension de surface dépend de la concentration en tensioactifs. De l'équation de Gibbs, l'on démontre aisément qu'une augmentation de la concentration en tensioactifs de la solution s'accompagne de la diminution de la tension de surface.

3 Rhéologie interfaciale

La rhéologie interfaciale est l'étude des relations contraintes/déformations [5,6] ayant lieu au sein des interfaces, donc dans des phases bi-dimensionnelles comme des monocouches de tensioactifs ou de polymères. De plus en rhéologie bi-dimensionnelle, notons que l'on distingue plusieurs types de déformations : la dilatation, l'élongation et le cisaillement. Nous nous intéresserons aux déformations en dilatation.

3.1 Rhéologie de surface en dilatation

3.1.1 Elasticité de surface [7, 8, 9, 10]

Soit une interface eau/air d'aire A_0 , de tension de surface γ et recouverte d'une quantité Γ de tensioactifs. Supposons qu'une dilatation locale se produit au niveau de cette interface (fig. 2), il s'en suit une augmentation locale de l'aire de la surface. Ainsi, la concentration surfacique des molécules adsorbées diminue localement ($\Gamma \downarrow$) et la tension de surface augmente. Il se produit un gradient de tension de surface au sein de l'interface. Pour rétablir l'équilibre et

supprimer le gradient de tension de surface, les molécules de tensioactifs ont tendance à migrer vers la région de tension de surface plus élevée (effet Marangoni). En somme il existe une force qui s'oppose à la déformation : c'est l'origine de l'élasticité interfaciale dilatationnelle.

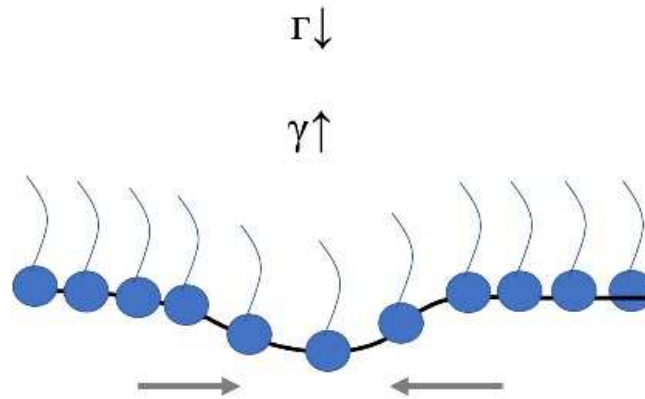


Figure 2 : Schéma représentant l'effet Marangoni, responsable de l'élasticité de dilatation

L'on définit le module élastique comme l'augmentation de la tension de surface en fonction d'une déformation dA/dA_0 :

$$E = \frac{A_0 d\gamma}{dA} = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad (Eq. 19)$$

Pour une couche de tensioactifs insolubles, une diminution de l'aire s'accompagne d'une augmentation de la quantité adsorbée Γ par unité de surface et l'élasticité s'écrit sous la forme :

$$E_0 = \frac{-d\gamma}{d \ln \Gamma} \quad (Eq. 20)$$

Le module élastique de surface en dilatation E est donc le coefficient de proportionnalité entre une déformation dA/dA_0 et une contrainte de surface, la tension de surface.

La dilatation suivie de la compression de la surface effectuée de façon sinusoïdale à une fréquence ω et une amplitude ΔA , peut être à l'origine d'un déphasage ϕ entre la variation de la déformation ($\Delta A/A_0$) et la tension de surface. Le module élastique E devient un nombre

complexe, avec une partie réelle E' (correspondant à l'énergie stockée) et une partie imaginaire E'' (qui rend compte des mécanismes dissipatifs).

$$E = E' + iE'' = |E| \cos \phi + i|E| \sin \phi \quad (\text{Eq. 21})$$

Abordons à présent les origines des mécanismes dissipatifs pour une meilleure compréhension des variations observées du module élastique E .

3.1.2 Mécanisme dissipatif en rhéologie de dilatation [9, 10]

Lorsqu'au sein d'un système tensioactif du type liquide/air ou liquide/liquide, l'interface est perturbée, par exemple par une contraction ou une expansion, le système est déplacé hors de l'équilibre d'adsorption et différents processus se mettent en place contribuant au rééquilibrage [9]. L'ensemble du processus de relaxation qui en résulte a pour but de ramener le système à l'équilibre. La relaxation peut être le fait de la diffusion [9, 10, 11], ou dans le cas de solution micellaire résulter d'une réorganisation au sein des micelles. La compréhension des processus de relaxation a conduit aux différents modèles mathématiques expliquant la variation des modules élastiques.

3.1.3 Modèles rhéologiques de surface

3.1.3.1 Le modèle de Lucassen – Van Den Tempel [10, 11]

Dans les modèles d'adsorption contrôlée par diffusion, on part du principe qu'il n'y a pas de barrière d'énergie d'activation pour le transfert des molécules à l'interface. Si l'équilibre entre la tension superficielle, l'absorption et la composition du liquide dans la couche adjacente à l'interface s'établit rapidement alors les variations de la tension superficielle sont uniquement dues aux fluctuations de la concentration dans la couche subsuperficielle. Sur cette base le réarrangement des molécules dans l'interface est instantané. Dans le modèle de Lucassen et Van den Tempel, la diffusion est le processus limitant du repeuplement de l'interface (les auteurs négligent toute barrière énergétique à l'adsorption ou la désorption). La variation des

modules élastiques dilatationnels en fonction de la fréquence ω est décrite pour une interface mobile. Les auteurs trouvent :

$$E' = E_0 \frac{1 + \Omega}{1 + 2\Omega + 2\Omega^2} \quad (Eq. 22)$$

$$E'' = E_0 \frac{\Omega}{1 + 2\Omega + 2\Omega^2} \quad (Eq. 23)$$

E_0 est l'élasticité limite d'une monocouche de tensioactif insoluble, définie par l'équation (Eq. 20)

avec

$$\Omega = \frac{dc}{d\Gamma} \sqrt{\frac{D}{2\omega}} \quad (Eq. 24)$$

C désigne la concentration en tensioactif, Γ l'excès de surface, D le coefficient de diffusion volumique des molécules de tensioactifs en solution. Le paramètre adimensionné Ω rend compte de la compétition entre les variations de concentrations à l'interface dues à la modulation de surface et les échanges de tensioactifs par diffusion. C'est également le rapport de la fréquence caractéristique de diffusion par la fréquence expérimentale d'oscillation. Ainsi pour une fréquence d'oscillation très supérieure à la vitesse de diffusion ($\Omega \ll 1$), les tensioactifs ne diffusent pas et l'on peut démontrer que $E=E'=E_0$ (élasticité limite) avec $E''=0$. À l'inverse pour ($\Omega \gg 1$), le module élastique croît avec la racine carrée de la fréquence d'oscillation. Notons que lorsque l'échange de diffusion entre la couche de surface et la phase est négligeable, certains auteurs utilisent le modèle rhéologique de Maxwell et de Voigt [12].

3.1.3.2 Le modèle de Maxwell et de Voigt [12, 13, 14]

Il s'agit de deux modèles rhéologiques simples et plus connus qui s'appliquent à la description de certains processus de relaxation dans des couches de polymères. Le comportement de la

couche de polymères est assimilé à celui d'un ressort et d'un piston en série (Fig. 3). Le piston représente le caractère visqueux du fluide et le ressort représente le caractère élastique.

Intéressons-nous maintenant au modèle de Maxwell. Les modules élastiques et visqueux peuvent être exprimés en fonction de la fréquence ω de déformation de l'interface.

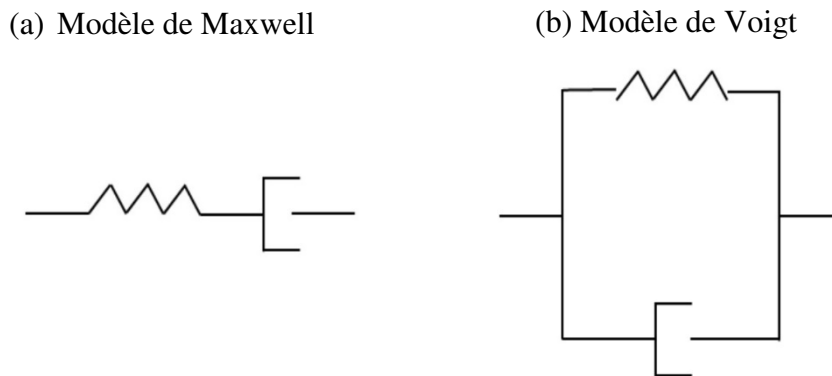


Figure 3 : Modèle de (a) Maxwell et de (b) Voigt.

$$E' = E_{\infty} + E_m \frac{\tau_m^2 \omega^2}{1 + \tau_m^2 \omega^2} \quad (Eq. 25)$$

$$E'' = E_m \frac{\tau_m \omega}{1 + \tau_m^2 \omega^2} \quad (Eq26)$$

E_m désigne le module élastique à fréquence infinie, τ_m est le temps caractéristique de relaxation. E_{∞} représente le module élastique à fréquence nulle. À fréquence élevée le caractère élastique prédomine. À basse fréquence c'est le caractère visqueux qui domine faisant du modèle de Maxwell la meilleure approche pour la description des couches viscoélastiques à caractère fluide [15, 16].

Dans le cas du modèle de Voigt (Fig. 3 (b)), le piston et le ressort sont associés en parallèle. Le modèle de Voigt peut décrire le comportement de couches viscoélastiques à caractère solide, comme les élastomères.

4 Monocouche de Langmuir et études des propriétés interfaciales [17,18]

4.1 Isotherme de Langmuir et apparentés

Soit l'isotherme de Langmuir définit comme suit :

$$\Gamma = \Gamma_m \frac{K_L C}{(1 + K_L C)} \quad (\text{Eq. L1})$$

où Γ_m est la concentration surfacique maximale et K_L est la constante d'équilibre de Langmuir.

Le paramètre Γ_m est une limite théorique. Les valeurs Γ_m et K_L déterminées par de nombreux auteurs sont énumérées dans des tables. À de très faibles concentrations ($K_L C \ll 1$) et $(1 + K_L C) \approx 1$, l'équation (Eq. L1) devient $\Gamma = \Gamma_m K_L C$ où

$$\Gamma = \Gamma_m K_L C = K_H C \quad (\text{Eq. L2})$$

$$\frac{\Gamma}{C} = \Gamma_m K_L$$

Ainsi l'isotherme de Langmuir peut être approximé par l'isotherme d'Henry :

$$K_H = \Gamma_m K_L$$

Pour juger des concentrations "élevées" ou "faibles", la concentration de référence est $1/K_L$. L'équation de Langmuir représente un modèle en réseau des molécules de surface, qui sont supposées ne pas interagir entre elles ou avec les sites de solvant. L'équation de Volmer (ignorant les interactions latérales) et une équation d'état de Van der Waals à deux dimensions conduisent à des isothermes d'adsorption qui diffèrent de manière significative des isothermes d'Henry / Langmuir. Des isothermes d'adsorption tenant compte de la taille finie des molécules et de leurs interactions latérales ont également été développées sur la base de la mécanique statistique. L'isotherme de Frumkin, qui considère les interactions solutés-solvants, a surtout été utilisée pour les agents de surface non-ioniques.

Notons que la pression de surface des solutions diluées, s'obtient des équations de Gibbs (Eq. 16) et de l'équation de Henry (une dérivée de l'équation de Langmuir) :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma = nRTK_H C \quad (\text{Eq. L3})$$

γ_0 désigne la tension de surface de l'eau pure, n est une constante qui dépend de l'agent tensioactif. R étant la constante des gaz parfaits. D'autres isothermes sont connues, et citées dans la littérature mais restent moins utilisées contrairement aux isothermes de Gibbs et de Langmuir. Ainsi pour l'étude du comportement interfacial des macromolécules, des polymères, l'on a recours aux techniques de monocouches de Langmuir et de Gibbs. Des données issues des isothermes de Langmuir ou de Gibbs, il est possible de comprendre les processus d'adsorption, de réarrangement ou de dégradation des macromolécules. Ces deux approches permettent également d'étudier en détail les molécules contenant des substances biologiques.

4.2 Monocouche de Langmuir et de Gibbs [18, 19, 20]

En répandant des substances insolubles dans l'eau à l'interface air/eau, une monocouche de Langmuir est formée, tandis qu'en injectant des substances capables de se dissoudre dans la sous-phase, une monocouche de Gibbs est formée par adsorption. La formation d'une monocouche de Langmuir à partir d'un solvant organique se produit par l'arrangement de molécules amphiphiles directement à l'interface air/eau et est étudiée en fonction de la surface de la monocouche. Les monocouches de Gibbs sont obtenues par l'adsorption de molécules tensioactives à l'interface et sont étudiées en fonction de la concentration en surface. La quantité de molécules à l'interface dépend de l'équilibre entre l'adsorption et la désorption, qui est réglable, par exemple, par la valeur du pH, la concentration en sel, la force ionique, les co-composants dans la sous-phase et la température. Une variété de polymères synthétiques et naturels ayant des structures chimiques différentes sont utilisés pour former les couches de Langmuir à l'interface air/eau. Notons que la caractérisation de ses monocouches avec la cuve

de Langmuir est basée sur l'analyse des isothermes de pression de surface (Π , confère Eq. L3) et de surface moléculaire (A). La technique de mesure de la pression de surface avec la cuve de Langmuir implique la mesure de la tension de surface d'une surface aqueuse sous différentes conditions de compression à la fois en présence d'une monocouche de surface (γ) et en son absence (γ_0). L'analyse de l'isotherme de pression de surface et de surface moléculaire (Π - A) fournit les informations sur les interactions entre les composants au niveau moléculaire [19, 20].

5 Mesures de la tension de surface [17,18]

De nombreuses méthodes de mesure de la tension de surface ont été rapportées par la littérature. Le choix de la méthode appropriée étant fonction de la cinétique et du système étudié. En fonction du principe de mesure, l'on peut citer :

- les méthodes de force (l'anneau de Noüy, méthode de la plaque de Wilhelmy) ;
- les méthodes basées sur la forme de la goutte (goutte pendante, goutte sessile).

À la différence des méthodes de forme, l'anneau de Noüy comme la plaque de Wilhelmy sont toutes basées sur l'immersion d'une plaque de géométrie variable (respectivement cercle, rectangle).

Ainsi avec la méthode de l'anneau de Noüy, l'on immerge un cercle de platine qui en remontant va former une lamelle avec le liquide. C'est la force capillaire sur l'anneau qui est mesurée à l'interface air/eau. Dans la méthode de la plaque de Wilhelmy : l'on immerge une plaque de platine qui reste tangentielle à l'interface air/liquide. La tension de surface est déterminée en mesurant l'effort au moment où la plaque se décolle de la surface. La force F qui est nécessaire au décollement de la surface du liquide est proportionnelle à la tension de surface, au cosinus de l'angle de contact et au périmètre mouillé.

$$F = \gamma P \cos \theta_r \quad (\text{Eq. L4})$$

Dans les méthodes basées sur la forme de la goutte/bulle : la forme de la goutte/bulle est fonction des effets conjugués de la gravité, de la tension de surface, du volume (goutte/bulle). Le traitement mathématique du contour de la goutte/bulle basée sur l'équation fondamentale de la capillarité a conduit au développement de la technique ADSA (Analyse de la forme de goutte axisymétrique). Dans le cadre de ce travail, les différentes mesures de tension de surface ont été réalisées par la technique ADSA.

5.1 Technique de mesure et de suivi de la tension de surface par l'analyse de forme de goutte axisymétrique

Les techniques d'analyse de forme de goutte axisymétrique (ADSA) sont considérées comme les plus puissantes en raison de leur précision, de leur simplicité et de leur polyvalence [21]. L'ADSA repose sur la meilleure adéquation entre des courbes théoriques avec des valeurs de tension superficielle connue et un profil expérimental. Aussi mentionnons que l'ADSA est également très adaptée à une implémentation informatique automatisée au moyen de l'analyse d'images numériques [22].

Historiquement, l'ADSA a été développée par Rotenberg et ses collaborateurs [23] pour la mesure des propriétés interfaciales. Elle a connu une amélioration à la suite des travaux de Del Río et Neumann [21]. Au cœur de cette technique, se trouve l'idée que la forme des gouttes/bulles expérimentales et la tension de surface (tension interfaciale) sont liées comme l'indique l'équation de Young-Laplace [21, 24]. Cette équation stipule que la différence entre la pression hydrostatique (ΔP) d'une surface courbe caractérisée par deux rayons de courbure (R_1 et R_2) est proportionnelle à la tension interfaciale (γ) et à la courbure moyenne ($\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$) :

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (Eq. L5)$$

Ainsi, pour une valeur donnée de γ , la forme d'une goutte peut être déterminée. L'inverse, c'est-à-dire la détermination de la tension interfaciale (γ) à partir de la forme, est également possible, bien que ce soit une tâche beaucoup plus difficile.

D'autres avantages justifient l'usage de l'ADSA dans le cadre d'études variées et en font une technique de choix. Rappelons que l'ADSA a été appliquée à des matériaux allant des liquides organiques aux métaux fondus et des solvants purs aux solutions concentrées. De plus, comme le profil de la goutte peut être enregistré sous forme d'images numériques, il est possible d'étudier les tensions interfaciales dans des systèmes dynamiques, où les propriétés dépendent du temps [22].

6 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules : taille et PDI (indice de polydispersité) [27]

Les systèmes d'encapsulation à base de lipides comptent parmi les technologies les plus prometteuses employées dans l'administration de médicaments et la libération prolongée de composés bioactifs. L'on cite comme vecteurs lipidiques de médicaments fréquemment utilisés : les liposomes, les nanoliposomes, les gels vésiculaires de phospholipides, les nanoparticules lipidiques solides, les transférômes et les tocosomes.

En effet, plus la taille des particules est petite, plus le rapport surface / volume qu'ils possèdent est important. Notons également que la taille des nanoparticules lipidiques affecte la stabilité, l'efficacité de l'encapsulation, le profil de libération du médicament, la biodistribution, la muco-adhésion et l'absorption cellulaire.

En ce qui concerne la caractérisation de la distribution de la taille des nanoparticules, le paramètre utilisé pour définir la gamme de taille des systèmes de nanoparticules est appelé "indice de polydispersité" (PDI). Le terme "polydispersité" est utilisé pour décrire le degré de

non-uniformité de la distribution de taille des particules. Également connu sous le nom d'indice d'hétérogénéité, le PDI est un nombre calculé à partir d'un ajustement à deux paramètres des données de corrélation (l'analyse des cumulants) [25-27]. Cet indice est sans dimension et a une échelle telle que les valeurs inférieures à 0,2 correspondent à des populations monodisperses. Les valeurs du PDI supérieures à 0,4 indiquent que l'échantillon a une très large distribution de taille des particules et ne convient probablement pas à l'analyse par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Différents algorithmes de distribution de la taille fonctionnent avec des données qui se situent entre ces deux valeurs extrêmes de la PDI (c'est-à-dire 0,1-0,4). La DLS est essentiellement une représentation de la distribution des populations de taille au sein d'un échantillon donné. La valeur numérique de la PDI va de 0,0 (en théorie, pour un échantillon parfaitement uniforme en ce qui concerne la taille des particules) à 1,0 (pour un échantillon très polydispersé avec des populations de tailles de particules multiples). Les valeurs inférieures ou égales à 0,2 sont le plus souvent considérées comme acceptables dans la pratique pour les matériaux à base de nanoparticules de polymères. Dans les applications d'administration de médicaments utilisant des supports à base de lipides, tels que les formulations de liposomes et de nanoliposomes, une valeur de PDI de 0,3 et moins est considérée comme acceptable et indique une population homogène.

La taille des particules ayant un impact dans la pénétration au niveau des organes cibles. Notons qu'au niveau de nombreux organes et particulièrement le tissu cérébral, la barrière hémato-encéphalique, la taille des particules permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique. La perméabilité des tissus ou des organes n'étant possible que pour des tailles spécifiques de particules. Illustrons l'impact de la taille des particules pour le dépôt de médicaments dans le cerveau et d'autres organes du corps dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Gamme approximative de taille de particule pour le dépôt de drogue dans divers organes du corps par différentes formes de dosage et voies d'administration [27].

<u>Voie d'administration/formulaire posologique</u>	<u>Gamme de taille de particules</u>
Lymphatique (RES)*	10-50 nm
Porteurs à longue circulation (cerveau, tumeur)	50-200 nm
Transdermique	10-600 nm
Intraveineux/intramusculaire	200-2000 nm
Oculaire	100-3000 nm
Aérosol	1 à 10 μm
Nasale	8 à 20 μm

* Système réticuloendothélial

Ces données suggèrent que le PDI et la taille des particules sont d'un intérêt majeur dans l'efficacité thérapeutique, ce qui indique et démontre la nécessité de recourir à la meilleure formulation garantissant la taille adéquate des particules.

7 Références

1. Horn, R.G. (1989), Thin liquid films: Fundamentals and applications. I. B. Ivanov, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1988, 1160 pp., AICHE J., 35: 1403-1404.
<https://doi.org/10.1002/aic.690350825>
2. Platz, G. (1992), J. H. Clint: Surfactant Aggregation, Blackie Publishing Group, Glasgow, London, 1992, ISBN 0-216-92905-9, 283 Seiten. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 96: 742-742.
<https://doi.org/10.1002/bbpc.19920960527>
3. Stauff, J. (1962), J. T. Davies und E. K. Rideal. *Interfacial Phenomena*. Academic Press, New York und London 1961. 474 S. Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 66 : 453-453.
<https://doi.org/10.1002/bbpc.19620660515>
4. Carel J. van Oss (1992) A review of “Fundamentals of Interface and Colloid Science: Volume 1 - Fundamentals”. J. Lyklema (with special contributions by H.P. van Leeuwen - Ch.6, T. van Vliet - Ch. 6 and A.-M. Cazabat -Ch. 7). Academic Press, London, 1991. \$95.00., Journal of Dispersion Science and Technology, 13:6, 717-718,
<https://doi.org/10.1080/01932699208943349>
5. Lucassen, J., Van Den Tempel, M. (1972). Longitudinal waves on visco-elastic surfaces. *Journal of Colloid And Interface Science*, 41(3), 491–498.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(72\)90373-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(72)90373-6).
6. Lucassen, J., Van Den Tempel, M. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(6), 1283–1291.
[https://doi.org/10.1016/0009-2509\(72\)80104-0](https://doi.org/10.1016/0009-2509(72)80104-0)
7. Paul Becher (1982) Anionic Surfactants: Physical Chemistry of Surfactant Action (Surfactant Science Series, Volume 11). E. H. Lucassen-Reynders, editor. Marcel

- Dekker, Inc., New York, and Basel, 1981. xi+412 pp., *Journal of Dispersion Science and Technology*, 3:2, 211-212. <https://doi.org/10.1080/01932698208943635>
8. Noskov, B. A., Loglio, G., Miller, R. (2011). Dilational surface visco-elasticity of polyelectrolyte/surfactant solutions: formation of heterogeneous adsorption layers. *Advances in colloid and interface science*, 168(1-2), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.010>
9. Ravera, F., Ferrari, M., Santini, E., Liggieri, L. (2005). Influence of surface processes on the dilational visco-elasticity of surfactant solutions. *Advances in colloid and interface science*, 117(1-3), 75–100. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2005.06.002>
10. Lucassen, J., Van Den Tempel, M. (1972). Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science*, 27(6), 1283–1291. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(72\)80104-0](https://doi.org/10.1016/0009-2509(72)80104-0)
11. Chang, C. H., Franses, E. I. (1995, July 25). Adsorption dynamics of surfactants at the air/water interface: a critical review of mathematical models, data, and mechanisms. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)03061-4](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)03061-4)
12. Noskov, B. A. (2010, August). Dilational surface rheology of polymer and polymer/surfactant solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.01.006>
13. Marze, S. (2009). Relaxation processes of PGPR at the water/oil interface inferred by oscillatory or transient viscoelasticity measurements. *Langmuir*, 25(20), 12066-12072. <https://doi.org/10.1021/la9016849>
14. Noskov, B.A. Dynamic surface elasticity of polymer solutions. *Colloid Polym Sci* **273**, 263–270 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF00657833>

15. Malzert, A., Boury, F., Saulnier, P., Benoit, J. P., Proust, J. E. (2002). Rheological Study of Lysozyme and PEG2000 at the Air– Water and Dichloromethane– Water Interfaces under Ramp Type or Sinusoidal Perturbations. *Langmuir*, 18(26), 10248-10254.
16. Monroy, F., Rivillon, S., Ortega, F., Rubio, R. G. (2001). Dilational rheology of Langmuir polymer monolayers: Poor-solvent conditions. *The Journal of chemical physics*, 115(1), 530-539.
17. Chang, C. H., Franses, E. I. (1995, July 25). Adsorption dynamics of surfactants at the air/water interface: a critical review of mathematical models, data, and mechanisms. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)03061-4](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)03061-4)
18. Schöne, A. C., Roch, T., Schulz, B., Lendlein, A. (2017). Evaluating polymeric biomaterial-environment interfaces by Langmuir monolayer techniques. *Journal of the Royal Society, Interface*, 14(130), 20161028. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.1028>
19. Wege, H. A., Holgado-Terriza, J. A., Gálvez-Ruiz, M. J., Cabrerizo-Vílchez, M. A. (1999). Development of a new Langmuir-type pendant-drop film balance. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 12(3–6), 339–349. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00088-5)
20. Ah-Fat, N. M. W., Craig, D. Q. M., Taylor, K. M. G. (1994). An investigation into the effects of surfactants on phospholipid monolayers using a Langmuir-Blodgett film balance. *International Journal of Pharmaceutics*, 107(3), 239–242. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90440-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90440-5)
21. Del Río, O.I., Neumann, A.W., 1997. Axisymmetric drop shape analysis: Computational methods for the measurement of interfacial properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops. *Journal of Colloid and Interface Science* 196, 136-147. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5214>

22. Hoorfar, M., & W. Neumann, A. (2006, September 13). Recent progress in Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA). *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.06>.
23. Rotenberg, Y., Boruvka, L., & Neumann, A. W. (1983). Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. *Journal of Colloid And Interface Science*, 93(1), 169–183. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(83\)90396-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(83)90396-X)
24. Kalantarian, A., Saad, S. M. I., & Neumann, A. W. (2013). Accuracy of surface tension measurement from drop shapes: The role of image analysis. *Advances in Colloid and Interface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.07.004>
25. Koppel, D. E. (1972) Analyse de la multi dispersion macromoléculaire en spectroscopie de corrélation d'intensité : La méthode de Cumulants. *J. Chim. Phys.* 57 : 4814-20.
26. Frisken, B. J. (2001) Revisiter les méthodes de cumulants pour l'analyse des données dynamiques de dispersion de la lumière. *APPL. OPT.* 40 : 4087-91
27. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1002>

***Chapter 2. Study of surfactants
cross-linking by click
chemistry on a model water/oil
interface***

Chapter 2. Study of surfactants cross-linking by click chemistry on a model water/oil interface
48

1	Introduction	50
2	Materials and methods	51
2.1	Chemicals	51
2.2	Surface tension measurements	52
2.3	Monitoring of the cross-linking reaction at interface.....	53
2.4	Interfacial rheology	54
3	Results and discussion.....	55
3.1	Study of cationic surfactant (compound 1) at the water / oil interface and CMC determination	55
3.2	Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2)	61
3.3	Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2) after washing	66
4	Conclusion.....	69
5	References	70

1 Introduction

In the design of drug delivery systems, the control of the surface composition is of prime interest. In the case of matrix particles,¹ this interest is generally related to the decoration with agents that impact the fate *in vivo*, enabling active targeting mechanisms, or in contrast, developing stealth properties. In the case of lipid particles, or in emulsion systems in general, which present considerable advantages over the other types of particles, like safety and loading capabilities,²⁻⁴ the dynamic liquid / liquid interface can be a limit to the stability of the decoration.⁵

Since adsorption of small molecular weight species is an equilibrium between molecules at the interface and solubilized in the bulk, adsorption can be reversible. Some literature reports describe an adsorption of the functional lipids that can be decorated afterwards,^{6,7} however the potentiality of unhooking of the ligand from the interface might remain a possibility.

In that context, we have proposed pioneer study⁸ on the use of preformed amphiphilic and functional polymers placed at the interface, able to propose an important droplet decoration along with a strong anchorage in the particle. Herein, the idea is other, and we propose to consider the *in situ* fabrication of high molecular weight entities at the water oil / interface, that could be an interesting alternative solution of this issue, and the main idea that have initiated the present study. Indeed, amphiphiles macromolecules will, as well, potentially desorb from the interface, but with an ability and a diffusion coefficient significantly lower compared to small molecular weight surfactants. In addition, creating a molecular cage onto the droplet interface can also improve the stability of the droplet itself and slows down the destabilizing processes of the emulsions.

Herein we will study the behavior of a cationic surfactant presenting three alkynes as terminated hydrophilic part, and study its reaction with a crosslinking agent soluble in the bulk phase, and presenting two azides functions (in presence of catalyzers sodium ascorbate and Cu^{2+} , all the different molecules are presented in the experimental section below). The monolayers are

formed in model interface made with rising drops of cyclohexane in a bulk aqueous phase, and the surface tension was measured according to the axisymmetric drop shape analysis method (drop tensiometer). One objective is the understanding of the fabrication and *in situ* formation of such a cage at the oil / water interface, comparing the monolayer properties of the surfactants alone, with the one and after all the chemical reaction after washing all free molecules. Further characterizations of the interfaces were led through measurement of dilatational elasticity, thus allowing to explore and understand the behavior of the intermolecular interactions within the monolayer.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Cationic surfactant, compound **1** (reported in Fig. 1), namely 4-(dodecyloxy)-benzyltripropargylammonium bromide, was synthesized as previously in previous work.⁹ The crosslinker, compound **2** (reported in Fig. 1), is a bi-functional fluorescent cyanine, namely N-(3-azidopropyl)-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-aminium 4-methylbenzenesulfonate, was synthesized as described in our previous works.¹⁰ Cyclohexane, copper sulfate and sodium ascorbate were purchased from Sigma.

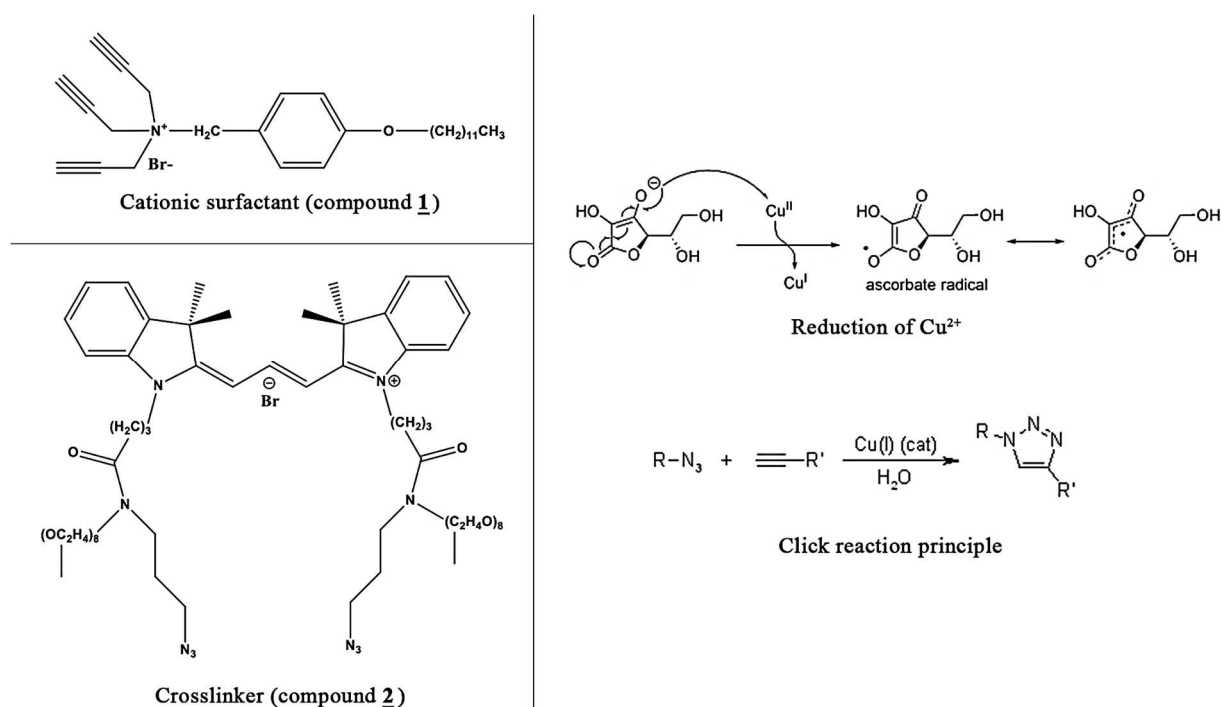


Figure 1: Chemical structures of the molecules used in this study, as surfactant (4-(dodecyloxy)-benzyltripropargylammonium bromide, compound **1**), and crosslinking agent (N-(3-azidopropyl)-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-aminium 4-methylbenzenesulfonate, compound **2**); and principle reactions of the click chemistry occurring in presence of catalyzers (sodium ascorbate and Cu²⁺).

The chemical reaction undertaken is a classical click reaction, performed in presence of copper I, reduced by sodium ascorbate, as schematically presented in Fig. 1.

2.2 Surface tension measurements

Axisymmetric drop shape analysis method (ADSA) using a Tracker drop tensiometer (Teclis, Longessaigne, France), was used to measure the dynamic surface tension γ at the cyclohexane / water interface (see Fig. 1). A rising drop (oil) was formed in ultrapure water (MilliQ Filtration System) containing compound **1** (cationic surfactant) at different concentrations detailed below. Both volume and temperature were controlled. The drop profile was recorded in real-time with a video camera, and its Laplacian shape gave the values of interfacial area and surface tension. All the experiments were performed in triplicate. As shown in Fig. 2, the cuvette is equipped of a water renewing systems that will be used to wash the

water from reagents and catalyzers in the following steps described below.

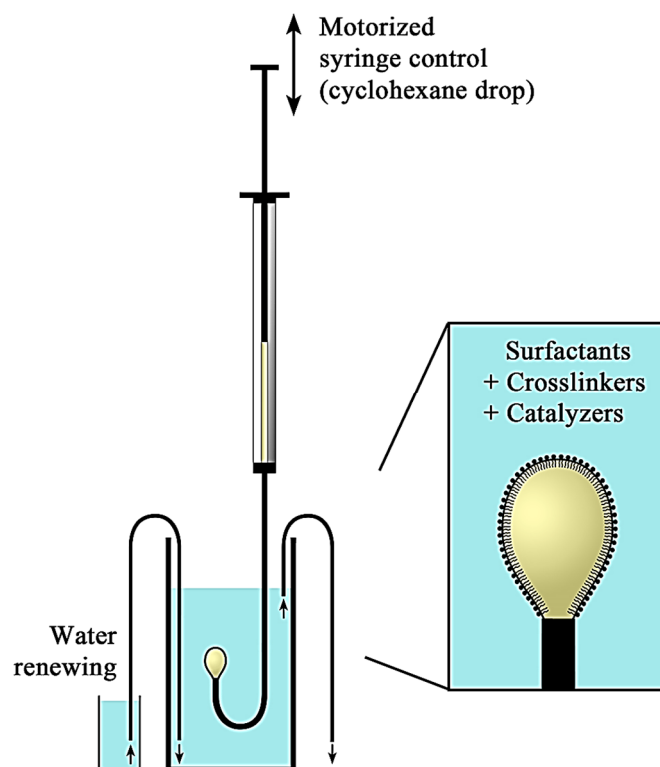


Figure 2: Experimental setup for the study of the monolayer, follow-up of the surface tension and interfacial rheology, along the successive addition of the different reagents and modification of the composition of the interface. Surfactants, crosslinkers and catalyzers are added in the aqueous phase. The water circulation allows washing the bulk water phase.

2.3 Monitoring of the cross-linking reaction at interface

The oil drop is formed in the cuvette containing surfactant **1**, sodium ascorbate and CuSO_4 (catalyzers, at 2.4 mM and 1.2 mM, respectively) and the interface let stabilized during 3h at 40°C. Then, compound **2** (cross-linking agent) was added in the cuvette. The molar concentrations of the compounds **1** and **2** were chosen according to $[\text{compound } 2] = 1.5 \times [\text{compound } 1]$, in order to respect the proportions between reactive sites present on the polar head of the surfactant **1** (3 alkynes as reactive sites), and those in the crosslinker **2** (2 azides as reactive sites), as illustrated in Fig. 1. The cross-linking click reaction was let for 24 h in a first series of experiments, and for 9 h in a second one for which the aqueous phase was washed

(through bulk phase exchange) at the end of this time-lapse.

2.4 Interfacial rheology

Sinusoidal variations of the interfacial area are imposed to the drop area through the syringe piston, and the sinusoidal surface tension response was recorded, providing the dilatational elastic modulus. Two types of experiments were performed:

(i) the follow-up of dilatational elasticity in function of the time, for which the selected frequency was 0.016 Hz and the amplitude of the imposed sinusoidal area variation did not exceed 3.2% of the cyclohexane drop area. The sinusoidal solicitations are performed with small amplitudes in order to ensure that all measurements are in the linear viscoelastic regime.

(ii) the follow-up of dilatational elasticity in function of the frequency. The system is let reaching the equilibrium before performing rheology experiments. Frequencies were chosen to follow a log scale: 0.01, 0.016, 0.022, 0.033, 0.05, 0.066, 0.10, and 0.16 Hz.

Interfacial rheology experiments were performed once equilibrium is reached, and typically provide values for the dynamic elasticity $E'(\omega)$ and the loss modulus $E''(\omega) = \omega\kappa(\omega)$, where ω is the angular frequency and $\kappa(\omega)$ the dilatational viscosity. Theoretical aspects regarding their evaluation from experimental data with a drop tensiometer are detailed in previous work.¹¹ For small sinusoidal deformation, the viscoelastic theory describes the linear response of the interface in the form of complex modulus

$$\tilde{E}(\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega) \quad (1)$$

In that case of soluble monolayers at equilibrium, one important characteristic of the monolayer is the Gibbs elasticity $E_0 = \lim_{\omega \rightarrow \infty} E'(\omega)$, a static elasticity corresponding to the high frequency limit.

3 Results and discussion

3.1 Study of cationic surfactant (compound 1) at the water / oil interface and CMC determination

Compound **1** showed a significant effect at the water / oil interface, and this first set of experiments was conducted to characterize its interfacial behavior and determine its critical micelle concentration (CMC) value. Different adsorption kinetics were followed at 25°C, inducing a drop of the surface tension to below 20 mN/m, to stabilize around 17 mN/m after reaching the CMC. These stabilized values are reported in Fig. 3, showing a very clear behavior of a self-aggregating water-soluble surfactants that form micelles, with a quite high reproducibility. The CMC is thus determined around 4.8×10^{-3} g/L at the intersection of the two straight lines.

Interestingly, this representation allows evaluating the specific interfacial area Σ and the specific interfacial coverage concentration $\Gamma = 1/\Sigma$ of the molecule **1** when adsorbed at the air/water interface at the CMC, according to the following Gibbs adsorption equation (Eq. 2)

$$\Gamma = -\frac{1}{\mathcal{N}_a \cdot k_B \cdot T} \cdot \frac{d(\gamma)}{d(\ln(C))} \quad (2)$$

where \mathcal{N}_a is Avogadro number, k_B the Boltzmann constant, T the temperature and C the concentration of compound **1** in water. It gives a value equal to $\Gamma_{\mathbf{1}} = 1.12 \text{ mg/m}^2$, which is coherent with the one expected for a low molecular weight surfactant with three reactive functions as described in Fig. 1. In comparison,^{12,13} sodium dodecyl sulfate (SDS) have an interfacial coverage concentration of $\Gamma_{\text{SDS}} = 0.92 \text{ mg/m}^2$ and for human serum albumin (HSA) it is equal to $\Gamma_{\text{HSA}} = 11.6 \text{ mg/m}^2$. Thus, surfactant **1**, which appear slightly larger than SDS with terminated with three alkynes, has a value of $\Gamma_{\mathbf{1}}$ indeed coherent with the formation of a monolayer at the water/oil interface.

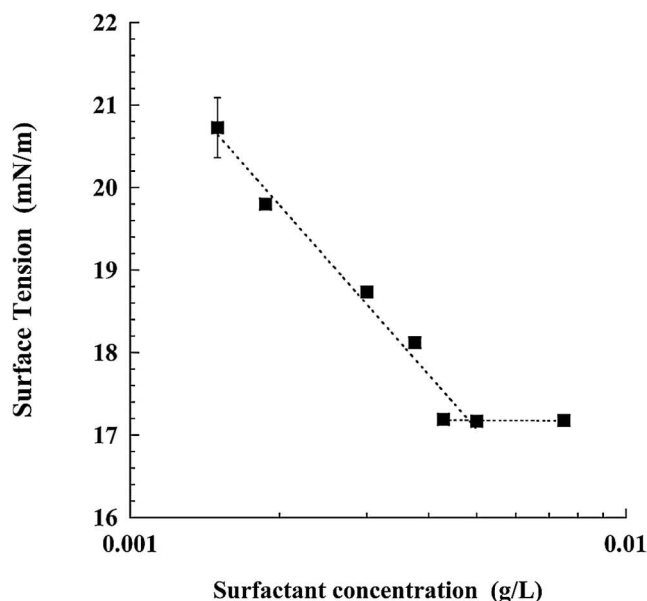


Figure 3: Stabilized values of the surface tension of surfactant (compound **1**), at the C₆H₁₂/ water interface, represented against its concentration in water (n = 3).

The properties of five selected monolayers were specifically studied, before the CMC (0.0015 g/L, 0.0019 g/L, 0.003 g/L, 0.00375 g/L) and after the CMC (0.0075 g/L). The results are reported below in Fig. 4, representing the dynamic elasticity and loss modulus in function of the frequency of the sinusoidal solicitation imposed to the cyclohexane drop. We can note a gradual increase of E' with frequency up to a stabilization that trends to E_0 , values determined below. Interestingly, the values of E'' are non-negligible, typically between 5 and 10 mN/m, meaning that dissipative phenomena plays a role in the interfacial interactions, either linked to adsorption/desorption or to interfacial reorganization of the molecules adsorbed. For the lower concentrations ($C < 3.0 \cdot 10^{-3}$ g/L), E'' values appear independent to the pulsation, and for increasing concentrations, they slowly decrease with ω . As the lower values of the loss modulus E'' means that the monolayer trend to pure elastic behavior, one can conclude that considering the higher number of molecules at interface at this range of concentration, the high-frequency solicitation slows down the ratio of surfactant that can adsorb and desorb, which is not the case for low surfactant concentration. In order to investigate the validity of such interpretation,

further studies of these results are undertaken as follow.

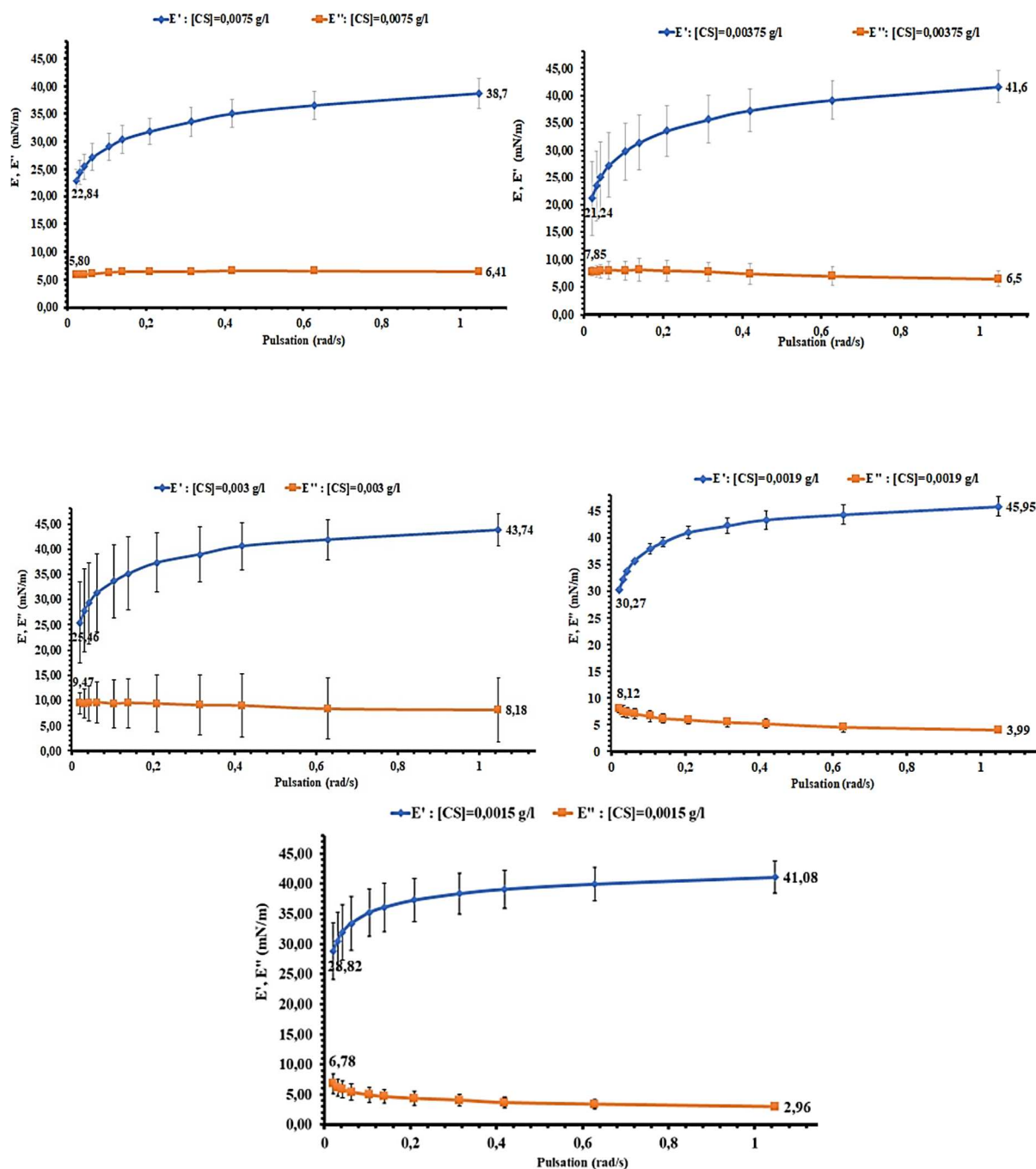


Figure 4: Dilatational rheology (E' and E'' against pulsation) of monolayers made with compound **1** at the C_6H_{12} / water interface, at different concentrations before the CMC (0.0015 g/L, 0.0019 g/L, 0.003 g/L, 0.00375 g/L) and after the CMC (0.0075 g/L). $T = 25^\circ C$ and $n = 3$.

In principle, such a soluble monolayer is compatible with the mathematical description of Lucassen and van den Tempel (LvdT).^{14,15} The main hypothesis of the LvdT model is

considering that the diffusion of the surfactants is the limiting phenomenon without energy barrier (*i.e.* upon adsorption and desorption). LvdT express the conservative and dissipative parts of elastic modulus according to Eq. (3) and (4), respectively:

$$E'(\omega) = E_0 \frac{1+\Omega}{1+2\Omega+2\Omega^2} \quad (3)$$

$$E''(\omega) = E_0 \frac{\Omega}{1+2\Omega+2\Omega^2} \quad (4)$$

with E_0 is the elasticity at high frequencies for which the increase of the interfacial area only 'dilutes' the interface, expressed as:

$$E_0 = \frac{dy}{d\Gamma} \Gamma \quad (5)$$

and Ω is the reduced angular frequency $\Omega = (\omega_D/\omega)^{1/2}$. The characteristic angular diffusion frequency ω_D is related to the diffusion coefficient D , the bulk and surfaces concentration c and Γ , as:

$$\omega_D = \frac{D}{2} \left(\frac{\partial c}{\partial \Gamma} \right)^2 \quad (6)$$

Interestingly, the value of ω_D represents the frontier between viscous friction regime (when $\omega < \omega_D$ and elastic regime when $\omega > \omega_D$).

Herein the LvdT is applied to the monolayers made with compound **1**, and at the different concentrations presented above in the concentration curve. The results were reported in Fig. 5, and the corresponding values of ω_D and E_0 in the Table 1. As a first observation, we can consider that the LvdT can be applied for the lower concentrations, $1.5 \cdot 10^{-3}$ and $1.9 \cdot 10^{-3}$ g/L, meaning that diffusion leading to their adsorption and desorption is the limiting phenomenon

upon energy threshold due to interfacial interactions. On the other hand, for higher concentrations, $3.0 \cdot 10^{-3}$ and $3.75 \cdot 10^{-3}$ g/L the application is less obvious notably with the gap between the theoretical curve of E'' and experimental points, but taking into account both E' and E'' , one can consider that there is still a global cohesion between experiment point and the LvdT model. This could reveal a modification of the inter-molecular interactions, increasing the adsorption/desorption energy barriers to the detriment of the diffusion phenomena. Finally, the LvdT model cannot be applied for the highest concentration, $7.5 \cdot 10^{-3}$ g/L, above the CMC, for which intermolecular interactions and energy barriers seems not negligible and seems to predominate over the diffusion phenomena.

As comparing the different curves in which we consider the LvdT can be applied, the values of E_0 appears relatively constant, around 45 mN/m (between 43 and 48 mN/m) and the characteristic angular diffusion frequency ω_D is gradually increasing with ω . This is an expected behavior since as the concentration increases at interface, the intermolecular bi-dimensional interaction and friction, likely increases too.

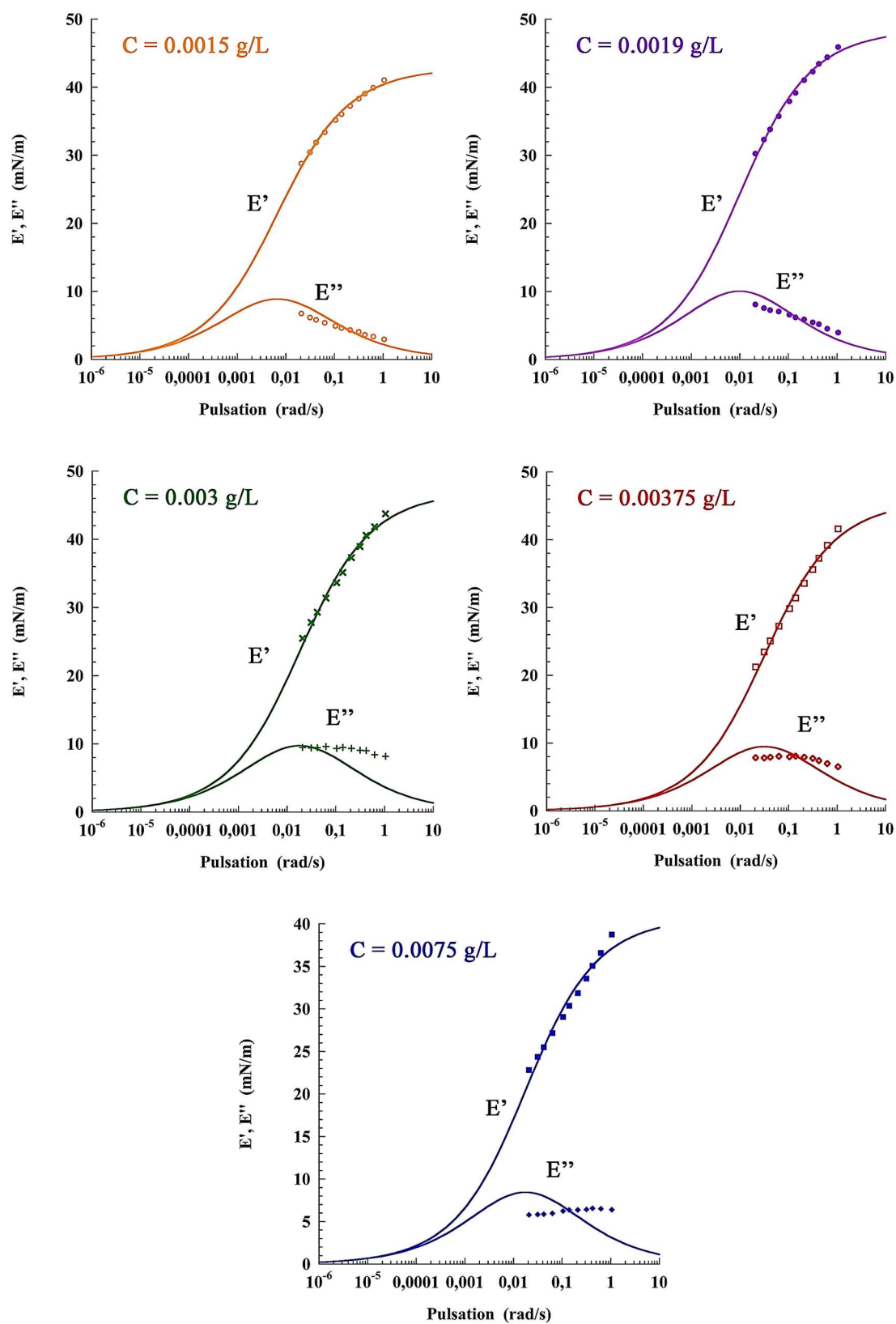


Figure 5: Application of the LvdT mathematical model on dilatational rheology results made with monolayer of compound 1.

Table 1: Characteristic values of the dilatational rheology experiments, with compound **1**, with application of the LvdT model (Fig. 5 and Eq. 3 and 4). Gray line means that LvdT is not working at this concentration.

Concentration (10^{-3} g/L)	E_0 (mN/m)	ω_D (10^{-3} rad/s)
1.5	42.8	3.3
1.9	48.5	4.9
3.0	47.0	9.0
3.75	45.7	15.7
7.5	40.7	8.7

3.2 Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2)

After 3 hours of stabilization of the monolayer (composed with surfactant **1** and catalyzers, at 40°C), the crosslinkers were added at molar ratio of $[2] = \frac{3}{2} \times [1]$ corresponding to the ratio between available reactive sites (as discussed above). Then, dilatational dynamic elasticity E' was followed-up at fixed frequency (0.016 Hz), every 1000 seconds. As a comparison, control experiment without crosslinker **2** (but still with catalyzers) were also conduct in exactly similar experimental conditions. A representative example of the profile of the surface tension curves, from the drop formation to the end of dilatational rheology experiments, were reported in Fig. 6 (a) and (b), with and without crosslinkers, respectively.

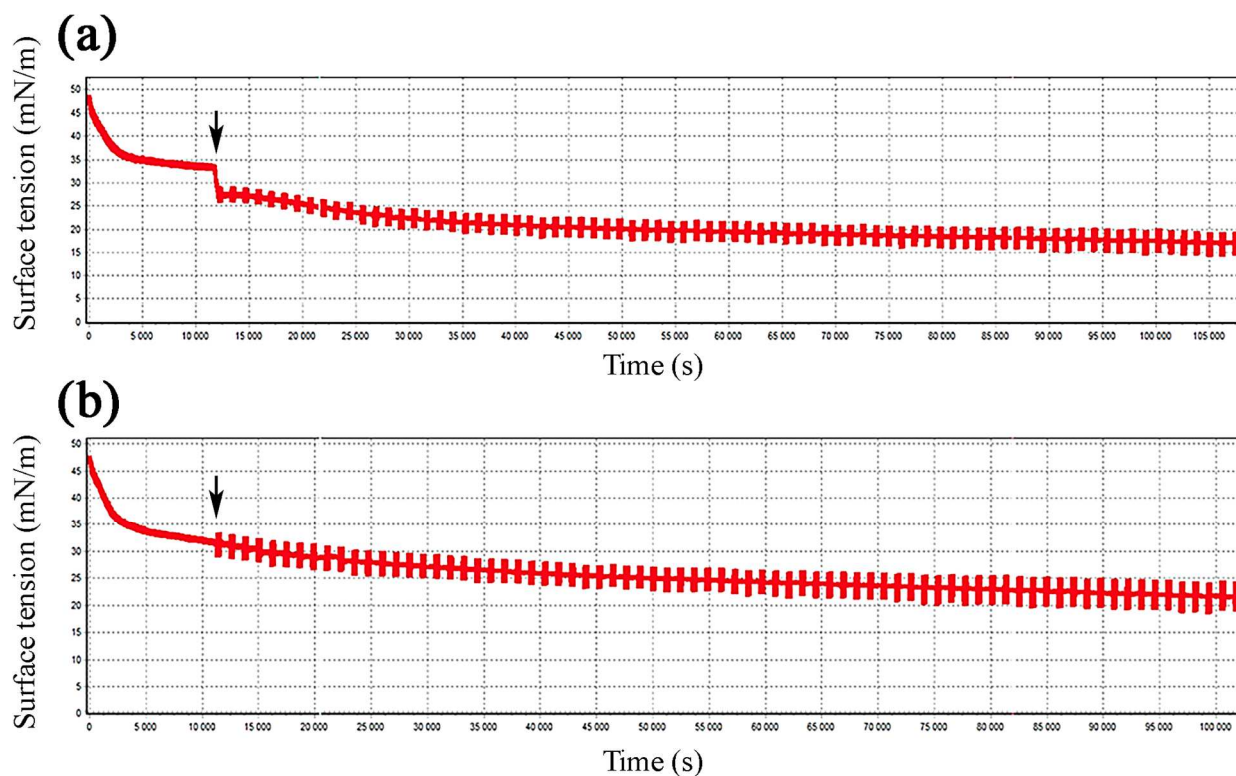


Figure 6: Overview of the experiments worked out for the characterization of the interfacial crosslinking of surfactant **1** with crosslinker **2**; (a) regular experiment with crosslinker and catalyzers, and (b) control experiment without crosslinker (and with catalyzers). Arrows indicate the moment of crosslinker addition (in (a)) and the beginning of dilatational surface rheology follow-up ($f = 0.016$ Hz every 1000 s).

Then, this experiment is conducted at three different concentrations of surfactant **1**, $0.1 \times \text{CMC}$, CMC and $3 \times \text{CMC}$, in Fig. 7 (a), (b) and (c), respectively, and the corresponding values of surface tension are reported in Fig. 8 (a), (b) and (c).

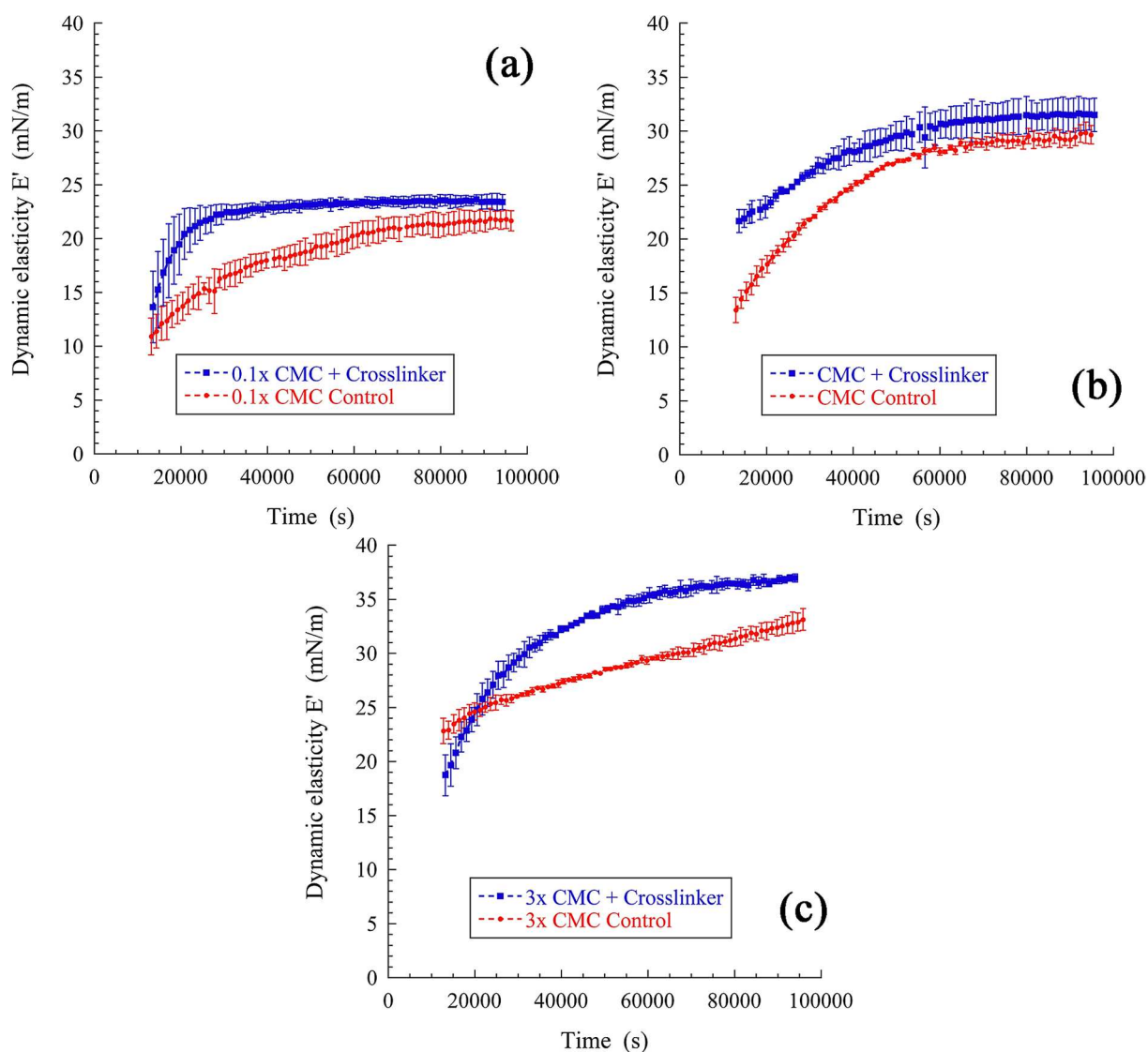


Figure 7: Dilatational dynamic elasticity (E') measured on monolayers of surfactant **1** and catalyzers after stabilization, with and without of crosslinker **2**, for three different concentrations of compound **1** (and thus also of compound **2**): 0.1×CMC, CMC and 3×CMC; $n=3$.

It is clear that the addition of crosslinker **2** affects the properties of the monolayer making increase its dynamic elasticity E' on a gradual manner. The loss modulus E'' remains generally constant with a very low value close to zero, for all experiments. The reason of such a modification of the monolayer behavior lies in the continuous ripening of the interface due to the gradual reorganization of the molecules, and probably helped by the sinusoidal sollicitation over time. The control without crosslinker **2** is the best illustration since it also shows a slight evolution over the 9 hours of the rheology experiment. The value of dynamic elasticity trend to

increase and stabilize, and since E'' is close to zero over all experiment, we can consider $E^* \sim E'$, the monolayer purely elastic and its due to the enhancement of intermolecular bi-dimensional interactions.

Nevertheless, in presence of crosslinker **2**, the kinetics of the elasticity increase is slightly faster, with a maximum difference about 10 mN/m, and at stabilization, the two curves arrive close each other. This means that compound **2** has an interaction with the monolayer, either inducing a crosslinking of **1**, either not (we cannot conclude at this stage). This observation is confirmed by considering the values of the surface tension γ over such a follow-up, reported in Fig. 8, in which the presence of crosslinker **2** in the solution induces a significant gap between the two experimental conditions.

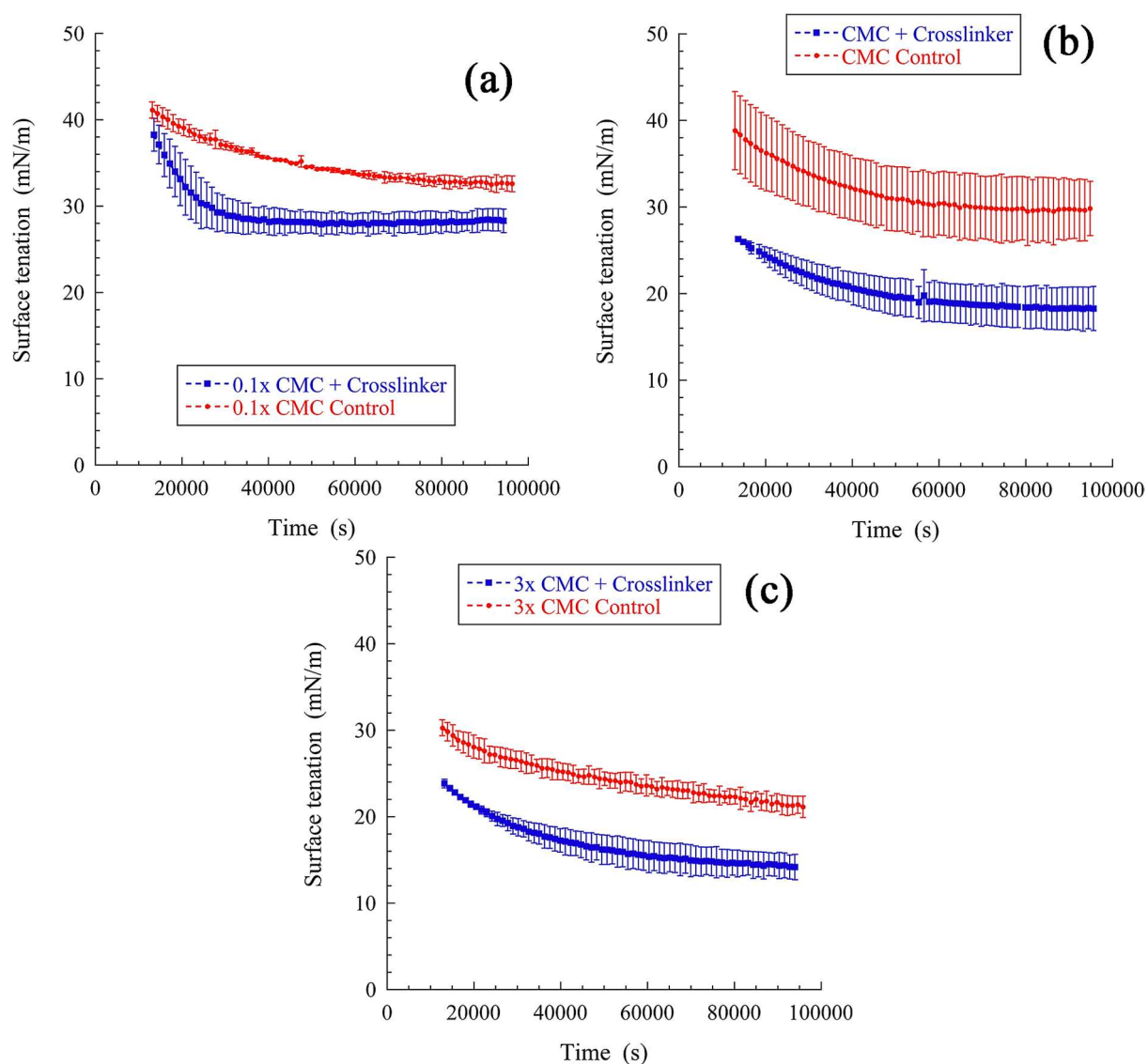


Figure 8: Surface tension (γ) measured on monolayers of surfactant **1** and catalyzers after stabilization, with and without of crosslinker **2**, for three different concentrations of compound **1** (and thus also of compound **2**): 0.1xCMC, CMC and 3xCMC.

The comparison of the three concentrations followed also show a clear evolution of the elasticity and of the surface tension. The higher the concentration, the higher the elasticity and the lower the surface tension. Along with the fact that loss modulus is still close to zero, this interesting result corroborates the conclusion that the molecules adsorbed at the interface are strongly trapped and interact together *-i.e.* with a limited adsorption /desorption and negligible *in situ* reorganization. As well, it seems that adding the compound **2**, trend to increase the

interfacial molecular concentration, directly impacting the surface tension, and proportionally to the concentration. To summarize, the aim of this experiment was evidencing a quantitative difference upon addition of crosslinker **2**, compare to a control experiment without, and the results reported in Fig. 7 and 8 are able to fill this first objective.

3.3 Study of mixed monolayers made of cationic surfactant (compound 1) and crosslinker (compound 2) after washing

The next steps will be study of the mixed monolayer without interference of the free compounds and catalyzers present in the bulk phase. To this end, we have performed a gradual washing of the bulk surrounding water through the bulk phase exchange in the cuvette. As a result, water containing reactional media is gradually removed and replaced for fresh and clean water. This approach also assumes that through the equilibrium between interface and sub-phase, the non-crosslinked entities adsorbed at the interface will be also washed and gradually removed.

After letting the reaction to occur during 9 hours, as in the last section, the washing is performed during 30 min at a rate of about 21 cm³/min. Then the bulk phase exchange is stopped, and the rheological study is led in function of the frequency, as it was described in section 3.1 for the pure monolayers of surfactant **1**. As studied in the last subsection, three different concentrations were tested: concentration of surfactant **1** equal to 0.1×CMC, CMC and 3×CMC and the results are presented in Fig. 9 (a), (b) and (c), respectively.

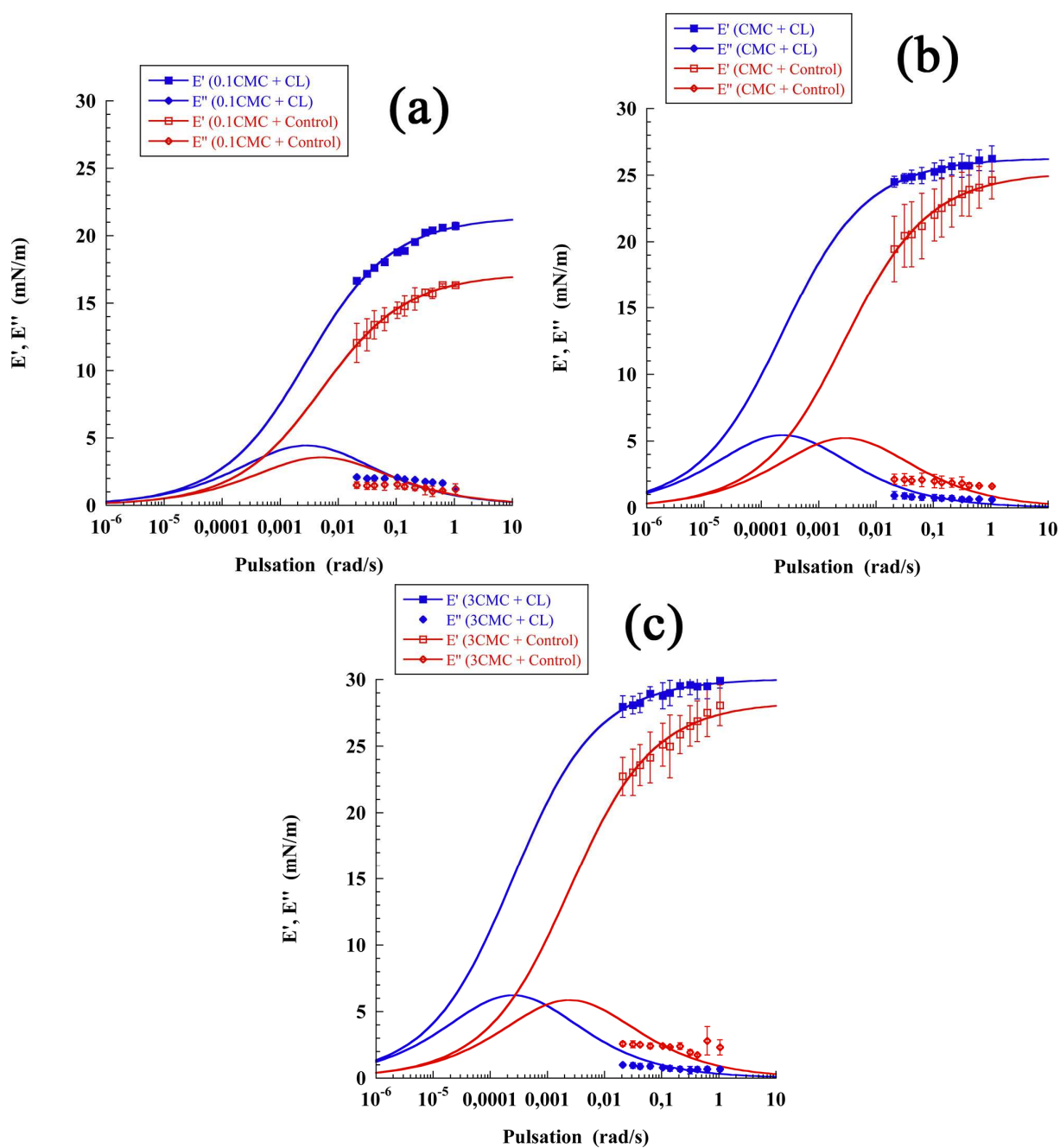


Figure 9: Dilatational rheology (E' and E'' against pulsation) of monolayers made with compound **1** and **2** at the C_6H_{12} / water interface, at three different concentrations of compound **1**: $0.1 \times CMC$, CMC and $3 \times CMC$. Experiments were conducted after washing the aqueous bulk phase; $n = 3$.

Table 2: Characteristic values of the dilatational rheology experiments, of mixed layer made with compound **1** and **2**, with application of the LvdT model (Fig. 9 and Eq. 3 and 4). Gray part is the control experiments without compound **2**.

Concentration of 1	E_0 (mN/m)	ω_D (10^{-3} rad/s)
0.1 \times CMC	21.4	1.4
CMC	26.3	0.12
3 \times CMC	30.0	0.12
0.1 \times CMC	17.2	2.6
CMC	25.2	1.4
3 \times CMC	28.3	1.2

Interestingly, in presence of crosslinker **2** the monolayers show a significantly different rheological behavior compared to control. Indeed, after washing the different free molecules and catalyzers, we can assume that monolayer is only composed of compounds strongly anchored to the water / oil interface, like crosslinked polymers. Accordingly, it seems that in presence of crosslinker, the properties of the monolayers have been modified, and thus that the interfacial crosslinking has probably –or partially– been performed.

In addition, we can consider the different curves to follow the LvdT model, for both the crosslinked and control monolayers. This means that even if the molecular weight of the compounds adsorbed increases, the diffusion remains the main limiting phenomenon resulting of the sinusoidal solicitation of the monolayers. Even for the higher concentrations at the CMC, or above, 3 \times CMC, when a reorganization of the molecules dominated or diffusion, now it is not the case anymore and we can consider the diffusion as limiting in all cases.

By comparing the curves, values of E_0 appears relatively close each other –still with values slightly higher with the crosslinker **2**– while the main difference comes from values of the characteristic angular diffusion frequency ω_D for which the difference with and without crosslinker reaches a factor 10 from the CMC. This is an interesting result, coherent with the fact that in the case of a crosslinking of the surfactant **1**, the molecular weight of the molecules trapped at the interface increases and their diffusion and mobility gradually affected.

In addition, in comparison with the results shown in Fig. 5 (comparing Table 1 and Table 2), both values of E_0 and ω_D are sensibly reduced, showing as well the modification of the monolayer.

4 Conclusion

In conclusion, in this study we have proposed an original methodology to explore the interfacial crosslinking of a surfactant able to react with an additional molecule added in the bulk surrounding water. The idea was to compare the monolayer properties, notably the dilatational elasticity before and after the surfactant crosslinking at the interface. Such investigation been a multifactorial study, the conclusions are drawn with indirect observations, but however give rise to significant trends. Herein we have studied a custom-made surfactant containing three alkynes sites (surfactant **1**), and in a second step, a crosslinker presenting two azides sites (compound **2**). After a basic characterization of the CMC and follow-up of the kinetics and equilibria, the main results were obtained through rheological studies, disclosing a clear modification of the dynamic elasticity, and of the diffusing properties of the entities adsorbed at the interface, through the application of the Lucassen and van den Tempel model. This study proposes an original approach to study and monitor the *in situ* modification of a monolayer, allowing emphasizing fine modifications of its properties and thus composition or structure.

5 References

- 1 A. Jakhmola, N. Anton and T. F. Vandamme, *Adv. Healthc. Mater.*, 2012, **1**, 413–431.
- 2 M. F. Attia, N. Anton, M. Chiper, R. Akasov, H. Anton, N. Messaddeq, S. Fournel, A. S. Klymchenko, Y. Mély and T. F. Vandamme, *ACS Nano*, 2014, **8**, 10537–10550.
- 3 A. S. Klymchenko, E. Roger, N. Anton, H. Anton, I. Shulov, J. Vermot, Y. Mely and T. F. Vandamme, *RSC Adv.*, , DOI:10.1039/c2ra21544f.
- 4 V. N. Kilin, H. Anton, N. Anton, E. Steed, J. Vermot, T. F. Vandamme, Y. Mely and A. S. Klymchenko, *Biomaterials*, , DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.02.053.
- 5 X. Li, N. Anton, G. Zuber and T. Vandamme, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, **76**, 116–133.
- 6 E. Bourseau-Guilmain, J. Béjaud, A. Griveau, N. Lautram, F. Hindré, M. Weyland, J. P. Benoit and E. Garcion, *Int. J. Pharm.*, 2012, **423**, 93–101.
- 7 S. Hirsjärvi, S. Dufort, G. Bastiat, P. Saulnier, C. Passirani, J.-L. Coll and J.-P. Benoît, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 6686–6693.
- 8 M. F. Attia, S. M. Dieng, M. Collot, A. S. Klymchenko, C. Bouillot, C. A. Serra, M. Schmutz, M. Er-Rafik, T. F. Vandamme and N. Anton, *Macromol. Biosci.*, , DOI:10.1002/mabi.201600471.
- 9 H.-Q. Peng, Y.-Z. Chen, Y. Zhao, Q.-Z. Yang, L.-Z. Wu, C.-H. Tung, L.-P. Zhang and Q.-X. Tong, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2012, **51**, 2088–2092.
- 10 I. Shulov, R. V Rodik, Y. Arntz, A. Reisch, V. I. Kalchenko and A. S. Klymchenko, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2016, **55**, 15884–15888.
- 11 P. Bouriat, N. El Kerri, A. Graciaa and J. Lachaise, *Langmuir*, 2004, **20**, 7459–7464.
- 12 N. Anton and P. Bouriat, *Langmuir*, 2007, **23** , 9213 9220. DOI:10.1021/la700698d.
- 13 P. Chen, R. M. Prokop, S. S. Susnar and A. W. Neumann, *Proteins at Liquid Interfaces*, Elsevier Ltd, Amsterdam, 1998.
- 14 J. Lucassen and M. Van Den Tempel, *Chem. Eng. Sci.*, 1972, **27**, 1283–1291.
- 15 S. A. Safran, *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces and Membranes*, CRC Press, 1994.

*Chapter 3. Interfacial study
of pH-sensitive lipids
deposited onto a bubble
interface*

<i>Chapter 3. Interfacial study of pH-sensitive lipids deposited onto a bubble interface</i>	71
1 Introduction	73
2 Materials and methods	75
2.1 Chemicals	75
2.2 Surface tension measurements	76
2.3 Lipid deposition and monolayer formation	76
2.4 Compression experiments	78
2.5 Interfacial rheology	79
3 Results and discussion.....	80
3.1 Impact of the bulk pH on the lipid monolayers at the air / water interface.....	80
3.2 Dilatational properties of the lipid monolayers in function of the bulk pH	86
3.3 Comparison with anionic lipid monolayer	89
4 Conclusion.....	95
5 Reference.....	97

1 Introduction

In the treatment of cancer, the clinical use of chemotherapeutics is efficient but also associated to two main drawbacks taken in the benefit-to-risk balance. The lack of specificity and the multidrug resistance (MDR) constitute their main limitations.¹ One important consequence of MDR is the modification of the pH in the tumor microenvironment, *i.e.* decrease and increase in the extracellular medium and in the cytosol, respectively.²⁻⁴ Designing drug carriers that specifically deliver the drug onto the tumor site is of particular interest, by reducing and inhibiting such side effects. In some cases, the pH gradient induced by the MDR is taken benefit as a trigger of drug release, that simplifies the targeting strategy. The most representative example concerns liposomes made with lipids having phosphatidyl-ethanolamine (PE) as polar head, that present a pH-sensitivity and fusogenic properties in acidic conditions. This is induced by a phase transition of the membrane.⁵⁻¹⁰ The PE-lipid bilayers, however, are not stable pure and need a stabilizer like alpha-tocopheryl succinate (α -TOS), oleic acid, palmitoylhomocysteine, or cholesteryl hemisuccinate (CHEMS).^{9,11-13} These reports have emphasized the impact of the sub-phase pH, on the bilayer phase transition, that finally results on the membrane destabilization and liposome destruction. We recently reported a comprehensive study investigating the stability of liposome against pH variations, exploring the incidence of liposomes' composition on this behavior. Playing on chemical nature and concentration of PE-lipids and stabilizers allows a fine equilibration between membrane stability and pH sensitivity, and thus allows tailoring the liposomes' properties and drug's controlled release.¹⁰

Such an approach was an indirect and global approach, focused on the liposome stability, and on the applicative aspects. In contrast, the present work proposes a complementary approach based on the direct investigation of the thermodynamic behavior of monolayers made with pH-sensitive lipids, in order to understand the relationship between pH variation and phase transition.

While the study of insoluble monolayers is generally setup on Langmuir troughs, we propose its transposition on classical axisymmetric drop shape analysis (ADSA) technique. This methodology we previously developed¹⁴ allows studying insoluble monolayers deposited on a bubble interface, with the double advantage (*i*) of controlling the composition of the bulk very easily, through a bulk phase exchange in the cuvette, (*ii*) along with using a very small amount of lipid for each experiment. Therefrom, compression isotherms can be measured several times for the same monolayer, with a gradual pH change stabilized as a difference between each compression.

The lipids used were custom-made model molecules¹⁵ terminated with pH-sensitive cationic and anionic functions, described in Fig. 1 as lipid **1** and lipid **2**, respectively. Compound **1** will provide a cationic lipid at acidic pH (ammonium form), whereas compound **2** will provide an anionic lipid at basic pH (phenate form), with three ethylene oxide blocks, that reinforce its amphiphilic properties. These lipids will be deposited onto the water/air interface of bubbles in ADSA experimental setup, and then after washing and stabilization (see details below in experimental section) the bubble interfacial area is gradually reduced and the monolayer compressed. As a result, the surface pressure is followed-up and the compression isotherms established. In order to complete the study, other set of experiments were conducted at constant bubble interfacial area, with also changing gradually the bulk pH, collecting surface pressure and Gibbs monolayer elasticity. Through these complementary approaches, the phase transitions and monolayer behaviors are clearly disclosed in function of initial compression (*i.e.* monolayer density), revealing potential change of the molecular organization at interface induced by pH modification.

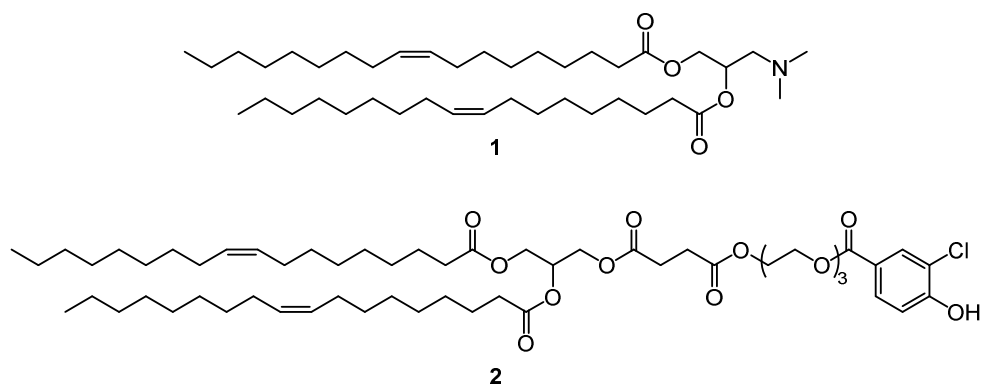


Figure 1: Structures of the two titratable custom-made model lipids investigated in this study. Lipid **1** is 3-(dimethylamino)propane-1,2-diyl dioleate, and lipid **2** is 2,3-bis(oleoyloxy)propyl(2-(2-(2-((3-chloro-4-hydroxybenzoyl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl) succinate.

To conclude, we think this experimental approach can be considered as a new tool in the study of insoluble monolayers and the characterization of their complex behavior at interface, in function of the composition of the sub-phase, and as well along a gradual modification of this composition.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Unless otherwise stated, all chemical reagents were purchased from Alfa Aesar (Bischeim, France) and were used as received. All buffer solutions were prepared with deionized water purified with an EMD Millipore Milli-Q integral system (resistivity $\leq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) and filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ carbonate membrane. The study of the respective ionization behavior of cationic lipid **1** and anionic lipid **2**, in liposomes by fluorescence spectroscopy has been recently reported.¹⁵

2.2 *Surface tension measurements*

Axisymmetric drop shape analysis method (ADSA) using a Tracker drop tensiometer (Teclis, Longessaigne, France), was used to measure the dynamic surface tension γ at the air / water interface. The ADSA is an absolute method, and thus the surface pressure Π is simply obtained as the difference between free water-air surface (γ_0) and covered surface (γ). A rising bubble (air) was formed in ultrapure water (MilliQ Filtration System), and both volume and temperature were controlled. The bubble shape was recorded in real-time with a video camera, and its Laplacian shape gave the values of interfacial area and surface tension. All the experiments were performed at 20°C, in triplicate.

2.3 *Lipid deposition and monolayer formation*

The study of insoluble monolayers deposited onto the interface of the rising bubble (illustrated in Fig. 2) in a drop tensiometer is an original method we recently developed.¹⁴ Compared to conventional techniques to study insoluble monolayers (*e.g.* Langmuir trough), this method presents two very important advantages: (*i*) the first one lies in the easy experimental configuration to perform interfacial rheology and access the viscoelastic properties of the monolayer; (*ii*) the second advantage is the facile modification of the composition of the aqueous phase, which is a fundamental point in the present study that allows varying very finely the pH of the bulk without modification of the monolayer. Actually, the cuvette was equipped with a water-renewing system using two peristaltic pumps for circulation (flow rate: 22 mL/min) (see Fig. 2). The insoluble amphiphiles are beforehand solubilized in chloroform at 193 μM and set in a microsyringe (10 μL). A very small volume of this chloroform containing lipid phase ($< 0.25 \mu\text{L}$) is deposited onto the air bubble previously formed and maintained at 6 μL . The organic phase spreads at the bubble surface, and the needle used to deposit the organic phase is rapidly removed from the solution. The bubble volume is mechanically controlled and set at 8 μL . Bulk water renewing that was turned off during the deposit step is

now turned on in order to extract and remove the chloroform. At this stage, the water circuit is opened (not like in Fig. 2), the extracted water is thrown out and replaced by fresh one. After 10 minutes, the bubble volume is gradually set to 13 μL corresponding to the gaseous state where γ stabilizes at 72 mN/m. Water renewing was maintained during 1000 s for stabilizing the monolayer, before closing the water circulation as presented in Fig. 2. The cuvette is connected to an external beaker that will be used for adding small amounts of HCl (0.1 M) or NaOH (0.1 M) in order to modify the pH of the whole circuit. As well, in function of the experimental configuration, the external beaker can contain the electrode of a pH-meter (as presented in the figure).

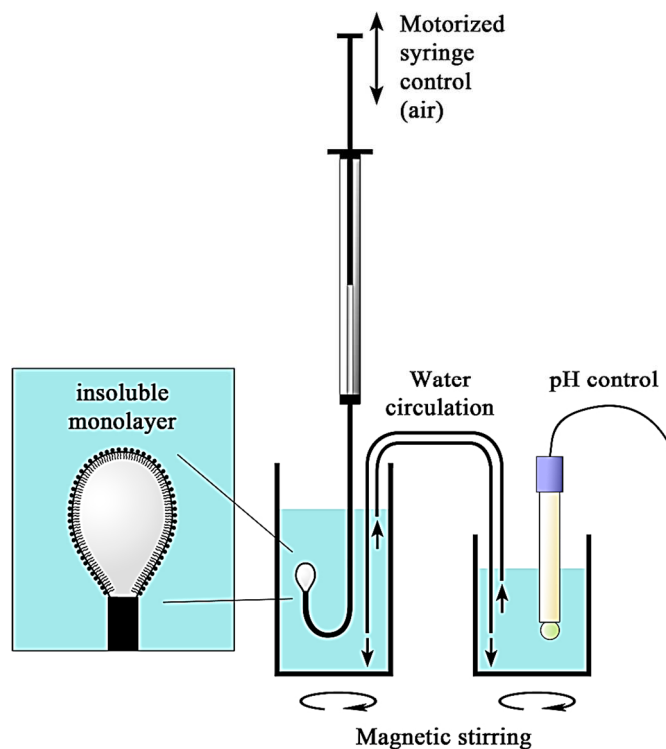


Figure 2: Experimental setup for the study of insoluble monolayer, compression experiments and interfacial rheology. Bubble is setup in the cuvette and the water circulation allows modifying the bulk composition and real-time pH measurement.

2.4 *Compression experiments*

After the monolayer is formed, the pH is brought at values corresponding to the lipid ionized form. In the case of cationic lipid **1**, 1 mL of HCl (0.1 M) was added in the external beaker to give a pH around 3.1, while in the case of anionic lipid **2**, 0.7 mL of NaOH (0.1 M) was added increasing the pH to around 10.1. Then the water circulation is maintained during 3600 s to insure a homogeneous composition of the bulk as well as the stabilization of the monolayer in its ionized form.

Water circulation is stopped and the monolayer compression is performed by decreasing the bubble volume from 13 μL , to either 2-3 μL or to reaching a tension of 25 mN/m. The compression process consists of a linear decrease of the bubble volume over time, according to a compression rate around 3 mm^2/min . As described in our previous study,¹⁴ during all monolayer compressions, the Bond number (Bo) keeps a suitable value $Bo > 0.15$ showing the applicability of the algorithm used in the ADSA method. When the compression is complete, the bubble volume is slowly brought back to 13 μL . The presence of basic electrolyte like (NaCl 50 mM) is necessary in solution for the use of electrode of pH-meter. However, since we observed that the presence of NaCl in the bulk induced a slight shift in the compression curves, the first compression with fully ionized amphiphiles was performed in pure water and will serve as reference for analysis for further analysis. Therefore, 2 mL of NaCl (2.8 M) was added to the external beaker as for fixing the electrolyte concentration at 50 mM, and allowing the measure and following-up of pH during all the experiment. Water circulation is thus turned on and the monolayer let stabilized 1800 s before stopping the circulation and performing a second compression. Then the same protocol was followed adding now an additional volume (variable in function of the pH) of NaOH (0.1 M) or HCl (0.1 M) in the external beaker, for cationic or anionic lipid respectively. The results are thus a set of different compression curves at different

pH going from the ionized form of the lipid towards its neutral configuration.

2.5 *Interfacial rheology*

Sinusoidal variations of the interfacial area are imposed to the drop area through the syringe piston, and the sinusoidal surface tension response was recorded, providing the dilatational elastic modulus. Selected frequency was 0.016 Hz and the amplitude of the imposed sinusoidal area variation did not exceed 3.2% of the bubble area. The sinusoidal solicitations are performed with small amplitudes in order to ensure that all measurements are in the linear viscoelastic regime.

In contrast with the compression experiments described above, and in order to study the direct impact of the pH change on the monolayer properties, interfacial rheology measurements were carried out at a fixed compression, and for different pH. The cationic lipids (lipid **1**) were deposited following a similar protocol than the one described above: (i) after deposition the monolayer was washed 1000 s, (ii) the water circulation circuit was closed and turned on, (iii) pH was decreased around 3.1 (as described above, through addition of 1 mL HCl, 0.1 M in the external beaker), (iv) the monolayer was stabilized during 3600 s under water circulation, (v) the compression was performed up to a selected value of $P_0 = 5, 7, 9, 20$ or 30 mN/m, (vi) NaCl concentration was set at 50 mM and let stabilized 1800 s, (vii) the value of surface tension was noted and rheology experiments were performed at $f = 0.016$ Hz giving the values of elastic modulus E and the loss angle ϕ (theoretical aspects regarding their evaluation from experimental data with a drop tensiometer are detailed in previous work¹⁶), (viii) a volume of NaOH 0.1 M (variable in function of the pH) was added to induce a pH increment of the bulk, and the monolayer was let stabilized 1800 s. Now steps (vii) and (viii) are followed successively up to the range of pH is covered. Then the whole protocol is redone with another value of Π_0 .

3 Results and discussion

3.1 *Impact of the bulk pH on the lipid monolayers at the air / water interface*

Let us first interest on the study of a monolayer formed with the cationic lipid **1** deposited at the air / water interface of the rising bubble of the tensiometer. The results are summarized in Fig. 3, that shows in (a) the compression experiment, and in (b) the corresponding values of surface pressure performed at constant bubble area. Initial compression at pH = 3.16 in ultrapure (MilliQ) water shows a concave curve regularly growing along compression. At such low pH, the lipids are largely ionized and their monolayer should behave as a homogeneous gaseous phase. Upon addition of electrolyte ([NaCl] in bulk at 50 mM) that actually allows measuring the pH value at 3.16, the curve conserves the same profile and is shifted to the right. Indeed, addition of electrolyte induce the neutralization of some ionized lipids, and since the curve exhibits the same concave shape, one can assume that in presence of salt the monolayer is still in gaseous phase and composed with a mixture of neutral and ionized molecules. In addition, the curve shift towards higher bubble area upon NaCl addition means that the specific area of a neutral molecule is larger than the one in cationic form. A further pH increase at 3.85 and 4.63 still results in an additional shift to the right of the curves. This corroborate the fact that ionized form decreases the specific area of lipids.

At higher pH values (starting from pH = 6.23), curves exhibit a clear break (a shoulder) at $\Pi = 27$ mN/m. This transition is typical of a change of surface state. The fact that the lower part of the curve is still shifting to the right along with pH (as mentioned above) indicates that at low surface pressures the monolayer is still in a gaseous state. It is still composed of a homogeneous mixture of ionized and neutral molecules, containing more and more neutral molecules as pH increase.

On the other hand, for higher pressures, the shoulder indicates the formation of a second phase which must logically be formed by a cluster of neutral molecules. In addition, a further

compression of this charged monolayer also results in neutralizing some ionized lipids. This may be due of the gradual increase of the surface electrostatic potential that gradually increases with the compression. The formation of such a second phase seems to be initiated by the number of neutral lipids, which, above a given threshold (~ 27 mN/m), are sufficient to gather and induce a phase separation.

To summarize, the interfacial behavior of such insoluble monolayer is very sensitive to the pH of the bulk, and can be distinctly divided in two cases: (i) $\text{pH} \leq 4.6$: gaseous state (at all pressures < 40 mN/m) made up of a homogeneous mixture containing few neutrals and a lot of ionized molecules. (ii) $\text{pH} > 6.23$: same gaseous state for the lower pressure ($\Pi < 27$ mN/m), followed for pressures higher than $\Pi > 27$ mN/m, by a second concave curve indicating the formation of a second phase probably made up of neutral molecules surrounded by a gaseous mixture of ionized enriched lipids. .

However, it is important to note that such a result is not common, since we could expect that higher excluded area per molecule for ionized molecules because of electrostatic repulsion. In order to confirm this observation, a second set of experiments as conducted at constant bubble area but with varying pH. The results were reported in Fig. 3(b).

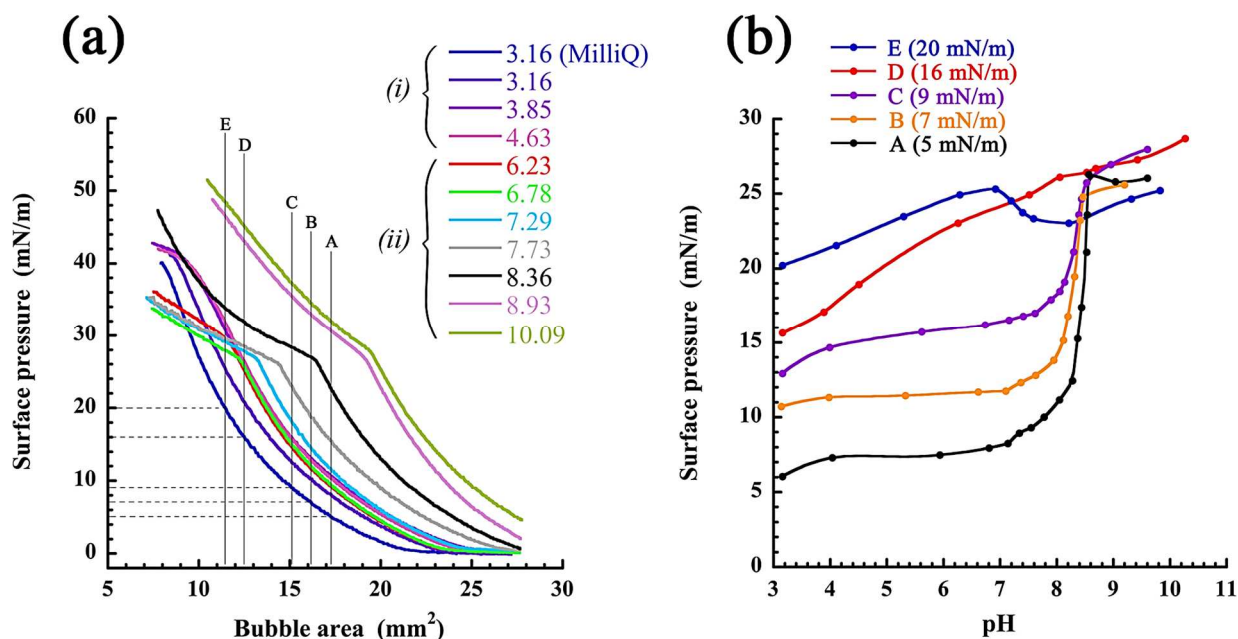


Figure 3: Study of cationic lipid **1** at the air / water interface, in function of pH ([NaCl] = 50 mM). **(a)** Compression experiments, each monolayer compression was performed at constant pH. The indication “MilliQ” means the bulk is pure MilliQ water before addition of NaCl. **(b)** Values of surface pressure in function of pH, each curve is carried out at constant bubble volume, fixed with the initial monolayer compression noted in the figure legend (*i.e.* $\Pi_0 = 5, 7, 9, 16$ and 20 mN/m). The different compression states presented in figure (b) are shown in figure (a) as vertical lines showing the evolution of the monolayer when only the pH is changed.

The initial monolayer compression was performed at pH = 3.16 without NaCl and stopped at a chosen value of the pressure $\Pi_0 = 5, 7, 9, 16$ or 20 mN/m (curves A, B, C, D or E, respectively). These values of Π_0 can be read on the ordinate of horizontal dashed lines in Fig. 3 (a) respective to the initial compression curve in blue for pH = 3.16 without NaCl.

Therefore, the vertical gray lines reported in Fig. 3 (a) correspond to the change of Π in function of pH at constant bubble area and should actually correspond to the results given in Fig. 3 (b). Thus, it appears that the values of Π disclosed in Fig. 3 (b) follow the trend disclosed by these vertical lines in Fig. 3 (a). For curves A, B, C and D, the values of Π undergo a constant increase, while the shape of curve E shows a maximum due to the particular location of the

vertical line that crosses compression curves that intersect with each other. It follows that these two complementary experiments show similar trends and thus confirm the behavior of the compression curves made at different pH presented in Fig. 3 (a). It is to be noted that the values of Π noticeably differ between Fig. 3 (a) and (b) for high surface pressures and pH. It is simply due to the fact that the values of the pressure in the compression curves in Fig. 3 (a) are instantaneous values, while in Fig. 3 (b), they are measured at equilibrium, after 1800s of monolayer stabilization. For the higher pH range, a lot of neutral molecules are already present and then the phase separation is slower. The dispersed phase is the gaseous phase enriched in cations. In fact, one should observe horizontal plateaus instead of concave curves in the upper part of compression curves made above pH = 6.23 if one assumes that those parts correspond to the coexistence of two phases. The fact that for lower pH the curves are more horizontal shows that phase separation occurs more readily when the interfacial mixture contains a fewer amount of neutral molecules. This can also explain why at equilibrium the surface pressure never exceeds 30 mN/m even for the high pH (as opposed as what we can see on compression curves), because monolayers have time to relax during 1800s. In addition, the good agreement observed between the compression experiments (Fig. 3 (a)) and the rheological studies (Fig. 3 (b)) confirms that excluded area per molecule ω increases with pH, and thus when lipids become neutral.

At first sight it is not intuitive since charged surfactants are expected to repel and then have higher ω than neutral one as it is, for instance, described in the literature for calixarenes,¹⁷ but ω can also be impacted by the conformation of the amphiphiles that depend on their affinity with the aqueous phase as described below. The ionized lipids at low pH are *pulled* by the aqueous bulk due to the high affinity of the charged polar head. Their two hydrophobic tails are then forced to get closer to minimize solvation energy by water, decreasing the apparent value of the mean excluded area per molecule ω . On the other hand, the neutral lipids at high pH lose

their affinity for the bulk, *i.e.* are more *confined* at the water/air interface. The un-solvated tails can now deploy under the effect of thermal agitation, finally increasing the value of the apparent ω . This behavior is schematically represented in Fig. 4, showing the ionized lipids as small red disks and neutral lipid as larger blue ones, and for gaseous and bi-phasic states, in Fig. 4 (a) and (b), respectively.

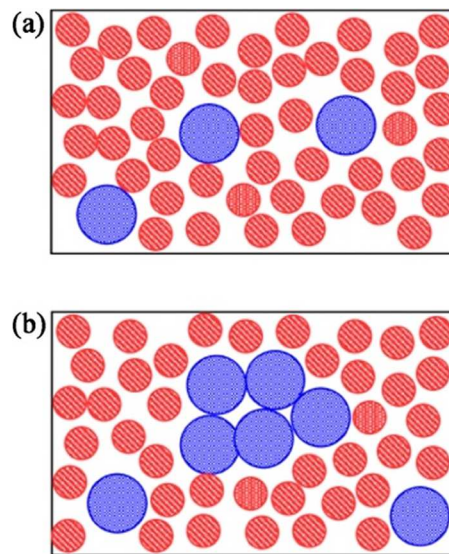


Figure 4: Schematic representation of the interfacial organization of the cationic lipids in function of pH range and compression region. Red and blue disks represent ionized and neutral molecules at interface, respectively. Configuration (a) corresponds to the gaseous state ($\text{pH} < 6$ or before the phase transition for higher pH): homogeneous mixture of ionized and neutral lipids; and configuration (b) corresponds to the bi-phasic state after the phase transition ($\text{pH} > 6$ and $II > 27$ mN/m): neutral molecules gathering as cluster, coexisting with a homogeneous mixture of ionized and neutral lipids.

This schematic representation illustrates the differences in the values of ω between the ionized and neutral forms of lipids and could explain the continuous shift of the curves as pH is increased, as linked to the increase of average ω along with the conversion of ionized to neutral

configurations. It follows that the global shift of the curve highlights the gradual transition between ionized and neutral states of the lipids, and eventually can help to determine the values of an apparent interfacial pKa associated to this ionization. Accordingly, this pKa value can be evaluated through expressing the bubble area that gives a constant given surface pressure within the gaseous domain (*i.e.* below 27 mN/m). This representation for the cationic lipid **1** studied above in Fig. 3, is reported in Fig. 5. In addition, in order to show that this behavior does not depends on Π , the curves were done for $\Pi = 5, 10$ and 20 mN/m (in the homogeneous phase). We can observe a typical sigmoidal curve shape with a very similar shape for the $\Pi = 5, 10$ or 20 mN/m, meaning that the ionized / neutral transition is mainly affected by the pH and not so much by the surface pressure. Eventually, the apparent interfacial pKa for this cationic lipid **1** appears around 8.5, as indicated by an arrow in the figure. This value is actually coherent with the one disclosed with the fluorescent method, as well as with the one expected for the amino function.

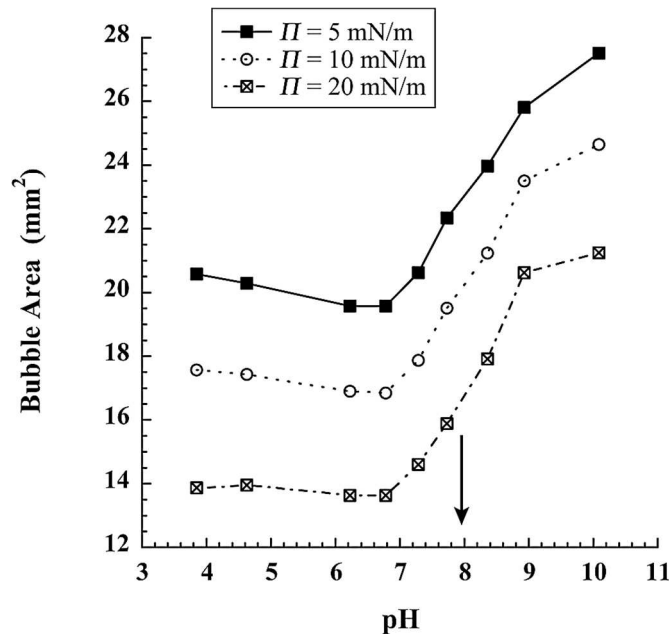


Figure 5: Analysis of the curve shift from compression curves Fig. 3 (a) for cationic lipid **1**, bubble area is expressed at constant pressure (following horizontal lines) in function of pH.

3.2 Dilatational properties of the lipid monolayers in function of the bulk pH

The results and their interpretation presented in the previous section are mainly based on the compression curves and the study of their evolution with pH. Rheological study of the lipid monolayer is performed in order to confirm those results. The dilatational properties of the monolayer of cationic lipids **1** are determined in similar experimental conditions than those chosen for the surface pressure experiments in Fig. 3 (b), for values of the initial compression $\Pi_0 = 5, 7, 9, 16$ or 20 mN/m. The results are reported in Fig. 6, showing the elastic modulus E in part (a) and the corresponding loss angle ϕ in part (b).

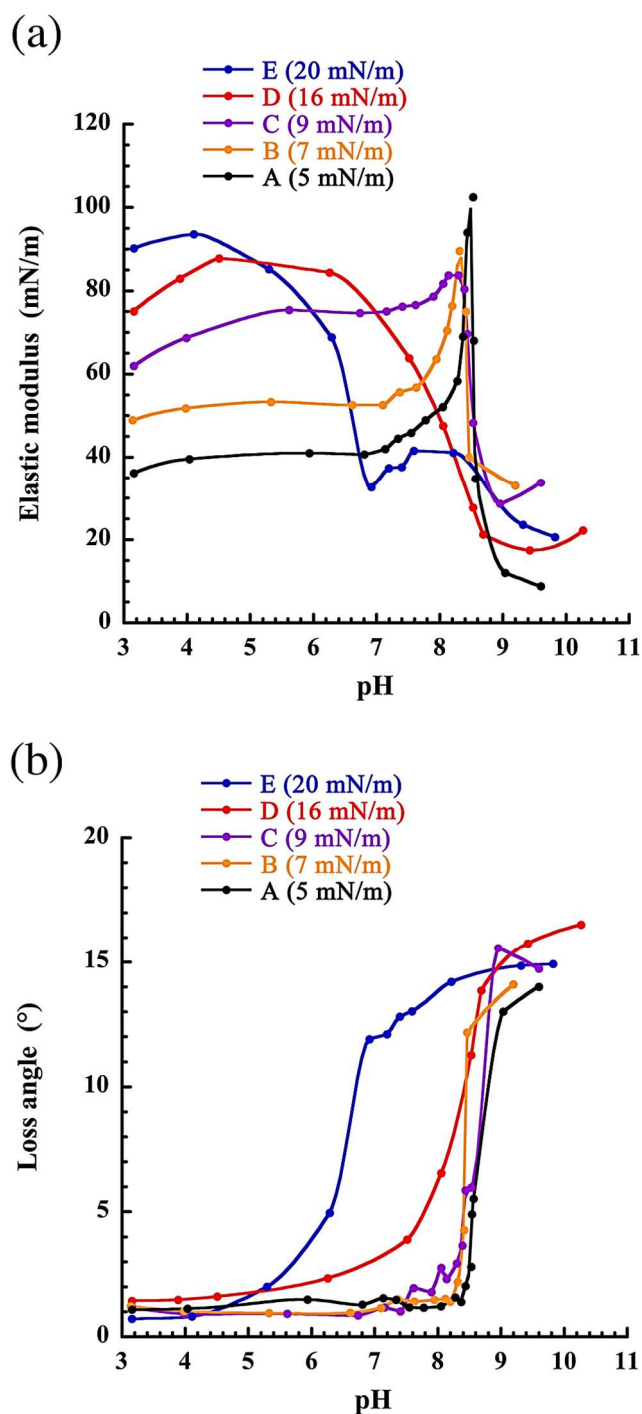


Figure 6: Dilatational rheology experiments of monolayers of cationic lipid **1** at the air / water interface, in function of pH ($[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$). **(a)** Elastic modulus in function of pH, each curve is carried out at constant bubble volume, fixed with the initial monolayer compression noted in the figure legend (*i.e.* $\Pi_0 = 5, 7, 9, 20$ and 30 mN/m). **(b)** Corresponding values of the loss angle in function of pH.

For experiments done at lowest surface pressure (Fig. 6, curves A, B and C), the value of E gradually increases up to drawing a very narrow peak located at $\text{pH} = 8.5$, coinciding with the apparent pK_a determined before. Actually, the existence of a maximum value for elastic modulus as a function of pH is expected regarding the compression curves of Fig. 3 (a). In absence of relaxation, the instantaneous (*i.e.* without relaxation) elastic modulus is defined by Gibbs in Eq. 1, where A_B is the bubble area at constant number of molecules at interface N and constant temperature T (since $A_B = AN$):

$$E_{\infty} = -A_B \left(\frac{\partial \Pi}{\partial A_B} \right)_{T,N} \quad (1)$$

Therefore, E_{∞} is directly linked to the slope of the compression curves $\Pi - A_B$ shown in Fig. 3 (a). When increasing the pH , *i.e.* when moving all along the vertical lines in Fig. 3 (a), we can read the values of E_{∞} as the successive slopes of compression curves at the intersections of vertical lines and compression curves. This held true as long as the loss angle remains weak: in absence of dissipative process in the monolayer. For curves A, B and C it appears that the slopes gradually increase while the monolayers are in gaseous state, up to reaching a maximum (corresponding to the peak of elasticity) just before the shoulders, and finally fall down when entering in the two phases region. It therefore seems that the left part of the peak corresponds to a gaseous monolayer while the right part corresponds to the two phases region.

As regards the A, B and C curves, the loss angle suddenly changes from zero to a value of around 15° when $\text{pH} = \text{pK}_a$. When $\phi \sim 0^\circ$ for $\text{pH} < \text{pK}_a$, the homogeneous phase is purely elastic, as it should be the case for a gaseous state made of insoluble molecules. Beyond pK_a , the significant increase of ϕ shows that the two-phases monolayer is able to relax.

In general, the non-negligible values of the loss angle means that the amphiphiles undergo adsorption/desorption phenomena. However, as these lipids (whatever their form ionized or not) are not soluble, it is not the case here. Thus, the relaxation mechanism should lie in the ability of the two-phases system to reorganize when the bubble area is varied.

On the other hand, at higher initial Π_0 (curves D and E), *i.e.* at higher initial compression, the switch observed in the values of ϕ appear before (for lower pH) compared to those discussed above for lower compressions. The same shift is observed for the elastic modulus. It follows therefrom that, upon compression, the transition between gaseous (elastic) and two phases (viscoelastic) is shifted towards lower pH, for instance pH = 6.5 for $\Pi_0 = 20$ mN/m.

This apparent pKa shift can be explained as follows: for higher surface pressure, the charged monolayer is more compressed and the local surface electrostatic potential becomes high, as it is for the potential energy of the monolayer, mainly composed with ionized lipids at low pH. According to the le Châtelier's law on equilibrium displacements, the chemical equilibrium (and then the pKa value) will be displaced in order to reduce the interfacial energy. This is the case when the pKa is reduced.

If this assumption is true, a second relaxation process takes place in the monolayer and can explain the shift of elastic modulus and loss-angle towards lower pH mentioned above. Upon dilatation and contractions of the drop during measurements, this relaxation takes place in the form of the lipid ionization and neutralization, respectively. The relaxation comes from the kinetics of diffusion of hydronium ions consumed by this process. This secondary relaxation process is related to their diffusion in water, comparably to the relaxation of a layer of soluble surfactant as described by Lucassen van den Tempel. It may explain the dissipative process that takes place below pH = 8.5 and as well the explain why the peak disappears, overtaken by this second relaxation phenomenon. Interestingly, this phenomenon can also be related to the shoulders observed in Fig 3a at $\Pi = 40$ mN/m when pH < 6.23.

3.3 Comparison with anionic lipid monolayers

Next experiments were focused on the comparison of such cationic lipids **1** with the anionic lipid **2**. Furthermore, in order to access the actual values of ω without influence of the bulk composition or presence of electrolyte, these experiments were performed without NaCl (pH

measurement was thus modified as follows: after monolayer stabilization 3 mL of bulk were collected in the external beaker and replaced by 3 mL of ultrapure water; collected volume is mixed with NaCl solution to reach 50 mM; after homogenization the pH of the aliquot is measured). In the case of anionic lipid **2**, the fully ionized state corresponds to basic solutions, at pH we fixed around 10. The idea is to establish reference compression curves in fully ionized state for both lipids in order to be in the condition of applicability of the Volmer's two-dimensional equation of state. In fact, in the case the long-range intermolecular interactions are considered negligible (our case with fully ionized compounds), the literature largely reports that liquid-expanded monolayers are satisfactory described by the common two-dimensional Volmer's equation of state^{14,18–23}

$$\Pi = \frac{kT}{A_B/N-\omega} - \Pi^* \quad (2)$$

where k is the Boltzmann constant, Π^* a constant called cohesion pressure and accounting for intermolecular interactions in the gaseous state (*i.e.* when $\Pi = 0$), simply due to the presence of molecules trapped at the interface (lipids at interface have no interactions each other). In this context, similar $\Pi - A_B$ set of curves in function of pH were done for both lipids, in electrolyte-free bulk, and reported in *Supplementary information* section (Fig. S1 and S2). Then the $\Pi - A_B$ compression curves corresponding to the fully ionized monolayers were fitted with the Volmer's equation Eq. 2 in the pressure range 0-10 mN/m (to insure the applicability of Volmer's equation), that is to say at pH = 3.1 for cationic lipids **1**, and pH = 10.1 for anionic lipid **2**, reported in Fig. 7 (a₁) and Fig. 7 (b₁) respectively.

Finally, the Volmer's equation satisfactory fits the compression curves and provided values of N that allows plotting the corresponding $\Pi - A$ curves reported in Fig. 7 (a₂) and Fig. 7 (b₂). The results give $N = 5.27 \times 10^{13}$ molecules for experiment shown in (a) and $N = 3.02 \times 10^{13}$ molecules

for the (b), that appear in the same order of magnitudes compared to experiments we previously published¹⁴ with exactly the same experimental setup with phospholipids and cholesterol.

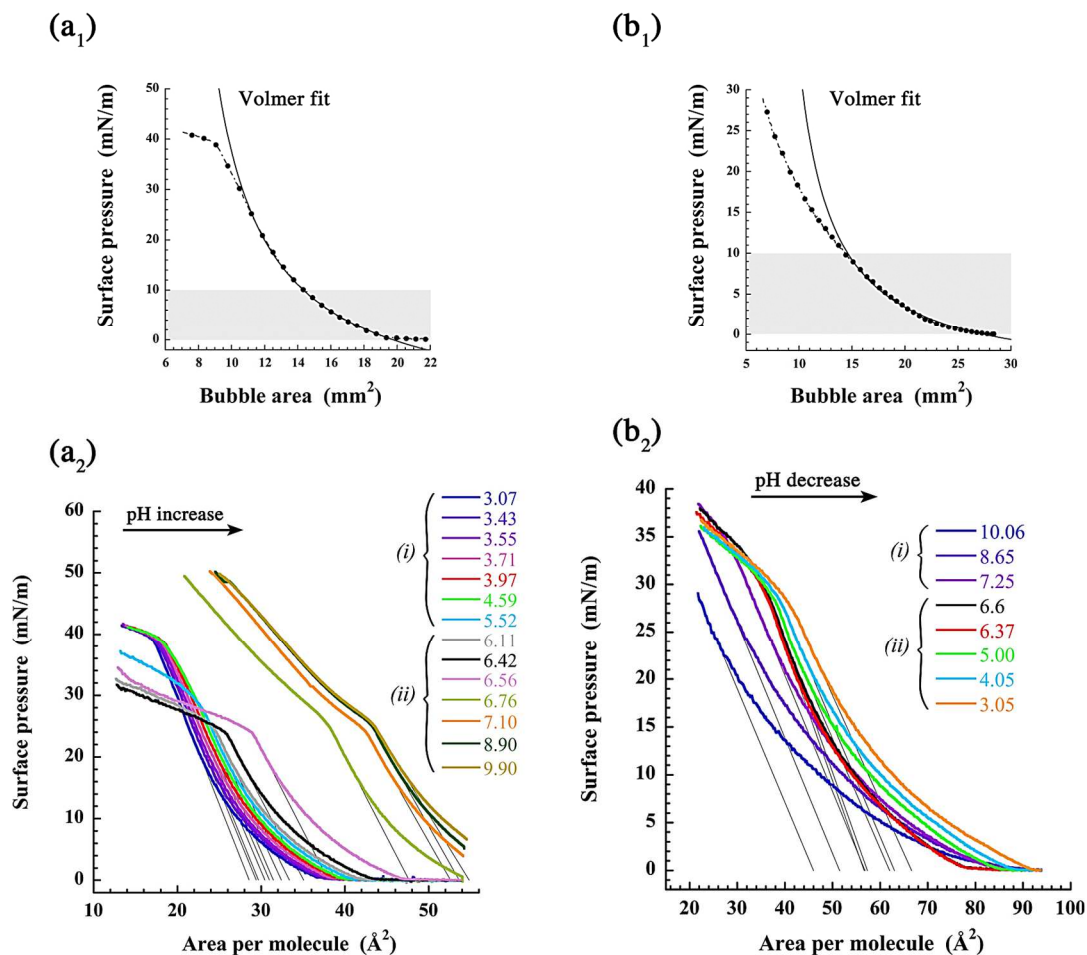


Figure 7: Study of (a) cationic lipid **1** and (b) anionic lipid **2** at the air / water interface without NaCl in the bulk, in function of pH. (a₁) and (b₁) shows the fit with the Volmer's two-dimensional equation of state (Eq. 2) of the $\Pi - A_B$ for fully ionized lipid, *i.e.* at pH = 3.1 for lipid **1** in (a₁), and at pH = 10.1 for lipid **2** in (b₁); gray part shows the pressure range (0–10 mN/m) in which the Volmer's equation is applied. (a₂) and (b₂) shows the $\Pi - A$ curves deduced from the values of N obtained from the Volmer's fit of (a₁) and (b₁).

As regards the $\Pi - A$ curve Fig. 7 (a₂) with cationic lipid **1**, the first observation is that the behavior observed is exactly similar to the one previously given with 50 mM NaCl in the bulk Fig. 3 (a). The curves show the formation of a plateau (phase (i)), followed by a gradual shift

of the curves that describes a transition between two established states (phase *ii*). The only difference appears in pH of maximum variation (pKa), at first sight between pH = 6.56 and 6.76. This signifies that the apparent pKa that was previously around 8.0 (in Fig. 3) is now (in Fig. 7) lower and around 6.6. Nevertheless such a shift in the pKa value is rather logical since it is sensitive to ionic strength in the bulk. In addition, apparent pKa of lipid **1** was determined by fluorescent method in similar conditions in our previous study¹⁵ giving experimentally a value equal to 7.01 and a predicted value of 8.02 (using the ACD/pKa v 6.00 software, ACD/Laboratories, Toronto, ON, Canada).

Regarding the anionic lipid **2**, the full ionization of the lipids arises at high pH, and neutralization of their charges is performed with decreasing the pH. The $\Pi - A$ curve Fig. 7 (b₂) shows that the behavior of the curves appears less marked than for the former cationic lipid, however, the global shift of the curves upon the pH decrease is conserved. Initial curve at pH = 10.1 presents the LE state expected for the ionized amphiphiles. Similarly, to cationic lipid, the compression curves move towards higher A up to pH = 6.6. Then a phase transition arises through the change in the slope (phase *ii*), showing a second domain in the curves for higher pressures at about $\Pi = 30$ mN/m. Then, as pH decreases, this LC domain increases along the further shift of the curves. Interestingly, the behavior of the compression curves upon a pH decreases appears very similar and symmetrical to the one disclosed with the cationic lipids. Now the determination of pKa, as before, have to be done on the range where the curves shift (phase *ii*) and appears around pH = 5, indeed compatible by the one expected for carboxylic acid.

To finish the study, we propose to confirm precisely these first evaluations of the pKa through the determination of the values of the excluded area per molecules ω and their evolution in function of pH. ω can be obtained from the $\Pi - A$ compression curves as the intersection between the tangent of the curve before the LE / LC transition and the horizontal line for $\Pi = 0$,

that is to say the extrapolation of the closed-compact value of A without interfacial pressure applied. These results (for the representative compression experiments of Fig. 7, with tangents as light gray lines) are reported as blue curves in Fig. 8. It is interesting to note that beyond monolayer made with fully ionized lipid, when the pH is increased or decreased, monolayers are composed of a mixture of ionized and neutral with potentially long-range intermolecular interactions not any more negligible. This means that the condition of applicability of the Volmer's equation of state (excepted for the fully ionized one) is not valid, and therefore meaning that the only valuable method to access the values of excluded area per molecules ω is the graphical one above described. Fig. 8 plots the experimental values of ω in function of pH for both lipids. This representation confirms the former observation, from ionized molecules ω increases in three phases, for instance as regarding the cationic lipids **1** without NaCl (filled blue squares), in the region $3 < \text{pH} < 4$, ω increases from ~ 28 to $\sim 32 \text{ \AA}^2$, then for $4 < \text{pH} < 6$, ω stabilized around $\sim 32 \text{ \AA}^2$ along with arising of the plateau (phase (i)), and finally for $\text{pH} > 6$, ω undergoes a strong increases up to stabilizing around $\sim 54 \text{ \AA}^2$, that is to say an increase of 93% with respect to initial value (phase (ii)). ω stabilizes for the lower and higher pH meaning that these values correspond to fully ionized and fully neutralized lipid forming the monolayers. pKa value can be read at 6.6.

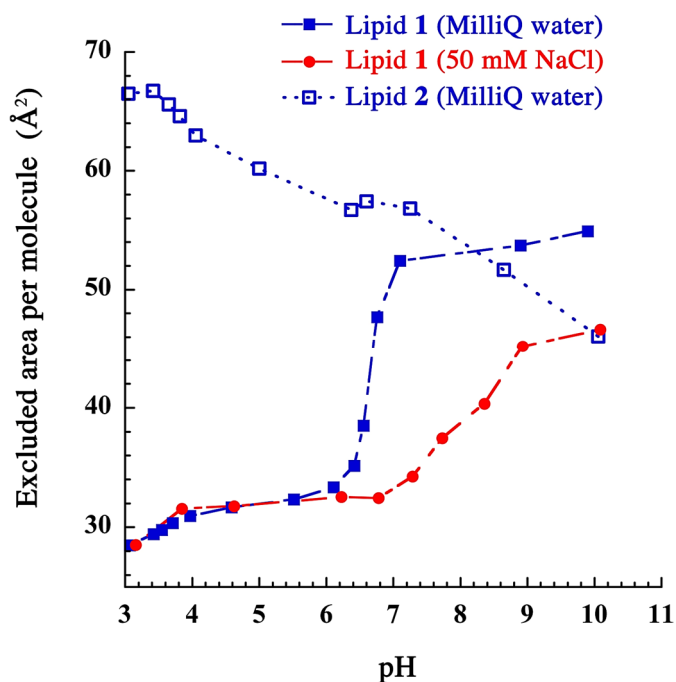


Figure 8: Excluded area per molecules ω against pH, obtained for the fits of the representative compression curves from intersections of gray lines (in Fig. 7) with the abscissa $\Pi = 0$. Blue curves are obtained from NaCl-free bulk (Fig. 7) and red curve obtained from similar approach with 50 mM NaCl in the bulk (from Fig. 3).

As regards the anionic lipid **2** (open blue squares), the curve behavior, to a lesser extent, appears similar to the cationic lipid. The first increases of ω from ~ 46 to $\sim 56 \text{ \AA}^2$ arises for $7 < \text{pH} < 10$ (phase *(i)*), then stabilize around $\sim 46 \text{ \AA}^2$ for $6 < \text{pH} < 7$, and finally increases ω again for $\text{pH} < 6$ up to stabilize around 66 \AA^2 for $\text{pH} < 3.5$ (phase *(ii)*). Here also the value of ω has seen an increase around 43%, as well likely attributed to the loss in the bulk affinity due to the loss of ionic charge, thus resulting in an increase confinement of the molecules at interface, and eventually in the rise of surface pressure. pK_a value here can be read around 4.8.

Finally, when we study the influence of the NaCl concentration in the bulk for cationic lipids (comparing filled blue squares and filled red circles), the two curves can superimpose up to $\text{pH} \sim 6$, and the last phase *(ii)* is slightly shifted for the red curve (from $\text{pH} = 6$ for the blue curve to $\text{pH} = 6.8$ for the red one), along with a lower stabilization value around $\sim 46 \text{ \AA}^2$. pK_a value is read around 8, very compatible with the one determined in Fig. 5 with the curves A_B –

pH. This result proves our hypothesis that the shift of ω is induced by a change of the interactions of the lipids with the aqueous bulk phase, and when they are in their ionized form (pH < 6), the lipids appear not influenced by the bulk composition. To conclude, the global study of such ionizable lipids as insoluble model monolayers disclosed a clear evolution with the pH of the bulk, disclosing the gradual modification of the monolayer composition and thus the values of apparent interfacial pKa.

4 Conclusion

In this study, we have proposed a new approach to study insoluble monolayers with an online monitoring of the bulk composition. The monolayer was made with pH-sensitive lipids (cationic ammonium lipid) deposited onto a bubble interface, maintained at a controlled volume in an ADSA experimental setup. After deposition, washing and stabilization, the lipid monolayers underwent a series of experiments in order to characterize their behavior at interface, in function of their compression and the pH of the surrounding aqueous phase. The successive compressions of a single monolayer, with a gradual pH variation (from ionized to neutral configuration) disclosed a gradual increase of the excluded area per molecule along with the apparition of a phase transition between *liquid-expanded* (LE) state and a condensed state (plateau). Complementary experiments at constant area confirmed this phase transition, in terms of surface pressure and dilatational properties of the monolayers. The phase transition appears when the monolayer drastically turns from a pure elastic behavior of LE state (high elastic modulus / negligible loss angle), to a viscous behavior of the condensed phase (lower elastic modulus / higher loss angle), –keeping in mind that these lipids are insoluble. In the last part of the study, we propose a comparison with an anionic (phenate) lipid totally ionized at high pH, and, through the application of the two-dimensional Volmer's equation of state, applicable with liquid-expanded monolayers in the case the long-range intermolecular interactions are considered negligible (our case with fully ionized compounds). Excluded area per molecules

were therefore determined in function of pH and emphasized variation regions that can be extrapolated as apparent pKa values –of the lipids *within the monolayer*. To conclude, this work proposes an original and simple approach to study the behavior of a monolayer undergoing gradual changes of their environment, and in our case of pH-sensitive lipids, reveal new results on their phase transition.

References

- 1 D. B. Longley and P. G. Johnston, *J. Pathol.*, 2005, **205**, 275–292.
- 2 O. Warburg, *Science (80-.)*, 1956, **123**, 309–314.
- 3 M. Walsh, S. Fais, E. P. Spugnini, S. Harguindey, T. Abu Izneid, L. Scacco, P. Williams, C. Allegrucci, C. Rauch and Z. Omran, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2015, **34**, 93.
- 4 Z. Omran, P. Scaife, S. Stewart and C. Rauch, *Semin. Cancer Biol.*, 2017, **43**, 42–48.
- 5 O. V Gerasimov, Y. Rui and D. H. Thompson, in *Vesicles*, ed. M. Rosoff, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 679–746.
- 6 G. Shi, W. Guo, S. M. Stephenson and R. J. Lee, *J. Control. Release*, 2002, **80**, 309–319.
- 7 H. Bi, S. Ma, Q. Li and X. Han, *J. Mater. Chem. B*.
- 8 H. Bi and X. Han, *Chem. Phys. Lett.*, 2018, **706**, 455–460.
- 9 S. Simoes, J. N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes and M. C. de Lima, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 947–965.
- 10 A. U. Rehman, Z. Omran, H. Anton, Y. Mély, S. Akram, T. F. Vandamme and N. Anton, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, **133**, 331–338.
- 11 H. Karanth and R. S. R. Murthy, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, **59**, 469–483.
- 12 S. Koudelka, P. Turanek Knotigova, J. Masek, L. Prochazka, R. Lukac, A. D. Miller, J. Neuzil and J. Turanek, *J. Control. Release*, 2015, **207**, 59–69.
- 13 J. C. de Oliveira Silva, S. E. M. Miranda, E. A. Leite, A. de Paula Sabino, K. B. G. Borges, V. N. Cardoso, G. D. Cassali, A. G. Guimarães, M. C. Oliveira and A. L. B. de Barros, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2018, **352**, 162–169.
- 14 N. Anton, P. Pierrat, L. Lebeau, T. F. Vandamme and P. Bouriat, *Soft Matter*, , DOI:10.1039/c3sm51688a.

- 15 P. Pierrat and L. Lebeau, *Langmuir*, 2015, **31**, 12362–12371.
- 16 P. Bouriat, N. El Kerri, A. Graciaa and J. Lachaise, *Langmuir*, 2004, **20**, 7459–7464.
- 17 A. R. Esker, L.-H. Zhang, C. E. Olsen, K. No and H. Yu, *Langmuir*, 1999, **15**, 1716–1724.
- 18 V. B. Fainerman and D. Vollhardt, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 145–150.
- 19 V. B. Fainerman, D. Vollhardt and V. Melzer, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 15478–15482.
- 20 T. D. Gurkov, S. C. Russev, K. D. Danov, I. B. Ivanov and B. Campbell, *Langmuir*, 2003, **19**, 7362–7369.
- 21 R. Guntupalli, I. Sorokulova, R. Long, E. Olsen, W. Neely and V. Vodyanoy, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2011, **82**, 182–189.
- 22 L. A. Valkova, S. V Zyablov, V. V Erokhin and O. I. Koifman, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 2010, **14**, 513–522.
- 23 L. A. Valkova, A. S. Glibin and O. I. Koifman, *Macroheterocycles*, 2011, **4**, 222–226.

***CHAPITRE 4. Étude de la
nanoprécipitation à l'interface***

Chapitre 4. Étude de la nanoprécipitation de polymères à l'interface	101
1 Introduction	101
2 Matériels et méthodes.....	102
2.1 Matériels.....	102
2.2 Méthodes	103
2.2.1 Solubilité maximale du PCL dans le mélange de solvant (THF et cyclohexane) 103	
2.2.2 L'opération de nanoprécipitation	104
2.2.2.1 Opération de nanoprécipitation sans huile (cyclohexane).....	104
2.2.2.2 Opération de nanoprécipitation en présence d'huile (C ₆ H ₁₂).....	105
2.2.2.3 Caractérisation physico-chimique	106
2.2.2.3.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	106
2.2.2.3.2 Statistiques.....	107
3 Résultats et discussion.....	107
3.1 Solubilité du PCL dans le solvant THF et le non-solvant C ₆ H ₁₂	107
3.2 Formulation et caractérisation des nanoparticules (NPs).....	108
3.2.1 Caractérisation des nanoparticules sans l'ajout d'huile (cyclohexane).....	108
3.2.2 Caractérisation des nanoparticules en présence d'huile (cyclohexane)	110
3.2.2.1 Diamètre hydrodynamique des nanoparticules.....	110
3.2.2.2 Indice de polydispersité (PDI) des nanocapsules	111
3.2.2.3 Limite de la formulation des nanocapsules par nanoprécipitation	113
4 CONCLUSION	115
5 Références	116

Préface

Le but était d'étudier la nanoprécipitation à l'interface eau/huile dans le tracker, mais pour cela il fallait au préalable étudier la nanoprécipitation en volume. Les circonstances ont fait que le temps a manqué pour arriver à l'étude interfaciale.

Chapitre 4. Étude de la nanoprécipitation de polymères à l'interface

1 Introduction

L'élaboration de nanoparticules (NPs) polymère s'inscrit dans la dynamique de recherche de nouveaux moyens de transport de médicaments dans l'organisme. Par ailleurs l'utilisation des nanoparticules polymères permet de modifier et de contrôler la pharmacocinétique, la bio distribution et souvent la toxicité des médicaments [1].

En outre les NPs polymères sont décrites généralement avec une forme sphérique et sont rigides. Il en existe deux types à savoir les nanosphères et les nanocapsules. Au sein des nanosphères, le principe actif (PA) est dispersé dans l'intégralité de la structure. Les nanocapsules objet de la présente étude, sont de minuscules réservoirs de substances actives. En effet, les nanocapsules sont formées d'une mince paroi de polymère qui entoure un compartiment huileux ou aqueux contenant le principe actif.

Parmi les polymères utilisés dans la formulation de nanocapsule, le poly- ϵ -caprolactone est un choix préférentiel en raison de ses nombreux avantages. Parmi ceux-ci on peut citer son caractère biocompatible, biodégradable, avec une facilité de mise en forme et de fabrication permettant des tailles de pores appropriées et la délivrance contrôlée des médicaments contenus dans leur matrice. Aussi sa dégradation n'entraîne pas la formation de métabolites toxiques pour l'organisme et sa grande stabilité lui confère des caractéristiques essentielles pour son emploi dans le domaine biomédical [2, 3, 4].

Par ailleurs, de nombreuses études démontrent l'intérêt accordé au poly- ϵ -caprolactone dans les systèmes de formulation de médicaments et de diagnostics aussi bien dans l'imagerie médicale que dans la tomodensitométrie [5].

Autant de raisons qui justifient son utilisation dans le cadre de cette étude. Le poly- ϵ -caprolactone (PCL) a été nanoprécipité en l'absence de tensioactif afin de permettre l'étude comparative. Une étude approfondie du système {poly- ϵ -caprolactone / solvant / eau / tensioactif} permettra d'optimiser la nanoprécipitation et de comprendre les mécanismes liés à la taille et à leur distribution.

Les effets de la concentration en poly- ϵ -caprolactone, du volume d'eau et de la concentration en tensioactif sur la taille et la distribution de taille des nanoparticules de polymère ont été déterminés. Afin de permettre l'élimination du solvant par évaporation, la nanoprécipitation du poly- ϵ -caprolactone a été réalisée en utilisant du tétrahydrofurane (THF) comme solvant organique.

La présente étude se donne le défi de maîtriser les mécanismes accompagnant la distribution de taille des nanoparticules de polymères au cours du procédé de nanoprécipitation en vue d'optimiser le transport des médicaments à leur site d'action pour une augmentation de leur efficacité.

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériels

Le tensioactif non-ionique (Kolliphor® ELP, PEG-35 ricinoléate, BASF), le poly- ϵ -caprolactone (PCL, masse moléculaire 10 000), le cyclohexane, le tétrahydrofurane (THF), ont été achetés à Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Le Kolliphor® ELP est une huile de ricin polyoxyéthylée avec un nombre de groupes d'oxyde d'éthylène autour de 35 et a une masse moléculaire d'environ 1 500 g/mole. Ce tensioactif est un mélange de différents oligomères de

poinds moléculaires suivant une distribution en forme de poisson centrée sur celle annoncée par le fabricant. Ce composé amphiphile présente un équilibre hydrophile-lipophile (HLB) d'environ 12-14 et crée une couche de PEG stabilisante entourant les nanoparticules (NP) polymères à partir de leurs fractions PEG hydrophiles. Une eau ultra-pure a été obtenue en utilisant le système de filtration MilliQ (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

2.2 Méthodes

2.2.1 Solubilité maximale du PCL dans le mélange de solvant

L'idée fut d'étudier dans un premier temps, la solubilité du polymère (PCL) dans un mélange de solvant (THF) et de non-solvant (C_6H_{12}), pour déterminer les conditions optimales afin de réaliser la nanoprécipitation sous la forme de nanocapsules. Notons que le PCL est soluble dans THF tandis qu'il est insoluble dans le cyclohexane. Il en vient que le PCL est soluble dans le mélange (THF et cyclohexane) dans des limites bien définies. Ce qui nous a amené à rechercher le maximum de solubilité du PCL pour des rapports en volume de THF et C_6H_{12} connus. Le protocole expérimental est décrit comme suit :

- pesez une masse m de PCL ajoutez un volume V C_6H_{12} .
- ajoutez progressivement de très petites quantités de THF (ici il est important de mentionner que nous avons commencé avec des volumes en THF de l'ordre du microlitre et nous avons procédé à de petits ajouts)
- la solution ainsi obtenue est saturée en PCL. La solubilisation du PCL dans le mélange de solvants (THF et C_6H_{12}) ayant été produite par la plus petite quantité de THF. L'ensemble après chaque ajout de THF, homogénéisez au vortex à 1000 tours/min à $20^\circ C$ pendant 21 minutes et observer à l'œil nu l'existence ou non de dépôts de PCL dans le fond du tube. En procédant ainsi par ajout fractionné de THF en cas de solubilisation du PCL dans le mélange (THF et C_6H_{12}), des

points de coordonnées constitués de la masse m et du rapport des volumes THF et C_6H_{12} servira à construire la courbe du maximum de solubilité du PCL dans ses deux solvants.

L'intérêt de cette courbe présentant le maximum de solubilité du PCL, c'est de déterminer les conditions optimales pour réaliser la nanoprécipitation sous la forme de nanocapsules.

2.2.2 L'opération de nanoprécipitation

L'opération de nanoprécipitation a été conduite initialement sans huile (cyclohexane) dans le but de voir les zones possibles d'obtention de nanoparticules. Ensuite sur la base des essais réussis de formulations, l'ajout de très faible quantité de cyclohexane a été opéré pour une comparaison de la taille des nanoparticules et comprendre les mécanismes qui lient la distribution de taille avec les paramètres du procédé.

2.2.2.1 Opération de nanoprécipitation sans huile (cyclohexane)

Dans 1 ml de THF, dissoudre des masses croissantes de PCL puis ajouter goutte à goutte à la solution aqueuse de Kolliphor® ELP. L'homogénéisation du PCL, THF est préalablement assurée par le Vortex®. Une fois homogénéiser la phase organique contenant le PCL est ajoutée goutte à goutte dans la phase d'eau contenant le surfactant Kolliphor® ELP. La nanoprécipitation du PCL se produit immédiatement, formant des nanoparticules stables de PCL.

La vitesse de rotation de la solution aqueuse de Kolliphor® ELP est maintenue constante à 250 tours/minutes. Dans cette série d'essais, deux paramètres sont variables :

- masse de PCL ; variable de 2,5 mg à 7,5 mg soit une valeur maximale de 1% en masse dans le THF.
- teneur de Kolliphor® ELP avec une valeur maximale fixée à 25% dans l'eau milliQ. Le solvant de dissolution du Kolliphor® ELP est l'eau milliQ.

Pour une valeur fixée de la teneur en Kolliphor® ELP, l'on effectue les essais de nanoprécipitation en faisant varier la masse de PCL. L'intérêt de ce procédé c'est la réalisation

de plusieurs formulations et la possibilité d'étudier la variabilité des paramètres influençant l'opération de nanoprécipitation. Toutes les expériences sont répétées au moins en trois exemplaires.

L'évaporation du THF a été réalisée au bain-marie à 50° C, pendant 20 minutes 30 secondes en maintenant toujours l'agitation de la phase aqueuse contenant le surfactant à 250 tours/minutes. Ensuite 1 ml de la suspension obtenue à l'issue de la nanoprécipitation et l'évaporation ; est analysé au Zetasizer pour la mesure de la taille (diamètre hydrodynamique des NPs).

2.2.2.2 Opération de nanoprécipitation en présence d'huile (C₆H₁₂)

L'opération est conduite comme précédemment avec une seule variante (**Fig. 1**), l'ajout d'une quantité variable de cyclohexane au cours de la dissolution du PCL dans le solvant THF. L'on définit alors un nouveau paramètre : le rapport du volume du THF sur le volume de C₆H₁₂. Il est alors possible d'effectuer à nouveau des essais de nanoprécipitation pour différentes valeurs de rapport de volume V_{THF}/V_{C₆H₁₂}, masses de PCL et teneurs Kolliphor® ELP. Différentes valeurs du rapport (V_{THF}/V_{C₆H₁₂}) permettent de se placer à différents niveaux de la courbe du maximum de solubilité du PCL et d'effectuer les essais de formulation des nanoparticules. Le point-clef de cette série d'expériences c'est la compréhension des mécanismes expliquant la distribution de taille.

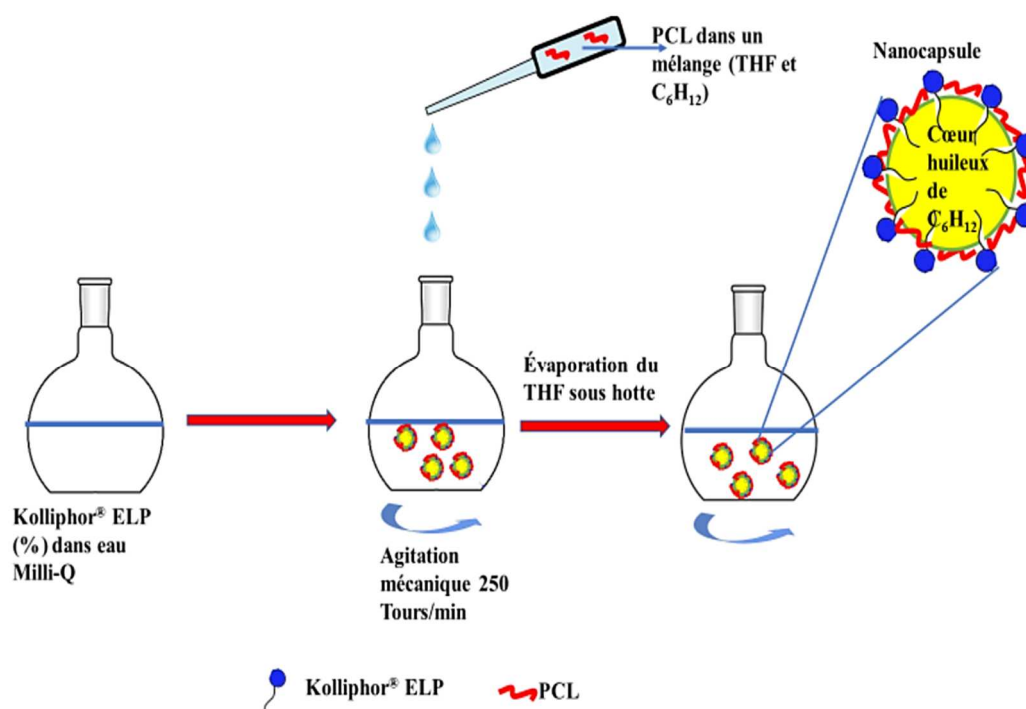


Figure 1 : Technique de Nanopréciptation pour la préparation de nanocapsule de PCL.

2.2.2.3 Caractérisation physico-chimique

2.2.2.3.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les distributions de taille et les indices de polydispersité (PDI) ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec un appareil de Malvern (NanoZS®, Malvern, Orsay, France). Le laser à hélium/néon, de 4 mW, a été utilisé à 633 nm, l'angle de diffusion étant fixé à 173° et la température maintenue à 25 °C. Les données du DLS ont été analysées selon la méthode des cumulants.

L'indice de polydispersité de la distribution de taille des NPs (PDI) est une mesure de la largeur de la distribution de taille. Cet indice est sans dimension et à une échelle telle que les valeurs inférieures à 0,10 correspondent à des populations monodisperses [6, 7]. Les valeurs de l'indice PDI supérieures à 0,7 indiquent que l'échantillon a une très large distribution de taille des particules et ne convient probablement pas à l'analyse par la technique de diffusion dynamique

de la lumière (DLS). Différents algorithmes de distribution de la taille fonctionnent avec des données qui se situent entre ces deux valeurs extrêmes de la PDI (c'est-à-dire 0,05-0,7) [8].

1 ml de la suspension de NPs a été nécessaire pour les mesures.

2.2.2.3.2 Statistiques

Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires et toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois. Les données ont été analysées par une analyse de variance et présentées sous forme de moyenne \pm écart type.

3 Résultats et discussion

3.1 Solubilité du PCL dans le solvant THF et le non-solvant C₆H₁₂

Initialement l'on a entrepris d'étudier la solubilité du polymère (PCL) dans un mélange de solvant (THF) et de non-solvant (C₆H₁₂), afin de déterminer les conditions optimales pour réaliser la nanoprécipitation sous la forme de nanocapsules. La détermination de la limite de solubilité du PCL (Fig. 2) dans ce mélange solvants/non-solvant, nous a permis d'étudier le compromis entre la taille des particules obtenues par nanoprécipitation et la quantité de non-solvant résiduel maximale.

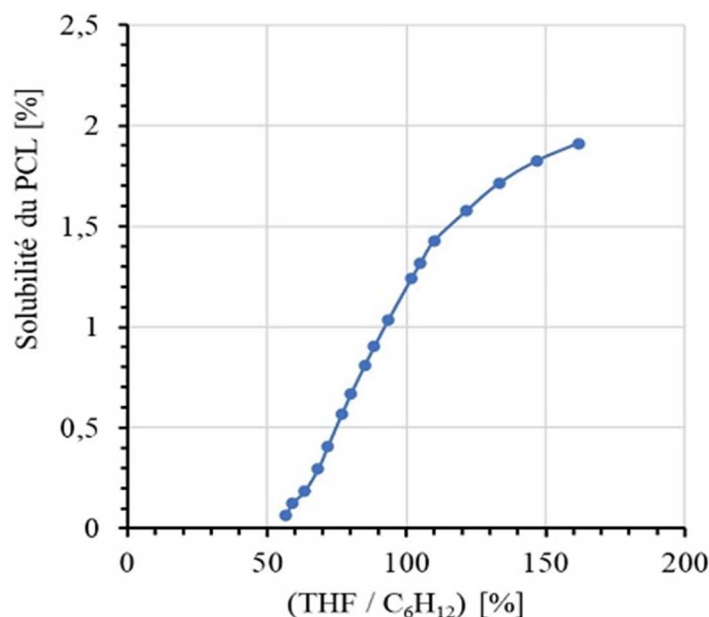


Figure 2 : Limite de solubilité du PCL dans le rapport (THF/ C₆H₁₂) à T= 20°C (100% signifie une quantité égale en solvant, 200% signifie que la quantité de THF est le double de celle de C₆H₁₂).

L'idée directrice de cette première série d'expériences est de définir les zones qui seront choisies comme point de départ pour la nanoprécipitation, qui permettra de comparer les formules plus ou moins concentrées en huile et/ou en polymère.

3.2 Formulation et caractérisation des nanoparticules (NPs)

3.2.1 Caractérisation des nanoparticules sans l'ajout d'huile (cyclohexane)

Aux masses indiquées de PCL (2,5 mg ; 5 mg ; 7,5 mg), la taille (diamètre hydrodynamique) des NPs diminuent avec l'augmentation de la teneur en surfactant (Fig. 3). Sans ajout d'huile, plus la masse de PCL augmente et plus le diamètre hydrodynamique augmente. Le PDI aux

trois masses indiquées de PCL (2,5 mg ; 5 mg ; 7,5 mg) varie de 0,182 à 0,403.

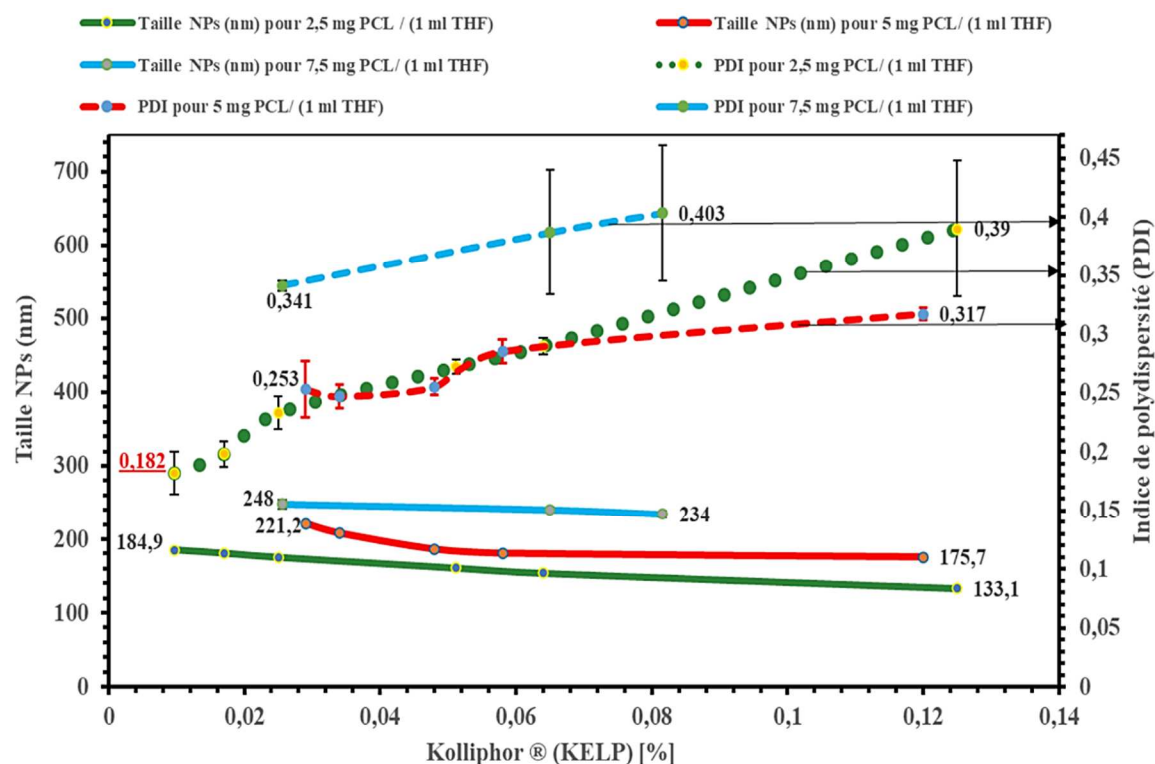


Figure 3 : Taille des nanoparticules de PCL et Indice de polydispersité (PDI) en fonction de la concentration de l'agent tensioactif dans la phase aqueuse (avant l'étape de diffusion du solvant). Trois quantités de PCL sont comparées = (2,5 mg ; 5 mg ; 7,5 mg) ; le volume de VTHF = 1ml. Les lignes continues colorées désignent le diamètre hydrodynamique et les lignes discontinues indiquent le PDI associés.

L'intérêt de ses premiers essais conduits sans ajouts d'huile, c'est d'orienter la formulation des nanocapsules par ajout de cyclohexane. Le cyclohexane, huile non biocompatible, est utilisé pour conduire la formulation des nanocapsules par nanoprécipitation, l'étude de la distribution de taille et comprendre la relation taille / paramètres de formulation.

3.2.2 *Caractérisation des nanoparticules en présence d'huile (C₆H₁₂)*

3.2.2.1 *Diamètre hydrodynamique des nanoparticules*

Le processus de formulation des NPs a été étudié et optimisé, en travaillant sur deux paramètres de formulation : la quantité d'agent tensioactif et le rapport (V_{THF} / V_{C₆H₁₂}). Les essais concluants ayant été observés pour un rapport (V_{THF} / V_{C₆H₁₂}) compris dans l'intervalle [200, 500] soit respectivement un volume de V_{C₆H₁₂} fixé à 2μl, 3μl puis finalement à 5μl pour 1mL THF, contenant 2,5 à 5 mg de PCL (voir figure 2, le rapport V_{THF}/V_{C₆H₁₂} devient de plus en plus grand mais l'on reste en dessous de la ligne bleue indiquant le maximum de solubilité du THF).

Tout d'abord, l'effet du surfactant non ionique (Kolliphor ELP®) sur la taille des NP polymères PCL a été contrôlé. Ainsi à la variation de la concentration en surfactant non ionique (Kolliphor ELP®) nous avons imposé pour chaque série de formulations un volume fixe de V_{C₆H₁₂}. Il est alors intéressant de noter que pour un volume donné de V_{C₆H₁₂}, l'étude de la variation de taille des NPs de PCL est sensible à la concentration en surfactant non ionique (Kolliphor ELP®) présent dans la phase aqueuse et montre une diminution de la taille des NPs nano-précipitées. Il apparaît que pour un rapport (V_{THF} / V_{C₆H₁₂}) compris dans l'intervalle [200, 500] c'est-à-dire un volume de V_{C₆H₁₂} = (2μl ; 3μl ; 5μl) toute augmentation de la concentration en surfactants s'accompagne d'une diminution de la taille des NPs de polymère PCL. (Fig. 4)

Cette diminution de taille, décrite dans la littérature vient du fait que la décomposition spinodale qui a lieu lors du transfert de solvant, est bloquée plus ou moins rapidement en fonction de la concentration en surfactants [9, 10, 11]

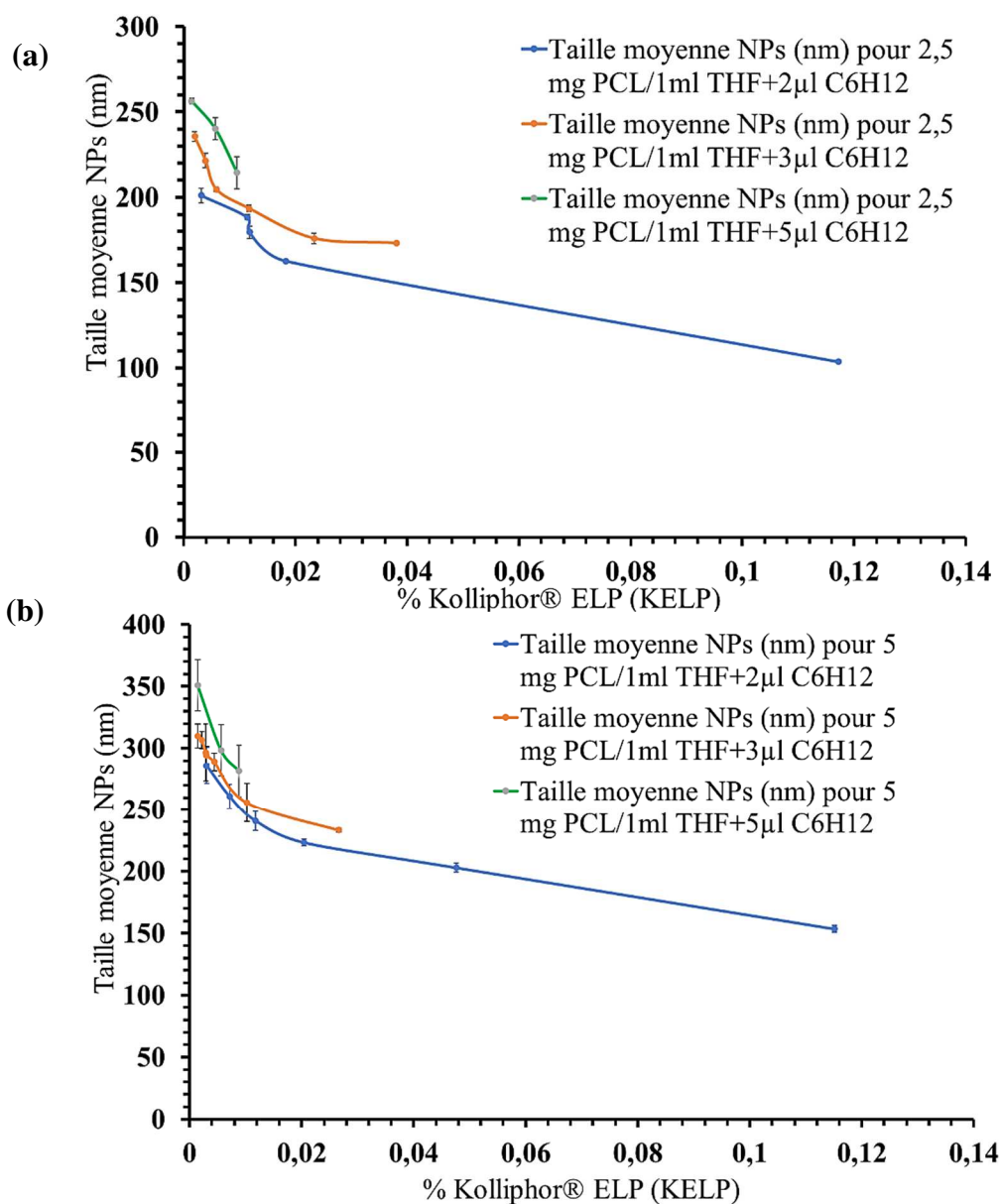


Figure 4 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules de PCL en fonction de la concentration de l'agent tensioactif dans la phase aqueuse (avant l'étape de diffusion du solvant). Deux quantités de PCL sont comparées. (a) masse de PCL = 2,5 mg (b) masse de PCL = 5 mg ; le volume de C₆H₁₂ = (2 µl, 3 µl et 5 µl) et VTHF = 1ml

3.2.2.2 Indice de polydispersité (PDI) des nanocapsules

En présence de (2µl, 3µ, 5µl de C₆H₁₂) les valeurs de PDI ont varié de 0,212 à 0,591 pour une masse PCL = 2,5 mg (Fig. 5) et de 0,231 à 0,583 pour 5 mg de PCL (Fig. 5). Il est admis du fait de la littérature que des valeurs de PDI de l'ordre de 0,2 et 0,3 sont jugées acceptables et indiquent une population homogène [8]

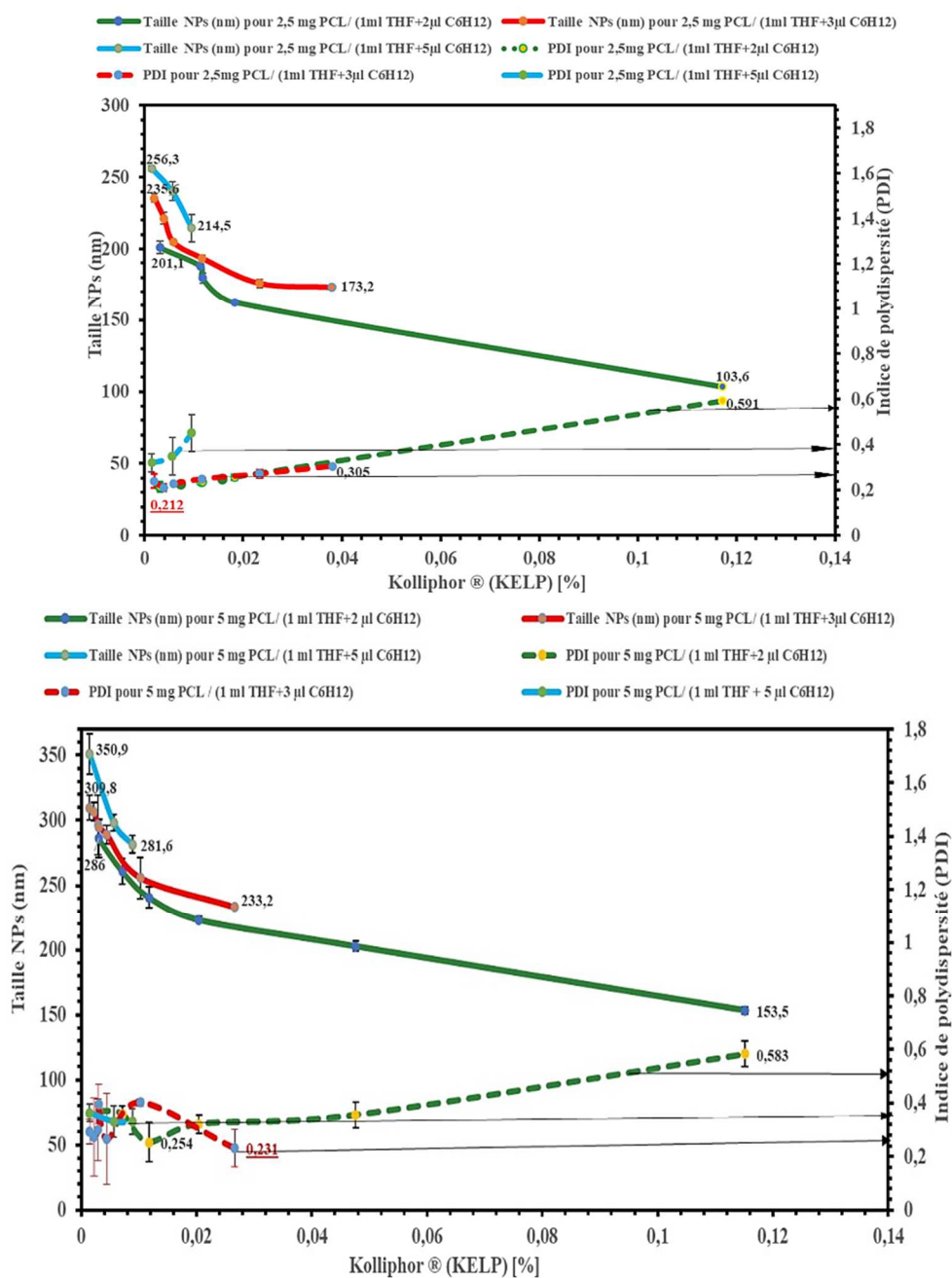


Figure 5 : Taille des nanoparticules de PCL en fonction de la concentration de l'agent tensioactif dans la phase aqueuse (avant l'étape de diffusion du solvant) et PDI associé au diamètre hydrodynamique. Deux quantités de PCL sont comparées. (a) masse de PCL = 2,5 mg (b) masse de PCL= 5 mg ; le volume de C₆H₁₂ = (2 µl, 3 µl et 5 µl) et VTHF = 1ml. En trait plein coloré le diamètre hydrodynamique et en trait discontinu le PDI associé à la formulation

Les valeurs extrêmes de PDI (0,591 pour 2,5 mg PCL et 0,583 pour 5 mg PCL) sont obtenues respectivement aux concentrations maximales en surfactant (Kolliphor ELP®) de 0,117 % et 0,115%. Ces résultats suggèrent qu'en pratique en utilisant le mélange de solvants THF et de

non-solvant C_6H_{12} , le PDI devrait être inférieurs à 0,591. En considérant le PDI comme un indicateur de la qualité du processus de formation de NPs, plus la valeur est élevée, plus elle indique un système polydispersé et peut donc présenter une tendance à la sédimentation. Dès lors des valeurs inférieures à 0,591 sont souhaitables pour rester dans le cadre des essais concluants. Ceci nous amène à explorer les limites de la formulation par nanoprécipitation.

3.2.2.3 Limite de la formulation des nanocapsules par nanoprécipitation

L'augmentation de la taille proportionnelle à l'augmentation du volume de C_6H_{12} (Fig. 4 et Fig. 5) a été notre hypothèse de base. Toutefois nous avons étudié les limites du processus de nanoprécipitation avec des volumes de C_6H_{12} plus importants de 7 à 25 μl C_6H_{12} (Fig. 6 et Fig. 7). L'analyse du PDI à l'issue des différentes mesures n'a révélé que des essais non concluants.

(a) Masse PCL= 2,5

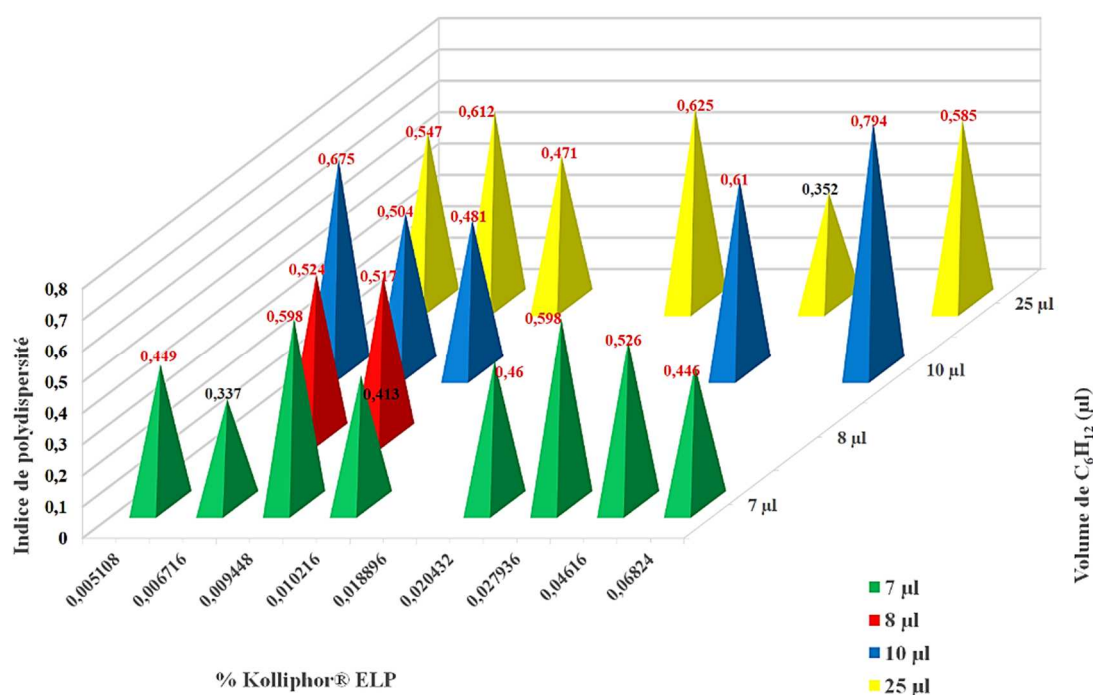


Figure 6 : Limites de la formulation par nanoprécipitation pour une masse de 2,5 mg PCL avec des volumes de C_6H_{12} variant de 7 μl à 25 μl . Les symboles colorés indiquent le volume de C_6H_{12} utilisé au cours la formulation. La valeur du PDI est indiquée pour chaque formulation.

(b) Masse de PCL= 5 mg

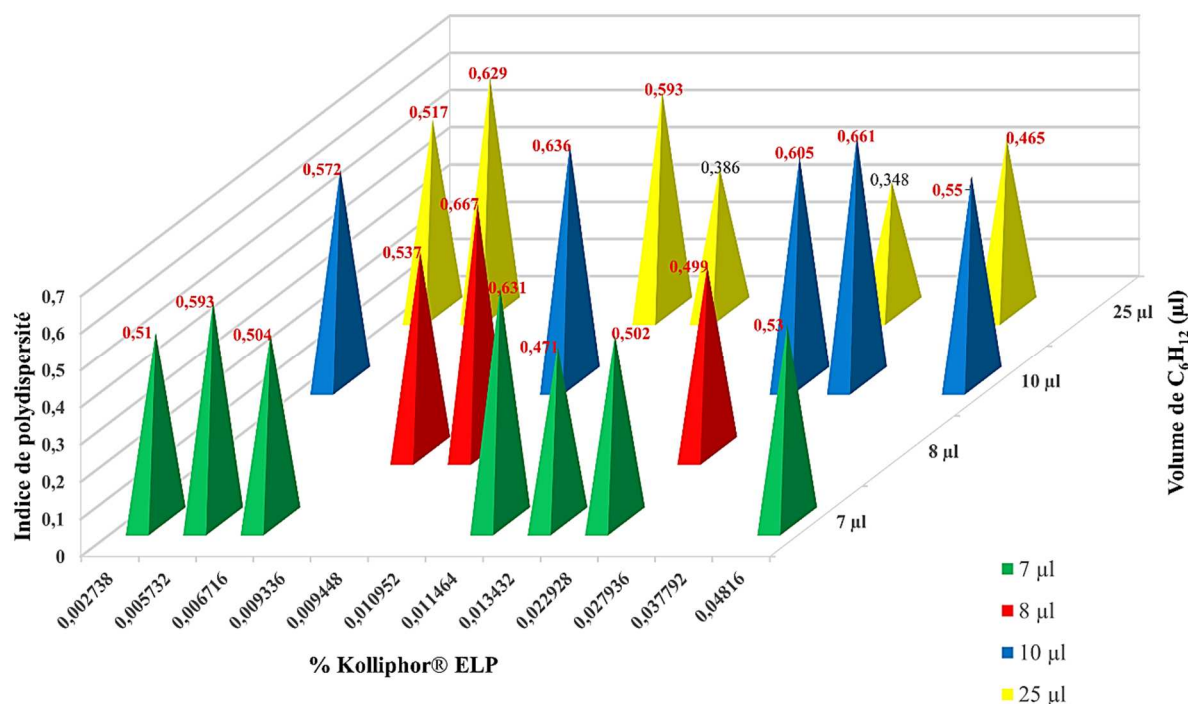


Figure 7 : Limites de la formulation par nanopréciipitation pour une masse de 5 mg PCL avec des volumes de C_6H_{12} variant de 7 μl à 25 μl . Les symboles colorés indiquent le volume de cyclohexane utilisé au cours la formulation. La valeur du PDI est indiquée pour chaque formulation

Les valeurs de PDI oscillent de 0,337 à 0,794 pour 2,5 mg de PCL et de 0,348 à 0,629 pour 5 mg de PCL. Des valeurs élevées de PDI (supérieures à 0,348) qui démontrent que nos formulations se rapprochent plus des systèmes polydispersés. Rappelons comme indiqués précédemment que les valeurs de PDI (0,2 ou 0,3) sont jugées acceptables et indiquent des systèmes monodispersés [8]. Dans cette section l'ensemble de nos résultats prouve bien que le processus de formulation des nanocapsules par nanopréciipitation est limité par le volume de cyclohexane comme le démontrent les **Figures (6 et 7)**. Ainsi pour des volumes de cyclohexane allant de 7 μl à 25 μl , c'est-à-dire pour des rapports $V_{THF}/V_{C_6H_{12}}$ compris dans l'intervalle $[1000/25=40, 1000/7=143]$, tous les essais sont restés non concluants. Le volume du non-solvant c'est-à-dire ici le cyclohexane est donc un élément-clef dans la formulation des nanocapsules par nanopréciipitation. Bien que la littérature mentionne des valeurs acceptables

de PDI inférieurs à 0,7 notons cependant ici la tendance des échantillons à l'agrégation particulaire. Il est d'ailleurs bien documenté que les systèmes polydispersés présentent une plus grande tendance à la déstabilisation que les systèmes monodispersés [8].

4 Conclusion

Une étude de la formulation de nanocapsules par la technique de nanoprécipitation qui nous a permis de voir l'influence du rapport de solvant (VTHF/VC₆H₁₂), de la masse de PCL sur la taille des nanocapsules et le PDI associé. L'étude de la variation de taille (diamètre hydrodynamique), du PDI associé indiquent bien que la technique de nanoprécipitation marche dans une certaine limite bien définie par le rapport de solvant (THF, C₆H₁₂) et la masse de polymère (PCL). Aussi avons-nous enregistré des essais concluants pour des masses de polymère (PCL) variant de 2,5 à 5 mg de polymère (PCL) et un rapport (VTHF / VC₆H₁₂) variant de 200 à 500 (soit par exemple de volume de C₆H₁₂ allant de 2 µL à 5 µL pour 1mL THF, contenant 2,5 à 5 mg de PCL). Devant la multitude des essais réalisés en vue d'aboutir à des essais concluants ou non, il ressort que la taille (diamètre hydrodynamique) et le PDI expriment bien la distribution des tailles observées. En présence de (2 µl, 3 µl, 5 µl de C₆H₁₂) les valeurs de PDI ont varié de 0,212 à 0,591 pour une masse m de polymère (PCL)= 2,5 mg et de 0,231 à 0,583 pour 5 mg PCL. Au regard des tailles de nanoparticules associées, en substituant le cyclohexane non biocompatible par une huile biocompatible, notre méthode de formulation peut être utilisée dans la production de nanocapsules.

Cette étude tout en soulignant l'importance de la taille (diamètre hydrodynamique des nanoparticules) et du PDI dans la formulation ; s'inscrit dans le développement de nanosystèmes pour les applications pharmaceutiques, cosmétiques, de l'alimentation et autres. L'un des aspects clefs de cette étude c'est d'avoir exploré les avantages et les limites de la technique de nanoprécipitation ; utilisée pour les formulations de nanoparticules lipidiques.

5 Références

1. Monfardini, C., Veronese, F.M., 1998. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate Chemistry* 9(4), 418. <https://doi-org/10.1021/bc970184f>
2. Medlicott, N.J., Jones, D.S., Tucker, I.G., Holborow, D., 1992. Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly- ϵ -caprolactone films prepared by solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, 84, 85-89. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90218-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90218-Q)
3. Vandamme, T.F., Gillard, J., 1994. Use of poly- ϵ -caprolactone for the preparation of microspheres containing calcitonin as drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 29, 397-398. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90108-2)
4. Vandamme, T.F., Legras, R., 1995. Physico-mechanical properties of poly (epsilon-caprolactone) for the construction of rumino-reticulum devices for grazing animals. *Biomaterials* 16(18), 1395. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)96875-Z](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)96875-Z)
5. Jakhmola, A., Anton, N., Anton, H., Messaddeq, N., Hallouard, F., Klymchenko, A., Mely, Y., Vandamme, T.F., 2014. Poly- ϵ -caprolactone tungsten oxide nanoparticles as a contrast agent for X-ray computed tomography. *Biomaterials* 35(9), 2981-2986. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.032>
6. Ding, S., Serra, C.A., Anton, N., Yu, W., Vandamme T.F. 2019. Production of dry-state ketoprofen-encapsulated PMMA NPs by coupling micromixer-assisted nanoprecipitation and spray drying. *Int. J. Pharm.*, 558, 1-8. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.031>
7. Koppel, D. E. (1972). Analyse de la multidispersion macromoléculaire en spectroscopie de corrélation d'intensité : La méthode de Cumulants. *J. Chim. Phys.* 57, 4814-4820.
8. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and

- Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10, 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
9. Anton, N., Bally, F., Serra, C.A., Ali, A., Arntz, Y., Mely, Y., Zhao, M., Marchioni, E., Jakhmola, A., Vandamme, T.F., 2012. A new microfluidic setup for precise control of the polymer nanoprecipitation process and lipophilic drug encapsulation. *Soft Matter*, 8, 10628-10635. <https://doi.org/10.1039/c2sm25357g>
 10. Chronopoulou, L., Sparago, C., Palocci, C. 2014. A modular microfluidic platform for the synthesis of biopolymeric nanoparticles entrapping organic actives. *J Nanopart Res*, 16, 2703. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2703-9>
 11. Martinez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. Á., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 532, 66-81. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>

*Chapitre 5. Discussion et
perspectives*

Ma thèse, subdivisée en trois projets, a mis l'accent sur l'étude des substances amphiphiles. La rhéologie interfaciale appliquée à l'étude des différents projets a permis de comprendre et mettre en lumière certains comportements des monocouches étudiées aux interfaces eau/air ou huile/eau. Pris séparément, les trois projets de notre thèse nous ont permis d'évoluer dans le domaine de la physicochimie interfaciale des amphiphiles, leur comportement et leur modification chimique à l'interface (huile/eau ou air/liquide). D'où l'intérêt du choix de l'interface adaptée à l'étude. Ainsi je peux exposer les trois projets de notre thèse et leurs apports au vu des résultats.

Le premier projet a porté sur l'étude et le suivi de la polymérisation d'amphiphile par chimie clic à l'interface eau/huile dans le but de développer de nouvelle stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules. Après une caractérisation de base de la CMC, des modulations ont été effectuées (0,1 CMC ; CMC ; 3 CMC) permettant le suivi de la cinétique et des équilibres rhéologiques observés au cours de la réaction de réticulation. Les résultats, révèlent une modification claire de l'élasticité dynamique et des propriétés diffusantes des entités adsorbées à l'interface. Alors que nous étions engagés dans l'étude rhéologique de l'agent tensioactif et de sa réaction de réticulation, nous sommes arrivés à mettre en place une méthodologie originale pour explorer la réticulation interfaciale d'un agent de surface capable de réagir avec une molécule supplémentaire ajoutée dans la phase aqueuse environnante. L'étape de lavage menée conjointement à l'étude rhéologique de la réaction de réticulation, nous a permis de révéler que le film qui se forme est très fortement ancrée à l'interface huile/eau. Montrant ainsi une modification de la monocouche comparée à la monocouche initialement créée. En complément au premier projet qui s'est effectué sur une interface eau/huile, le second projet s'est déroulé sur une interface air/eau. D'un point de vue analytique, évoluer successivement

d'une interface eau/huile à une interface air/eau vient enrichir mon étude expérimentale et les différents écueils sur lesquels il faut être vigilant.

De façon spécifique notre second projet traite de l'étude interfaciale des lipides sensibles au pH à l'interface air/eau, dans un dispositif expérimental de l'ADSA. Motivé par l'enjeu de l'étude du comportement des monocouches et de leur transition de phase lors des variations de pH, nous avons utilisé des lipides modèles fabriquées sur mesure (collaboration), terminés par des fonctions cationiques et anioniques. L'usage de lipides sensibles au pH est un élément-clef qui va permettre de modifier le pH de la phase aqueuse environnante et par conséquent le comportement des monocouches lipidiques à l'interface eau/air en solution. Nous avons montré que les compressions successives d'une monocouche unique, avec une variation progressive du pH (de la configuration ionisée à la configuration neutre) sont reliées à une augmentation progressive de la surface exclue par molécule ainsi qu'à l'apparition d'une transition de phase entre l'état gazeux et un état condensé (plateau). Des expériences complémentaires à surface constante ont confirmé cette transition de phase, en termes de pression de surface et de propriétés de dilatation des monocouches. Il est important de noter que la transition de phase apparaît lorsque la monocouche passe radicalement d'un comportement purement élastique (à l'état gazeux (module d'élasticité élevé / angle de perte négligeable)), à un comportement visqueux de la phase condensée (module d'élasticité plus faible / angle de perte plus élevé), en gardant à l'esprit que ces lipides sont insolubles.

Il est clair que mes deux études rhéologiques ont pour origine des bases scientifiques bien documentées dans la littérature (fonctionnalisation à l'aide de la réaction click ou d'une instabilité des monocouches lipidiques liée au pH). Ce sont ses éléments qui orientent le choix de la méthodologie pour conduire l'étude rhéologique (exemple méthode ADSA, travailler sur une interface eau/huile ou air/eau). Le troisième projet relatif à la rhéologie de la réaction de nanopréciipitation a nécessité que l'on développe dans un premier temps l'étude volumétrique

de la formulation de nanocapsules par la nanopréciipitation et d'explorer les limites du processus. Les résultats les plus importants présentés sont ceux qui devaient servir à conduire l'étude rhéologique à l'interface eau/huile. Nos résultats démontrent que la formulation des nanocapsules par nanopréciipitation est fortement influencée par le rapport de THF/C₆H₁₂ avec comme polymère le Poly-ε-caprolactone. L'étude de la variation de taille (diamètre hydrodynamique), du PDI associé indiquent bien que la technique de nanopréciipitation marche dans une certaine limite bien définie par le rapport de solvant (THF, C₆H₁₂) et la masse de polymère (PCL). Des résultats utiles à la conduite de l'étude rhéologique en utilisant la méthode ADSA. Notons que le facteur temps ne nous a pas permis de poursuivre l'étude. Quand il est admis que les études rhéologiques nécessitent un temps considérable. Cependant la poursuite de l'étude en elle-même peut bien s'inscrire dans le cadre des perspectives à mon travail de thèse.

D'un point de vue applicatif, l'expérience de fonctionnalisation peut bien guider la fabrication d'entité à haut poids moléculaire fortement ancrée à l'interface eau/huile. La méthodologie originale utilisée pour explorer la réaction de réticulation ou l'étude des monocouches lipidiques peut être adaptée à d'autres études rhéologiques.

Liste des publications

➤ **Poster presentation**

Brou, A. G., Anton, N., Gbassi, K. G., Vandamme, T. F.

Study of polymerization at the water/oil interface for the functionalization of nanoparticles. 26 th International Conference on Bioencapsulation. Strasbourg, France. August 27-29, 2019

Études interfaciales de polymères et surfactants insolubles, caractérisation par tensiométrie et rhéologie bi-dimensionnelle

Résumé

Les nanoparticules présentent une importante surface spécifique qui influence leur biodisponibilité. L'objectif de ce travail était de développer de nouvelles méthodes pour greffer des molécules actives à la surface des nanoparticules et d'optimiser la stabilité des vecteurs à visée thérapeutique et ou diagnostique. La première partie concerne l'étude du comportement interfacial d'un surfactant portant trois fonctions alcynes et de sa réaction de polymérisation par chimie clic par un agent réticulant soluble dans l'eau et présentant deux fonctions azotures. La seconde partie se focalise sur le comportement interfacial de lipides pH-sensibles, et propose une nouvelle approche d'étude par la méthode d'analyse axisymétrique de la forme de la goutte (ADSA). Dans la troisième partie un polymère préformé et solubilisé en phase organique est amené à précipiter à l'interface eau/huile. Cette étude est conduite d'abord en volume, pour étudier finement les conditions de précipitation à l'interface eau/huile.

Mots clés : Nanoparticule, comportement interfacial, surfactant, chimie clic, analyse axisymétrique de la forme de la goutte (ADSA)

Abstract

Nanoparticles have a large surface area which influences their bioavailability. The aim of this PhD work was to develop new methods for grafting active molecules onto the surface of nanoparticles and to optimise the stability of vectors for therapeutic and/or diagnostic purposes. The first part concerns the study of the interfacial behaviour of a surfactant carrying three alkyne functions and its polymerisation reaction by click chemistry with a water-soluble cross-linking agent having two azide functions. The second part focuses on the interfacial behaviour of pH-sensitive lipids and proposes a new study approach using the axisymmetric drop shape analysis (ADSA) method. In the third part a preformed polymer solubilized in organic phase is precipitated at the water/oil interface. This study is first conducted in volume, to finely study the precipitation conditions at the water/oil interface.

Key words: Nanoparticles, interfacial behaviour, surfactant, click chemistry, Axisymmetric drop shape analysis (ADSA)