THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale de Physique et Chimie des Matériaux

présentée par

Julie GUERY

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

EMULSIONS DOUBLES CRISTALLISABLES : STABILITE, ENCAPSULATION ET RELARGAGE

Soutenue publiquement le 10 Novembre 2006

Devant le jury composé de :

Mme	Sylviane LESIEUR	Rapporteur
M.	Fernando LEAL-CALDERON	Rapporteur
Mme	Valérie CABUIL	Président
M.	Nicolas LEQUEUX	Examinateur
M.	David A. WEITZ	Examinateur
M.	Bernard CABANE	Examinateur
M.	Jérôme BIBETTE	Examinateur

A mes parents

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Pierre Turq et Valérie Cabuil pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire « Liquides Ioniques et Interfaces Chargées » pendant ces trois années de thèse. Je remercie aussi chaleureusement Valérie pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Jérome Bibette a dirigé cette thèse et m'a encadrée au cours de ces 3 années. Je te remercie, Jérôme, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir accompagnée, aidée et soutenue pendant tout ce temps. Tes conseils et tes intuitions sur ce travail ont été précieux et ont porté leurs fruits. Merci pour tout.

Je remercie Fernando Leal-Calderon et Sylviane Lesieur qui ont assumé la tâche de rapporteur de mon manuscrit. Je remercie plus particulièrement Fernando pour l'intérêt qu'il portait à mon travail lors de ses passages au laboratoire. Je remercie Sylviane Lesieur pour ses conseils et ses critiques constructives sur mon manuscrit.

Je souhaite remercier chaleureusement Nicolas Lequeux. Tout d'abord, pour avoir accepté de faire partie de mon jury (mais avais tu vraiment le choix ??). Te croiser au laboratoire était toujours un plaisir. C'est quand même grâce à toi, « mon directeur officiel », si j'ai pu intégrer le labo…

Je remercie aussi David Weitz. It was a real pleasure for me to discuss and to work with you during these 3 years. You kindly accepted to judge this work and have patiently put up with a long oral presentation in French. Thank you so much for everything.
Je tiens à remercier très chaleureusement Bernard Cabane. Chacun dans sa vie fait une rencontre qui guidera ses choix professionnels et influencera le reste de sa vie. Je considère que c'est grâce à lui si j'en suis là aujourd'hui. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de nos discussions tout au long de ces années que ce soit chez l'Oréal ou à l'ESPCI. Vous m'avez toujours accueillie avec gentillesse et vous avez toujours pris le temps de répondre avec tellement de simplicité à toutes mes questions. Vous m'avez donné goût à la science et à la recherche et je vous en serais toujours reconnaissante. Je vous remercie aussi d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. C'était un joli symbole pour moi de partager ce moment avec vous.

De nombreuses personnes sont à l'origine de ce travail : Catherine Rouzeau, Audrey Royère, Cécile Goubault, Karine Andrieux. Je leur suis reconnaissante pour tout le travail effectué, leur apport et les premières réflexions sur les émulsions doubles cristallisables. Catherine, je te remercie pour tout. Pour ton amitié, tout d'abord. Tu as embelli mon début de vie au laboratoire. Je te remercie aussi pour tout ce que tu m'as appris. Tu m'as passé le flambeau sur ce sujet et j'ai conscience du travail énorme que tu avais fourni. Merci. Audrey, deuxième membre officiel de la célèbre « Suppoteam » ! Merci pour tout, pour tout ce qu'on a partagé au labo, pour ton écoute dans mes moments de blues et de doutes. Enfin, quelqu'un au labo qui comprenait et partageait mes soucis de Couette… Cécile, merci pour ton regard d'experte sur tous ces travaux, pour tes précieux conseils et ton soutien dans les moments difficiles.

Je tiens à remercier Emanuel Bertrand. Tout d'abord, je n'oublie pas à quel point tu t'es battu sur le plan administratif pour me permettre d'intégrer le laboratoire. Et ce n'était pas si facile… Ensuite, tu as toujours été là, plus ou moins disponible mais jamais très loin pour répondre à mes angoisses de thésarde. Et puis, professionnellement, je sais à quel point tu t'es investi dans mon travail, plus particulièrement dans la rédaction de l'article et je te remercie mille fois. Enfin, merci pour ton amitié et pour les papotages autour de thés à la menthe !

Je remercie chaleureusement Pierre Levitz. Nos longues discussions et les nombreux modèles qui en découlaient ont permis d'interpréter les expériences de rhéologie. Je te remercie pour ton enthousiasme communicatif et pour le temps que tu as consacré à ce sujet. Ce fut un immense plaisir et une grande chance pour moi de pouvoir travailler avec toi.

Toutes les manips de rhéologie, c'est-à-dire tout le premier chapitre expérimental et donc une bonne partie de ce travail de thèse ont été réalisées au laboratoire de Physicochimie des Polymères et des Milieux Dispersés et ont été rendues possible grâce à l'aide de Guylaine Ducouret. Je tiens sincèrement à vous remercier pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre confiance pour m'avoir laissé utiliser le rhéomètre pendant de nombreuses heures.
Je tiens à remercier également Sandrine Mariot pour m'avoir permis d'utiliser les appareils de DSC, mais aussi pour son dynamisme et sa gentillesse.
Plusieurs stagiaires ont découvert à mes côtés les joies de la formulation et des émulsions doubles cristallisables : Benoit de Gaudemaris, Benjamin Gennari et la souriante et adorable Jennifer Lang. Merci pour votre aide précieuse sur ce travail. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec chacun d'entre vous.

Je tiens à remercier chaleureusement Valérie Taly. Ce fut une expérience très enrichissante pour moi de travailler avec toi aussi bien sur le plan professionnel qu'humain. Merci d'avoir partagé avec moi ton dynamisme, ta passion pour la recherche et le début de ta grossesse !

Je remercie Howard Stone pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail lors de ses séjours parisiens. Thank you Howard for our interesting discussions and for your kindness.

Le centre R&D de Unilever à Port Sunlight et plus particulièrement Mel Carvell et Jordan Petkov ont manifesté un grand intérêt pour mon travail. Merci pour avoir cru en ce sujet, merci pour leur soutien et pour les discussions que nous avons partagées sur les nombreuses applications.
Ces quelques lignes sont aussi l'occasion pour moi de remercier les sociétés Gattefossé et Quimasso pour m'avoir gracieusement et généreusement fourni les matières premières utilisées tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier de nombreuses personnes dont j'ai croisé la route à l'ESPCI et avec qui j'ai partagé des moments de travail mais aussi de détente : Frédéric Kanoufi, merci pour ton aide quand je ne comprenais plus rien à l'électrochimie ; Steph, toujours le sourire, la bonne humeur, c'était bon de te trouver sur mon chemin à PC quand le moral chutait ; Arnaud (PPMH), Jean-Marc (LECA), Cécile et Fabrice (MMC), merci d'avoir partagé avec moi les doutes de tout bon thésard.

Une thèse, c'est aussi un laboratoire où l'on passe de nombreuses heures et où il est bon de se sentir bien. Alors un grand merci à tous les gens du labo LCMD, passés et présents.
Laetitia, ton arrivée dans le bureau a changé mon quotidien… Je n'oublierai jamais, nos fous rires, nos déprimes partagées, nos confidences et nos amis virtuels. Merci pour ton amitié. C'est une chance d'avoir pu partager ces trois années avec toi.
Jacques, merci pour ton accueil chaleureux quand je suis arrivée au laboratoire. Merci d'avoir partagé ton bureau avec moi, avec les hauts et les quelques bas de nos vies de thésard.
Jean, merci pour ta disponibilité et ton aide en informatique, microscopie…
Isabelle, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton grand cœur. Toujours là quand plus rien ne va : une gaine qui casse, un Couette qui déraille, un moteur qui rend l'âme… Tu m'as toujours sauvée des pires situations…!!

Jean-Yves, merci pour tout ce que tu fais pour nous au quotidien. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse. Tu es une perle rare pour un laboratoire !
Abdes, merci pour avoir supporté mon stress de fin de thèse et pour ton soutien. Coraline, merci pour ta bonne humeur et ton imperturbable optimisme. Djamal, merci pour avoir partagé avec moi de nombreux week-ends au laboratoire. C'était bon de se sentir moins seule. Lise, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide précieuse. Un grand merci à Rémi, Cécile, Anne, Caroline, Sébastien, Julien Legrand, Audrey, Nicolas, Thomas, Julien, Geneviève, Florence, Benjamin, Alexandre, Jérémie...

De nombreuses personnes m'ont fait goûtée aux joies de la recherche et m'ont encouragée dans cette voie. Tout d'abord, des personnes rencontrées chez l'Oréal : Gilles Guerin, merci pour m'avoir toujours fait confiance et pour votre soutien tout au long de ces années ; Laurence Arnaud, tu as cru en moi il y a déjà longtemps et je te remercie de m'avoir donné ma chance ; Jean-Thierry Simonnet et Florence L'Alloret pour m'avoir accueillie en stage de DEA ; Odile Aubrun, Bruno Biatry… Mais aussi des personnes croisées chez Rhodia à Cranburry : Pascal Hervé, Olivier Théodoly, Jean-François Berret. Merci pour m'avoir fait partager votre passion.

En dehors du labo, il reste du temps, trop peu parfois, pour les amis. Tous, vous m'avez aidée, soutenue, et sortie la tête de mes « petites gouttes dans mes grosses gouttes »… Je vous remercie, c'est beau et bon de vous savoir autour de moi. Tout d'abord, Marie, mon amie, pour tout ce qu'on a vécu et pour être toujours près de moi ; les filles, Célia, Cha, Carole, Sido, Béné, je vous adore ; Cyril, merci pour notre amitié, merci d'être là, toujours ; Carinakis, pour ta joie de vivre et ton amitié ; les « Chimie Paris » Nath, Dom, Benj, Florian, Ingrid, Thomas, Frantz… ; PH, pour notre vieille et belle amitié ; mes Calaisiens préférés, Marie, Nico, Joe, Sophie, Syl ; et tant d'autres, Aurélie, Amel, Gigi…

Enfin ma famille, un grand merci à Maman, Papa, Caro, Chri, Eloise, Math, Ony, Adri qui m'ont toujours soutenue… Je vous aime. Eta nire maitea, Galder… Merci d'être là, merci pour tout ce que tu me donnes…merci.

Table des matières

Introduction 13

1 Les nano et microréservoirs 15

1.1 Les enjeux des microréservoirs 15
1.1.1 L'encapsulation 16
1.1.2 La vectorisation 17
1.1.3 Les réactions en goutte 19
1.1.4 Conclusion 22

1.2 Les liposomes 22
1.2.1 Définitions 22
1.2.2 Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques 24
1.2.3 Stabilité des liposomes 26
1.2.4 Paramètres influençant la stabilité de la membrane lipidique 30
1.2.5 Applications 34
1.2.6 Limites des liposomes 36

1.3 Les nano et microparticules 37
1.3.1 Définitions 37
1.3.2 Propriétés d'encapsulation des microparticules 38
1.3.3 Influence de la porosité de la matrice 40
1.3.4 Applications et limites des particules à base de polymère 42
1.3.5 Phénoménologie propre aux particules solides de lipides 43
1.3.6 Applications et limites des particules solides à base de lipides 48

1.4 Les émulsions doubles 49
1.4.1 Définition d'une émulsion double 49
1.4.2 Métastabilité des émulsions doubles 51
1.4.3 Applications et limites des émulsions doubles 61

1.5 Conclusion 62

BIBLIOGRAPHIE 65

2 Matériaux et méthodes 77

2.1 Choix du matériau 77
2.1.1 Nature des huiles cristallisables et des tensioactifs 77
2.1.2 Equilibrage initial des pressions osmotiques 78

2.2 Préparation des émulsions doubles cristallisables quasi-monodisperses 79
2.2.1 Préparation d'une émulsion inverse quasi-monodisperse 79
2.2.2 Préparation d'une émulsion double quasi-monodisperse en phase concentrée 81

2.3 Méthodes de caractérisation des émulsions doubles cristallisables 83
2.3.1 Caractérisation du matériau par DSC 83
2.3.2 Observations en microscopie optique 85
2.3.3 Observations en microscopie électronique à balayage 85

2.3.4 Détermination de la distribution de tailles par diffusion statique de la lumière 85

2.4 Méthodes de suivi des processus de relargage des émulsions doubles cristallisables 86

2.4.1 Principe de la mesure potentiométrique 86

2.4.2 Montage expérimental utilisé 88

2.5 Méthodes de suivi du comportement sous écoulement 89

BIBLIOGRAPHIE 91

3 Stabilité au repos et sous écoulement des émulsions doubles cristallisables 93

3.1 Stabilité du système au repos 93

3.1.1 Système d'étude 93

3.1.2 Observations expérimentales 94

3.1.3 Interactions entre particules 94

3.2 Stabilité du système sous écoulement 97

3.2.1 De l'importance de l'écoulement et de ses conséquences 97

3.2.2 Observations expérimentales 99

3.2.3 Etude rhéologique du phénomène 101

3.2.4 Quantification du phénomène 108

3.2.5 Interprétation 111

3.3 Conclusion 127

BIBLIOGRAPHIE 129

4 Propriétés d'encapsulation et de relargage des émulsions doubles cristallisables 131

4.1 Propriétés d'encapsulation au stockage 131

4.1.1 Description des matériaux 131

4.1.2 Propriétés d'encapsulation du matériau en fonction de la température de stockage 132

4.1.3 Approche théorique du mûrissement de composition dans les émulsions doubles 134

4.1.4 Confrontation de la théorie avec l'expérience 135

4.1.5 Conclusion 138

4.2 Propriétés d'encapsulation du matériau sous conditions hypo-osmotiques 139

4.2.1 Remarques préliminaires 139

4.2.2 Quelques considérations sur la pression osmotique 140

4.2.3 Premières observations sur la Suppocire DM 142

4.2.4 Influence de la nature de la cire sur les cinétiques de relargage 146

4.2.5 Influence de la nature de la cire sur l'évolution structurale du matériau 152

4.2.6 Interprétation 156

4.3 Quelques arguments supplémentaires 166

4.4 Conclusion 169

BIBLIOGRAPHIE 170

Conclusion _____ **171**

Annexe 1 Calorimétrie différentielle à balayage _____ **173**
Annexe 2 Microscopie Electronique à Balayage _____ **175**
Annexe 3 Diffusion statique de la lumière _____ **177**

Introduction

De nombreux matériaux de taille colloïdale ont été envisagés au cours de ces dernières années pour encapsuler, vectoriser, ou compartimenter, c'est-à-dire jouer le rôle de microréservoirs capables de séparer une espèce d'un milieu continu par l'intermédiaire d'une membrane. Parmi ces nombreux systèmes aux propriétés physico-chimiques différentes, les émulsions doubles sont très vite apparues être un candidat idéal. Grâce à leur structure compartimentée, ces matériaux isolent du milieu continu des réservoirs internes aqueux, pouvant contenir un principe actif hydrophile, par l'intermédiaire d'une matrice d'huile. Cependant, les émulsions doubles sont des systèmes métastables : les processus impliqués dans le vieillissement du matériau sont rapides et, actuellement, aucune application industrielle utilisant cette technologie n'a pu être correctement développée.

L'objectif de cette thèse est de concevoir un nouveau type de microréservoir, basé sur la science des émulsions doubles, mais dont les cinétiques de destruction seront parfaitement contrôlées. Les émulsions doubles sont des systèmes complexes dont la fabrication fait intervenir de nombreux constituants : de l'eau, de l'huile, des tensioactifs permettant de stabiliser les interfaces… Au cours de cette thèse, nous remplaçons l'huile qui compose la matrice par une membrane solide. Pour cela, nous utilisons une huile que nous appelons cristallisable, c'est-à-dire dont la température de fusion est supérieure à la température ambiante. Nous souhaitons explorer l'influence d'une telle matrice solide sur la stabilité du matériau. La nature solide de la matrice impose, d'une part, des nouvelles propriétés de surface aux particules, propriétés qui vont régir leur stabilité au repos et sous écoulement. L'état solide de la membrane va, d'autre part, influencer les processus intervenant dans les échanges entre les structures internes et le milieu continu et va donc modifier les cinétiques de libération d'une espèce initialement encapsulée.

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres. Le premier chapitre fait un état de l'art sur les nano et microréservoirs actuellement développés. Les avantages et les limites des différents matériaux envisagés sont présentés afin de cerner les objectifs auxquels doit répondre le matériau que nous cherchons à développer. Dans un deuxième chapitre, nous décrivons le matériau mis au point, ses composants ainsi que son processus de fabrication et les méthodes

de caractérisation et d'études. Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la stabilité colloïdale de ce matériau au repos et sous écoulement, que nous devons comprendre et maîtriser avant d'en envisager une éventuelle utilisation en tant que microréservoir. Enfin, dans le quatrième chapitre, nous étudions les propriétés d'encapsulation et de relargage des émulsions doubles cristallisables. Les différents paramètres contrôlant les processus de destruction du matériau et donc de libération d'une espèce encapsulée sont étudiés.

1 Les nano et microréservoirs

A l'heure des nano- et microtechnologies, un enjeu important dans la science des matériaux est l'obtention de colloïdes de structure compartimentée. Quelle que soit la nature de la matrice et de la structure interne, l'idée est d'obtenir des microréservoirs capables de séparer deux milieux de même nature ou de natures différentes par une paroi. La nature physicochimique de ces microréservoirs que ce soit le cœur, les interfaces ou la matrice, peut être variée. L'enjeu est avant tout d'en maîtriser la fabrication de manière reproductible et d'en contrôler les propriétés physicochimiques (stabilité, étanchéité, rupture…) en fonction du domaine d'application.

Cette quête n'est évidemment pas nouvelle et de nombreuses études ont été menées ces dernières années mais aucune n'a abouti actuellement au matériau idéal, facilement transposable en fonction du domaine d'application.

Dans ce chapitre, notre objectif est, dans un premier temps, de présenter les enjeux actuels des microréservoirs et les applications potentielles de ces nouveaux matériaux. Nous présenterons ensuite les différents systèmes qui ont été envisagés pour jouer le rôle de microréservoirs. Nous nous attacherons à décrire les principales caractéristiques physicochimiques et les applications éventuelles de ces matériaux. L'objet de cette étude bibliographique est de faire ressortir les avantages et les limites des systèmes existants dans un seul objectif : concevoir un nouveau matériau stable et performant en tant que microréservoir, dont les caractéristiques seront définies à partir des points forts et des points faibles des matériaux existants.

1.1 Les enjeux des microréservoirs

Maîtriser la technologie des microréservoirs est un enjeu important en vue des domaines multiples d'applications de ces matériaux. Que ce soit pour encapsuler, vectoriser ou être utilisé en tant que réacteur, le développement de ces matériaux représente un challenge scientifique à la fois fondamental et industriel.

1.1.1 L'encapsulation

Dans l'industrie, encapsuler est une volonté et un défi permanent que ce soit pour protéger une espèce face à un milieu agressif ou en contrôler la libération dans le temps.

- La microencapsulation dans le domaine de l'imprimerie

Historiquement, une des premières applications de la microencapsulation a été le papier autocopiant. La commercialisation de ce produit a débuté en 1968 : 110 000 tonnes de microcapsules ont été utilisées pour cette application aux Etats-Unis (Green et Scheicher, 1955). Ces papiers chimiques sont encore employés pour toutes sortes de formulaires commerciaux à pages multiples. Depuis le milieu des années 80, la communication olfactive s'est développée. Sont apparus des encarts parfumés dans les magazines pour faire connaître un parfum, un savon, un adoucissant pour le linge, ou un produit détergent. La plupart de ces publicités sont réalisées avec des encres contenant des microcapsules enfermant le parfum et permettant sa libération sous contrainte (Nelson, 2002).

- La microencapsulation et la cosmétique

La microencapsulation suscite un véritable engouement dans le domaine de la cosmétique : un des objectifs est d'utiliser des microcapsules comme réservoirs pour diverses substances cosmétologiquement actives et susceptibles d'être dégradées trop rapidement dans le milieu continu externe du produit : la vitamine E (action antiradicalaire), la dihydroxyacétone (action bronzante), ou encore la caféine (Brannonpeppas, 1993).

- La microencapsulation dans le domaine de l'agroalimentaire

Dans l'industrie alimentaire, l'encapsulation est un moyen idéal en vue de masquer les goûts de certaines substances telles que les vitamines. Elle peut permettre aussi d'éviter les interactions entre les différents composants d'un complexe alimentaire et de protéger les principes actifs vis-à-vis de l'oxydation (protection des arômes) ou encore de l'humidité (protection du sel et du sucre). L'utilisation de microcapsules est même envisagée afin de réduire le volume gras et créer de nouveaux produits allégés (Augustin et al., 2001 ; Heinzen, 2002).

- La microencapsulation dans l'industrie textile

Depuis le début des années 90, des applications commerciales de la microencapsulation dans le domaine textile sont apparues. Les fabricants de textile montrent de plus en plus d'intérêt pour les tissus avec une odeur persistante ou un actif cosmétique se déposant sur la peau. D'autres applications sont étudiées tels que les répulsifs pour insectes, les colorants, les vitamines, les antimicrobiens et les matériaux à changement de phase et de couleur (Nelson, 2002).

- La microencapsulation dans l'agrochimie

Dans le domaine de l'agrochimie, certains vecteurs colloïdaux peuvent véhiculer des pesticides et des insecticides sous forme ultra-dispersés, ce qui permet d'améliorer la pénétration de la matière active et de la protéger vis à vis des dégradations. Ces améliorations permettent de diminuer les quantités de produit utilisées et contribuent ainsi à la protection de l'environnement (Markus, 1996).

- Autres intérêts industriels

Les microstructures présentent aussi un réel intérêt dans la détoxification d'un milieu : en effet, des substances actives peuvent migrer du milieu continu vers la structure interne de la capsule. Ainsi, un tel matériau apparaît utile pour purifier une eau contenant un résidu toxique, ou encore d'un point de vue médical dans le traitement des overdoses (Chiang et al., 1978).

Mais c'est véritablement dans l'industrie pharmaceutique que ces nouveaux concepts de matériaux présentent un réel intérêt. Au-delà de l'encapsulation de principe actif et donc sa protection face au milieu extérieur et une libération contrôlée dans le temps, c'est la vectorisation qui est recherchée : une libération contrôlée dans le temps mais aussi dans l'espace.

1.1.2 La vectorisation

Aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Les barrières à traverser sont des systèmes très

complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Certaines molécules sont inefficaces car elles ne diffusent pas spontanément à l'intérieur de la cellule alors que leur cible thérapeutique est à localisation intracellulaire. Ainsi, la vectorisation des médicaments est aujourd'hui un axe important de recherche dans le domaine pharmaceutique. Il s'agit donc de transporter des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique (Andrieux et al., 2003).

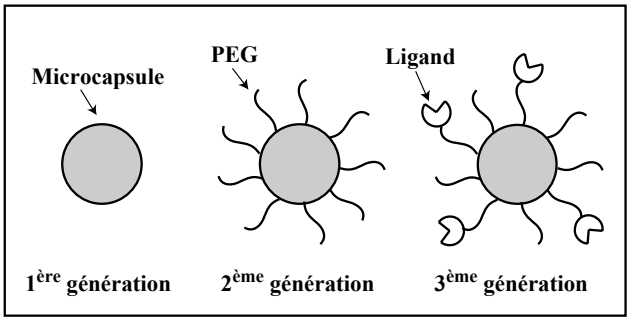


Figure 1.1
Vecteurs 1ère, 2ème et 3ème génération

Des vecteurs (cf. figure 1.1), dits de première génération, ont été mis au point dans les années 1970 par des équipes européennes (Couvreur et al., 1977 ; Gregoriadis, 1977). Après administration intravasculaire, ces vecteurs particulaires sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts de protéines et sont ainsi reconnus par les macrophages du foie et de la rate. Cet « adressage » peut être mis à profit pour améliorer l'efficacité de traitements à base d'antibiotiques destinés à combattre les infections intracellulaires ou pour diriger un agent anticancéreux au niveau du foie (cas des métastases hépatiques). De plus, grâce à ces vecteurs, la toxicité vis à vis d'autres organes est réduite (Damge et al., 1990 ; Fattal et al., 1989).

Les vecteurs de deuxième génération (cf. figure 1.1) sont nés de la nécessité de diriger les médicaments vers des territoires biologiques autres que la sphère hépato-splénique. La surface des vecteurs a alors été modifiée à l'aide de polymères hydrophiles et flexibles, typiquement des polyéthylène glycol (PEG). Le concept de répulsion stérique a abouti à la mise au point de vecteurs dits « furtifs », c'est à dire invisibles pour les macrophages (Woodle et al., 1992 a et b) et capables de diffuser de manière sélective au travers des capillaires rendus plus perméables par une réaction inflammatoire. Certaines avancées permettent même d'envisager la translocation de ces vecteurs de deuxième génération au niveau des sanctuaires biologiques

comme le cerveau (Brigger et al., 2002) ou le tissu oculaire, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles (Gabizon et al., 1988 et 1990).

Les vecteurs de troisième génération (cf. figure 1.1) sont maintenant capables d'apporter leur contenu sélectivement aux cellules de certains types uniquement (Maruyama et al., 1999). Celles-ci, présentent souvent à leur surface des marqueurs ou récepteurs spécifiques. Ces derniers sont maintenant bien décrits et leurs ligands, c'est-à-dire les protéines qui reconnaissent spécifiquement les récepteurs visés, sont souvent identifiés. Ainsi, les ligands de ces récepteurs peuvent être utilisés pour piloter les vecteurs et leur contenu vers les cellules qui les expriment. Dans ce but, le ligand est greffé à la surface des vecteurs afin d'y être exposé et de pouvoir interagir avec les récepteurs des cellules cibles.
Ainsi, maîtriser grâce à ces vecteurs la distribution spatiale et temporelle de molécules biologiquement actives dans l'organisme est, sans conteste, une application qui, bien qu'à ses débuts, peut contribuer à l'amélioration de la thérapeutique.

Au-delà du concept de microréservoirs capables de protéger et véhiculer des substances actives, il est aussi possible d'imaginer que ces microstructures soient le lieu de réactions chimiques et biologiques et puissent jouer le rôle de microréacteurs.

1.1.3 Les réactions en goutte

Les nano- et microtechnologies offrent de nouveaux outils à la chimie. L'avenir de ce domaine se trouve dans la miniaturisation et plus particulièrement dans les microréacteurs. L'enjeu actuel de la chimie est de réduire les volumes utilisés et de les compartimenter. Miniaturiser la taille des réservoirs présente, en effet, de nombreux avantages : une économie des substances nocives comme les solvants, un énorme gain de temps et de sécurité sur les réactions explosives mais encore une efficacité et un contrôle accrus des réactions par leur confinement.
La volonté de miniaturiser la taille des réacteurs et de passer d'une réaction dans un tube de quelques millilitres à une réaction dans un réacteur de quelques microlitres n'est pas nouvelle. Les gouttes d'eau microscopiques d'une émulsion inverse (eau dans huile) sont utilisées pour jouer le rôle de compartiments chimiques isolés, des microréacteurs au sein desquels ont lieu les réactions chimiques dans le domaine de la biologie, par exemple (Bernath et al., 2005 ;

Tawfik et Griffiths, 1998). Dans le cas d'une émulsion directe (huile dans eau), les gouttes d'huile peuvent être utilisées comme réacteur pour des réactions de polymérisation (Larpent et al., 1991 ; Antonietti, 2002).

Deux grandes limitations sont apparues pour ce type de réactions en goutte : tout d'abord, généralement fabriquée par agitation mécanique, en volume, l'émulsion est polydisperse et la taille des réacteurs n'est donc pas contrôlée. Or, la taille du réacteur, et donc le volume de réaction influence fortement les cinétiques de réaction. De plus, en volume, les microréacteurs ne peuvent pas être observés et triés individuellement, c'est-à-dire que les résultats et les produits issus de ces réactions en gouttes donnent une moyenne sur un ensemble d'objets dont on ne peut pas tirer individuellement d'information.

Un nouvel outil a alors été développé depuis quelques années et suscite un véritable engouement : la microfluidique. Par microfluidique, on entend les technologies qui contrôlent le flux de petites quantités de liquides ou de gaz (de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-12} litres) dans des systèmes miniatures. La microfluidique utilise des puces dans lesquelles circulent des gouttes micrométriques pour être analysées au fil de leur parcours. Elle permet aujourd'hui de fabriquer des émulsions inverses calibrées qui peuvent alors jouer le rôle de microréacteurs avec des débits importants. Ces débits sont tels que mille gouttes par seconde donc mille microréacteurs sont alors disponibles, soit autant de réactions chimiques identiques qui peuvent être étudiées et analysées. La géométrie des canaux contrôle les propriétés de mélange du contenu des gouttes et les temps de mélange ne prennent alors que quelques millisecondes (figures 1.2 et 1.3).

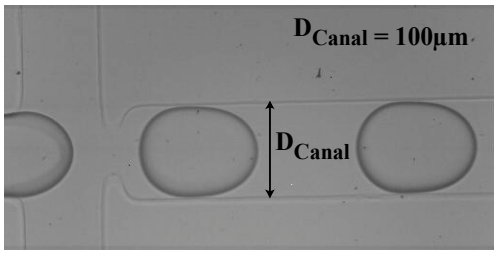


Figure 1.2
Formation de gouttes d'eau dans un canal microfluidique
(D'après Cristobal et al., 2006)

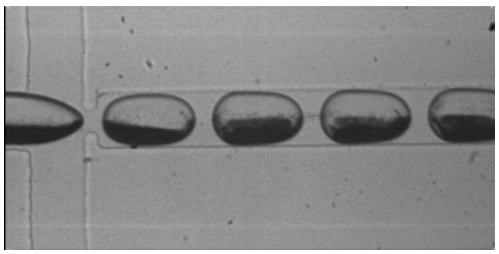


Figure 1.3
Encapsulation contrôlée de deux constituants au sein d'une goutte dans un canal microfluidique
(D'après Cristobal et al., 2006)

Grâce à ce nouveau concept, la réaction est de plus en permanence observable en divers états d'avancement. L'étude des cinétiques de réactions devient facile et performante : pour étudier ce qui se passe une seconde après le début de la réaction, il suffit de regarder l'endroit du circuit où les gouttes passent une seconde après le mélange. Il y a alors une équivalence entre

l'espace dans le microcanal et le temps de réaction dans le microréservoir. Grâce à ce concept de microréacteurs, la chimie passe véritablement à l'ère du haut débit, avec de grandes économies de substances et de temps (Song et al., 2003 ; Chen et al., 2005).

Dans le domaine de la biologie, la compartimentation et la maîtrise de réactions en gouttes apparaissent aussi être un outil indispensable pour le criblage de librairie de banques de gènes. Le criblage de banque de gènes nécessite de créer un lien entre le génotype (les ADN de la banque à cribler) et le phénotype (une caractéristique mesurable par l'intermédiaire de la protéine synthétisée) des objets utilisés. Ce lien est réalisé naturellement dans le compartiment cellulaire : le phénotype de chaque cellule est déterminé par les gènes qu'elle exprime. L'utilisation d'organismes vivants (bactéries, levures) pour le criblage de banques de gènes reste toutefois longue et contraignante (clonage du gène dans l'organisme, culture cellulaire…). De plus, elle n'est pas toujours efficace (obtention d'un signal mesurable, influence du métabolisme de la cellule, risque de cytotoxicité…).

Pour s'affranchir de ces contraintes, plusieurs méthodes d'études in vitro ont été développées (Griffiths et Tawfik, 2003 ; Mastrobattista et al., 2005 ; Bernath et al., 2004). Elles diffèrent principalement par le moyen utilisé pour assurer le lien entre le génotype et le phénotype. L'une de ces méthodes met en jeu la compartimentalisation in vitro (IVC) : il s'agit d'utiliser des microréservoirs pour maintenir le lien entre génotype et phénotype et recréer ainsi le compartiment cellulaire. Ces microréacteurs biologiques constituent ainsi une collection de réservoirs indépendants qui peuvent alors être triés grâce à l'utilisation d'outils de criblage à haut débit tel que le FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) comme l'illustre la figure 1.4.

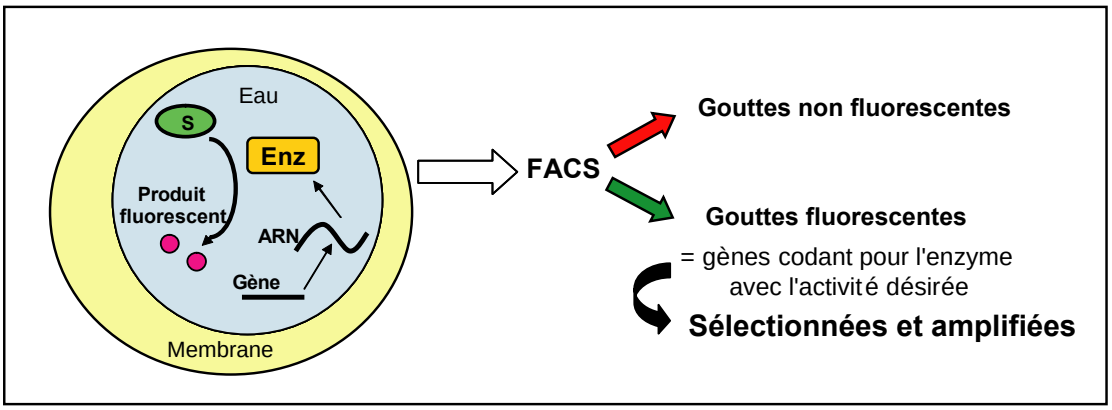


Figure 1.4
Principe de la compartimentalisation in vitro dans une microstructure
D'après Bernath et al., 2004.

1.1.4 Conclusion

En vue de ces nombreux enjeux aussi bien fondamentaux qu'industriels, de multiples matériaux ont donc été envisagés. Ils sont basés sur des concepts physico-chimiques différents les uns des autres et présentent donc des propriétés physico-chimiques différentes. Nous avons choisi de présenter plus particulièrement trois systèmes : les liposomes, les nano et microparticules et les émulsions doubles. Chacun de ces systèmes a fait l'objet de nombreuses études. L'objet de ce chapitre n'est pas de faire une revue bibliographique exhaustive et détaillée de chacun de ces matériaux mais de faire ressortir les principales particularités, les avantages et les limites de chacun de ces systèmes. Cette revue de l'état de l'art est indispensable afin de guider notre choix dans la conception d'un nouveau matériau stable et performant en tant que microréservoir.

1.2 Les liposomes

Les liposomes ont fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 40 ans. Par leur structure compartimentée, ils ont suscité et suscitent encore actuellement un réel intérêt dans le domaine de l'encapsulation.
Dans un premier temps, nous allons revenir plus particulièrement sur la signification du terme de « liposome ». Puis, nous décrirons les propriétés physicochimiques des lipides qui constituent la membrane, propriétés qui vont régir la stabilité de cette membrane et donc du liposome. Nous nous attacherons ensuite aux différents paramètres qui permettent de contrôler la stabilité de ces matériaux. Enfin, les nombreuses applications de ces systèmes seront évoquées ainsi que leurs principales limites.

1.2.1 Définitions

1.2.1.a Les lipides

Les lipides sont des molécules amphiphiles qui présentent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe (Shechter, 2002). En milieux aqueux, l'organisation la plus stable de ces molécules amphiphiles est celle qui permet de minimiser les interactions entre les composantes hydrophobes et les molécules d'eau.

Différents types d'auto-assemblage sont possibles selon la concentration en lipides, la température mais aussi selon la forme géométrique des molécules considérées (Israelachvili, 1992 ; Lipowsky et Sackmann, 1995) comme représenté sur la figure 1.5.

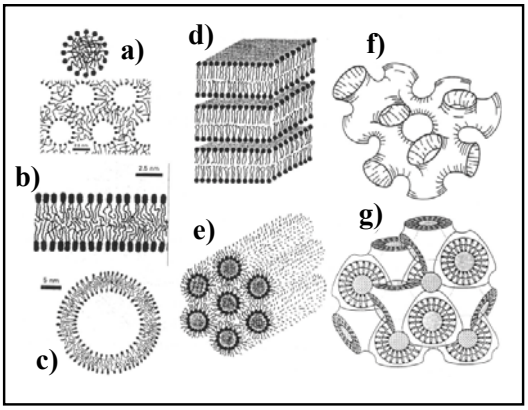


Figure 1.5
Exemple de phases possibles pour les molécules amphiphiles dans un solvant aqueux : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) vésicule, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique directe bicontinue.
(D'après Israelchvili, 1992 et Lipowsky et al., 1995)

Parmi ces assemblages, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux liposomes, candidats potentiels pour une utilisation en tant que microréservoirs.

1.2.1.b Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou plusieurs bicouches de lipides, le plus souvent de nature phospholipidique, permettant d'isoler un ou plusieurs compartiments internes aqueux du milieu aqueux extérieur. Les liposomes ont longtemps été considérés comme des analogues synthétiques de cellules vivantes. Bangham et al. (Bangham et al., 1965) et Johnson et al. (Johnson et al., 1971) sont les premières équipes à avoir fabriqué des liposomes.
Le rayon minimum de la paroi de la vésicule est fixé par la géométrie de la molécule : les têtes polaires des lipides sont séparées d'une distance maximale égale à deux fois l'extension des chaînes aliphatiques.
Les liposomes sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches lipidiques concentriques qui les composent. On distingue (figure 1.6) :

- les liposomes multilamellaires, appelés MLV pour « multilamellar large vesicles »,
- les liposomes unilamellaires de petite taille, appelés SUV pour « small unilamellar vesicles » (20 à 100 nm de diamètre),
- les liposomes unilamellaires de grandes tailles, appelés LUV pour « large unilamellar vesicles » (100 à 500 nm de diamètre),

- les liposomes géants, appelés GUV pour « giant unilamellar vesicles » (500 nm à 100 µm de diamètre).

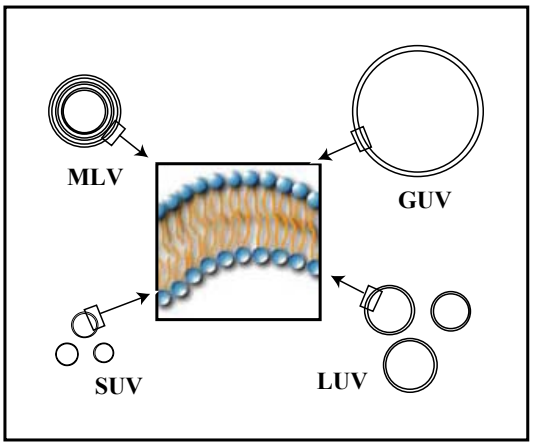


Figure 1.6
Représentation schématique des différents types de liposomes

Par leur structure compartimentée et l'innocuité de leurs composants, les liposomes sont très vite apparus comme le candidat idéal pour jouer le rôle de microréservoir. Leurs propriétés d'encapsulation sont fonctions de la nature de l'espèce à encapsuler mais aussi des caractéristiques physico-chimiques propres à la membrane.

1.2.2 Physico-chimie des lipides au sein des membranes lipidiques

La membrane des liposomes est un système complexe. Ses caractéristiques physico-chimiques et, notamment, l'organisation et la mobilité des phospholipides qui la constituent influencent la capacité d'encapsulation du liposome et son éventuelle utilisation en tant que microréservoir.

1.2.2.a Rotation des chaînes hydrophobes et fluidité membranaire

Chaque lipide pur possède une température de transition de phase qui correspond au passage réversible d'un état ordonné (L_β) vers un état désordonné (L_α) via un état intermédiaire P_β. (Lipowsky et Sackmann, 1995 ; Rappolt et al., 2000) (figure 1.7).

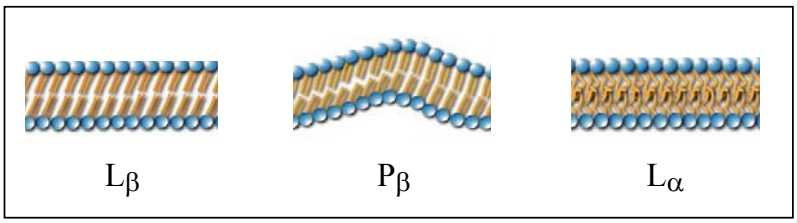


Figure 1.7
Représentation des principaux changements de phase au sein des membranes lipidiques (D'après Lipowsky et Sackmann, 1995 ; Rappolt et al., 2000)

Ces deux états résultent d'une rotation possible autour des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des queues apolaires des phospholipides. A une température suffisamment faible, la plupart des chaînes carbonées sont de type trans. Les chaînes sont étirées au maximum, parallèles les unes aux autres et ordonnées (figure1.8.A) : il s'agit de l'état L_β (figure1.8.C). Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire (Shechter, 2002). La probabilité d'une isomérisation trans-cis augmente. Dans une bicouche lipidique, les liaisons cis provoquent un changement de direction (figure 1.8. B) et rendent le parallélisme des chaînes plus difficile (Cevc, 1991). Au-delà d'une température donnée, appelée température de transition de phase, la conformation ordonnée passe à une conformation désordonnée : il s'agit de l'état L_α (figure1.8.D). Dans la conformation désordonnée, les chaînes oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la membrane. Elles ne sont plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche diminue (Cevc, 1991).

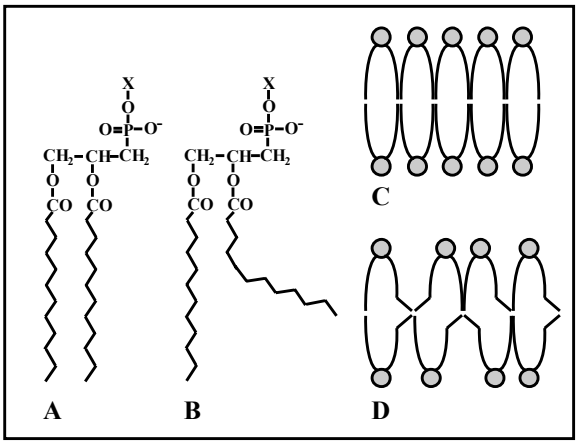


Figure 1.8
A. Phopspholipide « tout trans » ; B. Phospholipide avec une liaison cis ;
C. Membrane en conformation β ; D. Membrane en conformation α.
(D'après Lorin et al., 2004)

L'état ordonné de la bicouche, L_β, est défini comme un état de type gel, c'est-à-dire un état dans lequel les chaînes hydrophobes sont figées et présentent une mobilité réduite; l'état désordonné de la bicouche, L_α, est défini, au contraire, comme un état de type fluide, dans lequel les lipides sont animés de divers mouvements.

1.2.2.b Dynamique des lipides dans les membranes lipidiques

Des mouvements autres que l'expansion latérale interviennent au niveau des phospholipides des bicouches lipidiques (Lipowsky et Sackmann, 1995) :

- Les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane.
- Ils présentent aussi un mouvement de balancier plus ou moins prononcé.
- Ils sont aussi capables de diffuser au sein d'une même monocouche ou de passer d'une monocouche à l'autre (« flip-flop ») (figure 1.9).

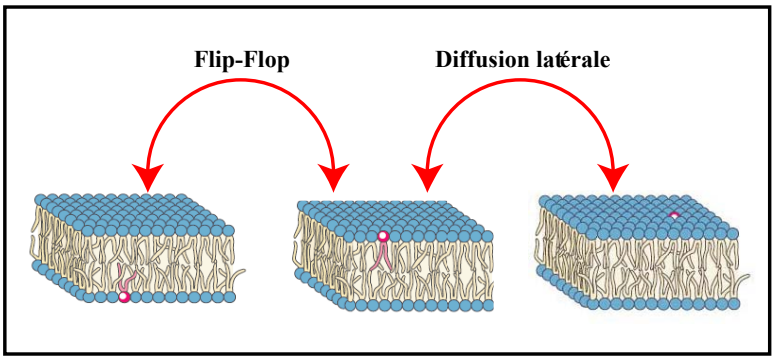


Figure 1.9
Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes.
(D'après Lipowsky et Sackmann, 1995)

La fluidité d'une membrane lipidique est donc définie comme l'aptitude des lipides à se mouvoir au sein de cette membrane (Shechter, 2002). Une bicouche dans son état ordonné de type gel, L_β, présente une fluidité plus faible que dans son état moins ordonné, L_α.

1.2.3 Stabilité des liposomes

1.2.3.a Fuite passive

La bicouche lipidique isole un réservoir aqueux du milieu continu, lui-même aqueux. Toute espèce initialement encapsulée dans le compartiment interne aura tendance à diffuser à travers la bicouche et à être libérée dans le milieu continu sur des échelles de temps variables, fonctions de la nature de la bicouche.
De nombreuses études ont été menées afin d'identifier les différents mécanismes intervenant dans ces processus de fuite. Ils diffèrent avant tout selon la nature de l'espèce encapsulée.

En l'absence de canaux ou de molécules de transport transmembranaire, la perméation, à travers la bicouche du liposome, de molécules d'eau et d'espèces non-ioniques est décrite

comme un processus de solubilisation-diffusion en trois étapes (Finkelstein, 1987 ; Stein, 1989 et 1990) :

- Adsorption de l'espèce à l'interface interne de la bicouche,
- Diffusion à travers la bicouche,
- Désorption

Les cinétiques de ce processus de solubilisation-diffusion sont fonction de la taille de l'espèce encapsulée, de son coefficient de partition entre l'huile et l'eau mais dépend aussi fortement de la fluidité de la membrane, c'est-à-dire de la dynamique des lipides au sein de la membrane : une réduction de la mobilité des lipides au sein de la membrane réduit la vitesse à laquelle les espèces diffusent à travers cette bicouche (Finkelstein, 1987 ; Stein, 1989). Différentes études ont expérimentalement établi un lien entre la fluidité de la membrane et sa perméabilité vis-à-vis de l'eau (Lande, 1995).
Dans le cas d'espèces ioniques, les mécanismes mis en jeu seront plus compliqués. En particulier, les mécanismes d'adsorption et de désorption dépendent alors fortement de la charge de la membrane et de la polarité des lipides mais aussi de la force ionique et du pH des deux milieux aqueux.

D'autres travaux (Nichols et Deamer, 1980; Lawaczeck, 1988 ; Jansen et Blume, 1998 ; Paula et al, 1996 ; Bordi et al., 1998) décrivent le flux des espèces ioniques à travers la membrane comme un passage d'ions à travers des pores se formant transitoirement dans la bicouche lipidique sous l'effet de fluctuations thermiques. Les pores constituent alors un chemin aqueux à travers lequel les ions peuvent diffuser, franchissant le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Comme souligné par Smith et al. (1984), ces pores résultent de fluctuations dans l'organisation lipidique de la bicouche mais leur densité, de l'ordre de 10^6-10^7 pores/cm^2, reste suffisamment faible pour ne pas affecter la structure de base de la membrane et provoquer sa destruction.

1.2.3.b Stabilité chimique

Les phospholipides assurent la stabilité de la membrane du liposome. Ces molécules sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles (Grit et al., 1993 a et b).

Des paramètres tels que la température, le pH et la conformation des phospholipides dans la membrane influencent la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Un pH optimal de 6.5 et une faible température permettent de limiter la dégradation des phospholipides par hydrolyse.
La peroxydation des chaînes d'acyles peut être limitée grâce à certaines précautions comme une température faible, l'absence de métal lourd en contact direct avec le liposome, une atmosphère inerte ou encore l'addition d'antioxydant (vitamine C).
Grit et Crommelin ont démontré que la dégradation des phospholipides par hydrolyse entraîne une hausse considérable de la perméabilité de la membrane (Grit et al., 1993 a et b). De même, la peroxydation des phospholipides dégrade les constituants de la membrane et des questions restent ouvertes actuellement sur l'innocuité des produits de cette réaction.

1.2.3.c Stabilité colloïdale

Les deux grands types d'instabilités auxquels sont soumis les liposomes sont l'agrégation et la fusion.
Les forces électrostatiques, stériques ou d'hydratation (c'est-à-dire les forces liées aux propriétés particulières des molécules d'eau près de la surface) qui existent entre deux liposomes, sont fonction de la nature des phospholipides constituant la membrane (Cevc et al., 1999). Le bilan de ces forces (attractives et répulsives) détermine la stabilité des suspensions de liposomes. Si les forces répulsives prédominent et si l'énergie répulsive qui en résulte est suffisamment efficace pour compenser les forces attractives, les membranes ne viennent pas au contact l'une de l'autre et la suspension de liposomes reste cinétiquement stable. Par contre, si la densité de charges à la surface du liposome est faible ou si il n'y a pas de répulsion stérique entre les objets, la barrière répulsive n'est alors pas suffisante pour compenser les forces attractives de Van Der Waals et les liposomes s'agrègent.

Une fois au contact, une fusion irréversible des membranes des liposomes peut être observée. Deux mécanismes permettant de décrire la fusion des liposomes sont présentés dans la littérature. Un premier mécanisme considère que, dans la région de contact, l'équivalent de deux lamelles lipidiques séparées par une couche d'eau se forme (figure 1.10.A) (Shechter 2002). L'enroulement des deux monocouches externes conduit à la formation d'une micelle inverse (figure 1.10.B) (Bentz et al., 1987 ; Lee et Lentz 1997). Cette micelle est caractérisée par un contact étroit des têtes polaires englobant un volume aqueux. La rupture coordonnée des deux monocouches internes en contact avec la micelle conduit à un pore reliant les

liposomes initiaux (figure 1.10.C) (Bentz et al., 1987). La dilatation de ce pore entraîne la fusion complète : les deux liposomes n'en font plus qu'un (figure 1.10.D). Les lipides sont alors de nouveau structurés en bicouches.

Un autre mécanisme a été plus récemment proposé. Dans celui-ci, le contact des monocouches externes conduirait à l'amorçage des deux micelles inverses, mais qui ne se formeraient pas entièrement (figure 1.10.B') (Hed et al., 2003). Cette première approche forcerait plutôt un contact entre les monocouches internes. La rupture ultérieure des deux monocouches internes pourrait conduire au pore de fusion puis à la fusion des deux liposomes. Plusieurs études soutiennent ce mécanisme (Bentz et al., 1987; Hed et al., 2003).

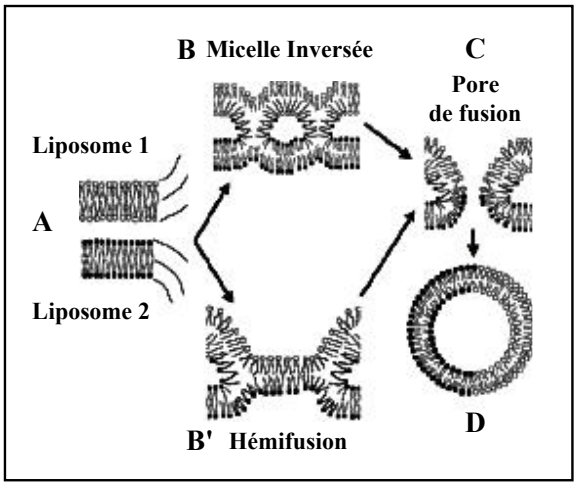


Figure 1.10
Structures adoptées par les lipides lors de la fusion (D'après Lorin et al., 2004)
A) Deux lamelles lipidiques séparées par une couche d'eau se forment
B) Formation d'une micelle inverse par enroulement des deux monocouches
B') Amorçage des deux micelles inverses
C) Pore de fusion suite à la rupture des deux monocouches internes
D) Fusion des deux liposomes

L'efficacité de la fusion dépend de la rigidité de courbure, κ, de la membrane des liposomes. Ce terme énergétique contrôle l'amplitude des fluctuations thermiques, des ondulations de la membrane. Les valeurs typiques de κ varient de quelques k_BT pour les membranes les plus souples à plusieurs dizaines de k_BT pour les plus rigides. L'efficacité de la fusion dépend aussi de la nature des lipides, de leur mobilité et surtout de leur état d'organisation. Il est, en effet, démontré que la présence de « désordre » et de défauts de la membrane, dans cette zone de contact, est favorable à la fusion des liposomes (Cevc et al., 1999). Ainsi, la température est un paramètre clef dans ce processus de destruction irréversible des liposomes : pour une température proche de la température de transition de phase des lipides, le passage de l'état

gel L_β à l'état fluide L_α s'accompagne de l'apparition de désordre dans l'organisation de la membrane et favorise donc la fusion.

En vue d'une application en tant que microréservoir, il est à noter que la formation des agrégats n'induit pas de perte du contenu aqueux ; chaque agrégat est un assemblage de liposomes individuels qui conservent leur intégrité. Par contre, dans le cas de la fusion, de nouvelles structures colloïdales sont formées et au cours de ce processus, une perte significative du contenu interne est généralement observée.

1.2.4 Paramètres influençant la stabilité de la membrane lipidique

Plusieurs paramètres peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même, sa stabilité et donc les propriétés d'encapsulation du liposome.

1.2.4.a La température

Comme nous l'avons décrit précédemment, la température est un facteur influençant fortement l'état d'organisation de la membrane : son augmentation permet le passage d'un état organisé (en dessous de la température de transition de phase) à un état désordonné (au dessus). Dans une gamme de température proche de la zone de transition, des imperfections vont apparaître dans la structure de la bicouche et la coexistence de ces zones organisées et désorganisées ont des conséquences sur les propriétés de la membrane : la présence de défauts favorise la fusion entre deux liposomes en contact (Cevc et al., 1999) mais augmente aussi la perméabilité de la membrane.
La transition de phase des lipides permet donc d'utiliser la température comme un paramètre externe contrôlant la perméabilité de la membrane et les propriétés d'encapsulation du liposome (Gaber et al., 1996).

1.2.4.b La composition de la bicouche

La composition de la bicouche permet de contrôler la fluidité de la membrane, paramètre qui intervient, comme nous l'avons déjà souligné, dans le contrôle des propriétés d'échange et de

stabilité du liposome. Un choix judicieux de la structure de la bicouche permet d'envisager un contrôle précis du relargage de l'espèce encapsulée dans le temps. L'insertion de molécules telles que le cholestérol peut ainsi mener à des modifications des propriétés physiques des membranes lipidiques. En effet, le cholestérol est une molécule possédant un caractère hydrophobe très marqué, ce qui lui permet de s'insérer au sein d'une membrane lipidique (Houslay, 1982). Elle est composée de quatre cycles rigides coplanaires et d'une chaîne ramifiée à 8 atomes de carbone (figure 1.11). La présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique engendre une condensation forte des lipides, faisant ainsi diminuer l'interface qu'ils occupent. Le cholestérol réduit ainsi la dynamique des lipides au sein de la membrane et tend donc à la rigidifier (Shechter, 2002). Ainsi rigidifiée, la membrane présente une perméabilité plus faible et une stabilité face à la fusion plus importante (Cocera et al., 2003 ; Raffy et Teissié, 1999).

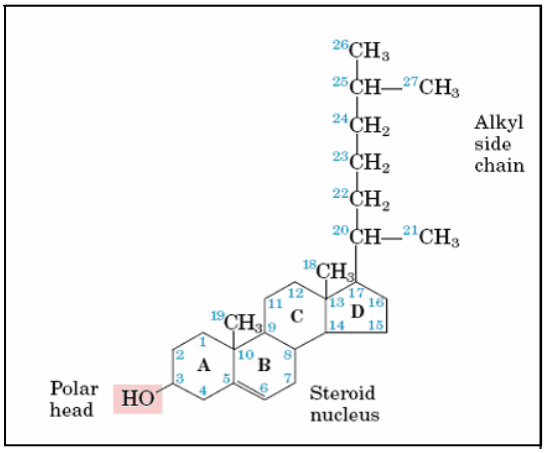


Figure 1.11
Structure de la molécule de cholestérol

1.2.4.c L'ajout de tensioactif dans le milieu continu

Lesieur et al. (2003) ont démontré que l'ajout d'une concentration donnée de tensioactif (octyl-β-D-glucopyranoside) provoque la libération d'une espèce encapsulée et plus précisément induit la formation transitoire de pores dans la membrane par lesquels l'espèce peut diffuser. Aux cours de ces expériences, les auteurs ont encapsulé dans les liposomes un fluide magnétique, constituée d'une dispersion de particules de maghemite (γ-Fe_2O_3). Le réel avantage de cette méthode réside dans l'utilisation de billes de taille et de forme contrôlée qui prouve sans conteste la formation de pores. Contrairement à une méthode utilisant une solution de macromolécules qui peuvent adopter différentes conformations et ne requièrent pas nécessairement de larges ouvertures pour diffuser, il est clairement démontré par ces

expériences que la perméation de ces billes de diamètre deux fois plus larges que l'épaisseur de la membrane ne peut se produire que par la formation de pores dans la membrane.

1.2.4.d Présence de polymère sur la membrane

La présence de polymères influence également le comportement de la membrane lipidique. Dans la nature, les membranes biologiques sont naturellement recouvertes de polymères, ce qui permet de limiter et contrôler les contacts entre cellules (Lipowsky et Sackmann, 1995).
Pour les liposomes, la présence d'une couche de polymère greffée à la surface (du polyéthylèneglycol par exemple) modifie la rigidité de courbure de façon importante (Baeckmark et al., 1995). De plus, les groupements PEG à la surface assurent une répulsion stérique entre les liposomes et limitent leur agrégation. Le groupe de Möhwald a montré que l'adsorption de polyélectrolytes augmente de façon importante la rigidité de la membrane lipidique, sans pour autant affecter la perméabilité de la membrane (Ge et al., 2003).

1.2.4.e Le pH

Les phospholipides ont une tête zwitterionique ou chargée. Ainsi, on peut s'attendre à des modifications du comportement des lipides avec le pH. Un changement de la valeur du pH externe peut modifier la charge de la tête polaire ou son hydratation. Cela a pour effet de modifier les forces entre têtes polaires voisines et donc modifier la stabilité de la membrane du liposome (Lee et al., 1999).
Ainsi, le développement de liposomes sensibles au pH permet d'envisager des matériaux qui sont stables pour le pH physiologique (pH = 7.4) mais se déstabilisent sous conditions acides, conduisant au relargage de leur contenu. Le concept de ce type de liposomes émerge de la mise en évidence de l'acidité des cellules endosomiales mais aussi, de l'environnement acide de certains tissus pathologiques (tumeurs, zones inflammées ou infectées) en comparaison avec un tissu normal. Une fois administrés, les liposomes restent stables dans l'organisme jusqu'à leur cible où, sous conditions acides, leur déstabilisation entraîne la libération de leur contenu (Drummond et al., 2000).
La plupart des liposomes sensibles au pH décrits dans la littérature sont constitués de lipides pouvant changer de conformation lors d'une baisse de pH. Un des inconvénients majeurs de ce type de liposomes est leur faible stabilité physique et/ou la perte de leur sensibilité au pH

au contact du sérum. Ainsi, plus récemment, une nouvelle approche consiste à fixer des copolymères eux-mêmes sensibles au pH à la surface des vésicules liposomales. Le polymère déstabilise la double couche lipidique uniquement lors d'un abaissement du pH et il en résulte une libération rapide du contenu liposomal à pH acide (Roux et al, 2002 et 2004).

1.2.4.f Le gradient de pression osmotique

Les membranes phospholipidiques sont peu perméables aux solutés mais perméables à l'eau (Reeves and Dowben, 1969 ; Huster et al., 1997). Elles constituent ainsi des membranes semi-perméables, sensibles aux variations de pression osmotique entre leur réservoir interne et le milieu continu aqueux (Finkelstein, 1987). En conditions hypo-osmotiques, c'est-à-dire si le potentiel chimique de l'eau dans la phase interne est inférieur au potentiel chimique de l'eau dans la phase externe, un flux d'eau apparaît du milieu continu vers l'intérieur. Les liposomes subissent alors une série de modifications structurales qui se traduit par le gonflement des vésicules, allant parfois même jusqu'à la rupture de la membrane.

L'effet du gradient de pression osmotique sur la membrane est étudié depuis longtemps (Gruner et al., 1985). Les temps caractéristiques des processus mis en jeu et donc la réponse du liposome aux gradients de pression osmotique sont fonction des propriétés mécaniques de la membrane, de la taille de la vésicule (Pencer et al., 2001) et sont influencés plus particulièrement par la composition de la membrane. En biologie, il est admis, par exemple, que les cellules présentent la capacité de contrôler les propriétés mécaniques de leur membrane en modulant leur composition en lipides (Murga et al., 1999).

Une description récente des processus subis par le liposome sous conditions hypo-osmotiques prend en compte la formation de pores dans la membrane : la vésicule répond de manière élastique au gonflement engendré par le flux d'eau mais lorsqu'une certaine limite élastique est atteinte, des zones de ruptures et plus particulièrement des pores se forment dans la membrane. Lorsque ces pores atteignent un rayon critique, l'excès de pression va être relaxé en éliminant une partie de l'eau interne et du soluté hors de la vésicule. Une fois l'équilibre des pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane rétabli, le pore se referme (Tieleman et al., 2003).

Comme dans le cas de la fusion, la formation de ces pores permettant la relaxation du liposome sous conditions hypo-osmotiques est fonction de la nature des phospholipides, de leur organisation et de la présence de défauts dans la membrane. Récemment, l'équipe de

Brochart et al. ont démontré l'influence de la présence de cholestérol et de Tween 20 sur la formation des pores et plus particulièrement sur leur durée de vie. Ils ont observé qu'en présence de cholestérol, les pores se refermaient plus rapidement tandis qu'en présence de Tween 20, ils restaient ouverts plus longtemps. Les temps d'ouverture de ces pores vont alors influencer les cinétiques de relaxation du liposome sous conditions hypo-osmotiques (Puech et al., 2003 ; Karatekin et al., 2003).

1.2.5 Applications

1.2.5.a Nature de l'espèce encapsulée

L'efficacité d'un liposome en tant que microréservoir dépend des propriétés physicochimiques de sa membrane mais aussi de la nature de l'espèce encapsulée et de son coefficient de partition entre les zones hydrophobes et les zones hydrophiles de la vésicule.
Si le soluté est purement hydrophile, il ne développe pas d'interactions avec la bicouche et se trouve dans le réservoir aqueux. Si le soluté est amphiphile et présente un coefficient de partition hydrophobe/hydrophile faible, il est localisé au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides et interagit avec la membrane par des forces de nature électrostatique, d'hydratation ou de Van der Waals. Si le soluté est purement hydrophobe, il est dissous dans la phase lipidique (Yu et Lin, 2000 ; Espuelas et al, 2003).
Par l'innocuité de ses composants, le liposome est un vecteur idéal de principes actifs en thérapeutique et en cosmétique.

1.2.5.b Applications thérapeutiques

Si la taille du liposome reste inférieure au micromètre, il peut être administré par simple injection (Gregoriadis, 1981). Dans la circulation, les liposomes fusionnent avec des membranes cellulaires ou sont endocytés (Pagano et Weinstein, 1978). Le principe actif est alors délivré dans la cellule.
Le médicament peut être aussi délivré lentement et de manière continue par le liposome vers les cellules cibles sans qu'il y ait pénétration du liposome dans les cellules. Ainsi, la morphine, composé amphiphile, peut être encapsulée dans des liposomes multilamellaires. Après injection de ces liposomes à l'endroit où l'anesthésie est désirée, la morphine diffuse lentement au travers des nombreuses bicouches des MLV avant d'être libérée de façon

passive et continue dans le milieu. L'emploi de liposomes permet de prolonger l'action de la morphine et de réduire sa concentration locale et donc sa toxicité et ses effets secondaires (Bouffioux, 1995).

Les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages (Schwendener et al., 1984). Ils s'accumulent dans le foie et la rate, ce qui limite leur utilisation pour traiter des affections au niveau d'autres organes (Van Rooijen, 1984). Par contre, le traitement des affections spécifiques du foie et de la rate est plus efficace via les liposomes. Pour augmenter le temps de vie des liposomes dans la circulation, l'adsorption de polyéthylèneglycol à leur surface est nécessaire et efficace (Klibanov et al., 1990).

Les liposomes peuvent aussi être utilisés pour encapsuler un gène ou un plasmide. Dans ce cas, le liposome est utilisé comme vecteur en thérapie génique (Dimitriadis, 1979 ; Zhou et al., 1994 ; Boukhnikachvili et al., 1997 ; Noguchi et al., 1998 ; Perrie et al., 2000 ; Briane et al., 2002).

Les liposomes sont aussi employés pour exposer des protéines à leur surface. Dans le cas de glycoprotéines virales, ces liposomes sont appelés virosomes (Kapczynski, Tumpey 2003). Après injection, les virosomes sont en grande partie captés par les cellules macrophages. Ils exposent ainsi directement l'agent antigène et activent le système immunitaire. Ces virosomes sont donc employés comme vaccins. Leur avantage est de ne pas contenir de matériel génétique infectieux tout en présentant la molécule antigénique.

Malgré ces nombreuses applications potentielles citées, actuellement, le nombre de produits sur le marché pharmaceutique utilisant la technologie des liposomes reste limité. On trouve Epi-Pevaril® pour les maladies pulmonaires, Ambisome® administré par injection pour le traitement des mycoses, DaunoXome® pour le traitement du Sarcome de Kaposi chez un patient atteint du SIDA, Doxyl® et Caelix® comme anticancéreux et Pevaryl®-Lipogel en application cutanée pour le traitement des mycoses.

1.2.5.c Applications cosmétologiques

L'utilisation des liposomes en cosmétique connaît un essor considérable (Lasic, 1998 ; Redziniak, 2003). En plus de la diffusion passive et continue à travers les bicouches des liposomes, ceux-ci pourraient fusionner avec les cellules de la peau et libérer le principe actif dans la cellule, augmentant ainsi l'efficacité du principe actif. Les premiers produits sur le

marché à utiliser la technologie des liposomes furent la crème « Capture » chez Dior en 1986 (Diederichs et Müller, 1994) ainsi que les produits niosomes de la gamme Lancôme chez l'Oréal.

1.2.6 Limites des liposomes

Les liposomes, par la biocompatibilité de leurs constituants, connaissent depuis plus de 30 ans un succès indéniable et les recherches au cours de ces dernières années sur ce domaine ont permis un avancement considérable de leur application dans le domaine thérapeutique et cosmétique. Cependant, ce type de système est loin de constituer le microréservoir « idéal » et de nombreuses limitations au développement des liposomes existent.

Il faut, en effet, noter la complexité de ce système qui doit être systématiquement adapté en fonction du soluté qu'il encapsule mais aussi en fonction de l'application souhaitée. Nous sommes loin du microréservoir idéal, facilement transposable et d'importants efforts de formulation doivent être systématiquement développés en fonction du domaine d'utilisation visé.

Les liposomes restent des systèmes instables, physiquement et chimiquement. Aujourd'hui, par exemple, aucune application pharmaceutique des liposomes par voie orale n'est possible en raison de la dégradation rapide des membranes lipidiques par la bile.

Ces dégradations de la membrane mais aussi les pertes de principe actif au cours de la fabrication mènent à des taux d'encapsulation relativement faibles de ces systèmes (inférieurs à 50%). La séparation, en fin de processus de fabrication, des molécules de principe actif libres de celles encapsulées entraînent des coûts importants qui limitent l'exploitation des liposomes à l'échelle industrielle. Développer des matériaux performants passe par l'utilisation de lipides de grande pureté, ce qui n'est pas non plus sans conséquence sur le prix du matériau.

Face à ces limitations, un autre type de système a parallèlement fait l'objet de nombreuses études, les nano et microparticules.

1.3 Les nano et microparticules

Depuis quelques années, un des axes principaux de la recherche dans le domaine de la microencapsulation concerne les vecteurs nano et microparticulaires de nature polymérique ou lipidique.

Ces systèmes sont nombreux et variés aussi bien dans leur composition que dans leur mode d'obtention et les paramètres qui gouvernent leurs propriétés physicochimiques sont tout aussi nombreux. Nous nous attacherons donc, dans un premier temps, à présenter uniquement leurs principales caractéristiques, ainsi que les différents paramètres gouvernant leurs propriétés d'encapsulation. Parmi ces nombreux paramètres, en vue de notre étude, nous avons souhaité attirer plus particulièrement l'attention du lecteur sur certains d'entre eux. Dans le cas des matrices de polymères, nous insisterons plus particulièrement sur l'influence de la porosité de la matrice sur la capacité d'encapsulation de ces matériaux. Dans le cas des particules lipidiques solides, nous étudierons plus en détail un paramètre clef : le polymorphisme cristallin des constituants de la matrice. Ce processus est en effet à la base des instabilités subies par le matériau, telles que la gélification et l'expulsion de la molécule active encapsulée, et limite donc ses applications.

1.3.1 Définitions

Les nano et microparticules sont des systèmes colloïdaux dont la taille est comprise entre 10 et 1000 nm. Elles sont constituées d'un matériau capable de retenir les molécules actives par séquestration ou adsorption. Les matériaux enrobants utilisés sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou encore des lipides.

Selon la nature de ces systèmes, on peut distinguer (figure 1.12) :

- les systèmes matriciels (Nano et microsphères) : dans ce cas, la particule est constituée d'un réseau polymérique ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve dispersée ou dissoute l'espèce que l'on souhaite encapsuler.
- les systèmes réservoirs (Nano et microcapsules) : dans ce cas, la particule est constituée d'un cœur liquide (plus ou moins visqueux) ou solide contenant l'espèce encapsulée, entouré d'une écorce solide et continue de matériau enrobant.

Dans les deux types de systèmes, l'espèce encapsulée peut aussi être adsorbée à la surface de la matrice.

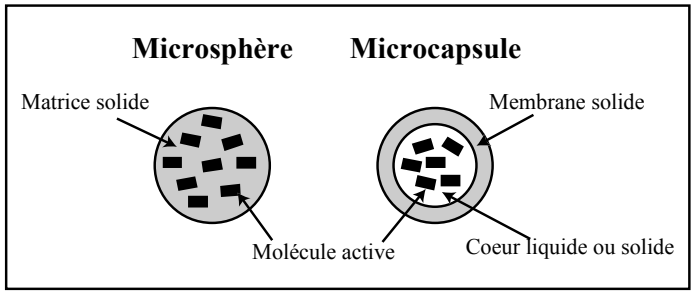


Figure 1.12
Représentation schématique d'une microsphère et d'une microcapsule

Les matériaux (polymères et lipides) utilisés pour obtenir ces structures sont nombreux et variés (Kreuter, 1994 ; Gombatz et al., 1995). Nous pouvons distinguer :

- les polymères d'origine naturelle : gélatine, alginate de sodium, chitosane, amidon
- les polymères cellulosiques : ethylcellulose, hydroxypropylcellulose…
- les polymères de synthèse : copolymères acryliques et métacryliques, polyoléfines, copolymères (acrylo-)vinyliques, polycaprolactone, polymères d'acides lactiques et glycoliques
- les lipides et cires minérales : corps gras solides, glycérides, cires (d'abeille, de carnauba…), cires minérales

Par rapport aux liposomes, l'intérêt majeur de ces matériaux particulaires réside dans la nature solide de leur matrice ou de leur membrane, qui leur confère une grande stabilité et des propriétés performantes d'encapsulation sur les temps longs (Couvreur et al., 1995 ; Soppimath K.S., 2001).

1.3.2 Propriétés d'encapsulation des microparticules

En fonction de l'application visée, les microparticules sont conçues pour libérer l'espèce, soit de manière déclenchée, soit de manière continue. Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement de cette membrane. La rupture est alors déclenchée, soit par une pression (mécanique ou osmotique), une variation de température, une variation de pH ou encore la dégradation enzymatique de la membrane. Les systèmes à libération continue sont majoritairement des microsphères. Les mécanismes mis en jeu sont, soit la diffusion de l'espèce à travers la matrice, soit la dégradation (érosion) ou dissolution de la matrice ou encore un couplage des deux (Shah et al., 1992).

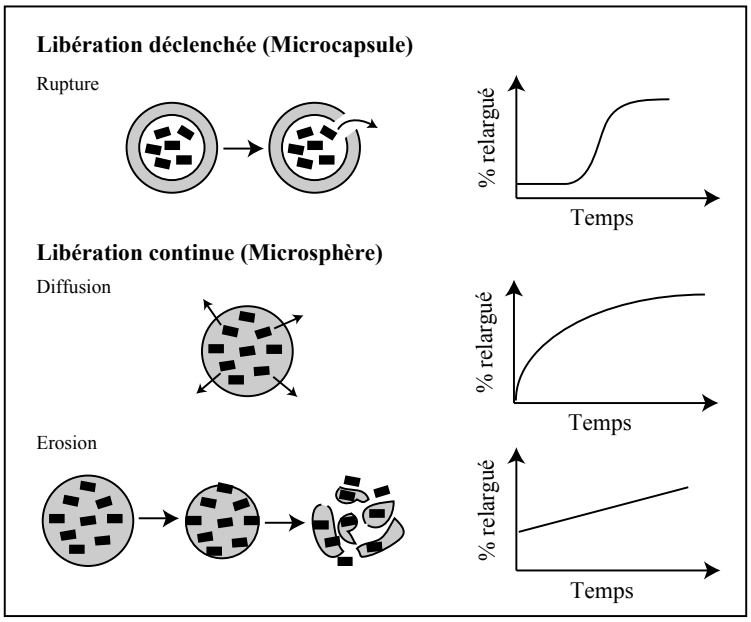


Figure 1.13
Représentation schématique des différents modes de relargage des microparticules et allure des cinétiques de relargage (D'après Kreuter, 1994)

Les profils de la figure 1.13 donnent une allure générale des différents modes de relargage des microparticules (Kreuter, 1994). Cependant, les cinétiques de libération de l'espèce encapsulée sont avant tout déterminées par les caractéristiques physicochimiques du système. Ces caractéristiques physicochimiques sont fonction du type de polymère ou de lipide utilisé mais aussi du processus de fabrication. Plus de 200 types de formulation sont actuellement citées dans la littérature et chacune d'elle influence l'arrangement de la microparticule mais aussi son taux d'encapsulation (Pinto Reis et al., 2006 ; Couvreur et al., 1995). Défini comme le rapport entre la masse de matière active sur la masse totale de la microparticule, le taux d'encapsulation peut être élevé dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90%. Dans le cas des microsphères, il reste relativement faible de l'ordre de 20 à 35%.

Le lien établi entre la particule et la molécule active influence aussi sa cinétique de libération. La molécule active peut être insérée dans le système au cours du processus de fabrication ou après formation de la particule. Dans le premier cas, un couplage covalent entre la molécule et le polymère peut s'établir. La molécule peut se trouver sous forme de solution solide ou dispersée au sein de la matrice. Dans le deuxième cas, après fabrication de la particule, la molécule active est adsorbée à sa surface. Elle peut alors rester à la surface ou diffuser vers la matrice et former une solution solide (Kreuter, 1994).

Les principaux paramètres qui gouvernent les propriétés d'encapsulation de ces systèmes sont :

- les paramètre externes tels que la température (Gao et al., 2005), le pH (Lamprecht et al., 2004 ; Sauer et al., 2001), la présence d'enzyme dans le milieu continu pouvant dégrader la particule, l'humidité,
- les paramètres intrinsèques à la phase interne tels que la solubilité de l'espèce, sa température d'ébullition et de fusion,
- les paramètres intrinsèques à la matrice ou à la membrane tels que la taille de la particule (Siepmann et al., 2004 ; Sansdrap et al., 1993 ; Berkland et al., 2002 ; Berkland et al., 2003), l'épaisseur de la membrane, la structure chimique du polymère, sa masse moléculaire (Capan et al., 1999), sa cristallinité et sa porosité (Klose et al., 2006).

Parmi les nombreux paramètres qui influencent les cinétiques de libération de microparticules, nous souhaitons décrire plus particulièrement l'influence de la porosité et des fractures de la matrice.

1.3.3 Influence de la porosité de la matrice

De nombreuses études ont démontré l'influence de la porosité des microparticules à base de polymère sur les cinétiques de libération d'une espèce encapsulée (Yang et al., 2001 ; De Rosa et al., 2002 ; Freytag et al., 2000 ; Klose et al., 2006). Par porosité, il faut entendre aussi bien la présence de fissures, de trous que de crevasses au sein de la microparticule.

La nature poreuse du matériau va influencer les processus intervenant au cours de la dissolution, de l'adsorption et de la diffusion d'un principe actif encapsulé (Mehta et al., 2000). Une molécule active située à l'intérieur d'un pore diffusera naturellement à travers ce pore et ce jusqu'à atteindre le milieu continu. Le relargage d'une espèce encapsulée est donc accéléré par rapport à un matériau non poreux présentant une matrice homogène (Lemaire et al., 2003).

Pour un matériau poreux donné, la diffusion de l'espèce, et donc sa libération, seront fonction du coefficient de diffusion propre à l'espèce, de la distribution des pores au sein du matériau mais aussi de leur taille, de leur forme, de leur structure, c'est-à-dire de la tortuosité du réseau de pores (Veith et al., 2004). Une molécule présente dans ce réseau aura à diffuser vers le

pore voisin le plus proche et se frayer un chemin à travers ce réseau jusqu'à atteindre le milieu continu. Pour une microparticule poreuse donnée, plus le réseau sera tortueux, plus la diffusion de l'espèce et sa libération vers le milieu continu seront ralenties (Sant et al., 2005).

Dans le cas d'une microcapsule dégradable par érosion, la présence de pores dans la matrice va également influencer ce processus et donc les cinétiques de relargage et de destruction du matériau. L'érosion du matériau augmente le volume du pore et donc l'espace de diffusion de la molécule, conduisant à une accélération de son relargage. Ainsi, au cours de l'érosion d'un matériau poreux, le coefficient de diffusion apparent de l'espèce va augmenter avec le temps (Lemaire et al., 2003).

La formation des pores dans la microparticule est influencée majoritairement par le processus de fabrication utilisé. Ainsi, afin de disperser dans la matrice une molécule active hydrophobe, la technique d'évaporation du solvant d'une émulsion huile dans eau est fréquemment utilisée (Rosca et al., 2004). Or, au cours de ce processus complexe, il a été mis en évidence la formation de pores au moment de l'évaporation du solvant organique (Sant et al., 2005).

Le taux de charge en molécule active, au cours du processus de fabrication, influence aussi l'homogénéité et la distribution en pores du matériau. Ainsi, il est observé que, plus le taux de charge est important, plus la microparticule présente une structure hétérogène (Görner et al., 1999). Cependant, on constate que, pour un matériau poreux donné, plus le taux de charge initial est important, plus la structure interne est tortueuse, conduisant à une cinétique de fuite de l'espèce encapsulée plus lente (Sant et al., 2005).

Dans le cas de l'encapsulation de molécules actives hydrophiles, telles que les oligonucléotides, un processus de fabrication basé sur la technique de formation d'une émulsion double eau / huile/ eau et évaporation du solvant est couramment utilisée (Rosca et al., 2004). Au cours de ce processus de fabrication, la formation de pores est aussi observée au sein de la matrice (De Rosa et al., 2002). Dans ce cas, la formation des pores est attribuée aux flux d'eau du milieu continu vers les réservoirs internes qui sont observés au cours du processus de fabrication. Ces flux d'eau sont liés à la différence de pression osmotique qui existe entre les réservoirs internes aqueux qui contiennent l'espèce encapsulée et le milieu continu. Ce déséquilibre osmotique sera d'autant plus important et donc la structure de la matrice d'autant plus poreuse que le taux de charge de l'espèce encapsulée sera important (De Rosa et al., 2002).

Afin de contrôler et limiter la formation de ces pores, il est nécessaire d'ajouter dans le milieu continu une espèce telle que du chlorure de sodium, ou encore du sorbitol, à une concentration permettant l'équilibre des pressions osmotiques (Pistel et al., 2000 ; Freytag et al., 2000). L'équilibre ainsi établi, une réduction significative de la porosité du matériau, ainsi qu'une meilleure capacité d'encapsulation des microparticules obtenues par ce mode de fabrication sont observées (De Rosa et al., 2003).

La présence de pores au sein de la matrice des microparticules est donc un paramètre à maîtriser afin de contrôler les cinétiques de relargage d'espèce initialement encapsulée au sein de ces matériaux.

1.3.4 Applications et limites des particules à base de polymère

1.3.4.a Applications

Les microparticules obtenues à partir de polymères sont donc des systèmes complexes, présentant de nombreux paramètres physicochimiques dont la maîtrise est essentielle afin de contrôler leurs propriétés d'applications. Elles restent à ce jour encore peu exploitées. Leur application la plus connue reste les papiers copiants à base de carbone, qui utilisent des microcapsules sensibles à la pression. Certains produits thérapeutiques basés sur la technologie des microparticules sont actuellement sur le marché : dans le traitement du cancer de la prostate (Leupron Depot® et Enantone Depot®), de la puberté précoce (Decapeptyl Depot®), de la stérilité (Parlodel LA®).

Administrées par voie orale, les protéines et les peptides sont rapidement dégradés par les enzymes présentes dans les fluides gastriques et intestinaux. Ainsi, les particules polymériques sont actuellement testées pour l'encapsulation et la protection de ces molécules (O'Hagan, 1998 ; Damgé et al., 1990 ; Carino et al., 2000).

Le temps de circulation des particules à base de polymère peut être augmenté par greffage de groupements PEG à la surface des vecteurs empêchant ainsi l'opsonisation des particules (Mosqueira et al., 2001)

Pour des tailles inférieures au micron, après 30 ans de recherche, seul un agent de diagnostique médical utilise cette technologie (Abdoscan®).

1.3.4.b Limites

L'une de leurs principales limites reste les procédés d'obtention de ces systèmes qui nécessitent l'utilisation d'un solvant et de monomères parfois toxiques et difficiles à éliminer (Smith et al., 1986), le chauffage, l'emploi d'acide ou encore une forte agitation mécanique. Ces conditions peuvent être des contraintes limitant l'utilisation de certains principes actifs ou la production de produit à grande échelle.

Ainsi, la fabrication de nano et microparticules à base de lipides solides (c'est-à-dire solides à température ambiante), stabilisées par des tensioactifs, s'est avérée une solution intéressante en vue de l'innocuité des composants utilisés. Cependant, ces matériaux présentent une phénoménologie particulière et une stabilité relative limitant leur application.

1.3.5 Phénoménologie propre aux particules solides de lipides

Comme dans le cas des microsphères à base de polymère, l'état solide des matrices de lipides réduit la diffusion moléculaire et permet d'envisager la prolongation de la libération du principe actif dans le milieu environnant (Müller et al., 2000 ; Mehnert et Mäder, 2001). Cependant, la nature lipidique de la matrice est aussi source d'instabilités. Le polymorphisme cristallin est notamment directement corrélé à la stabilité colloïdale de ces systèmes et à leur capacité d'encapsulation.

1.3.5.a Polymorphisme cristallin

Le polymorphisme cristallin est défini comme la capacité pour une substance organique ou minérale d'exister sous différentes structures cristallines, ces structures provenant d'une variété de conformations et d'arrangements moléculaires possibles (Sato et Garti, 1988 b). Le polymorphisme est l'une des importantes voies de dégradation physique qui affecte la stabilité d'un matériau cristallin car, même si ils sont chimiquement identiques, les différents polymorphes présentent généralement des propriétés thermodynamiques différentes comme leur température de fusion, leur solubilité…

Les particules lipidiques sont constituées de lipides qui sont solides à température ambiante. La plupart des particules lipidiques solides sont formulées à partir de glycérides. Les principales formes polymorphes des glycérides sont les formes α, β et β' (Sato et Garti, 1988

a et b). Suite à un refroidissement rapide, une dispersion fondue de glycérides cristallise sous la forme instable α. Cette structure peu organisée évolue au cours du stockage vers une forme cristalline stable présentant une meilleure organisation, la forme β, en passant par β'. Ce réarrangement cristallin entraîne une perte de la sphéricité initiale de la particule et l'apparition de cristaux sous forme de plaquettes à la surface (Siekmann et al., 1992 ; Siekmann et Westesen, 1994 a et b; Sato et Garti, 1988).

Le polymorphisme des glycérides a pour conséquence directe une augmentation du point de fusion de la substance dont les constituants passent plus ou moins rapidement de la forme cristalline instable α à la forme cristalline stable β. La vitesse de transition est directement liée à la température de stockage et cette vitesse sera d'autant plus grande que le stockage a lieu à une température inférieure mais voisine du point de fusion. Ainsi, la cristallisation de la trimyristine (triglycéride dont la chaîne carbonée de l'acide gras est en C_{14}) conduisant à la forme instable α s'effectue à 28°C. Après réarrangement de la structure cristalline vers la forme stable β, la fusion de cette forme cristalline se produit à 56°C.

La longueur de chaînes des triglycérides influence la température de fusion de la forme β : pour des chaînes longues (tristearine en C_{18} à 73°C, tripalmitine en C_{16} à 64°C), la température de fusion de la chaîne β se produit à une température plus élevée que pour des chaînes courtes (trimyristine en C_{14} à 56°C, trilaurine en C_{12} à 47°C) (Bunjes et al., 1996).

De plus, la cristallisation de triglycérides sous forme dispersée s'effectue à une température plus faible que celle des triglycérides en volume : dans le cas de la trimyristine, la recristallisation en volume se produit à 28°C alors que, sous forme dispersée, elle s'effectue à 9°C (Freitas et Müller, 1999 ; Westesen et al., 1993 ; Westesen et al., 1995). Ce décalage en température peut être attribué à la présence de tensioactif dans la forme dispersée mais aussi au fait que sous la forme dispersée, la cristallisation doit se faire dans des volumes petits, limités et indépendants. Ainsi, tandis qu'en volume, dès la formation du premier nucleus, la cristallisation se développe rapidement à travers l'ensemble du système, dans les systèmes dispersés, la cristallisation doit débuter dans chaque goutte, indépendamment de l'état cristallin des autres gouttes.

En conséquences, des particules préparées à partir de triglycérides, constituant solide à température ambiante, ne cristallisent pas nécessairement après refroidissement à des

températures de stockage habituelles, inférieures à leur température de cristallisation. Les particules peuvent rester liquides pendant des mois sans cristalliser. Westesen et Bunjes ont observé que des particules colloïdales dispersées à base de trimyristine et de trilaurine restent dans l'état liquide après plusieurs mois de stockage à température ambiante (Bunjes et al., 1998 ; Westesen et Bunjes, 1995). Les particules peuvent rester dans un état liquide, appelé surfondu. Cet état n'est pas thermodynamiquement stable. Au cours du stockage, une cristallisation partielle va alors se produire et les propriétés du matériau évoluent.

Ces réarrangements cristallins peuvent ainsi conduire à des problèmes de stabilité de l'échantillon tels que sa gélification ou l'expulsion de molécules actives initialement incorporées dans la matrice lipidique (Heurtault et al., 2003).

1.3.5.b Gélification des particules lipidiques solides

Le phénomène de gélification des particules lipidiques solides correspond à la transformation d'une suspension de ces particules de faible viscosité en un gel visqueux. Dans la plupart des cas, la formation de gels est un processus irréversible qui conduit à la perte de la structure colloïdale du système (Mehnert et al., 2001).

Siekmann et Westesen suggèrent que la formation du gel est directement reliée au processus de cristallisation des lipides (Siekmann et Westesen, 1994 b ; Westesen et Siekmann, 1997 b). Comme décrit précédemment, au cours du processus de cristallisation, la particule perd sa sphéricité. Les lipides cristallisés évoluent, en effet, vers la structure stable β, caractérisée par des cristaux sous forme de plaquettes qui se développent alors à la surface des particules. Cette surface créée au cours de la cristallisation nécessite d'être rapidement stabilisée par des tensioactifs. Les particules lipidiques solides décrites dans l'étude de Siekmann sont stabilisées par une monocouche de phospholipides. Les phospholipides en excès se trouvent sous forme de vésicules dans le milieu continu et leur mobilité est réduite (Westesen et Wehler, 1992). Ainsi, ils ne sont pas capables de couvrir immédiatement cette importante surface créée lors du réarrangement cristallin. Ces interfaces cristallisées aux faibles concentrations en tensioactifs représentent ainsi le site privilégié d'agrégation des particules, point de départ de la formation du gel (Westesen et Siekmann, 1997 b).

Actuellement, les mécanismes impliqués dans la formation de ces gels ne sont pas précisément décrits. Par contre, l'influence de différents paramètres a été clairement mise en évidence (Freitas et Müller, 1998 ; Freitas et Müller, 1999). L'équipe de Freitas démontre que des températures élevées, une exposition à la lumière ou encore l'application d'une contrainte mécanique favorisent la gélification des particules lipidiques solides. La variation de l'une de ces contraintes extérieures augmente, en effet, l'énergie cinétique des particules et leur probabilité de collision et donc favorise la formation du gel. Freitas démontre ainsi qu'un stockage dans l'obscurité à 8°C ralentit l'apparition de ce processus.

La gélification peut être ralentie voire stoppée par l'addition dans le milieu continu d'un co-émulsifiant (sodium glycocholate) (Siekmann et Westesen, 1992 ; Westesen et al., 1993) ou d'un polymère non ionique (tyloxapol) (Siekmann et Westesen, 1994 c). La caractéristique de ces molécules est leur haute mobilité dans le milieu continu (contrairement aux phospholipides organisés sous forme de vésicules) et donc leur capacité à recouvrir rapidement la surface créée lors du réarrangement cristallin.

1.3.5.c Influence du polymorphisme sur les propriétés d'encapsulation

Le polymorphisme observé dans les particules lipidiques solides influence aussi la capacité d'encapsulation de ces systèmes. Au cours du processus de fabrication, les molécules actives sont dissoutes ou dispersées dans la phase lipidique fondue. Suite au refroidissement et donc à la cristallisation sous la forme instable et peu ordonnée α des lipides, les molécules actives vont préférentiellement se localiser dans les zones amorphes, c'est-à-dire les moins organisées de la matrice cristalline (Jenning et al., 2000 b ; Bunjes et al., 1996).
Or, au cours du réarrangement cristallin conduisant à la forme stable β, l'augmentation de l'organisation de la structure lipidique cristalline s'accompagne d'une diminution des zones désordonnées liquides et conduit donc à l'expulsion de la molécule active (Pietkiewicz et al., 2006).

De même, si la matrice est composé d'un seul type de lipide (par exemple, un glycéride de haute pureté tel que la tristearine), la cristallisation conduit à la formation d'un cristal parfaitement ordonné présentant très peu de défauts (Bunjes et al., 1996 ; Westesen et al,

1997). Une telle matrice ne pourra donc pas incorporer de manière efficace une quantité importante de molécules actives.

Ainsi, des particules lipidiques permettant d'envisager un meilleur taux de charge en molécule ont été développées à la fin des années 90, nommées NLC (nanostructured lipid carriers). Le concept de ces matériaux repose sur la nécessité de la présence « d'imperfections » dans la matrice lipidique, c'est-à-dire de zones amorphes où la molécule active pourra résider, tout en conservant la structure solide de la matrice à température ambiante. Il s'agit donc de développer des structures lipidiques solides mais partiellement cristallines (Müller et al., 2002 a et b ; Saupe et al., 2006 ; Wissing et al., 2004).

On peut distinguer trois types de particules en fonction de l'état plus ou moins organisé et donc plus ou moins cristallin de la matrice (figure 1.14).

Le premier type est constitué d'un mélange de glycérides présentant des acides gras très différents (longueur de la chaîne carbonée, mélange d'acide saturés et insaturés). Ces différents acides gras conduisent après refroidissement à une proportion importante de zones amorphes dans la matrice et donc une meilleure insertion des molécules actives qui occuperont ces espaces non organisés. Ce premier type de matériau est appelé « imparfait ».

Le deuxième type est obtenu en mélangeant une quantité importante de lipides liquides (huile) avec des lipides solides. Durant le processus de fabrication, à température élevée, l'huile et les lipides sont miscibles. Au cours du refroidissement, une séparation de phase apparaît alors entre ces deux constituants et la formation de nano compartiments huileux au sein de la matrice est observée (Jores et al., 2004). Les molécules actives sont préférentiellement localisées dans les réservoirs huileux et protégées de la dégradation grâce à la matrice lipidique solide qui entoure ces compartiments. Ce type de système est communément appelé « multiple » en analogie avec les émulsions multiples eau/huile/eau (que nous présenterons en détail au paragraphe suivant) puisqu'il s'agit ici d'une dispersion huile / lipide solide / eau.

Enfin, le dernier type de système mis au point est de type « amorphe ». A température ambiante, les particules sont solides mais restent dans un état amorphe. La cristallisation est évitée grâce à un mélange particulier de lipides (par exemple, un hydroxyoctacossanylhydroxystearate avec un isopropylmyristate) (Müller et Jenning, 1999).

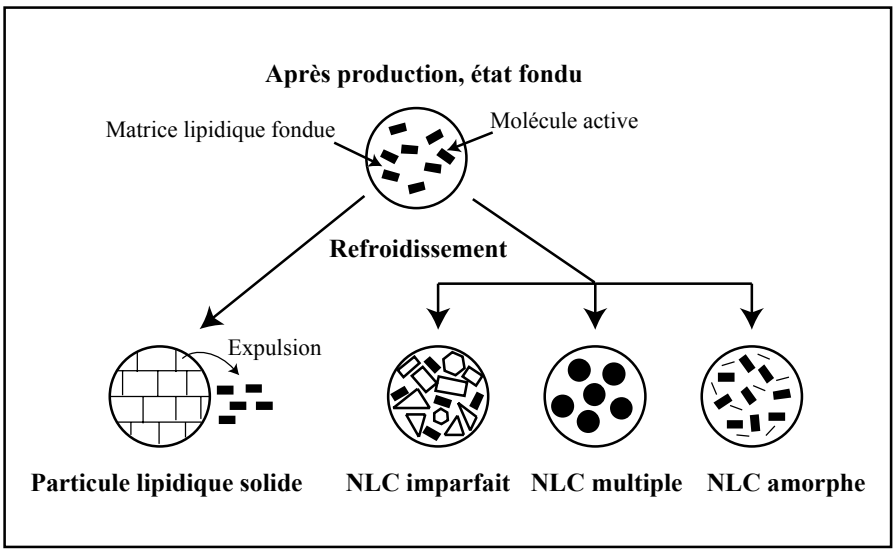


Figure 1.14
Différents types de particules lipidiques solides (D'après Müller et al., 2002 a)

Ainsi, l'utilisation de mélanges de lipides s'avère mieux adaptée à l'incorporation efficace de molécules actives.

Le polymorphisme et, plus particulièrement, le réarrangement sous la forme stable β des cristaux lipidiques apparaît certes, dans un premier temps, comme un inconvénient majeur pour les particules lipidiques solides puisqu'il conduit à l'expulsion des molécules actives, bien souvent au cours du stockage. Cependant, si cette transformation polymorphique est contrôlée, notamment en utilisant des mélanges de lipides comme dans le cas des NLC, et déclenchée en modifiant un paramètre extérieur (température, humidité), ce processus devient un atout en vue d'une libération contrôlée de molécules actives (Jenning et al., 2000 a, b, c).

1.3.6 Applications et limites des particules solides à base de lipides

1.3.6.a Applications

Actuellement, les études sur les applications éventuelles des particules lipidiques solides se poursuivent. Dans le domaine de la cosmétique, les formulations à base de particules lipidiques solides sont en plein développement, notamment pour l'encapsulation de la vitamine E et du rétinol (Müller et al., 2002 b ; Dingler et al., 1999 ; Jenning et al., 2000 c). L'utilisation de ces particules solides est aussi envisagée pour le relargage prolongé de parfum (Wissing et al., 2000 a) ou d'agent répulsif contre les insectes (Wissing et al., 2000 b). Plus

récemment, l'efficacité des particules lipidiques solides en tant qu'agent protecteur face aux rayonnements Ultraviolet a été démontrée (Wissing et al., 2001 ; Wissing et al., 2002 a et b).

Dans le domaine thérapeutique, les tests se poursuivent sur l'utilisation des particules lipidiques solides comme vecteurs thérapeutiques que ce soit pour des administrations par voie orale (Demirel et al., 2001) par injection (Cavalli et al., 1999 ; Yang et al., 1999) mais aussi pour les traitement oculaires (Cavalli et al., 2002).
Cependant, malgré des efforts considérables et des avancés significatives dans ce domaine de recherche, aujourd'hui, aucun produit utilisant la technologie des particules lipidiques solides n'est encore sur le marché.

1.3.6.b Limites

Les particules lipidiques solides ont paru être la solution idéale face aux limitations des particules à base de polymère : elles semblaient pouvoir combiner les avantages des liposomes (innocuité des composants) et celles des particules (matrice solide) tout en évitant leurs inconvénients. Mais ce ne fut pas aussi simple : ces matrices lipidiques présentent une propriété particulière, le polymorphisme des lipides cristallisés qui la constituent, propriété qui va gouverner leur stabilité et leur efficacité et risque aussi, si elle n'est pas maîtrisée, de limiter leur application en tant que microréservoir.

1.4 Les émulsions doubles

Les émulsions doubles, par leur structure compartimentée, ont depuis longtemps été envisagées comme un matériau idéal pour jouer le rôle de microréservoirs. Ce système a fait l'objet de nombreuses études et on peut noter que la première publication sur les émulsions doubles date de 1925 (Seifriz, 1925).

1.4.1 Définition d'une émulsion double

Une émulsion est une dispersion colloïdale de deux liquides non miscibles l'un dans l'autre tels que l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un agent de surface (tensioactif). Le processus de dispersion consiste à cisailler l'une des phases dans l'autre de manière à former des gouttes dont la taille peut varier de 0.1 µm à environ 10 µm.

Les émulsions simples sont formées de gouttes liquides dispersées dans une phase continue. Les émulsions doubles (appelées aussi multiples) sont des émulsions particulières, dans le sens où la phase dispersée est elle aussi une émulsion. Ces émulsions (simples ou doubles) sont qualifiées de « directes » ou « inverses », selon la nature aqueuse ou huileuse de la phase continue. Ces différents systèmes sont schématisés sur la figure 1.15.

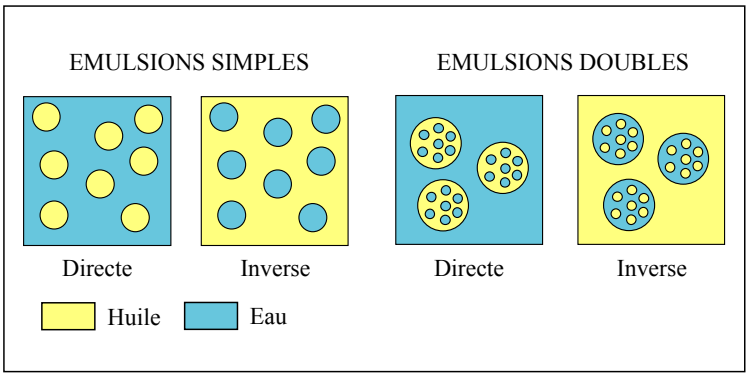


Figure 1.15
Différents types d'émulsions

Le type d'une émulsion simple, direct ou inverse, est fixé au premier ordre par la solubilité préférentielle du tensioactif dans l'une ou l'autre des phases, en accord avec la règle empirique de Bancroft (Bancroft, 1913) : le recours à un tensioactif hydrosoluble permet de former préférentiellement une émulsion directe, alors qu'un tensioactif liposoluble favorise une émulsion inverse.

La spécificité des émulsions doubles directes vient du fait qu'ils contiennent à la fois des films interfaciaux inverses (entre deux gouttes internes) et des films directs (entre deux globules) (figure 1.16).

Ainsi, généralement, les émulsions doubles directes font intervenir dans leur composition deux agents de surface : l'un hydrosoluble qui stabilise les films directs et l'autre liposoluble qui stabilise les films inverses.

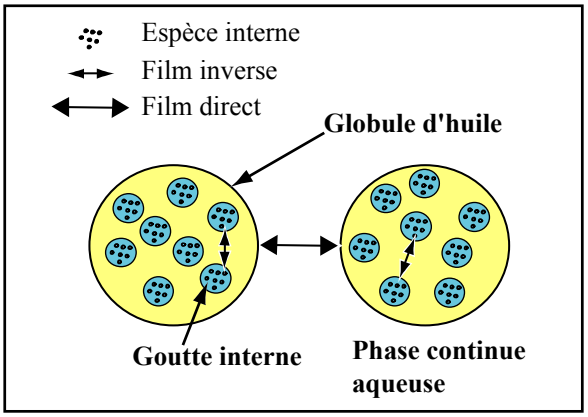


Figure 1.16
Description d'une émulsion double directe

Les émulsions doubles comprennent donc deux interfaces délimitant des compartiments (W/O/W pour des émulsions doubles directes) pouvant être de nature et de composition différentes. Grâce à cette structure compartimentée particulière et leur facilité d'obtention, les émulsions doubles sont rapidement apparues comme un matériau idéal en tant que microréservoir, que ce soit dans le domaine de la cosmétique, de la pharmacie ou de l'industrie agroalimentaire.

Cependant à ce jour, rares sont les produits commercialisés sous la forme d'émulsions doubles : un tel mélange de deux liquides non miscibles sous formes de gouttes est instable d'un point de vue thermodynamique. Par conséquent, à terme et dans tous les cas, les émulsions doubles sont destinées à se détruire, sous la forme d'eau et d'huile séparées macroscopiquement, sur des échelles de temps plus ou moins longues, allant de quelques minutes à plusieurs années. Ce retour vers l'état thermodynamiquement stable se produit selon différents mécanismes que nous allons à présent décrire.

1.4.2 Métastabilité des émulsions doubles

Dans une volonté de mieux comprendre et contrôler la métastabilité de ces systèmes, de nombreux travaux ont été menés durant ces vingt dernières années (Florence et al., 1982 a et b ; Garti et Bisperink, 1998). Deux grands types de mécanismes de destruction ont été mis en évidence : les processus de destruction accompagnés de la rupture d'un film et ceux sans rupture de film.

1.4.2.a Processus de relargage avec rupture de films : la coalescence

Dans le cas des émulsions simples, la coalescence est le mécanisme qui consiste en la fusion irréversible de deux gouttes et implique donc la rupture du film liquide séparant ces deux gouttes. C'est un phénomène qui conduit à la destruction complète de l'émulsion et à la séparation macroscopique des deux phases non miscibles.
La coalescence peut être décomposée en plusieurs étapes comme l'illustre la figure 1.17. Tout d'abord, les deux interfaces couvertes de tensioactifs se mettent au contact l'une de l'autre par agrégation (ou floculation) et forment un film plat (figure 1.17.1)), par drainage du liquide séparant les surfaces (Ivanov, 1988). Ensuite, un trou ou canal se forme spontanément dans le

film situé entre les gouttes (figure 1.17.2)). Enfin, le diamètre du trou croît jusqu'à ce qu'il y ait fusion complète des deux gouttes (figure 1.17.3)).

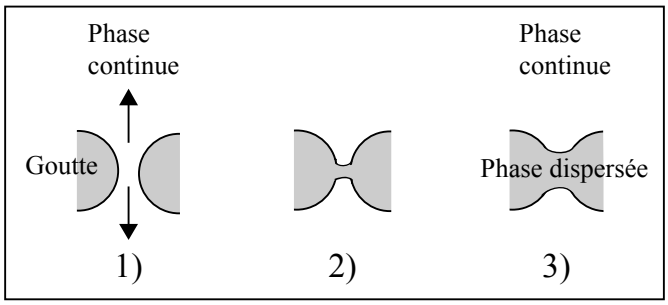


Figure 1.17
Mécanisme de rupture d'un film liquide
1) Drainage
2) Nucléation d'un trou
3) Croissance du trou, puis fusion des deux gouttes

Remarque : Les flèches représentent le sens du mouvement de la phase continue au cours du drainage

La durée de vie du film liquide peut être limitée par l'une ou l'autre de ces trois étapes et dépend essentiellement des propriétés des interfaces mises en jeu. Plusieurs théories ont été développées pour expliquer les mécanismes de la coalescence (De Vries, 1958 ; Kabalnov, 1998). Les plus récentes considèrent que la coalescence est un phénomène thermiquement activé puisqu'il faut une certaine énergie d'activation pour ouvrir un trou dans le film séparant les deux gouttes.

Dans le cas des émulsions doubles, des évènements de coalescence peuvent se produire à différents niveaux : entre deux gouttes internes, entre deux globules mais également entre une goutte interne et la surface d'un globule.

Dans le cas d'émulsions W/O/W stabilisées par deux tensioactifs courts (Span80/SDS), Pays et al. ont mis en évidence le rôle du tensioactif hydrophile dans les processus de destruction. Pour une concentration interne en gouttelettes modérée (inférieure ou égale à 20%) et une concentration en tensioactif hydrophile (SDS) en dessous de la CMC, l'émulsion double est relativement stable ; aucune évolution structurale du globule n'est observée. Par contre, dès que la concentration en SDS dépasse la CMC, la destruction des émulsions doubles est contrôlée par la coalescence goutte-globule (Pays, 2000 ; Pays et al., 2001). Ce mécanisme peut être décomposé en deux étapes (figure 1.18).

La première étape est l'adsorption réversible des gouttes sur le globule. Cette attraction est attribuée à des interactions de Van der Waals entre les gouttes d'eau et la phase aqueuse externe ainsi qu'à des forces de déplétion dues aux micelles de Span 80 en excès dans la

phase huile. La répulsion stérique entre les couches de tensioactifs à la surface des gouttes et globules ne suffit pas à empêcher cette adsorption. Ces forces attractives entre goutte et globule étant de l'ordre de quelques kT, l'agitation thermique peut suffire à décoller les gouttes : l'adsorption est donc réversible.

La seconde étape est la coalescence des gouttes adsorbées sur la surface interne du globule. Elle se fait par ouverture, à une fréquence donnée, d'un trou dans le film d'huile.

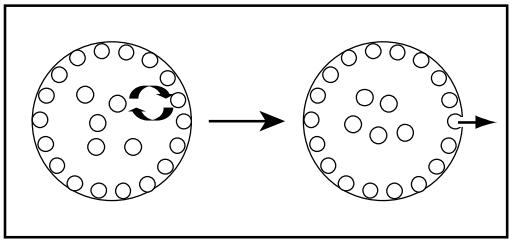


Figure 1.18
Adsorption réversible des gouttes internes à la surface des globules suivie de la coalescence goutte-globule

L'émulsions double W/O/W se transforme alors rapidement en une émulsion simple O/W et le temps caractéristique de cette transformation est d'autant plus court que la concentration en tensioactif hydrophile dépasse la CMC (Pays, 2000).

Ces premières observations sur l'importance de la concentration en tensioactif hydrophile avaient déjà été évoquées par Ficheux et al. (1998) et ont été confirmées par de nombreuses autres études (Villa et al., 2003 ; Gonzalez-Ochoa et al., 2003). Ces différents travaux mettent en évidence le rôle de la nature des interfaces et des tensioactifs notamment du tensioactif hydrophile dans le processus de destruction par coalescence goutte-globule.

Un facteur spécifique et important de la déstabilisation des émulsions multiples vient du fait que les tensioactifs primaires (à l'interface interne) et secondaires (à l'interface externe) sont différents et ont tendance à migrer vers l'interface opposée. Cette migration commence dès la préparation de l'émulsion multiple et s'effectue rapidement (Pays, 2000). Ceci conduit à la formation de deux interfaces de composition identique comprenant à la fois du tensioactif lipophile et du tensioactif hydrophile mais qui sont inverses (une des interfaces correspond à une émulsion W/O et l'autre à une émulsion O/W). Ces deux interfaces se trouvent donc déstabilisées et la coalescence (goutte-goutte, globule-globule et goutte-globule) est accélérée.

Les mécanismes suivant lesquels les molécules tensioactives diffusent à travers la couche d'huile peuvent être une simple diffusion pour les espèces neutres mais pour les espèces chargées, il est probable que leur transport se fasse par le biais de micelles inverses mixtes (Florence et al., 1981 ; Magdassi et Garti, 1986) comme représenté sur la figure 1.19.

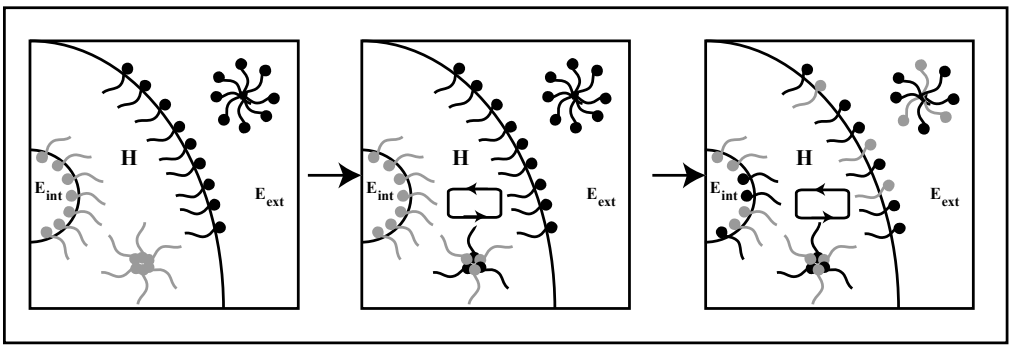


Figure 1.19
Diffusion des tensioactifs par micelles inverses mixtes.
Les tensioactifs en gris sont plutôt lipophiles et ceux en noir plutôt hydrophiles.

Les tensioactifs courts tels que les systèmes SDS/Span 80 ne permettent donc pas l'obtention d'un système double stable dans le temps. Le recours à des systèmes de polymères (Sela et al., 1994 et 1995) ou à des associations tensioactif-protéine (Garti et al., 1994) s'est avéré efficace pour stabiliser les interfaces. Des émulsions doubles avec une stabilité sur des temps plus longs ont été obtenues. En effet, les polymères hydrophiles utilisés en tant que tensioactifs pour le film direct ne peuvent pas traverser la membrane huile et s'adsorber sur l'interface des gouttelettes internes. Michaut et al (Michaut et al., 2003 et 2004) ont ainsi montré que dans le cas d'une émulsion double stabilisée par du sorbitane monoléate (film inverse) et par un polymère amphiphile (film direct), les interfaces restaient asymétriques et l'absence de migration du polymère hydrophile à travers la phase huile a été mise en évidence.

Dans un même objectif d'améliorer le temps de vie des émulsions doubles, des particules solides sont parfois incorporées dans la formulation des émulsions doubles. L'idée est que ces particules solides adsorbées aux interfaces vont jouer le rôle de barrière mécanique face à la coalescence. Binks et al. et Leal et al. ont ainsi réussi à formuler des émulsions doubles W/O/W avec pour seul émulsifiant des particules de silice aux propriétés de surface modifiées selon l'interface à stabiliser (Aveyard et al., 2003 ; Arditty et al., 2003). Ces particules solides sont ancrées aux interfaces et développent de fortes interactions latérales. Ainsi, les globules mais aussi les gouttelettes sont stables face à la coalescence sur des temps de l'ordre de l'année.

1.4.2.b Processus de relargage sans rupture de films :

Dans les émulsions doubles W/O/W, deux compartiments aqueux de composition différente sont séparés par une membrane d'huile. Cette membrane d'huile, contenant des tensioactifs, n'est en fait pas complètement imperméable à l'eau. Outre les phénomènes de coalescence évoqués précédemment, ces matériaux sont aussi le lieu privilégié d'échange de soluté par diffusion mais aussi de flux d'eau à travers la membrane huile.

- Le mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement dans les émulsions simples consiste en un transfert de matière entre les gouttes de phase dispersée et ce, au travers de la phase continue. Ce mécanisme se produit dès lors qu'il existe une solubilité, même très faible, à l'échelle moléculaire, de la phase dispersée dans la phase continue.

Le mûrissement d'Ostwald (Ostwald, 1901) se traduit, d'un point de vue expérimental, par la diminution du diamètre des petites gouttes jusqu'à leur disparition complète et l'augmentation du diamètre des plus grosses (cf. figure 1.20) (Taylor, 1998).

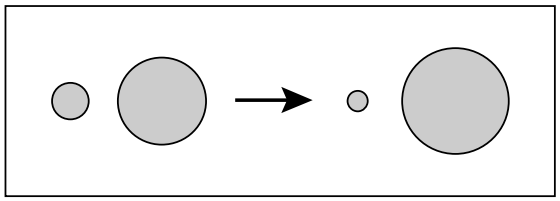


Figure 1.20
Représentation du mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est une conséquence de la différence de pression de Laplace entre deux gouttes de tailles différentes. La différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur d'une goutte sphérique de rayon r, appelée pression de Laplace P_l , est égale à $P_l = \frac{2\gamma}{r}$. La pression de Laplace étant supérieure dans les gouttes de faible rayon, la matière va donc spontanément diffuser des plus petites gouttes vers les plus grosses.

Les théories développées par Lifshitz et Slezov (Lifshitz et al., 1961) et Wagner (Wagner, 1961) permettent de prévoir la vitesse d'augmentation du rayon des gouttes par diffusion moléculaire de la phase dispersée au travers de la phase continue.

On peut limiter, voire totalement stopper, le mûrissement d'Ostwald entre les gouttes internes en ajoutant dans les réservoirs aqueux une espèce totalement insoluble dans la phase continue telle qu'un électrolyte ou un polymère hydrophile. Dans certaines applications, le principe actif encapsulé peut jouer ce rôle. La diffusion de l'espèce la plus soluble (l'eau) est alors inhibée puisqu'elle entraînerait une réduction de l'entropie de mélange (Aronson et al., 1993 ; Davis et al., 1981). Sur le plan théorique, Kabalnov et al. (Kabalnov et al., 1987) ont établi une condition nécessaire et suffisante pour éliminer le mûrissement d'Ostwald. La concentration molaire xi de l'espèce insoluble doit être telle que: $x_i > \frac{2\gamma V_{im}}{3RTr_0}$

où V_{im} est le volume molaire de l'espèce insoluble, γ la tension interfaciale, r_0 le rayon initial moyen de la distribution de gouttes, T la température absolue et R la constante des gaz parfaits.

Ainsi, dans les émulsions doubles, la fraction molaire de l'espèce encapsulée x_i devra être toujours de l'ordre de 1%, la tension interfaciale γ étant généralement inférieure ou égale à 10mN/m, pour un rayon initial des gouttes internes r_0 d'environ 0.2µm et un volume molaire inférieur à 10^{-4} $m^3.mol^{-1}$.

Dans ces conditions on a bien: $x_i \approx 0.01 > 1.510^{-3} > \frac{2\gamma V_{im}}{3RTr_0}$

Par ailleurs, le mûrissement entre globules est généralement négligeable en raison de la taille importante des globules (de l'ordre d'au moins 2 µm).

- <u>Flux d'eau par gradient de pression osmotique</u>

L'introduction d'un soluté dans la phase aqueuse interne modifie alors le potentiel chimique de l'eau, créant ainsi un déséquilibre osmotique par rapport à la phase aqueuse. L'apparition d'un gradient de pression osmotique entre ces deux phases se traduit (dans l'exemple d'une pression osmotique plus élevée dans la phase interne) par un flux aqueux de la phase externe vers la phase interne. Ceci provoque le gonflement des gouttes internes et donc des globules, et tend à amincir le fin film d'huile qui sépare les gouttes d'eau interne de l'interface du globule. Si la pression exercée par le gonflement devient trop forte, le film devient instable. Il y a alors rupture de la membrane d'huile et dispersion du contenu des gouttes internes dans la phase externe comme le montre la figure 1.21.

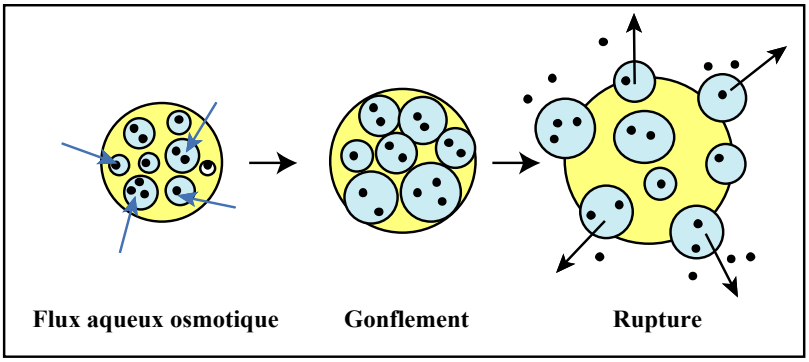


Figure 1.21
Effet de la pression osmotique sur la déstabilisation d'émulsion multiple E/H/E
(D'après Jager-Lezer, 1997)

Jager-Lezer et al. démontrent que la capacité de gonflement de la structure interne augmente considérablement si le tensioactif hydrophobe est plus concentré. Il semble, en effet, que la stabilité du film d'huile séparant le réservoir interne du milieu continu aqueux est améliorée en augmentant la concentration en tensioactif hydrophobe qui renforce lui-même le film interfacial (Jager-Lezer et al., 1997).

Différents mécanismes permettent d'expliquer le transport de l'eau à travers la membrane d'huile (Kita et al., 1978 ; Colinart et al., 1984 ; Garti et al., 1985 ; Jager-Lezer et al., 1997). Même si dans la plupart des cas ces mécanismes ont lieu simultanément, Wen et al. (Wen et al., 2000) distinguent deux situations dans lesquels l'un des mécanismes est prédominant. L'expérience consiste à former une goutte d'eau pure à l'extrémité d'une micropipette plongeant dans une phase d'huile, elle-même entourée d'eau salée (figure 1.22). La phase huile contient un tensioactif lipophile.

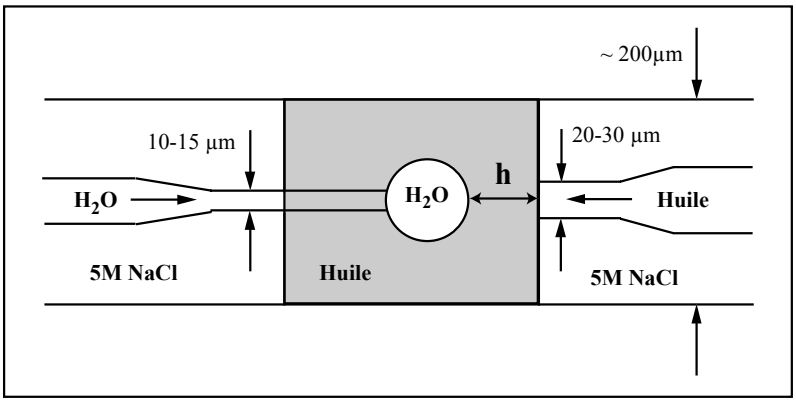


Figure 1.22
Expérience de Wen et al. (Wen et al., 2000) dans un capillaire. Une goutte d'eau est formée à l'extrémité d'une micropipette dans une phase d'huile, elle-même entourée d'eau. La distance entre la goutte d'eau et l'eau externe est notée h.

Le premier cas est celui où l'épaisseur h de la membrane d'huile est faible (typiquement h< 1µm). Le transport d'eau à travers l'huile est alors très rapide. Le mécanisme privilégié est l'hydratation de la partie hydrophile des tensioactifs à l'interface huile/phase aqueuse peu salée suivi de leur diffusion à travers la couche d'huile, puis leur déshydratation à l'interface huile/phase aqueuse fortement salée, l'eau d'hydratation étant relarguée à l'intérieur de la gouttelette (figure 1.23.A)). Lorsque l'épaisseur de la membrane d'huile est suffisamment faible, ses fluctuations peuvent conduire à une épaisseur de l'ordre d'une double couche de tensioactifs à travers laquelle les molécules d'eau diffusent (figure 1.23.C)).

La deuxième situation se rencontre lorsque l'épaisseur de la membrane d'huile est plus grande (typiquement h> 1µm). Dans ce cas, la vitesse de transport d'eau est plus lente. Il existe alors deux mécanismes prépondérants : le transport de l'eau au sein de micelles inverses de tensioactifs (figure 1.23.B)) et l'émulsification spontanée de petites gouttes d'eau à l'interface huile/phase aqueuse peu salée qui diffusent ensuite vers l'interface huile/phase aqueuse fortement salée. L'émulsification spontanée étant observée pour de fortes concentrations en tensioactif lipophile.

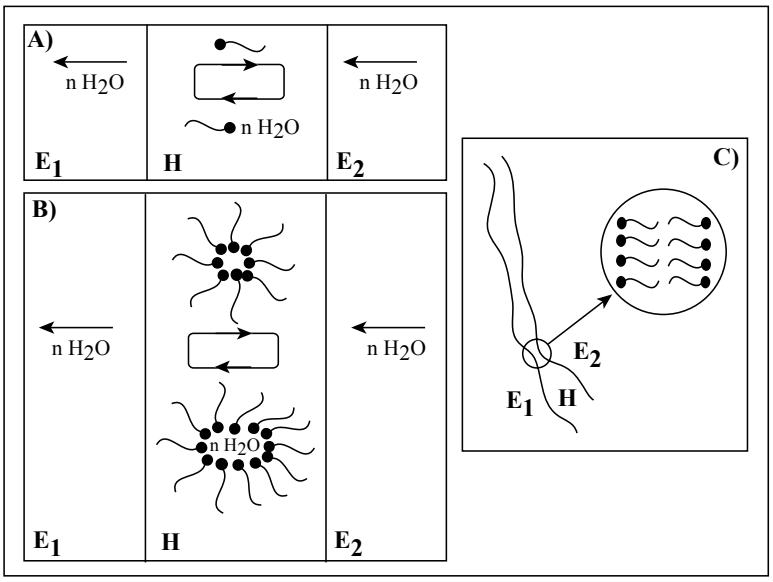


Figure 1.23
Mécanismes de transport de l'eau entre les deux phases aqueuses (E_1 et E_2) à travers la membrane d'huile (H) sous l'effet d'un gradient de pression osmotique. La pression est supérieure dans la phase E_1.
A : Diffusion par le biais de tensioactifs hydratés
B : Diffusion par micelles inverses
C : Passage au travers d'une fine couche de tensioactifs lors de fluctuations de l'épaisseur de la membrane d'huile

Les vitesses de flux d'eau seront fonction de l'amplitude du gradient de pression osmotique entre les phases aqueuses, de la nature et de la concentration des tensioactifs utilisés, de la nature ou encore de la viscosité de la phase huile (Matsumoto et al., 1980 a et b ; Garti et al., 1985 et 1987 ; Jager-Lezer et al., 1997).

Ainsi, maintenir l'équilibre des pressions osmotiques entre les compartiments aqueux internes et le milieu continu est une condition essentielle pour assurer la stabilité structurale de l'émulsion double et empêcher les flux d'eau par gradient de pression osmotique.

Pour remédier au déséquilibre osmotique engendré par l'introduction d'un soluté dans la phase aqueuse interne, lui-même nécessaire pour éviter le mûrissement d'Ostwald entre les gouttes internes, il est alors indispensable d'ajouter à la phase aqueuse externe une substance insoluble dans l'huile, à la concentration adaptée, permettant d'obtenir l'équilibre osmotique. On utilise généralement une espèce neutre de faible masse moléculaire, comme par exemple le glucose, de façon à n'altérer ni la viscosité ni la force ionique de la phase aqueuse.

Deux espèces sont donc nécessaires pour équilibrer les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane. Or, ces deux espèces sont généralement de nature différente et un gradient de concentration est alors créé qui lui-même va être le moteur de la diffusion de ces espèces par mûrissement de composition.

- <u>Mûrissement de composition</u>

Le mûrissement de composition intervient dans le cas où il existe une différence de composition entre les gouttes de phase dispersée, les substances dispersées étant toutes légèrement solubles dans la phase continue. L'entropie de mélange favorise alors l'uniformisation des compositions par diffusion des espèces solubilisées dans les gouttes internes vers la phase continue externe et vice-versa (Chiang et al., 1978 ; Matsumoto et al., 1989) (cf. figure 1.24).

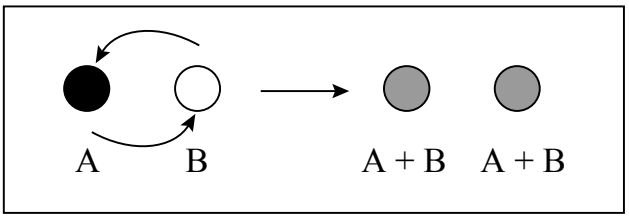


Figure 1.24
Représentation du mûrissement de composition

La fuite par mûrissement de composition dans les émulsions doubles s'apparente très fortement à la fuite dite « passive » des membranes phospholipidiques. Ce phénomène, mis en jeu dans un grand nombre d'échanges cellulaires, a donc été abondamment étudié.

Différents modèles microscopiques (cf. figure 1.25) ont été proposés dans la littérature pour expliquer ce phénomène (Hamilton et al., 1990). Dans tous les cas, ces différentes approches aboutissent à un modèle phénoménologique en accord avec la loi de Fick.

Certains modèles décrivent la perméation à travers la membrane comme résultant d'un mécanisme de solubilisation-diffusion par l'intermédiaire de micelles de tensioactifs lipophiles (Garti et al., 1994). Pour les espèces hydrophiles, le paramètre déterminant est l'énergie de Born qui représente le coût énergétique pour le transfert d'une espèce hydrophile à travers un milieu de haute constante diélectrique vers un milieu de faible constante diélectrique.

D'autres modèles considèrent que la perméation est liée à un mécanisme par nucléation de trous à travers la membrane. La taille caractéristique du trou permet alors le passage de petites substances hydrophiles avec un coefficient de diffusion suffisamment important. Le taux de transfert est alors contrôlé par le coût énergétique pour la formation d'un trou.

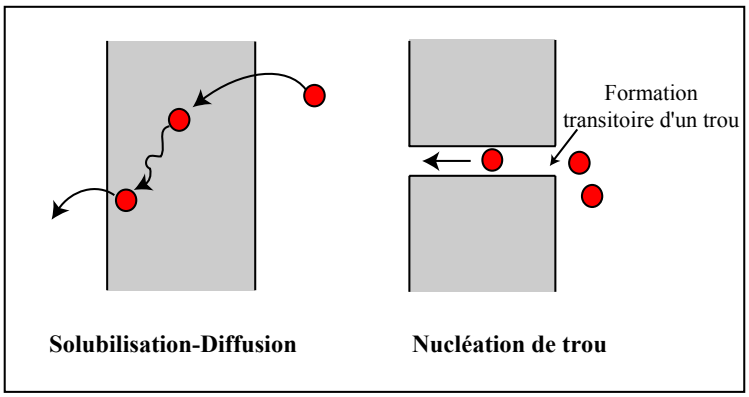


Figure 1.25
Mécanismes de perméation à travers une membrane

Il est à noter que ces modèles ont été établis pour des membranes « modèles ». La composition d'une membrane séparant les milieux aqueux internes et externes dans une émulsion double est excessivement plus complexe car elle met en jeu deux monocouches de tensioactifs dissymétriques, séparées par une membrane huileuse plus ou moins épaisse pouvant contenir des micelles.

- <u>Flux d'eau en conséquence du mûrissement de composition</u>

Il est important de noter que ces modifications de compositions dans le temps vont à nouveau engendrer un déséquilibre des pressions osmotiques et donc des modifications structurales de l'émulsion double. En effet, suite au mûrissement de composition, un déséquilibre entre les potentiels chimiques de l'eau interne et de l'eau externe apparaît et les flux d'eau engendrés

par ce gradient de pression osmotique entraînent une augmentation ou une réduction significative du diamètre des gouttes internes. Ces flux d'eau et les conséquences structurales qu'ils engendrent seront fonction des coefficients de perméabilité des différentes espèces à travers la membrane.
Ainsi équilibrer les pressions osmotiques à l'instant initial ne garantit en aucun cas l'absence de flux d'eau à travers la membrane d'huile.

Il est à noter que de nombreuses solutions ont été envisagées afin de ralentir la destruction des émulsions doubles :

- l'utilisation de tensioactifs longs tels que les polymères afin de limiter leur diffusion à travers l'huile et limiter les phénomènes de coalescence goutte-globule ;
- l'utilisation de deux espèces afin d'équilibrer les potentiels chimiques de l'eau interne et de l'eau externe, espèces qui doivent présenter un faible coefficient de perméabilité à travers la membrane afin de limiter le mûrissement de composition ;
- augmenter la viscosité de la phase huile afin de ralentir les processus d'échange d'eau et de soluté vers le milieu continu.

1.4.3 Applications et limites des émulsions doubles

1.4.3.a Applications

Les émulsions doubles ont très vite suscité un vif intérêt dans la recherche industrielle. Elles constituent, en effet, un matériau idéal qui combine dans un même véhicule un réservoir hydrophile et un réservoir hydrophobe. Pour ne citer que les émulsions E/H/E, de nombreuses études ont prouvé leur capacité d'encapsulation d'espèces d'intérêt cosmétique ou pharmaceutique.
Dans le domaine pharmaceutique, les émulsions doubles présentent un réel intérêt puisque, tout comme les liposomes et contrairement aux microparticules, leurs compartiments aqueux internes rendent possible le transport de principes actifs hydrophiles. Il est important de rappeler que la majorité des principes actifs dans le traitement des cancers sont hydrophiles. L'équipe de Higashi travaille ainsi depuis plusieurs années sur l'incorporation de principe actif anticancéreux dans les émulsions doubles W/O/W (Higashi et al., 1995, 1996, 1999, 2000).

La performance des émulsions doubles a aussi été validée pour l'encapsulation et le relargage contrôlé de protéine (Cournarie et al., 2004), d'antibiotique (Tedajo et al, 2005), de vaccins (Bozkir et Hayta, 2004) ou encore pour le traitement de l'overdose (Chiang et al., 1978). Dans le domaine de l'agroalimentaire, les émulsions doubles apparaissent efficaces dans l'encapsulation d'arôme (Rayner et al., 2004). Dans la cosmétique, de nombreux actifs (Vitamine E…) ont été encapsulés dans des émulsions doubles (Magdassi, 1997). Enfin, une application récente des émulsions doubles est leur utilisation comme microréacteur pour l'obtention de librairie de gènes en haut débit (Bernath et al., 2004 et 2005 ; Mastrobattista et al., 2005 ; Tawfik et Griffiths, 1998).

1.4.3.b Limites

Cependant, malgré les efforts de nombreuses équipes de chercheurs dans ce domaine, les émulsions doubles restent un matériau thermodynamiquement instable dont la stabilité et la capacité d'encapsulation sur des temps longs restent faibles. Les principaux processus de destruction qu'elles subissent conduisent, à terme, à la perte de leur contenu et en fait actuellement un matériau inexploitable en tant que microréservoir. Malgré un nombre élevé de brevets déposés dans ce domaine, très peu d'applications industrielles utilisent aujourd'hui cette technologie.

1.5 Conclusion

Développer un microréservoir, en maîtriser la fabrication et la stabilité dans le temps est un défi majeur dans la science des colloïdes en vue des nombreuses applications allant de l'encapsulation d'actifs en cosmétique à la vectorisation de médicaments vers un organe cible ou encore la maîtrise de réactions biologiques intracolloïdales en haut débit.

Face à ces enjeux, de nombreux matériaux aux propriétés physicochimiques différentes ont été envisagés ces dernières années. Cependant, aucun n'a pu actuellement conduire à un matériau suffisamment stable ou suffisamment performant, en vue de l'application visée, pour connaître un réel développement.

Les liposomes par leur membrane lipidique renfermant un compartiment interne aqueux permettent l'encapsulation d'espèces hydrophiles aussi bien qu'hydrophobes. De plus,

l'innocuité de ses constituants en a fait un matériau de choix dans le domaine de l'encapsulation et de la vectorisation. Cependant, l'état liquide de sa matrice et de sa membrane engendre des instabilités qui rendent difficile toute application.

Les nano et microparticules présentent le principal avantage de posséder une matrice ou une membrane solide. L'état solide de ces matériaux leur confère une perméabilité réduite face aux espèces qu'elles renferment. De plus, les particules solides à base de lipides réduisent toute limitation liée à des problèmes de toxicité. Ces matériaux s'avèrent certes performant pour l'encapsulation de molécules hydrophobes mais restent limités pour assurer l'encapsulation d'espèces hydrophiles ou pour toute application nécessitant un compartiment interne aqueux.

Les émulsions doubles, par leur structure compartimentée, sont apparues comme le candidat idéal pour toutes ces applications que ce soit l'encapsulation d'espèces hydrophiles aussi bien qu'hydrophobes ou l'utilisation de leur structure interne aqueuse comme réacteur. Mais, par définition, ce matériau est avant tout un système métastable : que ce soit par coalescence ou diffusion, le temps caractéristique de relargage de toute espèce encapsulée reste de l'ordre de quelques jours et, actuellement, aucune application industrielle utilisant cette technologie n'a pu être correctement développée.

L'objectif de cette thèse est donc de concevoir un nouveau matériau cinétiquement stable et performant en tant que microréservoir, qui saurait utiliser les avantages des systèmes décrits précédemment tout en s'efforçant d'en contourner les limites. Ce nouveau matériau devra être capable d'encapsuler des espèces aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes, posséder des propriétés physicochimiques permettant un contrôle de l'encapsulation dans le temps et dans l'espace, mais aussi posséder une stabilité sur des échelles de temps suffisamment longues pour les études fondamentales comme pour les applications industrielles. L'idée est de développer un matériau basé sur la science des émulsions doubles.

Dans une émulsion double W/O/W, la membrane d'huile est le lieu principal des échanges avec le milieu extérieur. Sa nature physico-chimique influence les temps de destruction du matériau et donc la capacité d'encapsulation du système. De plus, la nature de la membrane va définir les propriétés de surface des colloïdes et donc la stabilité cinétique de l'échantillon au repos et sous écoulement.

Ainsi, parmi tous les paramètres envisageables pour améliorer la stabilité des émulsions doubles, nous avons choisi de modifier la nature de la membrane. En s'inspirant des performances en terme de stabilité des microparticules lipidiques solides, nous souhaitons

tendre vers une matrice solide ou partiellement solide emprisonnant un réseau de gouttelettes internes. Pour cela, l'huile liquide utilisée classiquement dans les émulsions doubles (huile de soja, huile d'olive, dodécane…) est remplacée par un mélange de lipides que nous qualifierons de cristallisable, c'est à dire qui sera liquide au-dessus de sa plage de fusion et solide en dessous.

Nous développons donc dans cette thèse un nouveau matériau : les émulsions doubles cristallisables.

BIBLIOGRAPHIE

Andrieux K., Desmaële D., D'Angélo J., Couvreur P., 2003. Nanotechnologies et nouveaux médicaments, L'actualité chimique, 2003

Antonietti M., Landfester K., 2002. Polyreactions in miniemulsions, Prog. Polym. Sci., 27, 689-757

Arditty S., Whitby C.P., Binks B.P., Schmitt V., Leal-Calderon F., 2003. Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions, Eur. Phys. J. E, 11 (3), 273-281

Aronson M.P., Petko M.F., 1993. Highly concentrated water-in-oil emulsions. Influence of electrolyte on their properties and stability, J. Coll. Int. Sci., 159, 134-149

Augustin M.A., Sanguansri L., Margetts C., Young B., 2001. Microencapsulation of food ingredients, Food Australia, 53, 220-223

Aveyard R., Binks B.P., Clint J.H., 2003. Emulsions stabilized solely by colloidal particles, Adv. Collid. Interf. Sci., 100-102, 503-546

Baeckmark T., Elender G., Lasic D., Sackmann E., 1995. Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids ans poly(ethylene oxide) lipopolymers and interaction forces with surfaces, Langmuir, 11, 3975-3987

Bancroft W.D., 1913. Theory of emulsification, J. of Phys. Chem., 17, 501-519

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol, 13, 238-252

Bentz J., Ellens H., 1987. Membrane fusion: Kinetics and mechanisms, Colloid. Surf., 30, 65-112

Berkland C., King M., Cox A., Kim K., Pack D.W., 2002. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate, J. Control. Release, 43, 47-58

Berkland C., Kim K., Pack D.W., 2003. PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors, Pharm. Res., 20, 1055-1062

Bernath K., Hai M., Mastrobattista E., Griffiths A.D., Magdassi S., Tawfik D.S., 2004. In vitro compartimentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting, Anal. Biochemistry, 325, 151-157

Bernath K., Magdassi S., Tawfik D.S., 2005. Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in Vitro Compartmentalization (IVC) and Nano-droplet Delivery, J. Mol. Biol., 345, 1015-1026

Bordi F., Cametti C., Naglieri A., 1998. Ionic transport in lipid bilayer membranes, Biophys. J., 74, 1358-1370

Bouffioux O., 1995. Utilisation des modèles moléculaires numériques dans la recherché industrielle pharmaceutique. Travail de fin d'études. Bruxelles : Inst. Sup. Indus. De Bruxelles

Boukhnikachvili T., Aguerre-Chariol O., Airiau M., Lesieur S., Ollivon M., Vacus J., 1997. Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes, FEBS Lett., 409, 188-194

Bozkir A., Hayta G., 2004. Preparation and evaluation of multiple emulsions water-in-oil-in-water (w/o/w) as delivery system for influenza virus antigens, J. Drug Targ., 12, 157-164

Brannonpeppas L., 1993. Controlled-release in the food and cosmetic industries, ACS Sympos. Ser., 520, 42-52

Briane D., Lesage D., Cao A., Coudert R., Lievre N., Salzmann J.L., Taillandier E., 2002. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes, J. Histochem. Cytochem., 50, 983-991

Brigger I., Morizet J., Aubert G. et al., 2002. Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting, J. Pham. Exp. Therapeut., 303, 928-936

Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J., 1996. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, Int. J. Pharm., 129, 159-173.

Bunjes H., Sieckmann B., Westesen K.,1998. Emulsions of supercooled melts – a novel drug delivery system, S. Benita (Ed.), Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 175-204

Capan Y., Woo B.H., Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P.P., 1999. Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA, J. Control. Release, 60, 279-286

Carino G.P., Jacob J.S., Mathiowitz E., 2000. Nanospheres based oral insulin delivery, J. Control Rel., 65, 261-269

Cavalli R., Peira E., Caputo O., Gasco M.R., 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β-cyclodextrins, Int. J. Pharm., 182, 59-69

Cavalli R., Gasco M.R., Chetoni P., Burgalassi S., Saettone M.F., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin, Int. J. Pharm., 238, 241-245

Cevc G., 1991. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model, Biochemistry, 30, 7186-7193

Cevc G., Richardsen H., 1999. Lipid vesicles and membrane fusion, Adv. Drug Del. Rev., 38, 207-232

Chen D.L., Gerdts C.J., Ismagilov R.F., 2005. Using microfluidics to observe the effect of mixing nucleation of protein crystals, J. Am. Chem. Soc., 127, 9672-9673

Chiang C., Fuller G.C., Frankenfeld J.W., Rhodes C.T., 1978. Potential of liquid membranes for drug overdose treatment. In vitro studies, J. Pharm. Sci., 67, 63-66

Cocera M., Lopez O., Coderch L., Parra J.L., de la Maza A., 2003. Permeability investigations of phospholipid liposomes by adding cholesterol, Coll. Surf. A, 221, 9-17

Colinart P., Delepine S., Trouve G., Renon H., 1984. Water transfer in emulsified liquid membrane processes, J. Membr. Sci., 20, 167-187

Cournarie F., Savelli M.P., Rosilio W., Bretez F., Vauthier C., Grossiord J.L., Seiller M., 2004. Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions : comparison of the performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil, Eur. J. Pharm. Biopharm., 58, 477-482

Couvreur P., Tulkens P., Roland M. et al, 1977. Nanocapsules – New type of lysomotropic carrier, FEBS Letters, 84, 323-326

Couvreur P., Dubernet C., Puissieux F., 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trends, Eur. J. Pharm. Biopharm., 41, 2-13

Cristobal G., Arbouet L., Sarrazin F. et al., 2006. On-line laser Raman spectroscopic probing of droplets engineered in microfluidic devices, Lab on a Chip, 6 (9), 1140-1146

Damgé C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P., Devissaguet J.P., 1990. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery, J. Control. Rel., 13, 233-239

Davis S.S., Round H.P., Purewal T.S., 1981. Ostwald ripening and the stability of emulsion systems. An explanation for the effect in an added third component, J. Coll. Int. Sci., 80, 508-511

De Rosa G., Quaglia F., La Rotonda M.I., Appel M., Alphandary H., Fattal E., 2002. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres for the controlled release of oligonucleotide/polyethylenimine complexes, J. Pharm. Sci., 91, 790-799

De Rosa G., Quaglia F., Bochot A., Ungaro F., Fattal E., 2003. Long-term release and improved intracellular penetration of oligonucleotides-polyethylenimine complexes entrapped in biodegradable microspheres, Biomacromol., 4, 529-536

De Vries A., 1958. J. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 77, 383

Demirel M., YAzan Y., Müller R.H., Kilic F., Bozan B., 2001. Formulation and in vitro - in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles, J. Microencapsulation, 18 (3), 359-371

Diederichs J.E., Müller R.H., 1994. Liposome in Kosmetika und Arzneimitteln, Pharm. Ind., 56, 267-275

Dimitriadis G.J., 1979. Entrapment of plasmid DNA in liposomes, Nucleic Acids Res., 6, 2697-2705

Dingler A., Blum R.P., Niehus H., Müller R.H., Gohla S.H., 1999. Solid lipid nanoparticles (SLN™ / Lipopearls™) – a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, J. Microencapsul., 16, 751-767

Drummond D.C., Zignani M., Leroux J.C., 2000. Current Status of pH-sensitive liposomes in drug delivery, Progr. Lip. Research, 39, 409-460

Espuelas S., Haller P., Schuber F., Frisch B., 2003. Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers, Bioorg. Med. Chem. Lett., 13, 2557-2560

Fattal E., Youssef M., Couvreur P. et al., 1989. Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles, Antimicr. Ag. And Chem., 33, 1540-1543

Ficheux M.F., Bonakdar L., Leal-Calderon F., Bibette J., 1998. Some stability criteria for double emulsions, Langmuir, 14, 2702-2706

Finkelstein A., 1987. Water movement through Lipid Bilayer, Pores and Plasma Membranes, Theory and reality, John Wiley and Sons, Inc., New York

Florence A.T., Whitehill D., 1981. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions, J. Coll. Interf. Sci., 79, 243-256

Florence A.T., Whitehill D., 1982a. The formulation and stability of multiple emulsions, Int. J. Pharm., 11, 277-308

Florence A.T., Law T.K., Wateley T.L., 1982b. Interaction of polyoxyethylene alkyl ethers with cholesterol monolayers, J. Coll. Interf. Sci., 107, 584-587

Freitas C., Müller R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions, Int. J. Pharm., 168, 221-229

Freitas C., Müller R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase, Eur. J. Pharm. Biopharm., 47, 125-132.

Freytag T., Dashevsky A., Tillman L., Hardee G.E., Bodmeier R., 2000. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide containing biodegradable microspheres, J. Control. Release, 69, 197-207

Gaber M.H., Wu N.Z., Hong K., Huang S.K., Dewhirst M.W., Papahadjopoulos D., 1996. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, Int. J. Radiation Onc. Biol. Phys., 36 (5), 1177-1187

Gabizon A., Papahadjopoulos D., 1988. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors, Proceed. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 6949-6953

Gabizon A., Price D.C., Huberty J. et al., 1990. Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors. Biodistribution and imaging studies, Cancer Res., 50 (19), 6371-6378

Gao H., Yang W., Min K., Zha L., Wang C., Fu S., 2005. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanocapsules with controlled permeability, Polymer, 46, 1087-1093

Garti N., Madgassi S., Whitehill D., 1985. Transfer phenomena across the oil phase in water-oil-water multiple-emulsions evaluated by coulter-counter. Effect of emulsifier on water permeability, J. Colloid Interface Sci., 104, 587-591

Garti N., Romano-Pariente A., Aserin A., 1987. The effect of additives on release from W/O/W emulsions, Colloids Surf., 24, 83-94

Garti N., Aserin A., Cohen Y., 1994. Mechanistic considerations on the release of electrolytes from multiple emulsions stabilized by BSA and non-ionic surfactants, J. Control. Rel., 29, 41-51

Garti N., Bisperink C., 1998. Double emulsions: progress and applications, Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 3, 657-667

Ge L.Q., Möhwald H., Li J.B., 2003. Phospholipids liposomes stabilized by the coverage of polyelectrolyte, Colloids Surf. A, 221, 49-53

Gombatz W., Pettit D.K., 1995. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery, Rev. Bioconjugate Chem., 6, 332-351

Gonzalez-Ochoa H., Ibarra-Bracamontes L., Arauz-Lara J.L., 2003. Two-stage coalescence in double emulsions, Langmuir, 19, 7837-7840

Görner T., Gref R., Michenot D., Sommer F., Tran M.N., Dellacherie E., 1999. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix, J. Cont. Rel., 57, 259-268

Green B.K., Scheicher L., 1955. Pressure sensitive record materials, US Patent n° 2, 217, 507, Ncr C.

Gregoriadis G., 1977. Targeting of drugs, Nature, 265 (5593), 407-411

Gregoriadis G., 1981. Targeting of drugs: implications in medicine, Lancet, 2, 241-246

Griffiths A., Tawfik D.S., 2003. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartimentalization, Eur. Mol. Biol. Org. J., 22, 24-35

Grit M., Zuidam N.J., Underberg W.J.M., Crommelin D.J.A., 1993 a. Hydrolysis of partially saturated egg phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions and the effect of cholesterol incorporation on hydrolysis kinetics, J. Pharm. Pharmacol., 45, 490-495

Grit M., Crommelin D.J.A., 1993 b. Chemical stability of liposomes – Implications for their physical stability, Chem. Phys. Lipids, 64, 3-18

Gruner S.M., Lenk R.P., Janoff A.S. et al., 1985. Novel multilayed lipid vesicles. Comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles, Biochemistry, 24, 2833-2842

Hamilton R.T., Kaler E.W., 1990. Alkali-metal ion-transport through thin bilayers, J. Phys Chem., 94, 2560-2566

Hed G., Safran S.A., 2003. Initiation and dynamics of hemifusion in lipid bilayers, Biophys. J., 85, 381-389

Heinzen C., 2002. Microencapsulation solve time dependent problems for foodmakers, Eur. Food and Drink Rev., 3, 27-30

Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J-E., Benoit J-P., 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, Biomaterials, 24, 4283-4300

Higashi S., Iwata K., Tamura S., 1995. Arterial-injection chemotherapy for heptocellular carcimona using monodispersed poppy-seed oil microdroplets containing fine aqueous vesicles of epirubicin, Canc., 75, 1245

Higashi S., Maeda Y., Kai M., Kitamura T., Tsubouchi H., Tamura S., Setoguchi T., 1996. A case of hepatocellular carcimona effectively treated with epirubicin aqueous vesicles in monodispersed iodized poppy-seed oil microdroplets, Hepato-Gastroenterology, 43, 1427

Higashi S., Setoguchi T., 2000. Hepatic arterial injection chemotherapy for hepatocellular carcimona with epirubicin aqueous solution as numerous vesicles in iodinated poppy-seed oil microdroplets: clinical application of water-in-oil-in-water emulsion prepared using a membrane emulsification technique, Adv. Drug Deliv. Rev., 45, 57

Higashi S;, Tabata N., Kondo K.H., Maeda Y., Shimizu M., Nakashimla T., Setoguchi T., 1999. Size of lipid microdroplets effects results of hepatic arterial chemotherapy with an anticancer agent in water-in-oil-in-water emulsion to hepatocellular carcimona, J. Pharmacol. Exp. Ther., 289 (2), 816

Houslay M.D., 1982. Dynamics of biological membranes, Wiley: New York

Huster D., Jin A.J., Arnold K., Gawrisch K., 1997. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by O-17 NMR, Biophys. J., 73, 855-864

Israelachvili J.N., 1992. Intermolecular and surface forces, 2nd ed., Academic press

Ivanov I.B., 1988. Thin liquid films : Fundamentals ans Applications, Ed. Marcel Dekker : New York, 29, 1126

Jager-Lezer N., Terrisse I., Bruneau F., Tokgoz S., Ferreira L., Clausse D., Seiller M., Grossiord J.L., 1997. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion, J. Control. Release, 45, 1-13

Jansen M., Blume A., 1995. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayer composed phospholipids with different head groups and fatty acyl chain, Biophys. J., 68, 997-1008

Jenning V., Mäder K. gohla S.H., 2000 a. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixture of liquid and solid lipids: a H-NMR study, Int. J. Pharm., 205, 15-21

Jenning V., Thünemann A.F., Gohla S.H., 2000 b. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, Int. J. Pharm., 199, 167-177

Jenning V., Gysler A., Schafer-Koring M., Gohla S.H., 2000 c. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, Eur. J. Pharm. Biopharm., 49, 211-218

Johnson S.M., Bangham A.D., Hill M.W., Korn E.D., 1971. Single bilayer liposomes, Biochim. Biophys. Acta, 233, 820-826

Jores K., Mehnert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K., 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, J. Control. Release, 95, 217-227

Kabalnov A.S., 1998. In Modern aspects of emulsion science, Binks B.P., Ed., The Royal Soc. of Chem., Cambridge

Kabalnov A.S., Pertzov A.V., Shchukin E.D., 1987. Ostwald ripening in 2-component disperse phase systems. Application to emulsion stability, Coll. and Surf., 24, 19-32

Kapczynski D.R., Tumpey T.M., 2003. Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus, Avian Dis., 47, 578-587

Karatekin E., Sandre O., Guitouni H., Borghi N., Puech P.H., Brochart-Wyart F., 2003. Cascades of transient pores in giant vesicles: line tension and transport, Biophysical J., 84, 1734-1749

Kita Y., Matsumoto S., Yonezawa D., 1978. Permeation of water through oil layer in W/O/W type multiple-phase emulsions, Nippon Kagaku Kaishi, 1, 11-14

Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L., 1990. Amphiphatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, FEBS Lett., 268, 235-237

Klose D., Siepmann F., Elkharraz K., Krenzlin S., Siepmann J., 2006. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles, Int. J. Pharm., 314, 198-206

Kreuter J., 1994. Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.), Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 219-343

Lamprecht A., Yamamoto H., Takeuchi H., Kawashima Y., 2004. pH-sensitive microsphere delivery increases oral bioavailability of calcitonin, J. Control. Release, 98, 1-9

Lande M.B., Donovan J.M., Zeidel M.L., 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonis and protons, J. Gen. Physol., 106, 67-84

Larpent C., Tadros T.F., 1991. Preparation of microlatex dispersions using oil-in-water microemulsions, Colloid and polymer science, 269 (11), 1171-1183

Lasic D.D., 1998. Novel applications of liposomes, Trends Biotech., 16, 307-321

Lawaczeck R., 1988. Defect structures in membranes: routes for permeation of small molecules, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 92, 961-963

Lee C.H., Petrov P., Döbereiner H.G., 1999. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients, Langmuir, 15, 8543-8546

Lee J., Lentz B.R., 1997. Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion, Biochemistry, 36, 6251-6259

Lemaire V., Bélair J., Hildgen P., 2003. Structural modelling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process, Int. J. Pharm., 258, 95-107

Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Ménager C., Cabuil V., Dahdi D., Pierrot P., Edwards K., 2003. Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid loaded liposomes, J. Am. Chem. Soc., 125, 5266-5267

Lifshitz I.M., Slezov V.V., 1961. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions, J. Phys. Chem of Solids, 19 (1-2), 35-50

Lipowsky R., Sackmann E., 1995. Structure and dynamics of membranes, Elsevier Sci. B.V.

Lorin A., Flore C., Thomas A., Brasseur R., 2004. Les liposomes : description, fabrication et applications, Biotechnol. Agron. Soc. E,viron., 8 (3), 163-176

Magdassi S., Garti N., 1986. A kinetic model for release of electrolytes from W/O/W multiple emulsions, J. Control. Release, 3, 273-277

Magadassi S., 1997. Delivery systems in cosmetics, Colloids Surf. A, 123-124, 671-679

Markus A., Advances in the technology of controlled-release pesticide formulations. In Microencapsulations Methods and industrial applications, BENITA S. Eds., Dekker, New York, 1996, 73-91

Maruyama K., Ishida O., Takizawa T. Et al., 1999. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes, Adv. Drug Del. Rev., 40, 89-102

Mastrobattista E., Taly V., Chanudet E., Treacy P., Kelly B.T., Griffiths A.D., 2005. High-throughput screening of enzyme libraries: In vitro evolution of a β-Galactosidase by Fluorescence-Activated Sorting of Double Emulsions, Chemitry and Biology, 12, 1-10

Matsumoto S., Kohda M., 1980 a. Viscosity of W/O/W emulsions. Attempt to estimate the water permeation coefficient of the oil layer from the viscosity changes in dilutes systems on aging under osmotic-pressure gradients, J. Colloid Interface Sci., 73, 13-20

Matsumoto S., Inoue T., Kohda M., 1980 b. Water permeability of oil layers in W/O/W emulsions under osmotic pressure gradients, J. Colloid Interface Sci., 77, 555-563

Matsumoto S., Kang W.W., 1989.Formation and application of multiple emulsions, J. Dispersion Sci. Technol., 10, 455-482

Mehnert W., Mäder K., 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterisation and applications. Adv. Drug Deliv. Rev., 47, 165-196

Mehta K.A., Serpil Kislalioglu M., Phuapradit W., Waseem Malick A., Shah N.H., 2000. Effect of formulation and process variables on porosity parameters and release rates from a multi unit erosion matrix of a poorly soluble drug, J. Control. Release, 63, 201-211

Michaut F., Hébraud P., Perrin P., 2003. Amphiphilic polyelectrolyte for stabilization of multiple emulsions, Polym. Int., 52, 594-601

Michaut F., Hébraud P., Perrin P., 2004. Interface composition of multiple emulsions, Langmuir, 20, 8576-8581

Mosqueira V.C.F., Legrand P., Morgat J.L., Vert M., Mysiakine E., Gref R., Devissaguet J.P., Barrat G., 2001. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density, Pharm. Res., 18, 1411-1419

Müller R.H., Jenning V., 1999. Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung einer Suspensionverfestiger, amorpher Öltröpfchen. Deutsche Ptaentanmeldung 199 38 371.5

Müller R. H., Mäder K., Gohla S., 2000. Solid lipid nanopaticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art., Eur. J. Pharm. Biopaharm., 50, 161-178.

Müller R. H., Radtke M., Wissing S.A., 2002 a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, Int. J. of Pharm., 242, 121-128

Müller R. H., Radtke M., Wissing S.A., 2002 b. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, Adv. Drug Deliv., 54 Suppl., S131-S155

Murga M., Bernik D., de Valdez G., Disalvo A., 1999. Permeability and stability properties of membranes formed by lipids extracted from Lactobacillus Acidophilus grown at different temperatures, Arch. Biochem. Biophys., 364, 115

Nelson G., 2002. Application of microencapsulation in textiles, Int. J. Pharm., 242, 55-62

Nichols J.W., Deamer D.W., 1980. Net proton hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique, Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 2038-2042

Noguchi A., Furuno T., Kawaura C., Nakanishi M., 1998. Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes, FEBS Lett., 433, 169-173

O'Hagan D.T., 1998. Microparticles and Polymers for the Mucosal Delivery of Vaccines, Adv. Drug Del. Rev., 34, 305-320

Ostwald W., 1901. Z. Phys. Chem., 37, 385

Pagano R.E., Weinstein J.N., 1978. Interactions of liposomes with mammalian cells, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 435-468

Paula S., Volkov A.G., Van Hoek A.N., Haines T.H., Deamer D.W., 1996. Permeation of protons, potassium ions and small polar molecules through phospholipids bilayer as a function of membranes thickness, Biophys. J., 70, 339-348

Pays K., 2000. Les émulsions doubles : coalescence et mûrissement de composition, Th. de l'Un. de Bordeaux I

Pays K., Kahn J., Pouligny B., Bibette J., Leal-Calderon F., 2001. Double emulsions : a tool for probing thin-film metastability, Phys. Rev. Letters, 87 (17), 178304

Pencer J., White G.F., Hallett F.R., 2001. Osmotically induced shape changes of large unilamellar vesicles measured by dynamic light scattering

Perrie Y., Gregoriadis G., 2000. Liposome-entrapped plasmid DNA : characterisation studies, Biochim Biophys. Acta, 1475, 125-132

Pietkiewicz J., Sznitowska M., Placzek M., 2006. The expulsion of lipopholic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates, Int. J. Pharm., 310, 64-71

Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F., 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, Nanomedicine: Nanotech., Biology and Medic., 2, 8-21

Pistel K.F., Kissel T., 2000. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique, J. Microencaps., 17, 467-483

Puech P.H., Borghi N., Karatekin E., Brochard-Wyart F., 2003. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge, Phys. Rev. Lett., 90 (12), 128304

Raffy S., Teissié J., 1999. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content, Bioph. J., 76, 2072-2080

Rappolt M., Pabst G., Rapp G., Kriechbaum M., Amenitsch H et al., 2000. New evidence for gel-liquid crystalline phase coexistence in the ripple phase of phosphatidylcholines, Eur. Biophys. J., 29, 125-133

Rayner M., Bergenstahl B., Massarelli L., Trägardh G., 2004. Double emulsion prepared by membrane emulsification: stability and entrapment degree in a flavour release system, Abstract Food Colloids conference, Harrogate

Redziniak G., 2003. Liposomes et peau : passé, présent, futur, Pathol. Biol., 51, 279-281

Reeves J.P., Dowben R.M., 1969. Formation and properties of thin-walled phospholipids vesicles, J. Cell. Physiol., 73, 49-60

Rosca I.D., Watari F., Uo M., 2004. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, J. Control. Rel., 99, 271-280

Roux E., Francis M., Winnik F.M., Leroux J.C., 2002. Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplamic delivery of drugs, Int. J. Pharm., 242, 25-36

Roux E., Passirani C., Scheffold S., Benoit J.P., Leroux J.C., 2004. Serum-stable and long circulating PEGylated pH-sensitive liposomes, J. Control. Rel., 94, 447-451

Sansdrap P., Moes A.J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedine from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, Int. J. Pharm., 98,157-164

Sant S., Nadeau V., Hildgen P., 2005. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles, J. Control. Release, 107, 203-214

Sato K., Garti N., 1988 a. Crystallisation of fats and fatty acids, N. Garti, K. Sato (Eds.), Crystallisation and Polymorphism of Fats and Fatty Acids, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 227-266

Sato K., Garti N., 1988 b. Crystallisation of fats and fatty acids, Garti N., Sato K. (Eds.), Crystallisation and Polymorphism of Fats and Fatty Acids, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 3-87

Sauer M., Streich D., Meier W., 2001. pH-sensitive nanocontainers, Adv. Mater., 13, 1649-1651

Saupe A;, Gordon K.C., Rades T., 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanotructures lipid carriers by cryo-field scanning electron microscopy and Raman spectroscopy, Int. J. Pharm., 314, 56-62

Schwendener R.A., Lagocki P.A., Rahman Y.E., 1984. The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages, Biochim. Biophys. Acta, 772, 93-101

Seifriz W., 1925. Studies in emulsions, J. Phys. Chem., 29, 738

Sela Y., Magdassi S., Garti N., 1994. Polymeric surfactants based on polysiloxanes graft poly(oxyethylene) for stabilization of multiple emulsions, Coll. Surf. A. Physicochem. and Engineer., 83 (2), 143-150

Sela Y, Magdassi S., Garti N., 1995. Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone based polymeric surfactants, J. Control. Rel., 33, 1-12

Shah S.S., Cha Y., Pitt C.G., 1992. Poly(glycolic acid-co-D,L-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery, J. Control. Rel., 18, 261-270

Shechter E., 2002. Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels. 2ème édition, Paris, Masson

Siekmann B., Westesen K., 1992. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids, Pharm. Pharmacol. Lett. 1, 123-126

Siekmann B., Westesen K., 1994 a. Electron-microscopic characterization of melt-homogenised solid lipid nanoparticles, Eur. J. Pharm. Sci. 2, 190

Siekmann B., Westesen K., 1994 b. Thermoanalysis of the recrystallisation of melt-homogenized glyceride nanoparticles, Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 3, 159-175

Siekmann B., Westesen, 1994 c. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the non-ionic surfactant tyloxapol. II. Physicochemical characterisation and lyophilisation, Pharm. Pharmacol. Lett., 3, 225-228

Siepmann J., Faisant N., Akiki J., Richard J., Benoit J.P., 2004. Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory, J. Control. Release, 96, 123-134

Smith A., Hunneyball, I. M., 1986. Evaluation of polyacid as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration, Int. J. Pharm., 30, 215-230

Smith J.R., Laver D.R., Coster H.G.L., 1984. The conductance of lecithin bilayers: the dependence upon temperature, Chem. Phys. Lipids, 34, 227-235

Song H., Ismagilov R.F., 2003. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents, J. Am. Chem. Soc., 125, 14613-14619

Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, J. Control Release, 70, 1-20

Stein W.D., 1989. Transport and Diffusion across cell membranes, Academic press, New York

Stein W.D., 1990. Channels, Carriers and Pumps. An introduction to Membrane Transport, Academic press, San Diego, CA

Tawfik D.S., Griffiths A.D., 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution, Nature Biotechnology, 16, 652-656

Taylor P., 1998. Ostwald ripening in emulsions, Adv. Coll. Interf. Sci., 75, 107-163

Tedajo G.M., Bouttier S., Fourniat J., Grossiord J.L., Marty J.P., Seiller M., 2005. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsions, Int. J. Pharm., 288, 63-72

Tieleman D.P., Leontiadou H., Mark A.E. et al., 2003. Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields, J. Amer. Chem. Soc., 125, 6382-6383

Van Rooijen N., Van Nieuwmegen R., 1984. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study, Cell Tissue Res., 238, 355-358

Veith S.R., Hughes E., Vuataz G., Pratsinis E., 2004. Restricted diffusion in silica particles measured by pulsed field gradient NMR, J. Colloid and Interf. Sci., 274, 216-228

Villa C.H., Lawson L.B., Li Y., Papadopoulos K.D., 2003. Internal coalescence as a mechanism of instability in water-oil-water double emulsion globules, Langmuir, 19, 244-249

Wagner C., 1961. Theorie des alterund von niederschlagen durch umlosen (Ostwald-reifung), Zeit. Elektrochem., 65 (7-8), 581-591

Wen L., Papadopoulos K.D., 2000. Effects of surfactants on water transport in W1/O/W2 emulsions, Langmuir, 16, 7612-7617

Westesen K., Wehler T., 1992. Physicochemical characterisation of a model intravenous oil-in-water emulsion, J. Pharm. Sc., 81, 777-786

Westesen K., Siekmann B., Koch M.H.J., 1993. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction, Int. J. Pharm., 93, 189-199

Westesen K., Bunjes H., 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix, Int. J. Pharm., 115, 129-131

Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, J. Control. Release, 48, 223-236

Westesen K., Siekmann B., 1997 b. Investigation of the gel formation of phospholipids-stabilized solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm., 151, 35-45

Wissing S.A., Mäder K., Müller R.H., 2000 a. Solid lipid nanoparticles (SLN^{TM}) as a novel carrier system offering prolonged release of the perfume Allure (Channel), Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater, 27, 311-312

Wissing S.A., Mäder K., Müller R.H., 2000 b. Prolonged efficacy of the insect repellent lemon oil by incorporation into solid lipid nanoparticles (SLN^{TM}), Third World Meeting APGI/APV, Berlin, 439-440

Wissing S.A., Müller R.H., 2001. Solid lipid nanoparticles (SLN^{TM}) – a novel carrier for UV blockers, Pharmazie, 56, 783-786

Wissing S.A., Müller R.H., 2002 a. The development of an improved carrier system for sunscreen formulation based on crystalline lipid nanoparticles, Int. J. Pharm., 242, 373-375

Wissing S.A., Müller R.H., 2002 a. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, J. Control. Release, 81, 225-233

Wissing S.A., Kayser O., Müller R.H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, Adv. Drug Rev., 56, 1257-1272

Woodle M.C., Storm G., Newman M.S. et al., 1992 a. Prolonged systemic delivery of peptide drugs by long-circulating liposomes. Illustrations with vasopressin in the Brattleboro rat, Pharm. Res., 9 (2), 260-265

Woodle M.C., Lasic D.D., 1992 b. Sterically stabilized liposomes, Bioch. et Bioph. Acta, 1113, 171-199

Yang S.C., Lu L.F., Cai Y., Zhu J.B., Liang B.W., Yang C.Z., 1999. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effects on brain, J. Control. Release, 59, 299-307

Yang Y.Y., Chung T.S., Ping Ng N., 2001. Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, Biomaterials, 22, 231-241

Yu H.Y., Lin J.H., 2000. Intracellular delivery of membrane-impermeable hydrophilic molecules to a hepatoblastoma cell line by asialoglycoprotein-labeled liposomes, J. Form. Med. Assoc., 99, 936-941

Zhou X., Huang L., 1994. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylisine: characterization and mechanism of action, Biochim. Biophys. Acta, 1189, 195-203

2 Matériaux et méthodes

Dans ce chapitre, le matériau choisi ainsi que ses principales caractéristiques vont être détaillés. Puis, les différentes techniques expérimentales utilisées au cours de cette étude seront présentées.

2.1 Choix du matériau

2.1.1 Nature des huiles cristallisables et des tensioactifs

Dans notre étude, nous souhaitons obtenir une émulsion double directe dont la matrice grasse est dans un état solide, c'est-à-dire dont la température de fusion est supérieure à la température ambiante.

De plus, en vue d'éventuelles applications pharmaceutiques, nous souhaitons travailler avec des matières premières non toxiques et dont la formulation ne nécessite pas l'utilisation de solvant organique. Notre choix a été guidé par les nombreuses études qui ont été menées ces vingt dernières années sur les nanoparticules lipidiques solides. Ces particules sont préparées à partir de différents types d'huile : mono, di ou triglycérides, acides gras ou esters d'acide gras pour la partie huileuse. Pour les tensioactifs, des phospholipides, des polymères ou encore des polysorbates (tween 20 et tween 80) sont utilisés (cf. Chapitre 1, 1.3).

Dans cette étude, nous utilisons des mélanges de triglycerides :

- la Suppocire DM (Gattefossé) qui est un mélange complexe de glycérides d'acides gras saturés de C_8 à C_{18}. D'après le fournisseur, la température de fusion s'étale de 26 à 46°C. Une autre caractéristique de cette cire est son taux hydroxyle (environ 10). D'après le fournisseur, ce paramètre influence la vitesse de croissance des cristaux. Plus le taux d'hydroxyle est élevé plus la vitesse de croissance des cristaux est lente.
- la Suppocire NC (Gattefossé) qui est aussi un mélange complexe de glycérides d'acides gras saturés de C_{12} à C_{18}. La température de fusion s'étale de 21 à 41°C. Pour la Suppocire NC, le taux d'hydroxyle est compris entre 20 et 30.
- le Dynasan 114 (Sasol) qui est un triglycéride d'acide myristique de haute pureté. La température de fusion de ce matériau est beaucoup mieux définie et est centrée sur 55°C. La formule de l'acide myristique est :

$$(CH_2\text{-}O\text{–}CO\text{-}C_{13}H_{27})\text{-}(CH\text{-}O\text{-}CO\text{-}C_{13}H_{27})\text{-}(CH_2\text{-}O\text{-}CO\text{-}C_{13}H_{27})$$

Nous avons choisi comme tensioactif hydrophile, la Gelucire 4414 (fourni par Gattefossé) qui est un mélange de mono, di et triglycérides et de mono, di et triesters de polyéthylène glycol et d'acide gras. L'acide gras prédominant est l'acide laurique (chaîne carbonée en C_{12}). Le groupement PEG de la Gelucire 4414 possède 32 motifs.
Un autre tensioactif, le Stepan PEG 6000DS (fourni par la société Stepan), sera utilisé au cours de cette étude. Il présente la même composition chimique que la Gelucire 4414 mais son groupement PEG possède 150 motifs.
Le tensioactif lipophile est l'Arlacel P135 (fourni par Quimasso-Uniqema) qui est un PEG-30 dipolyhydroxystearate (Sorbitan monoleate).

Ces matériaux ont été sélectionnés au cours de précédentes études en vue d'applications pharmaceutique (Brevet WO 2005/087362, 2005).

2.1.2 Equilibrage initial des pressions osmotiques

Comme nous l'avons décrit au chapitre 1, il est essentiel, au cours du processus de fabrication, de maintenir l'équilibre osmotique entre la phase aqueuse interne et la phase aqueuse externe afin de limiter au maximum les flux d'eau à travers la membrane. Tout au long de notre étude, le chlorure de sodium (NaCl) sera l'espèce initialement encapsulée et le glucose sera utilisé pour équilibrer le potentiel chimique de l'eau dans la phase externe. Le chlorure de sodium est connu pour la faible perméabilité des ions chlorures à travers les milieux organiques (Sela et al., 1995 ; Garti et al., 1996). Nous pouvons supposer que sa perméabilité restera faible à travers les cires utilisées. La perméabilité du glucose est légèrement inférieure à celle des ions chlorures à travers les membranes phospholipidiques (Hamilton et al., 1990 ; Paula et al., 1998).
Le glucose a pour formule chimique brute $C_6H_{12}O_6$ et sa masse molaire est de 180 g/mol. Le chlorure de sodium, NaCl, a une masse molaire de 58.44 g/mol. Ces deux composés proviennent de chez Aldrich. La figure 2.1 représente la courbe d'équivalence des pressions osmotiques du glucose et du chlorure de sodium (données issues du Handbook of Chemistry). Ainsi, par exemple, une solution aqueuse contenant 0.4 mol/l de NaCl possède la même pression osmotique qu'une solution de glucose à 0.65 mol/l.

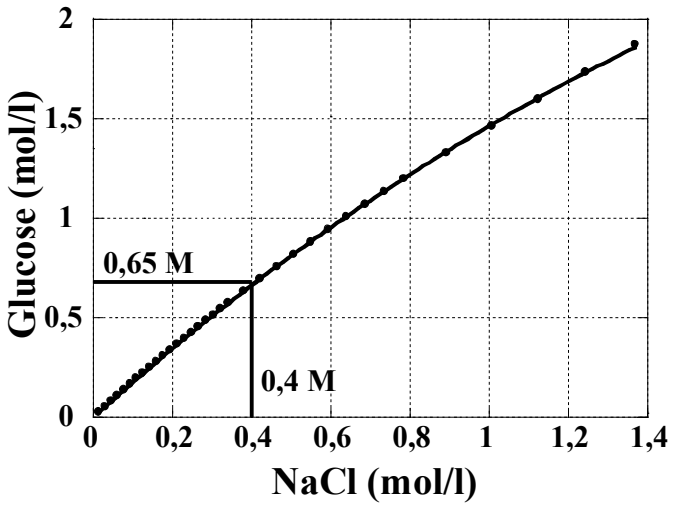


Figure 2.1
Correspondance des concentrations d'une solution de glucose et de NaCl à l'équilibre osmotique

2.2 Préparation des émulsions doubles cristallisables quasi-monodisperses

La stabilité des systèmes colloïdaux (phénomènes de mûrissement de composition, crémage, sédimentation, agrégation…) est fortement influencée par la taille des objets et donc, dans notre cas, par la taille des gouttes internes et des globules. Par conséquent, il convient de s'affranchir d'une éventuelle variation de ce paramètre : pour cela, nous utilisons une méthode de préparation d'émulsions doubles « doublement monodisperses », c'est à dire constituées à la fois de gouttes internes et de globules de diamètres bien calibrés.

La méthode de fabrication adoptée, répondant à ces critères, fait intervenir deux étapes (Goubault et al., 2001) :

- dans un premier temps, la préparation d'une émulsion inverse quasi-monodisperse, la phase interne contenant le traceur ;
- ensuite, la préparation d'une émulsion directe quasi-monodisperse ayant comme phase dispersée l'émulsion inverse précédente.

2.2.1 Préparation d'une émulsion inverse quasi-monodisperse

On prépare dans un premier temps une émulsion inverse polydisperse constituée de 70%$_m$ d'eau salée (exemple : NaCl à 0.4 mol/l) dispersée dans 30%$_m$ d'un mélange lipophile (exemple : 33%$_m$ tensioactif lipophile (Arlacel P135) et 67%$_m$ cire). L'émulsification se fait

manuellement en incorporant progressivement l'eau salée dans la phase grasse. Afin d'obtenir une dispersion homogène, les différentes phases ainsi que le mélange sont maintenus à une température supérieure au point de cristallisation de la cire (exemple : 65°C pour la suppocire DM qui présente une plage de cristallisation de 5 à 31°C et une plage de fusion de 26°C à 46°C).

Le diamètre des gouttes obtenues dans cette émulsion primaire grossière varie de 1 µm à environ 8µm.

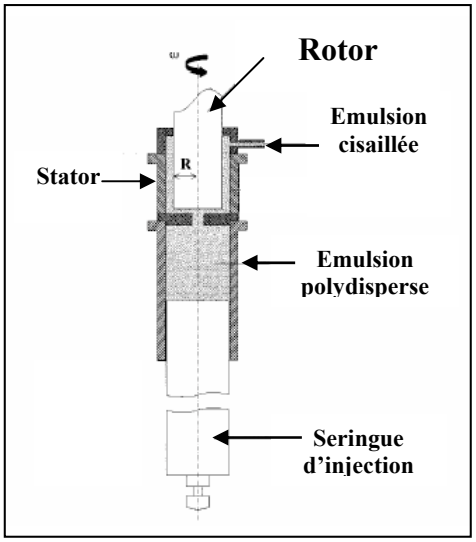


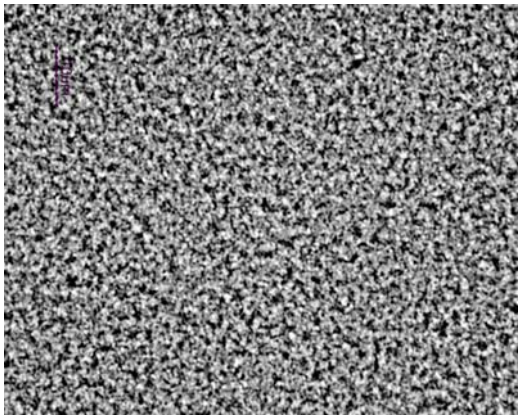
Figure 2.2
Schéma de principe de l'émulsificateur « Couette »

L'émulsion polydisperse initiale est poussée au moyen du piston dans l'entrefer constitué d'une partie fixe (stator) et d'une partie en rotation (rotor). L'émulsion est alors cisaillée puis récupérée.
Entrefer (= Re - Ri) = 100µm
Gradient de cisaillement : Pour la vitesse maximale de rotation du rotor ω (= 680 tours/minutes), le gradient de cisaillement vaut : $G_{\max} \approx \frac{R \times \omega}{R_e - R_i} \approx 14200 s^{-1}$
Pour Re-Ri = 100 µm
Schéma adapté de la publication (Mabille et al., 2000)

Cette émulsion est ensuite cisaillée dans une cellule de « Couette » elle-même thermostatée (Couette PG398C, distribué par la société TSR), constituée d'un rotor et d'un stator cylindriques et coaxiaux, séparés par un faible entrefer (<200 µm) selon le procédé développé par Mason et Bibette (1996 et 1997). Le faible entrefer permet d'appliquer un cisaillement spatialement homogène et des contraintes très élevées. Le schéma de principe de la cellule utilisée au laboratoire est présenté sur la figure 2.2. Les conditions expérimentales conduisant à la fragmentation monodisperse sont décrites dans la thèse de C. Mabille et ne seront pas détaillées ici (Mabille, 2000 ; Mabille et al., 2000).

Pour l'émulsion inverse le cisaillement appliqué est de 400 tours par minutes (rpm) avec un entrefer rotor-stator de 100 µm. Le temps de séjour de l'émulsion dans l'entrefer est de l'ordre de 10s. On obtient alors une émulsion inverse quasi-monodisperse dont le diamètre moyen est de 0.4 µm. Cette émulsion inverse est conservée, concentrée à une température supérieure au point de cristallisation de la cire afin de la conserver dans son état liquide.

Cette émulsion est ensuite diluée dans une solution de cire, elle-même maintenue à une température au dessus de son point de cristallisation, à la fraction massique en gouttelettes désirée (φ_i). Un exemple d'émulsion inverse obtenue par ce procédé après dilution à chaud est présenté sur la photographie 2.1.



10 µm

Photo 2.1
Emulsion inverse calibrée
φ_i = 70%, d_i = 400 nm

2.2.2 Préparation d'une émulsion double quasi-monodisperse en « phase concentrée »

La technique choisie pour obtenir des globules doubles monodisperses est un procédé d'émulsification en phase concentrée (Brevet CNRS n° 9710154, 1997).
Ce procédé d'émulsification permet de préparer des émulsions doubles dont la fraction massique en gouttes internes (φ_i) peut varier de 30% à 75% et la fraction massique en globules (φ_g) de 55% à 90%. Pour fabriquer l'émulsion double directe, on procède alors de la même façon que pour l'émulsion inverse.
Tout d'abord, l'émulsion inverse précédente est dispersée dans une phase continue aqueuse.

Dans notre étude, la fraction massique en eau salée (φ_i) de l'émulsion inverse est de 40%. La phase aqueuse externe de l'émulsion double contient :

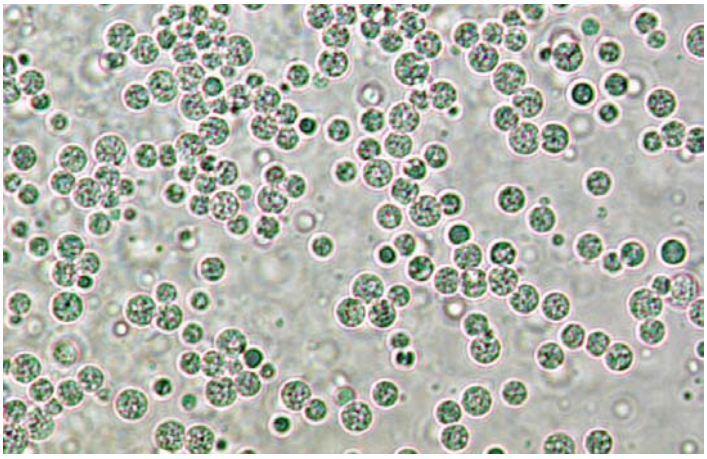
- un ajusteur de pression osmotique (exemple : glucose à 0.65mol/l)
- un tensioactif hydrophile (exemple : Gelucire 4414 à 8%$_m$)
- un épaississant (exemple : Alginate de sodium à 0.5%$_m$)

L'incorporation se fait de façon très délicate manuellement, de manière à ne pas former des globules quadruples (E/H/E/H/E) ou provoquer l'inversion de l'émulsion et ce, jusqu'à obtenir une fraction massique en globules (φ_g) d'environ 70%. A nouveau les différentes

phases ainsi que la dispersion obtenue sont maintenues à une température supérieure au point de cristallisation de la cire.

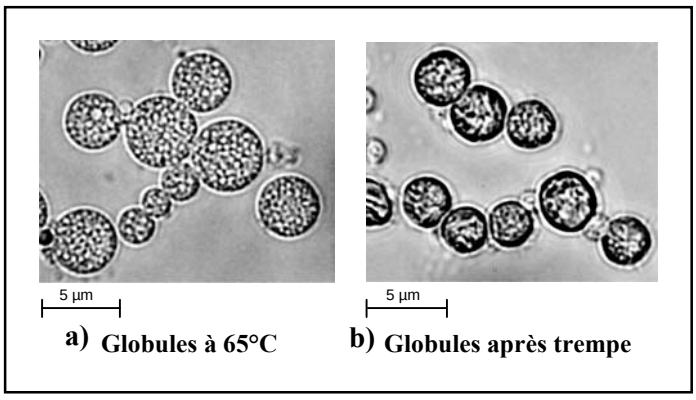
L'émulsion double grossière est ensuite cisaillée dans la cellule de « Couette » thermostatée. L'entrefer utilisé est de 100 µm et le gradient de cisaillement appliqué varie de 100 à 300 rpm selon la taille des globules que l'on souhaite obtenir. L'utilisation d'un épaississant permet d'ajuster la viscosité de la phase externe pour obtenir une distribution granulométrique la plus monodisperse possible (Mabille et al., 2000).

Après fragmentation dans la cellule de Couette, l'émulsion double calibrée est rapidement diluée dans une solution de glucose chaude jusqu'à la fraction en globules souhaitée (φ_g). Puis, une étape de trempe est alors nécessaire afin de cristalliser la cire. La photo 2.2 est une photo obtenue au microscope optique d'une émulsion double quasi-monodisperse obtenue de cette façon, à 65°C. Les photos 2.3 représentent deux photos de quelques globules de l'émulsion double avant (photo 2.3 a)) et après trempe (photo 2.3 b)).



10 µm

Photo 2.2
Emulsions doubles cristallisables à 65°C
φ_i = 40%, φ_g = 10%, d_i = 400nm, d_g = 4µm



Photos 2.3
Emulsions doubles cristallisables a) à 65°C ; b) après trempe

2.3 Méthodes de caractérisation des émulsions doubles cristallisables

2.3.1 Caractérisation du matériau par DSC

Les cires utilisées sont des mélanges plus ou moins complexes de triglycérides. La température de fusion indiquée par le fournisseur ne correspond pas à une transition franche entre un état liquide et un état solide. Les cires présentent un comportement thermique complexe : la fusion ou la cristallisation se produit de manière progressive sur une plage de température assez large.

La stabilité des émulsions sous écoulement ainsi que leurs propriétés d'encapsulation étant étroitement liées à l'état de la cire, la transition liquide/solide de chaque cire sera caractérisée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Les mesures sont réalisées avec un appareil TA Instrument 2920 Modulated DSC au Laboratoire de Physico-Chimie Macromoléculaire de l'ESPCI. Le principe et le protocole d'utilisation de cet appareil sont présentés en annexe A.1. La figure 2.3 représente le thermogramme obtenu dans le cas d'une émulsion double cristallisable formulée à partir de Suppocire DM.

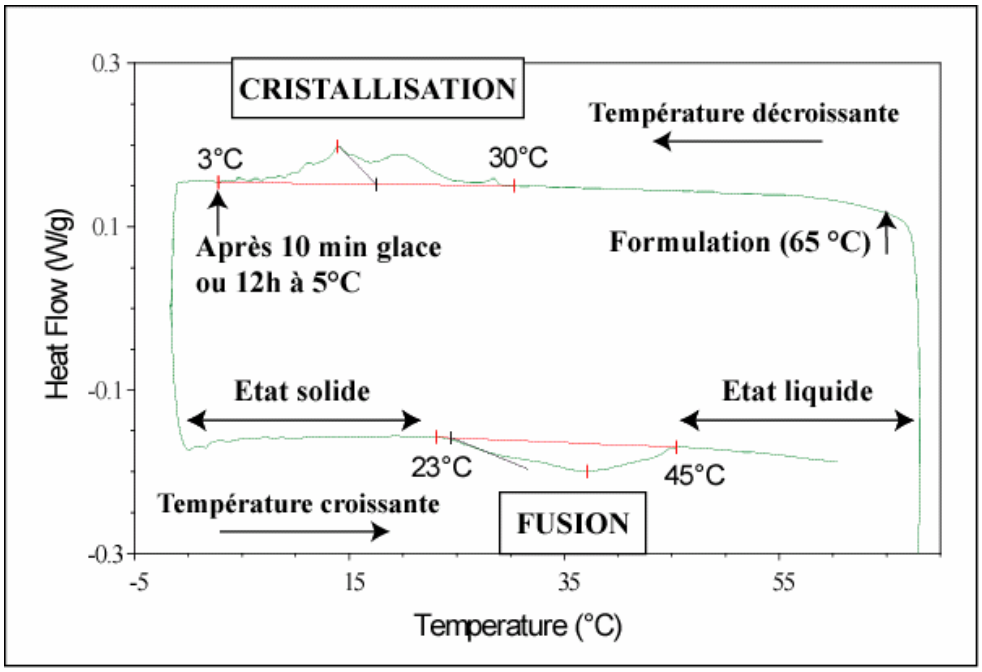


Figure 2.3
Caractérisation par DSC de l'émulsion double cristallisée à base de Suppocire DM
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 70\%$, $d_i = 400$nm, $d_g = 4\mu$m

Pour réaliser cette mesure, après formulation, l'émulsion double cristallisable est maintenue à 65°C et une faible quantité (8mg) est rapidement placée dans la cellule permettant la mesure en DSC. Après une isotherme de 5 minutes à 65°C, on impose une descente en température à une vitesse de 2°C par minute de 65°C à 0°C. D'après l'allure du thermogramme, la cristallisation de l'échantillon débute à 30°C et se termine à 3°C. L'échantillon est ensuite maintenu 10 minutes à 0°C. Puis, une montée en température est imposée à l'échantillon, à nouveau à 2°C par minute de 0°C à 60°C. La fusion de la cire intervient entre 23°C et 45°C. La bande de cristallisation et la bande de fusion sont étalées sur une large gamme de température, traduisant la complexité du mélange de triglycérides composant la Suppocire DM. De plus, une surfusion importante est mise en évidence. Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre dans le cas des particules lipidiques solides (cf. Chapitre 1, 1.3.5.a), cette surfusion serait liée au polymorphisme cristallin des triglycérides constituant la cire.

Dans notre étude, après fabrication à 65°C, les émulsions subissent une étape de refroidissement. Dans le cadre de l'étude de la stabilité du matériau sous écoulement, après formulation à 65°C, les émulsions sont placées 12 heures à 5°C. Dans le cadre de l'étude des propriétés d'encapsulation du matériau, après formulation à 65°C, les émulsions sont placées 10 minutes dans un bain de glace sous agitation, pour limiter le vieillissement du matériau vis-à-vis des fuites passives de sel. Nous considérons que, dans les deux cas, la transition liquide/solide s'effectuera selon le scénario exprimé par le thermogramme mesuré en DSC. Après cette étape de refroidissement, les différents constituants de la cire sont dans leur état solide.

Ensuite, le matériau est placé à une température d'étude. Selon cette température, la cire sera dans un état liquide, si la température d'étude se situe au dessus de 45°C ; dans un état solide, si la température d'étude se situe en dessous de 23°C. Pour une température située entre 23°C et 45°C, la matrice sera un mélange de zones liquides et de zones solides et sera dans un état que nous qualifions de partiellement solide.

Les mesures réalisées en DSC ne sont pas suffisantes, vue la complexité des mélanges, pour identifier, dans l'état solide, sous quelles formes cristallines instables (α) ou stables (β) se trouvent les cristaux de triglycérides. Nous supposons que l'état dit solide de la matrice est un mélange de zones amorphes et de zones cristallines.

2.3.2 Observations en microscopie optique

La microscopie optique est une technique très intéressante pour l'étude des systèmes colloïdaux. Elle permet d'obtenir des informations, certes qualitatives, mais souvent essentielles à la compréhension générale des systèmes. Dans le cas des émulsions doubles, cette technique permet d'évaluer la taille des globules et des gouttes internes, d'estimer leur polydispersité, d'identifier certaines instabilités comme la coalescence ou la floculation…
Les observations microscopiques sont effectuées avec un microscope à contraste de phase (Microscope Optique Leica) dont la résolution est de 300 nm. De plus, le microscope a été équipé d'une platine thermostatée, nous permettant de contrôler l'état solide ou liquide de nos matériaux et de suivre leur évolution structurale en fonction de la température imposée.

2.3.3 Observations en microscopie électronique à balayage

La Microscopie Electronique à Balayage (S-3600N, Hitachi) nous donne accès à une vision en relief des particules cristallisées. La profondeur de champ nettement plus élevée que celle du microscope optique en fait un outil complémentaire, qui nous donne des informations sur l'état de surface et la cohésion des gouttes d'émulsions cristallisées. Le principe d'utilisation de l'appareil et le protocole de préparation des échantillons sont décrits dans l'annexe A.2.

2.3.4 Détermination de la distribution de tailles par diffusion statique de la lumière

Nous souhaitons nous affranchir d'une éventuelle influence de la taille des particules sur les phénomènes étudiés (stabilité au repos et sous écoulement, processus intervenant au cours de la libération de l'espèce encapsulée…). Nous allons donc systématiquement caractériser la distribution granulométrique des particules de manière à pouvoir comparer quantitativement les différents comportements.
Pour cela, nous utiliserons un appareil commercial (Mastersizer S, Malvern) doté d'un système de mesure des diamètres par diffusion statique de la lumière. Le principe et le protocole d'utilisation de cet instrument sont présentés dans l'annexe A.3.
La taille des globules doubles est mesurée après trempe. Les particules sont alors dans leur état solidifié. La distribution de tailles représentative des émulsions doubles sur lesquelles nous avons travaillé est présentée sur la figure 2.4.

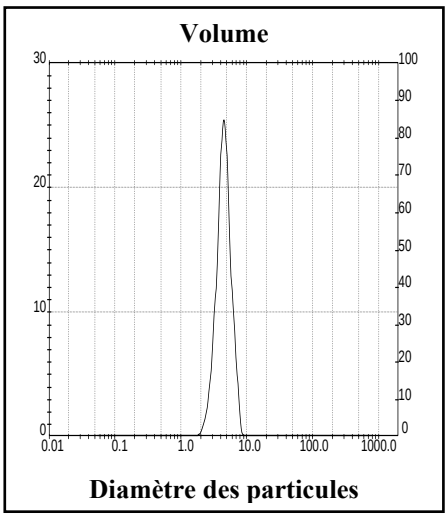


Figure 2.4
Distribution de tailles de l'émulsion double
D[4,3] = 4.5 µm
U_V = 0.19

Dans ce qui suit, nous considérons comme « monodisperse » toute émulsion double dont l'uniformité est inférieure ou égale à 30%.

Pour estimer la taille des gouttelettes d'eau de l'émulsion inverse, l'utilisation du Malvern n'est pas adaptée. Nous avons donc estimé le diamètre des gouttelettes et systématiquement contrôlé la distribution en taille par des observations au microscope optique.

2.4 Méthodes de suivi des processus de relargage des émulsions doubles cristallisables

Afin d'étudier de manière quantitative les propriétés d'encapsulation et de relargage des émulsions doubles cristallisables, une technique de mesure potentiométrique, non destructive et continue, est utilisée. Elle permet de suivre, en continue, dans la phase aqueuse externe, la quantité de traceur libéré dans le temps et initialement incorporé dans la phase aqueuse interne.

2.4.1 Principe de la mesure potentiométrique

Soit une électrode métallique plongée dans une solution contenant une espèce oxydante et une espèce réductrice. La réaction électrochimique associée à ce système est :

$$\text{Oxydant} + n\,e^- \rightleftharpoons \text{Réducteur}$$

Le potentiel de cette électrode à l'équilibre est donné par l'équation de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF}\ln(\frac{a_{oxydant}}{a_{réducteur}})$$

où E_0 est le potentiel standard de l'électrode,

R, la constante des gaz parfaits,

T, la température,

F, la constante de Faraday (F = 96500C),

et $a_{oxydant}$ et $a_{réducteur}$, les activités respectives de l'oxydant et du réducteur.

Dans le cas simple d'une électrode d'argent métallique plongée dans une solution contenant des ions Ag^+, l'équation s'écrit :

$$Ag^+ + e^- \rightleftharpoons Ag$$

et le potentiel de l'électrode est égal à : $E = E_0 + \frac{RT}{F}\ln(a_{Ag^+})$

Dans l'hypothèse où la solution contient également des ions chlorure et l'électrode d'argent est recouverte d'un précipité de chlorure d'argent, l'équilibre de dissociation s'écrit :

$$\underset{\downarrow}{AgCl} \rightleftharpoons Ag^+ + Cl^-$$

où $\underset{\downarrow}{AgCl}$ représente le précipité de chlorure d'argent.

En présence du précipité, les activités des ions sont reliées par la loi d'action de masse, soit :

$$a_{Ag^+} \times a_{Cl^-} = K_S$$

où K_S est la constante d'équilibre, qui ne dépend que de la température.

En présence du précipité, l'activité des ions argent est donc fixée par l'activité des ions chlorures dans la solution et le potentiel de l'électrode s'écrit donc :

$$E = E_0^{'} - \frac{RT}{F}\ln(a_{Cl^-})$$

On obtient de cette façon une électrode « spécifique » aux ions chlorures, le potentiel de l'électrode étant directement lié à la concentration de cet ion dans la solution. En ce qui concerne l'électrode de référence, notre choix s'est porté sur une électrode au sulfate

mercureux, qui ne contient aucune espèce électroactive susceptible d'interférer avec les ions chlorures à détecter.
La relation directe entre la différence de potentiels et la concentration en ions chlorures nécessite une calibration, justifiée par la complexité du système. Celle-ci est effectuée avec une émulsion directe possédant à peu près la même distribution granulométrique, la même fraction massique de phase dispersée et la même phase continue que l'émulsion double étudiée.

2.4.2 Montage expérimental utilisé

Ce montage a été développé par Pays et al. (Pays, 2000). Il a été conçu pour suivre en continu et de façon non destructive la concentration des ions chlorures dans la phase aqueuse externe.
La détection au moyen d'électrodes au sein d'une solution colloïdale engendre des difficultés résultant de :

- l'hétérogénéité de la solution induite par le crémage ;
- la présence de gouttes d'huile partiellement solide pouvant « obstruer » les jonctions électrolytiques et faire évoluer le potentiel de l'électrode de référence ;
- la présence d'espèces ioniques (épaississants) pouvant perturber la détection.

En raison du crémage des globules, une dérive dans la mesure du potentiel a été constatée. Afin d'éliminer ce problème, une agitation très douce mais permettant de maintenir une bonne homogénéité de l'ensemble de l'échantillon, a été mise en place. Des mesures réalisées sur un même système avec une agitation continue plus ou moins importante ont permis de démontrer l'absence de l'influence du mode d'agitation dans nos conditions expérimentales.
Par ailleurs, pour éviter les problèmes d'obstruction souvent rencontrés avec des électrodes de référence constituées d'une jonction électrolytique poreuse, les électrodes choisies sont des électrodes à écoulement, beaucoup plus adaptées aux mesures dans les milieux colloïdaux. Ce type d'électrode est constitué d'un capillaire, par lequel s'écoule très lentement (2 µl/h) la solution interne qui fixe le potentiel de l'électrode de référence (K_2SO_4). Le débit n'est pas à même de modifier la force ionique de la phase continue ou l'équilibre osmotique. Ce type de jonction permet de « renouveler » l'électrode et donc d'éviter les problèmes d'obstruction.

Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 2.5 : il comprend quatre cellules thermostatées, équipées chacune d'une électrode de référence et d'une électrode de mesure. Un système d'acquisition (carte d'acquisition, ref. : AT_MIO 16E-10, National Instruments) permet d'enregistrer la concentration des ions chlorure en fonction du temps dans chacune des cellules.

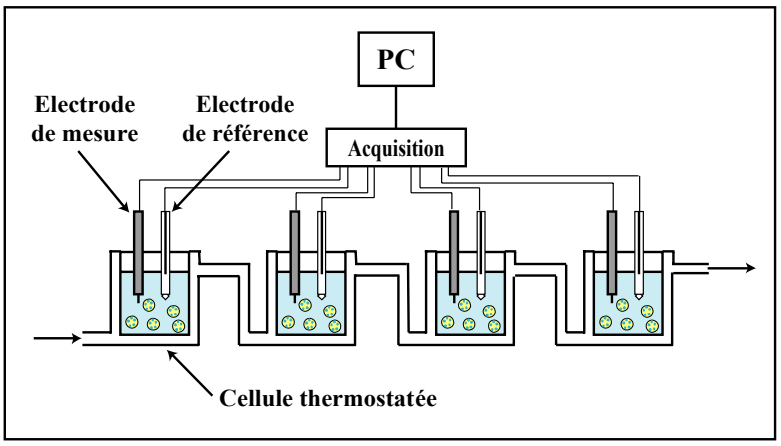


Figure 2.5
Dispositif expérimental de mesure de la libération d'un traceur par potentiométrie

2.5 Méthodes de suivi du comportement sous écoulement

La stabilité des émulsions doubles cristallisées sous écoulement est caractérisée par une étude rhéologique. Nous suivons l'évolution de la viscosité dans le temps pour un échantillon soumis à un taux de cisaillement constant. Les mesures de viscosité ont été effectuées dans le Laboratoire de Physico-Chimie Macromoléculaire de l'ESPCI avec un rhéomètre Rheometrics RFSII à déformation imposée. Connaissant le couple imposé, il est possible d'en déduire la contrainte et donc la viscosité du système. Nous travaillons avec une géométrie cône-plan sablée, de diamètre 50 mm et avec un gap de 45 µm, comme l'illustre la figure 2.6.

Afin de suivre en parallèle le comportement rhéologique et l'évolution structurale du système, soumis à un taux de cisaillement constant, nous avons utilisé le Rhéoscope 1 de la société ThermoHaake à contrainte imposée. Il est équipé d'un cône de 70 mm de diamètre, d'angle 1° avec un entrefer de 52 µm. Le Rhéoscope est équipé d'une fenêtre de visualisation recouverte d'un plateau en verre sur lequel est déposé l'échantillon. La fenêtre permet de visualiser une zone de l'échantillon de surface 220 x 150 µm. La caméra CCD permet une acquisition maximale de 5 images par seconde. La figure 2.7 est une représentation schématique du Rhéoscope 1. Le microscope est équipé d'un grossissement (x5).

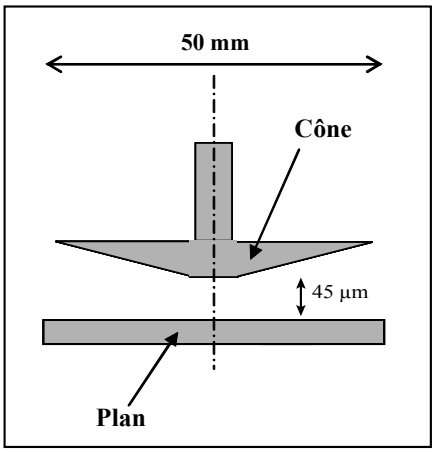


Figure 2.6
Schéma de la géométrie du Rheometrics RFSII

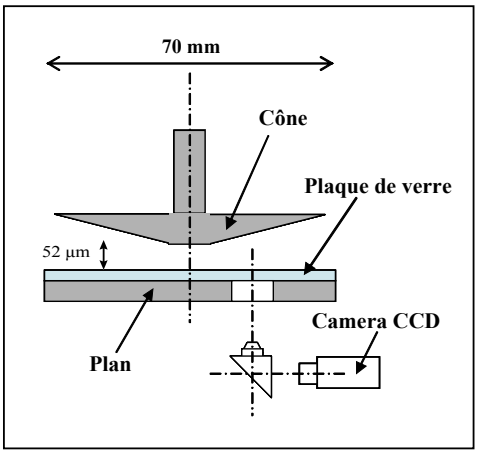


Figure 2.7
Schéma de la géométrie du Rheéoscope 1 de ThermoHaake

Dans les deux cas, la gamme de taux de cisaillements appliqués varie de $5s^{-1}$ à $300s^{-1}$. La température est contrôlée pendant la durée de l'expérience, grâce à un bain thermostaté et une circulation d'eau, et est fixée à 25°C.

Afin de déterminer la viscosité de solutions très fluides, telles que la viscosité de la phase continue de nos systèmes, constituée d'eau, de glucose et de glycérol, nous utilisons l'appareil Contraves Low-Shear, disponible au Laboratoire de Physico-Chimie Macromoléculaire de l'ESPCI. Ce rhéomètre équipé de cylindres coaxiaux thermostatés entraînés par un moteur à vitesse de rotation régulée ($0.016s^{-1}$ à $89s^{-1}$) dispose d'un capteur de couple très sensible (0.01µN.m à 6µN.m). La gamme de viscosité pouvant être balayée va de 1cP à une centaine de cP.

BIBLIOGRAPHIE

Brevet CNRS n° 9710154 déposé le 07 août 1997 : « Emulsion double polydisperse, émulsion double monodisperse correspondante et procédé de préparation de l'émulsion monodisperse ». Inventeurs : Bibette J., Leal Calderon F., Gorria P.

Brevet WO 2005/087362 déposé en mars 2004 : « Procédé de préparation de microsphères biodégradables calibrées ». Inventeurs : Royère A., Ethypharm, Bibette J., Bazile D.

Garti N., Aserin A., 1996. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants, Adv. in Coll. and Int. Sci., 65, 37-69

Goubault C., Pays K., Olea D., Gorria P., Bibette J., Schmitt V., Leal-Calderon F., 2001. Shear rupturing of complex fluids: Applcation to the preparation of quasi-monodisperse water-in-oil-in-water double emulsions, Langmuir, 17 (17), 5184-5188

Hamilton R.T., Kaler E.W., 1990. Alkali metal ion transport through thin bilayers, J. Phys. Chem., 94, 2560-2566

Mabille C., 2000. Fragmentation des émulsions dans un écoulement de cisaillement simple, Thèse de l'Université de Bordeaux.

Mabille C., Schmitt V., Gorria Ph., Leal Calderon F., Faye V., Deminiere B., Bibette J., 2000. Rheological and shearing conditions for the preparation of monodisperse emulsions, Langmuir, 16, 422-429

Mason T.G., Bibette J., 1996. Emulsification in viscoelastic media, Phys. Rev. Lett., 77, 3481-3484

Mason T.G., Bibette J., 1997. Shear rupturing of droplets in complex fluids, Langmuir, 13 (17), 4600-4613

Pays K., 2000. Les emulsions doubles: Coalescence et Mûrissement de composition, Th. de l'Un. de Bordeaux.

Paula S., Volkov A.G., Deamer D.W., 1998. Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism, Bioph. Jornal, 74, 319-327

Sela Y., Magdassi S., Garti N., 1995. Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone-based polymeric surfactants, J. Control. Release, 33, 1-12

3 Stabilité au repos et sous écoulement des émulsions doubles cristallisables

Dans ce chapitre, notre objectif est d'étudier la stabilité des émulsions doubles cristallisables au repos et sous écoulement. Ces systèmes, en tant que dispersions de particules micrométriques, sont susceptibles de subir des instabilités. Que ce soit au repos ou sous écoulement, le contrôle de la stabilité de ces dispersions est essentiel d'un point de vue fondamental ou en vue d'une utilisation de ces nouveaux matériaux en tant que microréservoirs.

Dans un premier temps, nous nous attacherons à décrire la stabilité de ces matériaux au repos. Nous reviendrons notamment sur les différentes forces qui contrôlent la stabilité des particules.

Dans un deuxième temps, nous étudierons le comportement du matériau sous écoulement et, plus particulièrement, soumis à un cisaillement contrôlé.

3.1 Stabilité du système au repos

3.1.1 Système d'étude

Notre étude porte sur le matériau composé de Suppocire DM. Le matériau est préparé selon le protocole décrit au chapitre 2. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- les pressions osmotiques sont équilibrées par une solution interne de NaCl à 0.1 M et une solution externe de glucose à 0.17 M (cf. chapitre 2, figure 2.1).
- la fraction massique en gouttelettes internes, φ_i, est de 40%
- la fraction massique en globules, φ_g, est de 13%
- le diamètre des gouttelettes internes, d_i, est de 400 nm
- le diamètre des globules, d_g, est de 4.5 µm

Après fabrication à chaud, le matériau est conservé dans un pilulier de 5 ml, maintenu au repos, à 5°C pendant 12 heures. D'après l'étude par DSC présentée au chapitre 2 (cf. 2.3.1), la matrice de cire se trouve alors dans son état solide.

3.1.2 Observations expérimentales

Les globules présentent une taille de 4.5µm. Ces objets, en limite de taille colloïdale, ne sont pas maintenus en suspension par le mouvement Brownien. Au repos, du fait de la différence de densité entre le globule et le milieu continu, les globules crèment rapidement. La force visqueuse qui tend à s'opposer au déplacement des objets au cours du crémage n'est pas suffisante pour empêcher la séparation de phases observée. Cependant, pour une fraction massique en objets inférieure à 20%, le crémage ne conduit pas à une agrégation irréversible des particules. L'échantillon est crémé mais si il est lentement agité, les particules se redispersent et les objets retrouvent leur individualité.

Ces premières observations démontrent l'existence d'une barrière répulsive aux faibles distances. Afin de comprendre ces observations et d'identifier la nature de cette barrière répulsive, nous souhaitons revenir brièvement sur les différentes interactions qui contrôlent la stabilité de dispersions de particules au repos.

3.1.3 Interactions entre particules

Les forces d'interaction entre particules sont déterminées par leurs propriétés de surface et de volume. Elles régissent la tendance des particules à s'agréger ou non, de manière réversible ou non et sont donc essentielles pour déterminer la stabilité cinétique des suspensions, notamment au repos. Ces forces sont de deux types : les forces attractives et les forces répulsives. Parmi les forces attractives, il faut citer les interactions hydrophobes, le pontage par une macromolécule, la déplétion et les forces de Van der Waals. Les forces répulsives concernent principalement les répulsions électrostatiques et stériques.

Dans le cas de notre système, les particules ne sont pas chargées mais présentent à leur surface des groupements de polyéthylène glycol (PEG) provenant du tensioactif utilisé pour assurer la stabilité du film direct. Ainsi, les seules forces d'interaction à prendre en compte sont les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives stériques.

- <u>Les forces attractives de Van der Waals</u>

Toujours présentes, ces forces ont pour origine la différence de polarisabilité entre deux milieux. L'énergie qui s'exerce entre deux objets ponctuels éloignés d'une distance r décroît

comme $1/r^6$. L'intégration de cette énergie sur le volume de deux grands objets de rayon a séparés d'une distance (r-2a) face à face donne une loi décroissante en $1 / (r^2-(2a)^2)$.
La caractéristique principale des attractions de Van der Waals est que leur intensité diverge lorsque les surfaces arrivent au contact. Le potentiel attractif entre deux sphères de rayon a, distantes de r centre à centre, pour r proche de a, s'écrit :

$$V_{att}(r) = -\frac{H}{24}\left(\frac{2a}{r-2a}\right)$$ avec H, la constante de Hamaker (de l'ordre de k_BT)

Ce potentiel est le produit d'un terme géométrique par la constante de Hamaker, calculée à partir de la théorie de Lifshitz (Lifshitz, 1956).

- La répulsion stérique

Lorsque des macromolécules sont adsorbées à la surface des particules, une force répulsive, dite stérique, existe. Dans le cas de notre système, il s'agit donc des groupements PEG qui servent à stabiliser les globules lors de la formulation à chaud (figure 3.1).

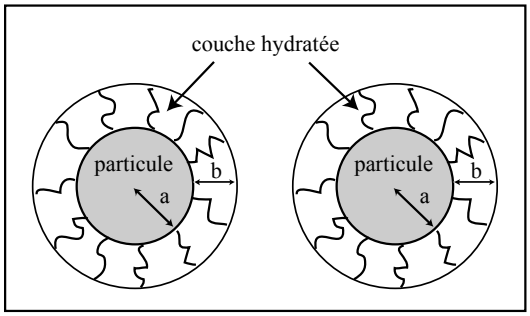


Figure 3.1
Particules couvertes par une couche hydratée d'épaisseur b, formée de macromolécules

Il est important que les chaînes ne soient pas déshydratées pour que le milieu ait la même polarisabilité que l'eau. Dans le cas contraire, on formerait l'équivalent de nouvelles particules de rayon (a + b) qui seraient, à leur tour, soumises à l'attraction de Van der Waals.
Par contre, si les chaînes hydrophiles restent hydratées, il apparaît une répulsion entre deux particules lors du recouvrement des couches. Cette répulsion est liée à l'augmentation de la pression osmotique des chaînes dans la couche hydratée. Une barrière stérique est alors créée. La portée de cette protection est l'épaisseur de la couche hydratée. Son « efficacité » sera fonction de la densité en chaînes à la surface du globule mais aussi de la longueur et de l'hydratation des groupements PEG.

- Potentiel d'interaction entre les particules

La stabilité d'une dispersion est déterminée par la somme des forces attractives et répulsives. Selon le signe de la force totale, une fois au contact, les particules auront tendance soit à s'agréger, soit à se repousser. Dans notre cas, les forces en présence étant la répulsion stérique et l'attraction de Van der Waals, les potentiels attractif et répulsif qui existent entre deux globules présentent les profils représentés sur la figure 3.2 :

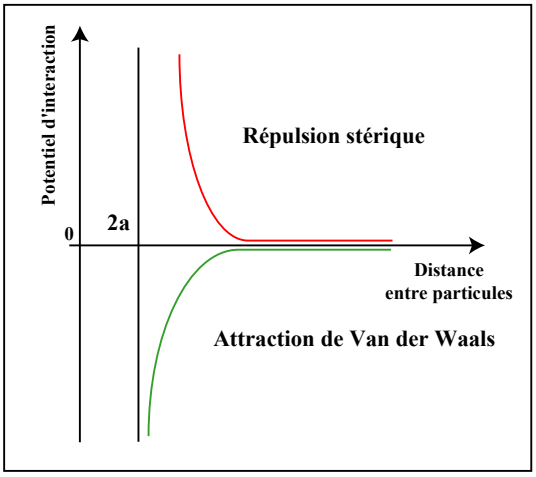


Figure 3.2
Potentiels d'interactions entre deux particules
- **potentiel répulsif lié à la répulsion stérique**
- **potentiel attractif lié à l'attraction de Van der Waals**

Le crémage conduit à la mise en contact des globules cristallisés. Une fois au contact, les globules subissent l'attraction de Van der Waals mais sont protégés par la barrière répulsive d'origine stérique. Nous pouvons affirmer, d'après nos observations expérimentales, que la barrière répulsive est suffisamment efficace pour retarder l'agrégation irréversible des particules au repos mais nous ne pouvons conclure, à ce stade de l'étude, si cette barrière possède une hauteur finie ou non.

Les particules agrégées se trouvent dans un puits de potentiel peu profond et une légère agitation de l'échantillon suffit à fournir l'énergie nécessaire pour sortir les particules du puits de potentiel et les redisperser. Au repos, les émulsions doubles cristallisées peuvent donc être considérées comme stables puisqu'elles restent toujours à une distance face à face supérieure ou égale à 2b. La figure 3.3 est une représentation qualitative du potentiel d'interaction entre les particules au repos.

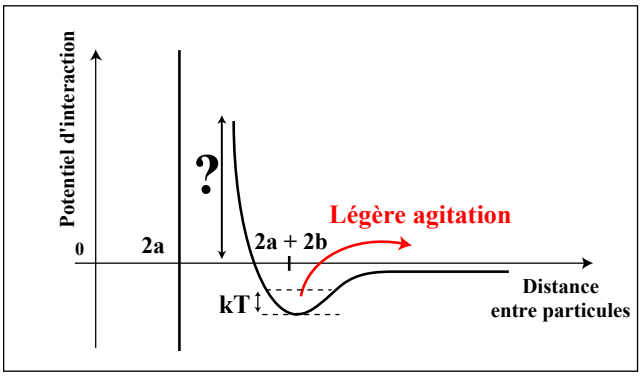


Figure 3.3
Représentation qualitative du potentiel d'interactions entre les particules d'émulsions doubles cristallisées au repos

3.2 Stabilité du système sous écoulement

3.2.1 De l'importance de l'écoulement et de ses conséquences

De nombreuses suspensions de particules telles que, par exemple, les peintures, les encres ou les dispersions de latex sont instables sous écoulement. Ces instabilités peuvent se manifester par différents comportements rhéologiques et plus généralement par une augmentation de la viscosité du système sous écoulement.

L'évolution de la viscosité d'une suspension sous écoulement sera fonction des interactions entre particules, de la fraction massique en objets mais aussi de la distribution de taille des particules, de leur forme et de leur densité. En effet, ces paramètres gouvernent les conditions d'obtention de l'empilement compact maximal des particules sous écoulement. Selon ces paramètres, l'augmentation de viscosité observée peut aller d'un épaississement induit par le cisaillement (rhéoépaississement) jusqu'au cas extrême du blocage de l'écoulement de la suspension par encombrement (jamming) (Holmes et al., 2005 ; Bertrand et al., 2002).

Observé pour la première fois par Freundlich et Röder en 1938 (Freundlich et al., 1938) dans le cas d'une suspension de sphères dures, l'épaississement induit par cisaillement se manifeste par une augmentation de la viscosité apparente du système lorsque le taux de cisaillement imposé à l'échantillon augmente. Deux théories distinctes ont été proposées pour décrire l'origine structurale du rhéoépaississement dans le cadre des suspensions de sphères dures. La première, développée par Reiner (Reiner, 1949) et formalisée par Hoffman (Hoffman, 1972 et 1974), est basée sur le concept de couches de particules qui glissent les unes sur les autres (Metzner et al., 1958). Selon cette théorie, dans le régime des faibles cisaillements,

l'écoulement des couches de particules les unes sur les autres induit, dans un premier temps, la fluidification de la suspension sous cisaillement. Pour une valeur critique du cisaillement, une instabilité de l'écoulement provoque la rupture de l'organisation des couches et les particules alors désorganisées vont se bloquer les unes par rapport aux autres, conduisant à la hausse de la viscosité du système. Cette transition dynamique microstructurale, caractérisée par le passage de couches organisées à un état désorganisé du système, est décrite comme une transition dynamique ordre-désordre (Hoffman, 1972).
Une deuxième théorie est basée sur une floculation irréversible des particules induite par le cisaillement. Cette description justifie l'augmentation de la viscosité par la formation d'agrégats de taille croissante sous cisaillement (Bossis et al., 1989).
Par des techniques basées sur la diffusion de la lumière (Hoffman, 1998) et la diffusion de neutrons (Chen et al., 1992), Hoffman et d'autres auteurs ont démontré l'existence de couches organisées dans le cas de suspensions colloïdales de sphères dures monodisperses. La première théorie permet de décrire parfaitement l'agrégation de ces systèmes sous cisaillement. Cependant, pour des particules polydisperses ou anisotropes (Bender et al., 1996), l'organisation en couches des particules n'est plus vérifiée. La deuxième théorie basée sur la formation d'agrégats de particules sous cisaillements est alors le modèle le plus adéquat pour décrire l'agrégation de tels systèmes et reste, dans tous les cas, le modèle le plus fréquemment cité dans la littérature récente, en particulier dans le cas de suspensions de particules sphériques Browniennes (Maranzano et al., 2001).

Un cas extrême du rhéoépaississement des particules sous cisaillement est le blocage de leur écoulement par encombrement, communément appelé jamming. Ce comportement se traduit par le passage d'un système fluide à un état bloqué, induit par le cisaillement. Au-delà d'une contrainte critique, la suspension concentrée arrête de s'écouler (Trappe et al., 2001). Ce phénomène a lieu dans de nombreux systèmes, naturels ou industriels (colmatage de fractures naturelles lors d'un forage pétrolier, maïzena, sables mouvants…). Pour des particules sphériques, le blocage de l'écoulement se produit à des fractions volumiques relativement élevées (40%) (Hoffman, 1972) alors que dans le cas de particules anisotropes, selon la géométrie des particules, il peut apparaître pour des fractions volumiques beaucoup plus faibles. Nous pouvons citer le cas de particules d'oxychlorure de bismuth, sous forme de plaquettes, d'environ 6 µm de diamètre, dispersées dans une solution diluée de polyélectrolyte dont le cisaillement induit un blocage de l'écoulement pour une fraction volumique de l'ordre de 20% (Bertrand et al., 2002).

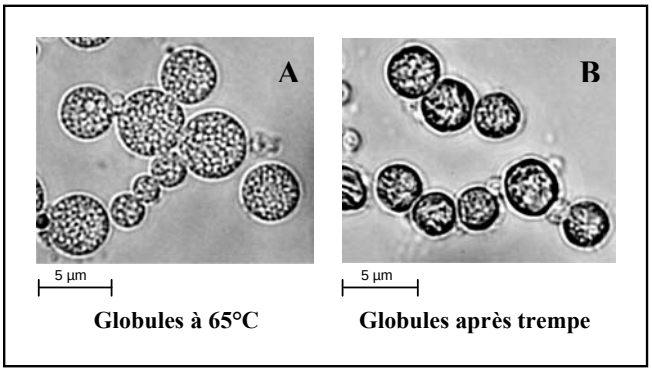
A l'échelle industrielle, les instabilités et, plus particulièrement, l'agrégation sous écoulement de particules apparaissent donc comme un inconvénient majeur. Dans le domaine de la pétrochimie, des peintures, de la cosmétique ou encore de l'agroalimentaire, de nombreux produits sont formulés à partir de dispersion de particules. Les procédés industriels de fabrication et de transport de tels produits impliquent des écoulements importants et donc des contraintes et des cisaillements considérables imposés aux produits. Si les dispersions sont instables et s'agrégent sous écoulement, l'augmentation de viscosité résultant de cette agrégation peut provoquer des dommages important dans les équipements et gêner la production industrielle de tels systèmes.

Avant d'envisager une utilisation éventuelle des émulsions doubles cristallisées, il est donc essentiel de caractériser le comportement de ce matériau sous écoulement.

3.2.2 Observations expérimentales

3.2.2.a Evolution des propriétés de surface au cours du refroidissement

Au cours de l'étape de refroidissement et donc de solidification de la cire, un changement notable de l'état de surface des globules apparaît. A une température supérieure à la plage de fusion de la cire (T > 45°C), l'huile est liquide et les globules présentent une structure sphérique dont la surface est lisse (photo 3.1.A)). Par contre, à une température inférieure à la plage de fusion (T < 23°C), l'huile est alors solide et les globules présentent une surface « rugueuse » et plissée (photo 3.1.B)).

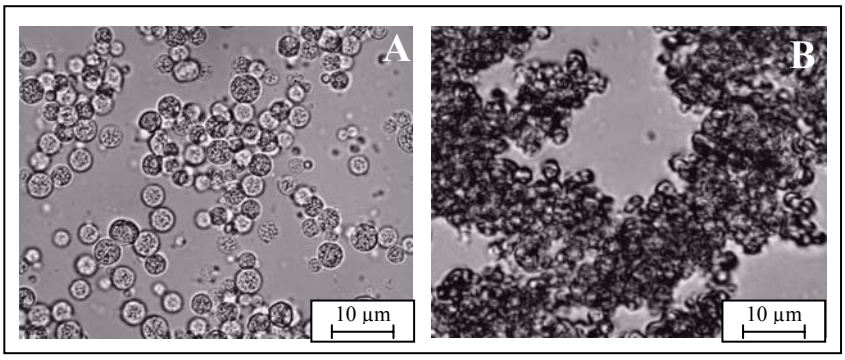


Photos 3.1
Emulsion double cristallisable après fabrication
A) à 65°C ; B) à température ambiante

3.2.2.b Agrégation du matériau sous écoulement

Suite à la solidification de la phase grasse, parallèlement à l'évolution des propriétés de surface, le comportement rhéologique du matériau change considérablement. Dans l'état liquide, le matériau est stable sous écoulement. Au cours de son processus de fabrication, le matériau subit, en effet, différents cisaillements et reste stable. Par contre, une fois solidifié, sous l'effet d'un cisaillement, le matériau s'agrège de manière irréversible.

Ce phénomène a d'abord été mis en évidence de manière qualitative : après les 12 heures de refroidissement, un échantillon, dont la fraction massique en globules est de 13%, contenu dans une fiole, est fortement agité manuellement. Après quelques secondes, le système initialement liquide tend vers un comportement solide : il s'écoule plus difficilement. Au cours de l'agitation, l'échantillon initialement fluide et homogène (photo 3.2.A)) évolue vers un système « pâteux » et agrégé (photo 3.2.B)) comme le montrent les observations en microscopie optique. Après agitation et formation des agrégats, le système est laissé au repos plusieurs heures mais il ne retrouve pas son état initial : l'agrégation observée est irréversible.



Photos 3.2
Evolution structurale de l'émulsion double cristallisable à température ambiante après une forte agitation manuelle
A) Avant agitation
B) Après agitation

Afin de comprendre et quantifier ce phénomène, le comportement d'une émulsion double cristallisée soumise à un cisaillement contrôlé est suivi au cours d'une étude rhéologique.

3.2.3 Etude rhéologique du phénomène

3.2.3.a Description générale du phénomène

Le matériau étudié présente les mêmes caractéristiques structurales que celles décrites précédemment. L'étude rhéologique est réalisée avec le rhéomètre Rheometrics RFSII à déformation imposée avec une géométrie cône-plan et un gap de 45 µm (cf. chapitre 2). Au cours de la mesure, la température est contrôlée et maintenue à 25°C. Tout au long de cette étude, la température sera la même et ne sera donc plus précisée par la suite.

L'évolution de la viscosité de l'échantillon en fonction du temps est mesurée pour un cisaillement donné. La figure 3.4 présente l'évolution de la viscosité dans le temps pour un échantillon soumis à un cisaillement de $80s^{-1}$.

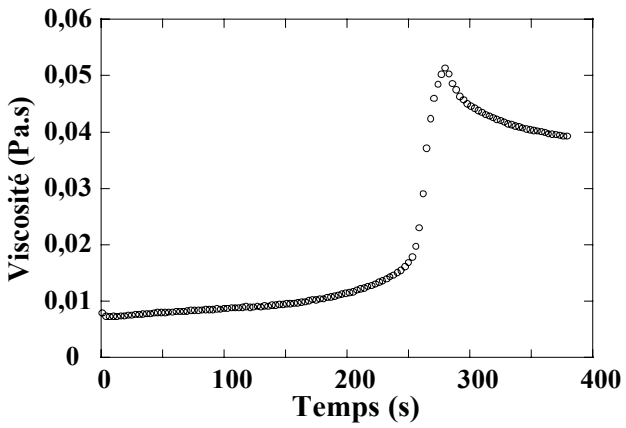


Figure 3.4
Evolution de la viscosité d'une émulsion double cristallisable en fonction du temps pour un taux de cisaillement de $80s^{-1}$ à 25°C
(φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm)

La viscosité initiale est de 7 mPa.s, soit environ 7 fois la viscosité de l'eau. Dans un premier temps, la viscosité reste pratiquement constante. Après une période d'induction de l'ordre de 250 secondes, la viscosité augmente brutalement et est multipliée par un facteur environ 5. Après une valeur maximale de 0.05 Pa.s, la viscosité décroît légèrement et se stabilise vers 0.04 Pa.s. Cette augmentation brutale de la viscosité s'accompagne d'un changement prononcé de la texture macroscopique de l'échantillon : à la fin de l'expérience, dans l'entrefer, on observe que l'échantillon, à l'aspect initialement liquide, a évolué en une pâte « granuleuse ». Si le cisaillement est arrêté et l'échantillon laissé plusieurs minutes au repos, la structure reste agrégée.

Ainsi, l'émulsion double cristallisée soumise à un cisaillement constant s'agrège et ce, de manière irréversible. Afin de comprendre ce phénomène et d'établir le lien entre l'agrégation observée et la montée en viscosité mesurée, il est essentiel de déterminer l'évolution structurale dans le temps de l'échantillon soumis à un cisaillement constant.

3.2.3.b Evolution structurale

Pour suivre en parallèle le comportement rhéologique de l'échantillon et son évolution structurale, nous utilisons un rhéomètre couplé à un microscope optique et une caméra vidéo (figure 3.5). L'appareil utilisé est le Haake Rhéoscope 1 dont le principe est décrit au chapitre 2 (cf. 2.5). Au cours du temps, à chaque mesure de viscosité correspond donc une image de l'échantillon présent dans l'entrefer, dans un plan focal donné. La série de photos 3.3 décrit l'évolution structurale dans le temps de l'échantillon soumis à un cisaillement de $80s^{-1}$.

La figure 3.5 illustre la correspondance entre les évolutions rhéologique et structurale de l'échantillon soumis à un taux de cisaillement de $80s^{-1}$.

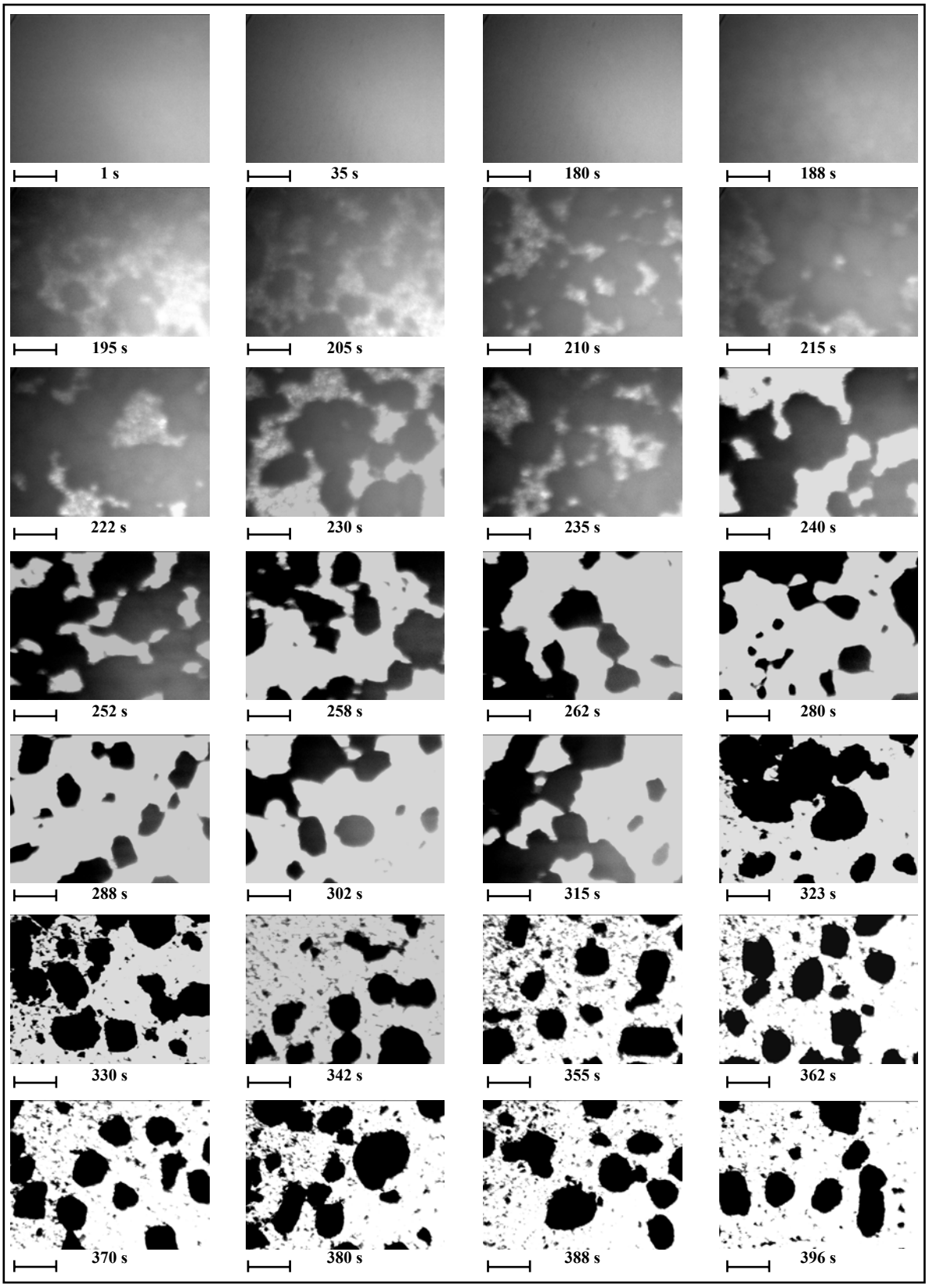
Au début de l'expérience, l'échantillon est homogène ; ceci se traduit par un fond continu, noir et homogène observé à la caméra (figure 3.5.A). Jusqu'à 180 secondes, le système n'évolue pas et la viscosité reste pratiquement constante.

Puis, à partir de 180 secondes et donc bien avant le temps correspondant à la montée brutale de la viscosité de l'échantillon, un contraste entre des zones claires et des zones plus sombres se dessine (figure 3.5.B). Les zones claires correspondent au milieu continu aqueux où la concentration en globules devient de plus en plus faible au cours du temps. Les zones plus foncées correspondent aux globules qui se sont connectés : le système percole. Cette connexion entre les objets se traduit par un premier changement de pente dans l'évolution de la viscosité avec le temps. Jusqu'à 250 secondes, on observe donc la formation d'un réseau de globules connectés entre eux et l'augmentation de la viscosité du système s'explique alors par un écoulement rendu plus difficile à travers ce réseau connecté.

Si le cisaillement est appliqué pendant une durée plus longue, c'est-à-dire au-delà de 250 secondes, la viscosité augmente brutalement. Les observations au microscope montrent une augmentation de la proportion des zones claires, c'est à dire une augmentation du volume de milieu continu vide en globule et donc en parallèle, une densification des agrégats formés (figure 3.5.C). L'augmentation de viscosité rend compte de l'écoulement plus difficile du milieu continu à travers ce réseau compact d'agrégats.

Enfin, après 280 secondes, la relaxation de la viscosité traduit le réarrangement final de ces agrégats en objets de structures sphériques et de taille centrée autour de 150µm, stable à ce cisaillement (figure 3.5.D). Des observations dans différents plans focaux montrent que ces agrégats sont connectés de part et d'autre de l'entrefer. Cet état final explique le plateau en

viscosité obtenu qui correspond donc à l'écoulement du milieu continu à travers un système d'agrégats connectés à travers le gap du rhéomètre.



Photos 3.3
Evolution structurale de l'émulsion double cristallisée soumise à un taux de cisaillement de 80 s^{-1}.
Microscope optique, Rhéoscope. Grandissement (x 5) Echelle : 150 µm
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 13\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4.5$ µm

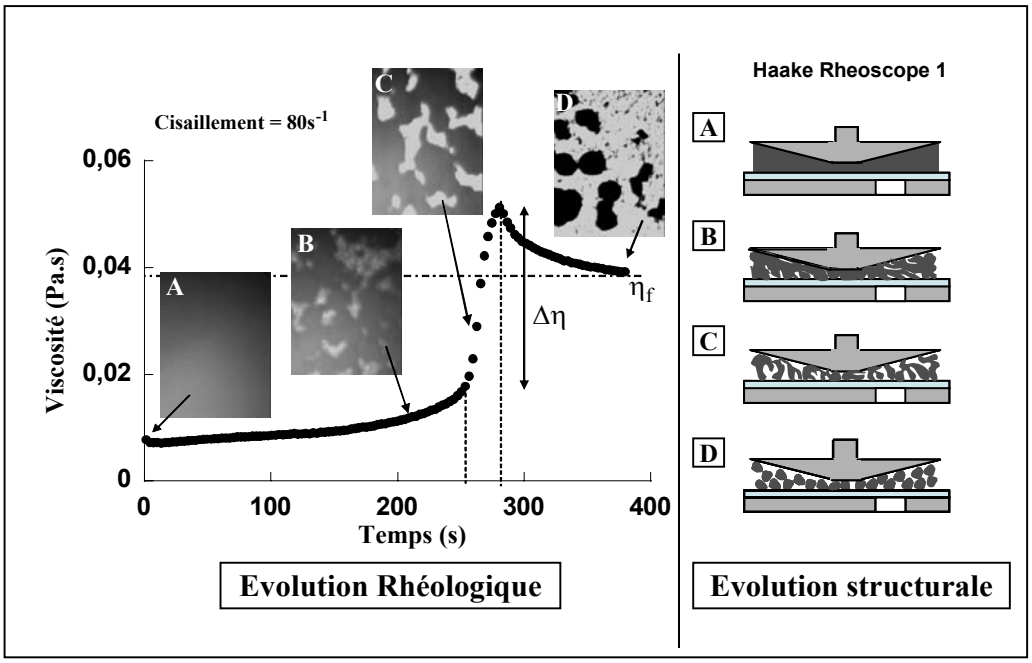


Figure 3.5
Suivi en parallèle de l'évolution rhéologique et de l'évolution structurale d'un échantillon soumis à un cisaillement de 80s^{-1} à 25°C. Les mesures sont effectuées à l'aide du Haake Rheoscope 1 qui est la combinaison d'un rhéomètre à déformation imposée couplé à un microscope optique et une caméra vidéo. $\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 13\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4.5$ µm

A) A l'instant initial, l'échantillon est homogène et la viscosité est de 10^{-2} Pa.s
B) Formation d'agrégats et début de la montée en viscosité
C) Densification des agrégats et saut de viscosité
D) Réarrangement des agrégats et relaxation de la viscosité

Ainsi, c'est la réorganisation du système sous cisaillement et la formation de structures connectées et de plus en plus compactes jusqu'à la connexion finale de ces objets à travers l'entrefer du rhéomètre, qui modifie l'écoulement du milieu continu et justifie la montée en viscosité observée.

Les premières observations qualitatives ainsi que celles menées par microscopie suggèrent donc le passage d'un matériau fluide et homogène à un système agrégé et pâteux.

3.2.3.c Nature de l'agrégat final

L'échantillon est soumis, dans un premier temps, à un taux de cisaillement de 80s^{-1}. Une fois le plateau de viscosité atteint, le cisaillement est encore maintenu pendant deux minutes. Le système est alors dans son état agrégé. Puis, sans retirer l'échantillon du rhéomètre, une rampe en cisaillement est imposée. L'évolution de la contrainte du système agrégé en fonction du taux de cisaillement est mesurée. Les résultats sont présentés sur la figure 3.6.

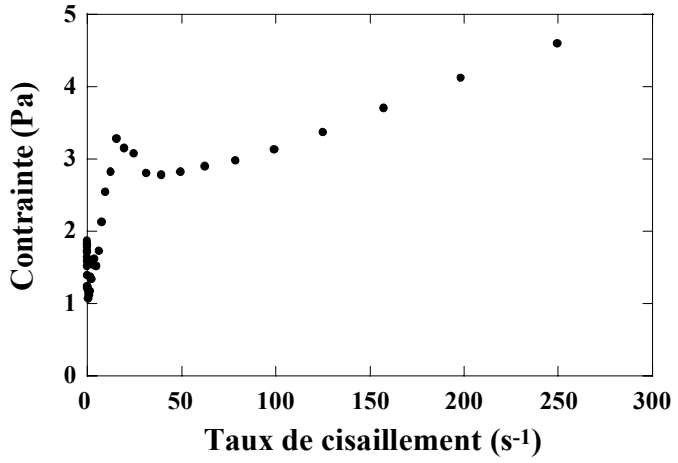


Figure 3.6
Evolution de la contrainte en fonction du cisaillement pour un échantillon agrégé, obtenu après une 1ère étape où le système a été soumis à un taux de cisaillement de 80s^{-1}.
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Le système agrégé présente une contrainte seuil que nous estimons de l'ordre de 3 Pa. Le système agrégé final s'apparente donc à un solide avec une contrainte seuil qu'il faut appliquer pour provoquer son écoulement. Néanmoins, il faut préciser que cette courbe ne correspond pas à un comportement de matériau à contrainte seuil classique. En effet, il apparaît clairement sur la figure 3.6 que la contrainte seuil n'est pas précisément définie. Nous ne nous étendrons donc pas sur la description du matériau après agrégation.

3.2.3.d Influence du taux de cisaillement

Le même échantillon (cf. 3.1.1) est soumis à différents taux de cisaillements et pour chacun de ces taux de cisaillements, l'évolution de la viscosité est suivie dans le temps et est représentée sur la figure 3.7.

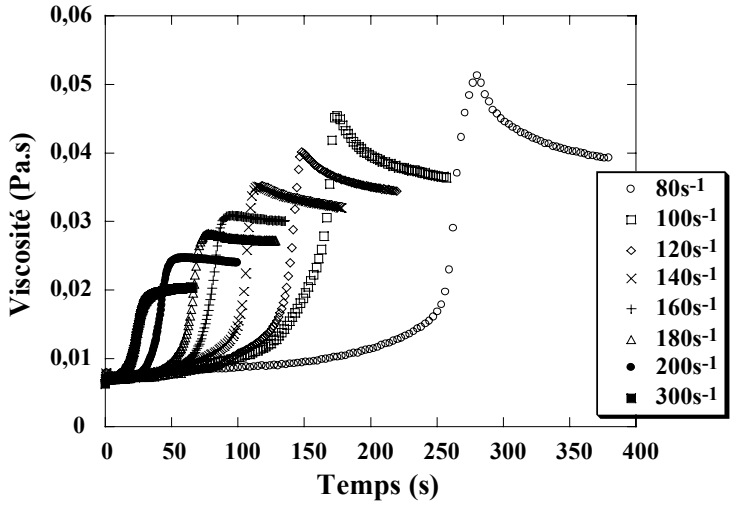


Figure 3.7
Evolution de la viscosité en fonction du temps pour un même échantillon soumis à différents taux de cisaillements
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Quel que soit le taux de cisaillement, l'échantillon présente le même comportement rhéologique : après un temps d'induction donné, une rapide montée de la viscosité est observée. Ce temps d'induction ainsi que la valeur finale du plateau de viscosité sont fonction du taux de cisaillement imposé à l'échantillon : plus le taux de cisaillement est grand, plus le temps d'induction est court et plus le plateau final en viscosité est faible. Il est à noter que la relaxation de la viscosité à la fin du processus n'est plus observée pour les valeurs de cisaillements supérieures ou égales à 200 s^{-1}.

3.2.3.e Evolution structurale du système en fonction du cisaillement

L'évolution structurale du matériau en fonction des différents taux de cisaillements imposés est suivie au Rhéoscope. Les mêmes étapes dans le processus de formation des agrégats sont observées, seule la durée de chaque étape est plus courte. De plus, pour les taux de cisaillements élevés ($\geq$ 200s^{-1}), dès leur formation, les agrégats adoptent leur taille caractéristique finale, il n'y a pas de réarrangement de leur structure. Ceci peut expliquer l'absence de relaxation au niveau de la viscosité finale et le fait que le plateau en viscosité soit atteint immédiatement après le saut en viscosité. Les photos 3.4 correspondent aux observations réalisées au Rhéoscope pour un même échantillon, soumis à différents taux de cisaillement (80s^{-1}, 200s^{-1}, 300s^{-1}), une fois le plateau de viscosité atteint.

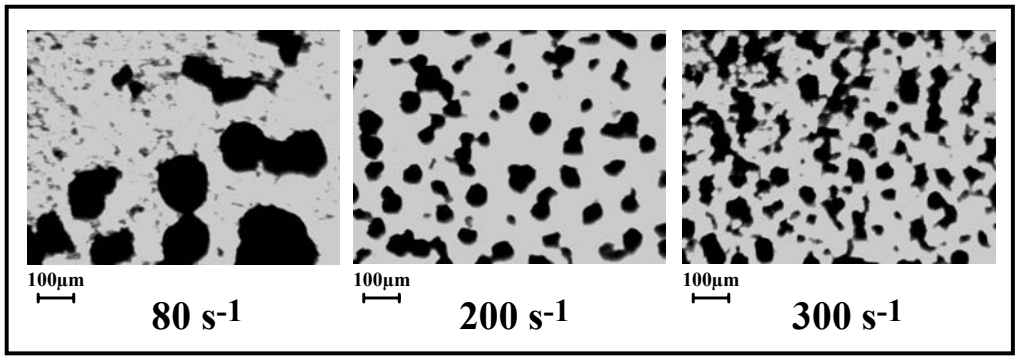


Photo 3.4
Observation au microscope optique (Haake Rheoscope 1) de la structure de l'échantillon sur le plateau de viscosité pour un taux de cisaillement de 80s^{-1}, de 200s^{-1} ou de 300s^{-1}
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Plus le taux de cisaillement est important, plus la taille caractéristique des agrégats est petite. Il semble donc que le plateau de viscosité finale soit directement relié à la taille de ces agrégats : pour une même fraction massique en objets (φ_g) et donc pour une même quantité de matière, les agrégats connectés à travers l'entrefer étant plus petits pour un cisaillement

important, l'écoulement du milieu continu sera plus facile par rapport à un réseau d'agrégats plus volumineux. Ainsi, la viscosité finale, qui traduit cet écoulement, sera plus faible.

De plus, pour chacun de ces agrégats, obtenus pour un même échantillon soumis à différents cisaillements, si nous mesurons l'évolution de la contrainte en fonction du taux de cisaillement, une contrainte seuil est mise en évidence comme l'illustre la figure 3.8.

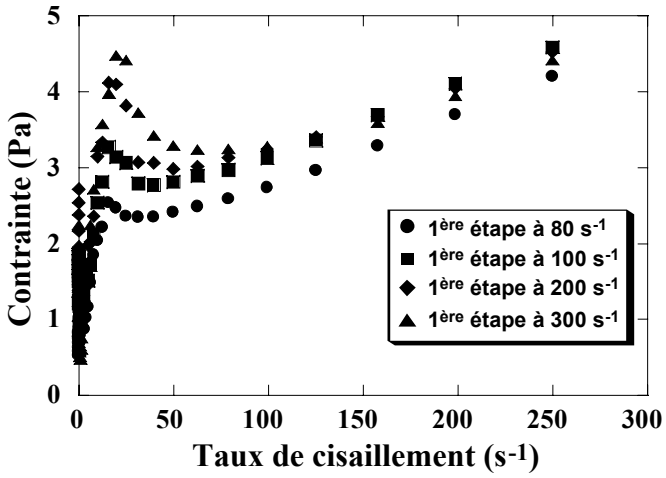


Figure 3.8
Evolution de la contrainte en fonction du taux de cisaillement pour un échantillon agrégé, obtenu après une 1ère étape où le système a été soumis à un taux de cisaillement de 80s^{-1}, de 100s^{-1}, de 200s^{-1} ou de 300s^{-1}
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Plus le cisaillement subi par l'échantillon au cours de la première étape est important, plus la contrainte seuil est importante. Cependant, à nouveau, il apparaît clairement sur la figure 3.8 que la contrainte seuil n'est pas précisément définie et que ces systèmes ne correspondent donc pas à des matériaux à contrainte seuil classique. Ce comportement complexe observé aux faibles cisaillements nécessiterait une étude plus approfondie pour comprendre la nature du matériau après agrégation.

Au-delà de la valeur finale de la viscosité et de la taille des agrégats, la période d'induction avant la brutale montée en viscosité diffère selon le taux de cisaillement imposé au système : plus le cisaillement appliqué à l'échantillon est important, plus la montée en viscosité se produit rapidement. Ainsi, afin de comprendre l'origine du phénomène d'agrégation observé, il est nécessaire de quantifier la dépendance du temps d'induction avec le taux de cisaillement.

3.2.4 Quantification du phénomène

3.2.4.a Définition du temps d'induction

Une valeur précise pour le temps d'induction est définie : pour une expérience à un cisaillement donné, nous extrapolons linéairement la lente montée initiale ainsi que la brusque augmentation de la viscosité. Le temps d'induction, t_c, est alors déterminé par l'intersection de ces deux droites. Sur la figure 3.9, le temps d'induction pour un échantillon soumis à un cisaillement de 80 s^{-1} est ainsi déterminé.

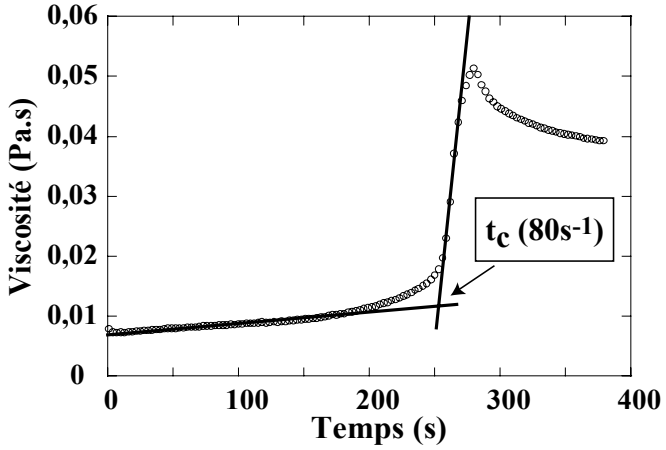


Figure 3.9
Evolution de la viscosité en fonction du temps pour un taux de cisaillement de 80s^{-1} et détermination du temps d'induction t_c (80s-1)
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

3.2.4.b Influence du taux de cisaillement sur le temps d'induction

A partir de la figure 3.9 et de la figure 3.7, les temps d'induction correspondant aux transitions pour les différents cisaillements imposés à un même échantillon sont déterminés. La figure 3.10 représente l'évolution t_c en fonction du taux de cisaillement.

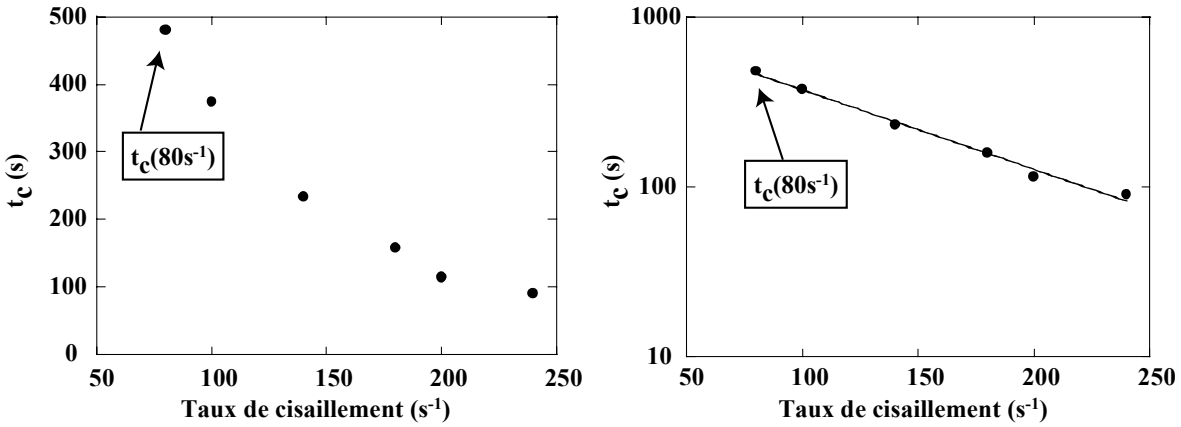


Figure 3.10
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement.
Représentation linéaire-linéaire et logarithme-linéaire
φ_i = 40%, φ_g = 13%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Il apparaît clairement que la dépendance de t_c avec le taux de cisaillement n'est pas linéaire. Le meilleur ajustement de cette courbe est une loi exponentielle, comme le montre la figure 3.10 en représentation logarithme-linéaire. La dépendance exponentielle de t_c avec le cisaillement peut alors s'écrire :

$$t_c = t_0 \exp\left(\frac{-\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)$$

où $\dot{\gamma}_c$ est une valeur critique du taux de cisaillement et t_0 est un préfacteur avec la dimension d'un temps.

3.2.4.c Influence de la fraction massique

Afin de confirmer cette dépendance exponentielle, mise en évidence pour une fraction massique donnée, l'évolution de la viscosité en fonction du temps sous différents taux de cisaillements est suivie pour un échantillon présentant les mêmes caractéristiques structurales (d_g = 4.5µm ; d_i = 400nm ; φ_i = 40%) mais préparé à différentes fractions massiques. La fraction massique en globules des échantillons étudiés varie de 10 à 17%. Au dessus de 17% en objets, les cinétiques d'agrégation sont trop rapides. Si l'échantillon est stocké à une fraction massique supérieure à 20%, le simple crémage entraîne une agrégation irréversible des couches supérieures de l'échantillon. La figure 3.11 présente l'évolution des temps d'induction pour chaque échantillon en fonction du taux de cisaillement appliqué.

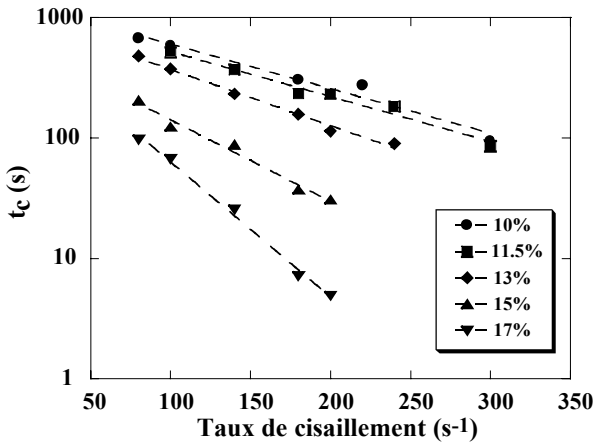


Figure 3.11
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement pour différentes fractions massiques
φ_i = 40%, d_i = 400 nm, d_g = 4.5 µm

Quelle que soit la fraction massique de l'émulsion double cristallisée, nous constatons à nouveau que le temps d'induction dépend exponentiellement du taux de cisaillement imposé à l'échantillon. De plus, une nette décroissance de $\dot{\gamma}_c$ pour des valeurs croissantes de la fraction massique est mise en évidence : plus l'échantillon est concentré en objets, plus la cinétique d'agrégation est rapide.

Pour conclure, nous avons démontré que les émulsions doubles cristallisables sont des systèmes stables au repos mais instables sous écoulement. Cette instabilité se traduit par une soudaine et rapide augmentation de la viscosité de l'échantillon soumis à un taux de cisaillement constant.

Ce type de comportement sous cisaillement a déjà été décrit dans la littérature pour différents matériaux. Parmi ces nombreux systèmes, nous pouvons citer la gélification sous cisaillement de sphères dures fortement attractives (Potanin, 1991), la gélification de solution de polymères en présence d'agents couplant sous cisaillement (Omari et al., 2003) ou encore l'agrégation sous cisaillement d'émulsions de bitume en présence de particules de silice (Legrand et al., 2005). Pour chacun de ces systèmes, l'évolution de la viscosité de l'échantillon soumis à un taux de cisaillement donné est la même : une période d'induction pendant laquelle la viscosité du système évolue très peu est mesurée puis, une rapide et soudaine augmentation de la viscosité est observée.

Dans notre étude, nous avons caractérisé cette montée en viscosité par le temps d'induction, t_c, temps au-delà duquel la montée en viscosité est observée. L'observation la plus remarquable est la dépendance exponentielle de ce temps d'induction avec le taux de cisaillement imposé à l'échantillon. Cette dépendance exponentielle est inattendue et n'a jamais été décrite au préalable dans la littérature dans le domaine de l'agrégation de particules sous écoulement.

3.2.5 Interprétation

Afin d'interpréter l'instabilité des émulsions doubles cristallisées sous cisaillement, nous devons comprendre plus particulièrement deux points :

- le premier concerne le processus par lequel les particules se connectent de manière irréversible, c'est-à-dire l'origine microscopique de l'instabilité
- le deuxième concerne la cinétique de formation des agrégats sous cisaillement et plus particulièrement la dépendance exponentielle du temps d'induction avec le taux de cisaillement, mise en évidence expérimentalement.

3.2.5.a Origine microscopique de l'instabilité

Une fois au contact, les émulsions doubles cristallisées soumises à un taux de cisaillement s'agrègent et ce, de manière irréversible. Le caractère irréversible de cette agrégation semble directement corrélé à l'état de surface des particules (« rugueux » et plissé) et à la nature partiellement solide de la cire à 25°C, d'après l'analyse en DSC présenté au chapitre 2 (cf. 2.3.1).

Les agrégats obtenus au cours du cisaillement sont constitués de globules qui conservent chacun leur individualité. Par contre, dès que l'échantillon agrégé est chauffé, (au delà du point de fusion de la cire), les globules qui forment l'agrégat, perdent leur intégrité et coalescent. Ce type d'agrégats s'apparente aux structures obtenues par coalescence partielle d'émulsion simple directe (huile dans eau) où la phase grasse est constitué d'un mélange de corps gras partiellement solide.

- <u>Description du processus</u>

La coalescence partielle d'émulsion simple directe contenant des cristaux est étudiée et décrite depuis de nombreuses années notamment dans le domaine de l'agroalimentaire où ce processus est à la base de l'obtention du beurre, de la crème chantilly ou encore des crèmes glacées (Davies et al., 2000) mais est aussi observé, comme nous l'avons évoqué au chapitre 1, dans la gélification des particules lipidiques solides (Westesen et al., 1997).

Dans le cas d'émulsions simples ou d'émulsions doubles directes à base de lipides solides à température ambiante, le processus de fabrication de ces matériaux se termine par une étape

de refroidissement. La matrice grasse transite alors vers un état solide ou partiellement solide selon la température de refroidissement ou selon la température d'étude du matériau. La matrice constituée d'un mélange de corps gras (un mélange de mono-, di- et triglycérides dans le cas de notre étude) présente des zones liquides et des zones solides et cet état partiellement solide rend possible la déformation plastique des matériaux une fois au contact.

Au cours du processus de cristallisation de la matrice, des cristaux peuvent se développer à la surface des gouttes d'émulsion. Sous cisaillement, une fois au contact, ces cristaux peuvent percer l'interface d'une goutte voisine (Vanapalli et al., 2001). L'huile liquide disponible dans la matrice de ces objets va alors préférentiellement mouiller le cristal et renforcer ainsi le lien créé entre les deux gouttes (Boode et Walstra, 1993a ; van Boekel et Walstra, 1981). Un pont irréversible entre les deux gouttes cristallisées est formé. La coalescence entre les deux objets est dite « partielle » puisque le réseau cristallin propre à chaque goutte permet la conservation de la structure sphérique initiale de chaque objet et donc son individualité au sein de l'agrégat final. Ce processus comprend donc trois étapes : la mise en contact des globules, la pénétration du cristal dans l'interface voisine et le renforcement par l'huile de ce point de contact. Une fois réchauffée, la coalescence « totale » des globules est observée. Ces différentes étapes sont résumées sur le schéma 3.12.

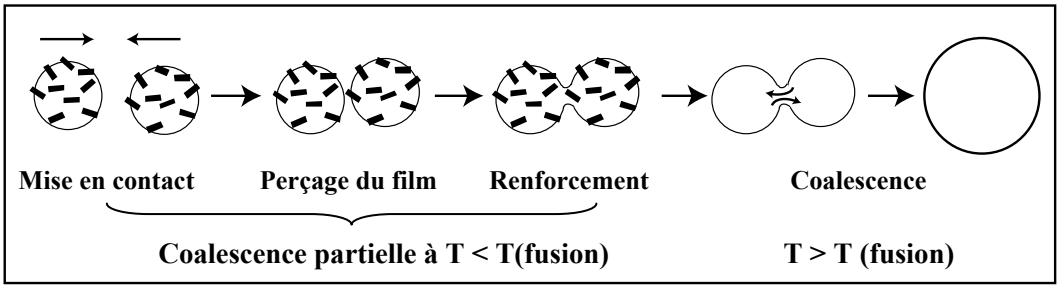


Figure 3.12
Représentation schématique des différentes étapes de la coalescence partielle

Au vue de la nature partiellement solide des globules doubles cristallisés à 25°C et de l'état de surface des globules après l'étape de refroidissement, il semble donc justifié d'affirmer que le processus de coalescence partielle est à l'origine de l'irréversibilité de l'agrégation des émulsions doubles cristallisables sous cisaillement.

- Influence de la présence des gouttelettes internes

Ce processus d'agrégation étant communément observé pour des émulsions simples directes, nous nous interrogeons sur l'influence de la nature « double » du matériau sur le phénomène. Pour cela, une émulsion simple directe cristallisée présentant les mêmes caractéristiques (d_g = 4.5 µm ; φ_g = 10%) que l'émulsion double est fabriquée à partir des mêmes constituants pour la phase grasse (Gelucire 4414 ; Suppocire DM) que ceux de l'émulsion double. Cette émulsion simple cristallisée est soumise à différents taux de cisaillements et pour chaque taux de cisaillement, l'évolution de la viscosité du système est mesurée au cours du temps (figure 3.13).

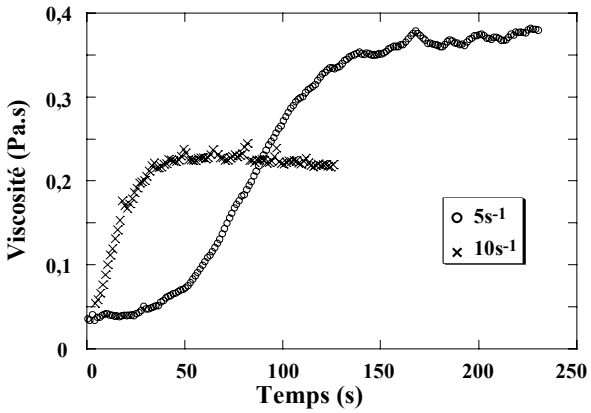


Figure 3.13
Evolution de la viscosité en fonction du temps pour une émulsion simple directe soumise à différents taux de cisaillements
φ_g = 10%, d_g = 4.5 µm

Le même processus d'agrégation est observé pour l'émulsion simple cristallisée, caractérisé par une montée soudaine de la viscosité après un temps d'induction, fonction du taux de cisaillement. Cependant, nous pouvons remarquer qu'afin de détecter le saut en viscosité, il est nécessaire d'appliquer des cisaillements beaucoup plus faibles que dans le cas de l'émulsion double. Au-delà de $40s^{-1}$, l'évènement se produit instantanément et le temps d'induction n'est plus détectable.

Le temps d'induction correspondant à chaque cisaillement est extrait de ces courbes. La figure 3.14 représente l'évolution du temps d'induction en fonction du cisaillement appliqué pour l'émulsion simple et pour une émulsion double présentant les mêmes caractéristiques mais dont la fraction en gouttelettes internes de l'émulsion double est de 40%.

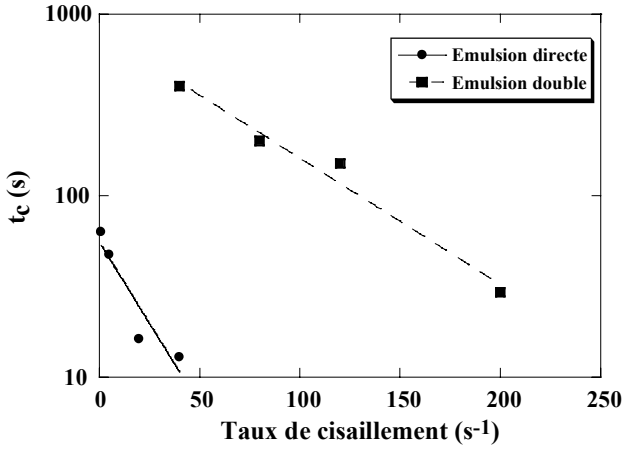


Figure 3.14
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement pour une émulsion simple (φ_g = 10%, d_g = 4.5 µm) **et une émulsion double** (φ_i = 40%, d_i = 400 nm, φ_g = 10%, d_g = 4.5 µm)

Une dépendance exponentielle est à nouveau mise en évidence pour le temps d'induction de l'émulsion directe avec le taux de cisaillement, même si la gamme de cisaillement balayée est très peu étendue. Au delà de cette observation, le principal résultat est que les cinétiques d'agrégation sont plus rapides pour un globule simple que pour le globule double. Ce constat peut apparaître, dans un premier temps, surprenant : les émulsions simples et les émulsions doubles sont, en effet, constituées du même mélange de triglycérides et du même tensioactif. Il s'agit donc de la mise en contact et de la coalescence partielle sous cisaillement de particules dont les surfaces sont constituées, dans les deux cas, du même matériau. C'est donc la composition interne de ces particules qui influence leurs propriétés de surface et leur cinétique d'agrégation. Au cours de la transition liquide/solide, la présence de gouttelettes internes va modifier l'organisation de la matrice et plus particulièrement son état de surface. Une hypothèse serait de considérer que la nucléation de cristaux s'effectuerait préférentiellement aux interfaces. Or, un globule double, du fait de ses structures internes, présente davantage d'interfaces et non pas uniquement des interfaces entre le globule et le milieu externe comme le globule simple. Donc pour même quantité de cire, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un globule double présenterait moins de cristaux à sa surface externe qu'un globule simple, c'est-à-dire une distribution plus faible à sa surface de protubérances responsables de la connexion irréversible sous cisaillement entre deux objets, comme l'illustre la figure 3.15. Une caractérisation plus précise de l'état de surface de ces différents objets par diffraction des rayons X ou AFM nous permettrait d'interpréter plus précisément ces observations.

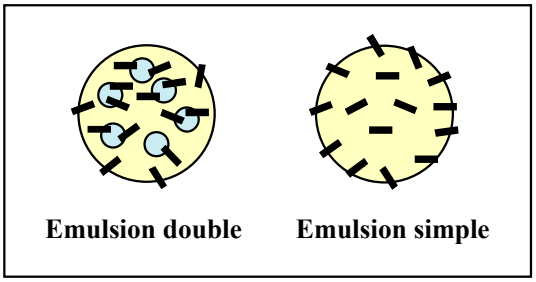


Figure 3.15
Représentation schématique de l'influence des structures internes sur la répartition des cristaux dans la matrice cristalline.

- Influence du taux de cisaillement sur la coalescence partielle

Le processus de coalescence partielle nécessitant la mise en contact des objets dépend aussi fortement du taux de cisaillement imposé au système (Boode et Walstra, 1993a ; Boode et al., 1993b ; Heinrichs et Kessler, 1997 ; Giermanska-Kahn et al., 2005). Récemment, Davies et al. (2000) ont étudié la stabilité sous cisaillement d'émulsions simples directes partiellement solides, constituées de triglycérides et stabilisées par des protéines. Les courbes traduisant l'évolution de la viscosité de ces systèmes soumis à un cisaillement présentent une allure semblable à celles obtenues dans le cadre de notre étude.

Ainsi, au-delà de l'origine microscopique de ce phénomène, nous souhaitons interpréter la cinétique d'agrégation des émulsions doubles cristallisables et plus particulièrement la dépendance exponentielle du temps d'induction avec le taux de cisaillement imposé au système.

3.2.5.b Cinétique d'agrégation sous cisaillement

- Modèle de croissance des agrégats

Décrire la structure d'agrégats formés sous écoulement et leur cinétique de croissance n'est pas un problème aisé car les géométries qui apparaissent sont généralement des structures irrégulières, ne possédant pas une géométrie euclidienne classique et donc difficiles à caractériser quantitativement. C'est seulement dans les années 70 que l'introduction de la notion de dimension fractale et en parallèle le développement de nombreux outils de simulation numérique ont permis de développer des modèles permettant de décrire les phénomènes de gélification, de percolation ou d'agrégation.

- **La géométrie fractale**

La notion de fractale a été définie par Mandelbrot (Mandelbrot, 1975) dans les années 1970 pour rendre compte de formes rencontrées dans la nature et qui ne peuvent pas être décrites par la géométrie euclidienne. Les structures décrites par les fractales sont avant tout caractérisées par leur autosimilarité : chacune de leur parties, quelles que soient leurs dimensions, est semblable au tout. Les objets fractals se ressemblent à toutes les échelles. On parle alors d'invariance par changement d'échelle ou de similitude interne. Une autre propriété est la suivante : si l'on évalue la masse, M, contenue dans une sphère de rayon R centrée sur un point de l'objet, alors cette masse varie comme R^{Df} : $M(R) \propto R^{Df}$, où D_f est la dimension fractale en volume qui dans le cas général est comprise entre 1 et 3.

La dimension fractale donne des informations sur la répartition moyenne de la masse d'un objet dans l'espace mais elle ne donne aucune information sur ses différentes interconnexions. Certaines fractales peuvent avoir la même dimension alors que la distribution de matière ne se fait pas de la même façon. Pour des agrégats, le comportement fractal n'existera que dans certaines limites de longueur, grandes devant la taille des particules élémentaires mais petites devant l'agrégat lui-même.

- **Les modèles d'agrégation**

De nombreux modèles mathématiques ont été élaborés pour représenter la croissance d'agrégats formés de particules. Ils peuvent être scindés en deux groupes.

Le modèle DLCA (Diffusion Limited Cluster Aggregation)

Ce modèle a été établi pour décrire une agrégation colloïdale irréversible. Dans ce modèle, la probabilité de collage entre des agrégats ou des particules qui se rencontrent est égale à 1. Lorsque deux agrégats se collent, ils forment un nouvel agrégat plus grand. Ce dernier diffuse jusqu'à ce qu'il rencontre un autre agrégat avec lequel il se combinera et ainsi de suite. La croissance des agrégats n'est limitée que par leur diffusion. Si les réarrangements sont négligeables, la structure des agrégats est ramifiée et fractale (D_f ~1.8). Le volume effectif occupé par l'ensemble des agrégats augmente au cours du temps car leur densité diminue avec leur taille (nature fractale de l'agrégat). Si la concentration en particules est suffisante, ce volume correspondra au bout d'un certain temps au volume de l'échantillon. A ce stade, tous les agrégats sont connectés et leur taille n'évolue plus. Ils forment une structure figée, appelée « gel ».

Le modèle RLCA (Reaction Limited Cluster Aggregation)

Ce modèle traduit lui aussi une agrégation colloïdale irréversible. Mais dans ce modèle, la probabilité de collage, lorsque des agrégats ou des particules se rencontrent, est inférieure à 1. Cette probabilité traduit l'effet d'une barrière dans le potentiel d'interaction entre les particules. La croissance des agrégats n'est plus limitée seulement par la diffusion mais aussi par la réactivité. Les agrégats résultants sont ramifiés et fractals, mais ils sont plus compacts que les agrégats du régime DLCA (D_f ~2.1) car une particule pourra pénétrer l'intérieur de l'amas avant de s'y accrocher.

- <u>Agrégation péricinétique et orthocinétique</u>

Lors d'un écoulement, une particule est non seulement soumise au mouvement Brownien mais aussi aux forces hydrodynamiques. Lorsqu'une particule de rayon a se déplace à une vitesse V ($V = a \times \dot{\gamma}$, où $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement) dans un fluide de viscosité η_c, elle subit une force de frottement visqueux de la part du fluide décrite par la loi de Stokes. Cette force, F_S, a pour expression dans le cas d'une sphère de rayon a : $F_S = 6\pi\eta_c \times a \times V$

Afin de déterminer l'influence du taux de cisaillement sur une particule sous écoulement, le nombre de Peclet, P_e, a été introduit. Il représente le rapport entre le temps caractéristique du gradient de cisaillement ($\frac{1}{\dot{\gamma}}$) et le temps caractéristique du mouvement Brownien. Il est défini par la relation :

$$P_e = \frac{V \times a}{D} = \frac{\dot{\gamma} \times a^2}{D}$$

avec V la vitesse d'écoulement, a le rayon de la particule et D le coefficient de diffusion brownienne de la particule.

Pour une particule sphérique, le nombre de Peclet s'écrit :

$$P_e = \frac{3\pi\eta_c a^3 \dot{\gamma}}{4k_B T}$$

avec η_c la viscosité du milieu continu, k_B la constante de Boltzmann et T la température du système.

Le nombre de Peclet peut aussi s'interpréter comme le rapport de l'énergie induite par le cisaillement ($\eta_c a^3 \dot{\gamma}$) sur l'énergie d'activation thermique ($k_B T$).

Quand le nombre de Peclet est largement inférieur à 1, le cisaillement n'affecte pas le mouvement de l'objet et le mouvement Brownien domine les cinétiques d'agrégation. Ce régime, purement diffusif, est appelé régime d'agrégation péricinétique. Dans ces conditions, la fréquence d'agrégation est indépendante du taux de cisaillement imposé.

Quand le nombre de Peclet devient largement supérieur à 1, la convection est alors le mécanisme de transport prédominant. Ce régime convectif est appelé régime d'agrégation orthocinétique. Dans ces conditions, la fréquence de formation des doublets est proportionnelle à la fréquence de collision de deux objets (Potanin, 1991). Dans ce cas, la fréquence caractéristique de formation d'une paire est donnée par :

$$f \cong \frac{\pi}{6} \alpha n_1 a^3 \dot{\gamma} \cong \alpha \varphi \dot{\gamma}$$

avec n_1, le nombre de particules initiales par unité de volume

a, le rayon de la particule

$\dot{\gamma}$, le taux de cisaillement imposé au système

$\varphi = \frac{\pi}{6} n_1 a^3$, la concentration volumique en particules

Le paramètre α est introduit pour tenir compte de l'efficacité de la connexion entre deux objets au moment de leur rencontre. Des modèles numériques prédisent une dépendance en loi de puissance de α avec le taux de cisaillement appliqué qui peut s'écrire : $\alpha \propto \dot{\gamma}^{(-\varepsilon)}$

Le coefficient ε est fonction de la trajectoire des particules sous écoulement (Potanin, 1991) et est généralement compris entre 0 et 0.25.

Ainsi, selon ces considérations, le temps caractéristique de formation d'une paire, dans un régime d'agrégation orthocinétique, où la convection est le mécanisme de transport prédominant dépend algébriquement du taux de cisaillement et s'écrit :

$$t \propto \frac{1}{(\dot{\gamma})^{\varepsilon'}}$$ avec $\varepsilon' = 1-\varepsilon$, compris entre 0.75 et 1.

Dans le cadre de notre étude, au vue de la gamme de taux de cisaillement imposée (entre 80 et 300 s^{-1}) et de la taille des globules (d_g = 4.5µm), le nombre de Peclet est largement supérieur à l'unité. Pour une viscosité du milieu continu, η_c, comprise entre 1.1 et 1.5 mPa.s, le nombre de Peclet est tel que : Pe > 580. Nous nous situons donc dans le régime orthocinétique où le mécanisme de transport prédominant est la convection. Or, si nous essayons de décrire les résultats expérimentaux avec une loi algébrique (représentée par les courbes en pointillés sur la figure 3.16), nous trouvons un exposant variant entre (1.3) et (3.4) selon la fraction massique de l'échantillon, comme nous le montre la figure 3.16.

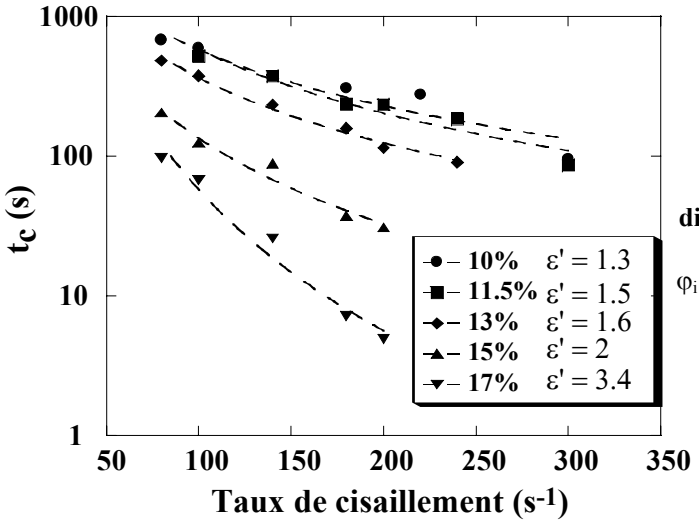


Figure 3.16
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement pour différentes fractions massiques, ajustée par une loi algébrique
φ_i = 40%, d_i = 400 nm, φ_g = 40%, d_g = 4.5 µm

Ceci exclut donc toute interprétation de l'agrégation en tant que phénomène purement convectif.

- <u>Interprétation de la dépendance exponentielle</u>

La dépendance exponentielle du temps d'induction avec le taux de cisaillement pour un système donné sous écoulement suggère que le processus d'agrégation mis en évidence expérimentalement est un processus thermiquement activé, décrit par une loi d'Arrhénius et caractérisé par une fréquence d'essai de l'évènement et une barrière énergétique à franchir.

Or, dans le processus d'agrégation que nous décrivons, il n'y a apparemment pas d'activation thermique. Au lieu de cela, la thermalisation effective, qui génère la fréquence caractéristique d'agrégation de deux globules, provient du cisaillement lui-même. L'écoulement sous cisaillement provoque la rencontre de deux globules à une fréquence caractéristique qui dépend de $\dot{\gamma}$.

En l'absence de cisaillement, nous avons démontré que la suspension est stable. Cette stabilité de l'échantillon au repos justifie donc l'existence d'une barrière colloïdale répulsive liée à l'effet stérique exercée par les chaînes des groupements PEG présents à la surface des globules. Un minimum secondaire peu profond du potentiel existe éventuellement conduisant à une agrégation réversible des particules au repos, au cours du crémage. Mais une faible agitation permet de sortir les particules de ce puits de potentiel peu profond.
En revanche, en l'absence de cisaillement, les effets thermiques seuls ne sont pas suffisants pour permettre le franchissement de la barrière répulsive.

Sous cisaillement, l'irréversibilité de l'agrégation des particules démontre l'existence d'un puits de potentiel profond au contact de la surface. Ainsi, la barrière répulsive présente une hauteur finie, E, et c'est l'énergie fournie au système par le cisaillement qui permet le franchissement de cette barrière et conduit à l'agrégation irréversible observée. La dépendance exponentielle du temps d'induction avec le cisaillement doit refléter la décroissance de la barrière énergétique entre les particules d'une quantité correspondant à l'énergie hydrodynamique fournie au cours du cisaillement : $\eta \dot{\gamma} a^2 \delta$

où δ est la distance microscopique qui caractérise la portée du potentiel répulsif entre particules

η est la viscosité du milieu continu

a est le rayon de la particule

Le profil du potentiel d'interaction total entre deux globules d'émulsion double cristallisée peut donc être représenté de la manière suivante (figure 3.17) :

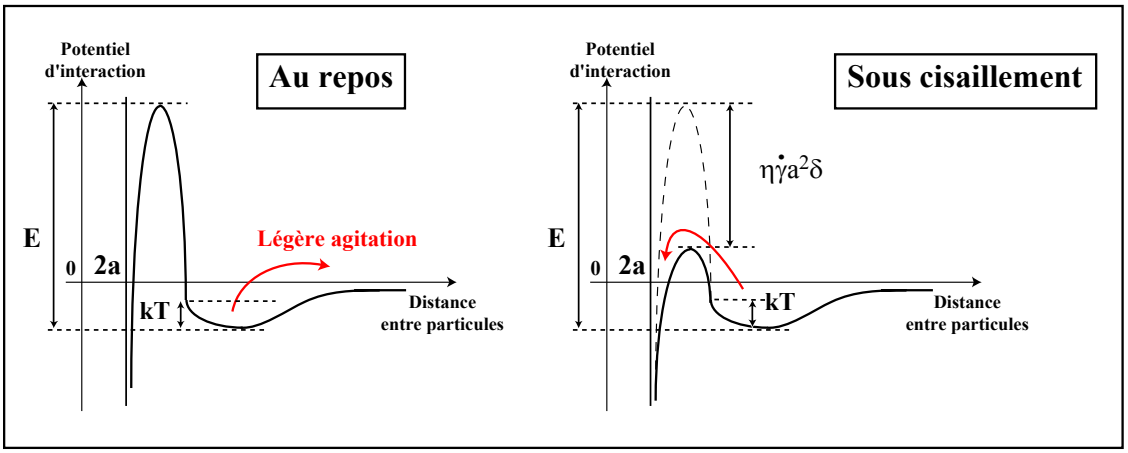


Figure 3.17
Représentation schématique des potentiels d'interaction entre deux particules d'émulsions doubles cristallisées au repos et sous cisaillement

Selon cette approche, le temps moyen conduisant à l'agrégation irréversible de deux particules est donc donné par :

$$\boxed{\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E - \eta \dot{\gamma} a \delta}{k_B T}\right)}$$

où τ_0 est le temps d'essai de formation d'une paire par cisaillement

E la barrière d'énergie répulsive en l'absence de cisaillement

En l'absence de barrière répulsive, lorsque la convection est le mécanisme de transport prédominant, le temps caractéristique d'agrégation de deux sphères sous cisaillement dépend algébriquement du cisaillement, comme nous l'avons évoqué précédemment. Nous estimons donc que le temps d'essai de formation d'une paire sous cisaillement, τ_0, peut s'écrire :

$$\tau_0 \propto \left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{\varepsilon'}$$ avec ε' compris entre 0.75 et 1.

On peut ainsi établir la relation :

$$\boxed{\tau \propto \left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{\varepsilon'} \cdot \exp\left(\frac{E - \eta \dot{\gamma} a^2 \delta}{k_B T}\right)}$$

La dépendance algébrique préexponentielle du temps d'agrégation de deux particules avec le taux de cisaillement est négligeable par rapport à la dépendance exponentielle.

Le concept selon lequel une barrière énergétique peut être réduite par cisaillement a déjà été présenté par Ozon et al. (2003) pour décrire un tout autre système, le rajeunissement d'un verre colloïdal. Les auteurs ont étudié l'effet du cisaillement sur la dynamique de vieillissement d'une suspension colloïdale de particules d'argile synthétique. Ils mettent en évidence qu'un taux de cisaillement d'amplitude $\dot{\gamma}$ réduit, d'un facteur proportionnel à $\exp(-\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c})$, le temps de relaxation mesuré juste après l'arrêt du cisaillement. Ils démontrent ainsi que cette dépendance exponentielle du temps caractéristique du phénomène avec le taux de cisaillement traduit la réduction de la barrière énergétique contrôlant ce réarrangement colloïdal par le taux de cisaillement fourni au système.

- <u>Corrélation entre τ et le temps d'induction mesuré expérimentalement</u>

La relation exacte entre le temps d'induction défini de manière expérimentale, t_c, et le temps théorique moyen de formation d'une paire agrégée irréversiblement, τ, n'est actuellement pas clairement établie. En effet, la description du processus de croissance des agrégats n'est pas un problème aisé car les géométries qui apparaissent sont des structures irrégulières difficiles à caractériser quantitativement.

Le modèle d'agrégation limitée par la réaction (RLCA) semble être la description la plus adéquate puisqu'il prend en compte une efficacité de collage entre les objets au moment de la collision. Selon cette hypothèse, la fréquence de formation d'un agrégat peut être décrite par la relation : $\frac{1}{t_c} \propto \left(\frac{1}{\tau}\right)^{F(\varphi_g)}$

où $F(\varphi_g)$ est une fonction, qui prend en compte la probabilité pour une particule d'appartenir à l'agrégat final, pour une dispersion de particules à la fraction massique φ_g.

Selon ces considérations, le temps d'induction, t_c, peut alors s'écrire :

$$\boxed{t_c \propto \left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{F(\varphi_g)\cdot\varepsilon'} \cdot \exp\left(\frac{-\eta\dot{\gamma}a^2\delta}{k_B T} F(\varphi_g)\right)}$$

D'après nos expériences, la réduction de la barrière répulsive, ΔE, induite par le cisaillement, peut être facilement estimée. A partir de ces considérations théoriques, on peut, en effet, écrire que : $t_c \propto \left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{F(\varphi_g)\cdot\varepsilon'} \cdot \exp\left(\frac{-\eta\dot{\gamma}a^2\delta}{k_B T} F(\varphi_g)\right) = t_0 \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) = t_0 \exp\left(-\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)$

Or, la gamme de cisaillement balayée variant entre 80 et 300s^{-1} et au vue de la gamme de variations de $\dot{\gamma}_c$ (entre 40 et 120 s^{-1} selon les expériences considérées), on peut estimer que la barrière énergétique est réduite d'une quantité, ΔE, variant entre $1k_BT$ et $8k_BT$ (où k_BT est l'énergie thermique).

Actuellement, l'expression analytique exacte de la probabilité $F(\varphi_g)$ n'est pas établie. Nous pouvons affirmer intuitivement que $F(\varphi_g)$ doit être une fonction croissante de φ_g. $F(\varphi_g)$ étant comprise entre 0 et 1, la dépendance du terme préexponentiel $\left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{F(\varphi_g)\cdot\varepsilon'}$ avec le cisaillement est négligeable face à la dépendance exponentielle. Ainsi, cette expression théorique du temps d'induction est en parfait accord avec la dépendance exponentielle mise en évidence expérimentalement du temps d'induction, t_c, avec le taux de cisaillement.

De plus, par cette relation, le cisaillement critique peut alors s'écrire : $\dot{\gamma}_c = \frac{k_B T}{\eta a^2 \delta F(\varphi_g)}$

Puisque $F(\varphi_g)$ est une fonction croissante de φ_g , la décroissance observée expérimentalement de $\dot{\gamma}_c$ avec la fraction massique en objet, φ_g , est bien vérifiée.

Décrire l'agrégation des émulsions doubles cristallisées par un modèle d'agrégation limitée par la réaction nous permet donc de justifier la dépendance exponentielle du temps d'induction t_c avec le cisaillement. Cependant, cette description reste une simplification à la vue de nos observations sous microscope qui suggèrent un mécanisme non pas seulement hiérarchique mais aussi coopératif. Ainsi, une meilleure compréhension du rôle du cisaillement, et des forces hydrodynamiques qu'il engendre, sur le processus de croissance des agrégats s'avère nécessaire afin de décrire précisément la forme analytique de la fonction de probabilité $F(\varphi_g)$. La relation exacte entre le temps d'induction mesuré expérimentalement, t_c, et le temps théorique de formation d'une paire, τ_c pourrait ainsi être établie.

3.2.5.c Influence de différents paramètres sur la cinétique d'agrégation

- <u>Influence de la viscosité du milieu continu</u>

Nous avons préparé quatre émulsions présentant les mêmes caractéristiques structurales (d_g = 4.5 µm ; d_i = 400nm ; φ_g = 13% ; φ_i = 40%) mais qui diffèrent par la viscosité de la phase continue. Pour augmenter la viscosité de la phase continue, du glycérol à différentes concentrations a été ajouté à la solution (eau + 0.17M Glucose). Les viscosités de ces différentes solutions sont alors établies grâce à l'appareil Contraves Low-Shear (cf. Chapitre 2 2.5) (cf. Tableau 3.1).

Glycérol (% massique)	Viscosité (mPa.s)
0	1.0
5	1.1
10	1.3
13	1.4
15	1.5

Tableau 3.1 : Viscosité d'une solution à 0.17M en glucose et contenant du glycérol en fonction du % massique en glycérol.

Il est à noter que la gamme de variation des viscosités n'est pas très étendue alors que nous sommes déjà à des fractions massiques en glycérol de 15%. Pour atteindre des viscosités plus importantes, il faudrait donc ajouter des quantités non négligeables de glycérol qui risqueraient de perturber la stabilité du système.

L'évolution de la viscosité de chacun de ces systèmes, soumis à différents taux de cisaillement, est mesurée. La figure 3.18 représente l'évolution de la viscosité dans le temps pour une émulsion double cristallisée dont la viscosité de la phase continue est de 1.1mPa.s (solution à 5% en Glycérol).

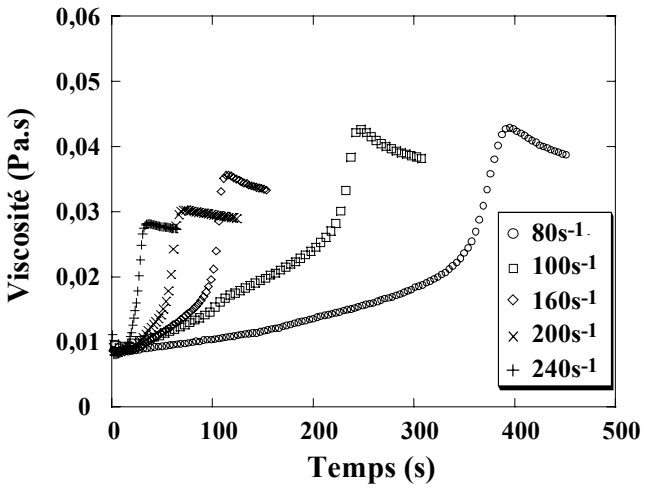


Figure 3.18
Evolution de la viscosité en fonction du temps pour un même échantillon soumis à différents taux de cisaillement
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 13\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4.5$ µm, $\eta = 1.1$ mPa.s

Pour chaque système, les temps d'induction correspondant aux différents taux de cisaillements imposés sont extraits des courbes et la figure 3.19 représente l'évolution du temps d'induction en fonction du taux de cisaillement pour les différentes viscosités du milieu continu.

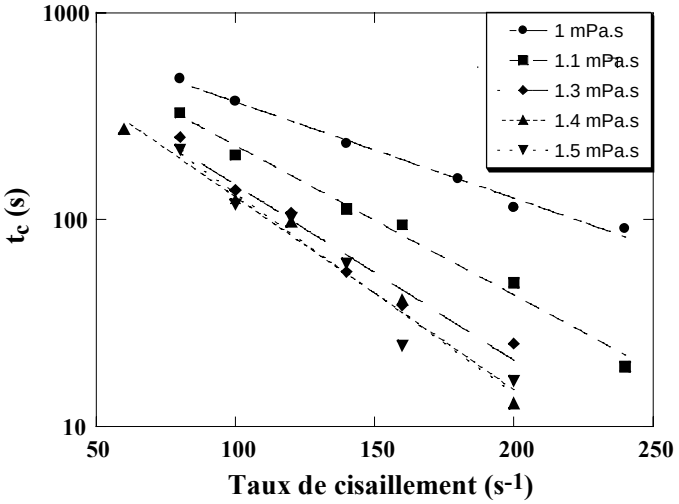


Figure 3.19
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement pour différentes viscosités de la phase externe
$\varphi_i = 40\%$, $d_i = 400$ nm, $\varphi_g = 13\%$, $d_g = 4.5$ µm

Pour un cisaillement donné, plus la viscosité du milieu continu augmente, plus le temps d'induction est court. On constate, de plus, que ces courbes présentent une valeur semblable pour l'ordonnée à l'origine, t_0, mais des valeurs décroissantes avec la viscosité du milieu continu pour la pente, $\frac{1}{\dot{\gamma}_c}$.

Or, si l'on considère l'énergie hydrodynamique fournie au système au cours du cisaillement, $\eta \dot{\gamma} a^2 \delta$, cette quantité sera d'autant plus importante que la viscosité du milieu continu est grande. Ainsi, la réduction de la barrière énergétique contrôlant l'agrégation de deux particules sous cisaillement sera d'autant plus efficace que le milieu continu sera visqueux.

Si l'on revient à l'équation théorique établie pour le temps d'induction, $t_c = \left(\frac{1}{\dot{\gamma}}\right)^{F(\varphi_g)\cdot\varepsilon'} \cdot \exp\left(E \cdot F(\varphi_g)\right) \cdot \exp\left(\frac{-\eta \dot{\gamma} a^2 \delta}{k_B T} \cdot F(\varphi_g)\right)$, le préfacteur ne dépend pas de la valeur de la viscosité du milieu continu, ce qui justifie une même ordonnée à l'origine, t_0, pour les différentes courbes.

De plus, si on trace l'inverse du taux de cisaillement critique, $\frac{1}{\dot{\gamma}_c}$, obtenue à partir de l'ajustement des courbes de la figure 3.19 en fonction de la viscosité du milieu continu, η, on obtient la courbe représentée sur la figure 3.20.

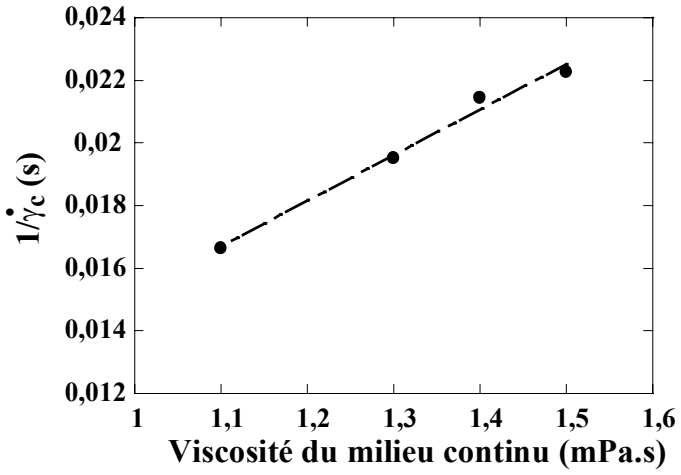


Figure 3.20
Evolution de l'inverse du taux de cisaillement critique en fonction de la viscosité du milieu continu
$\varphi_i = 40\%$, $d_i = 400$ nm, $\varphi_g = 13\%$, $d_g = 4.5$ µm

Puisque, $\frac{1}{\dot{\gamma}_c} = \frac{\eta a^2 \delta F(\varphi_g)}{k_B T}$, on retrouve bien une dépendance linéaire de $\frac{1}{\dot{\gamma}_c}$ avec la viscosité η. Notre modèle est donc, là encore, cohérent avec les expériences.

Cependant, nous sommes conscient que la gamme de variation de la viscosité reste très peu étendue (de 1.1 à 1.5 mPa.s) et que, pour véritablement confirmer la dépendance linéaire de $\frac{1}{\dot{\gamma}_c}$ avec la viscosité du milieu continu, il serait nécessaire d'étudier l'effet de variations plus importantes de la viscosité. Pour cela, il faudrait utiliser un gélifiant plus « efficace », c'est-à-dire un gélifiant capable, introduit en faibles fractions volumiques, de modifier sur une plus grande gamme la viscosité du milieu continu, tout en ne perturbant pas la stabilité du système.

- <u>Influence de la nature du tensioactif hydrophile</u>

Toute notre étude a utilisé un matériau stabilisé par le tensioactif hydrophile, Gélucire 4414. Cet agent de surface possède une partie PEG constituée de 32 motifs. La Gelucire 4414 est remplacée par le Stepan qui présente la même structure chimique mais dont le groupement PEG est plus long. Il est constitué de 150 motifs.

L'évolution de la viscosité d'une émulsion double cristallisée à base de Stepan soumise à différents taux de cisaillements est suivie en fonction du temps. La figure 3.21 présente

l'évolution des temps d'induction issus de ces courbes en fonction du taux de cisaillement pour une émulsion à base de Stepan et une émulsion à base de Gelucire 4414. Ces deux systèmes présentent, par ailleurs, les mêmes caractéristiques structurales (d_g = 4µm ; d_i = 400nm ; φ_g = 15% ; φ_i = 40%).

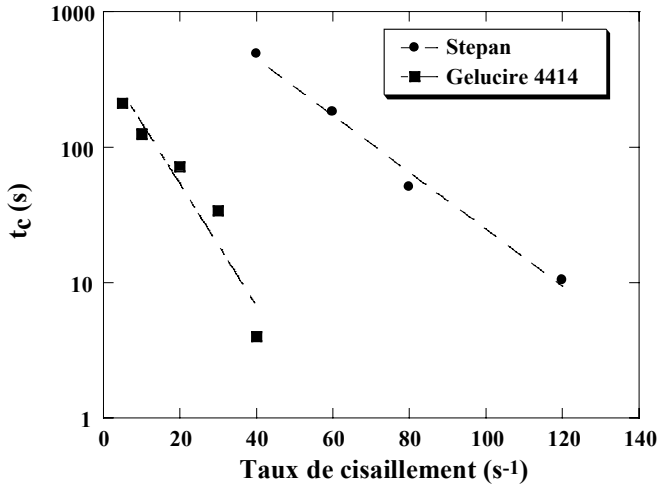


Figure 3.21
Evolution du temps d'induction t_c en fonction du taux de cisaillement pour deux tensioactifs qui diffèrent par la longueur de leur groupement PEG. Gelucire 4414 : 32 motifs ; Stepan : 150 motifs
φ_i = 40%, d_i = 400 nm, φ_g = 15%, d_g = 4 µm

Les cinétiques d'agrégation dans le cas du Stepan sont plus lentes que dans le cas de la Gelucire 4414. Or, la barrière répulsive, de hauteur E, qui assure la stabilité des particules en l'absence de cisaillement, a pour origine l'effet stérique des groupements PEG présents à la surface des globules cristallisés (cf. 3.1.3). Plus le groupement PEG est long, plus la répulsion stérique est « efficace » et donc plus l'amplitude de la barrière d'énergie, E, en l'absence de cisaillement est grande. Ainsi, pour un cisaillement donné et donc pour une réduction d'énergie de la quantité $\eta \dot{\gamma} a^2 \delta$ donnée, la cinétique d'agrégation sera d'autant plus lente que le groupement PEG sera long.

3.3 Conclusion

Les émulsions doubles cristallisées sont stables au repos. La présence des groupements PEG à la surface des globules assure une répulsion stérique suffisamment efficace pour compenser les forces attractives de Van der Waals et pour maintenir les particules dans un état certes floculé mais réversible par simple agitation manuelle.

Sous écoulement, les émulsions doubles cristallisées s'agrégent de manière soudaine, rapide et irréversible. Cette agrégation induite par cisaillement a pour origine microscopique l'état de surface des particules et plus particulièrement la nature partiellement solide du matériau qui conduit à la coalescence partielle des globules une fois au contact. Cependant, pour être au contact et rendre possible la connexion de l'interface d'un globule par un cristal présent à la surface du globule voisin, il est nécessaire de franchir la barrière répulsive qui existe entre ces deux objets. L'énergie hydrodynamique fournie par le cisaillement permet de réduire cette barrière qui devient alors de hauteur comparable à kT et facilement franchissable.
L'abaissement de la barrière répulsive par la contribution des forces hydrodynamiques se traduit par une dépendance exponentielle du temps caractéristique du processus d'agrégation avec le taux de cisaillement.

Un certain nombre de points pourraient être approfondis et fourniraient un complément d'informations pour la description de ce processus. Il serait intéressant, par exemple, d'exploiter les hauteurs des plateaux de viscosité finale et de comprendre leur dépendance avec le cisaillement mais aussi avec la taille des agrégats formés. La caractérisation de ces agrégats ainsi que la compréhension du comportement complexe de leur écoulement aux faibles cisaillements doivent être approfondies. Il serait aussi intéressant de caractériser plus précisément l'origine microscopique de cette agrégation et donc de caractériser l'état de surface des objets par une analyse en AFM ou par diffraction des rayons X. Ceci nous permettrait alors de quantifier et de donner une signification plus précise à la distance δ, définie comme la distance microscopique qui caractérise la portée du potentiel répulsif entre particules et qui est donc fonction de leur état de surface.
Enfin et surtout, il reste à comprendre le rôle des forces hydrodynamiques sur la croissance des agrégats. Une hypothèse simplificatrice basée sur le modèle RLCA permet de donner une relation cohérente avec nos résultats expérimentaux pour relier exponentiellement le temps d'induction et le taux de cisaillement. Cependant, une modélisation plus précise de ce processus de croissance coopératif s'avère indispensable pour déterminer l'expression exacte du temps d'induction et comprendre plus précisément l'influence des différents paramètres étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

Bender J.W., Wagner N.J., 1996. Reversible shear thickening in monodisperse and bidisperse colloidal dispersions, J. Rheol., 40, 899-916

Bertrand E., Bibette J., Schmitt V., 2002. From shear thickening to shear-induced jamming, Phys. Rev. E, 66, 060401

Boode K., Walstra P., 1993 a. Partial coalescence in oil-in-water emulsions 1. Nature of the aggregation, Coll. and Surf. A: Physicochem. and Eng. Asp., 81, 121-137

Boode K., Walstra P., de Groot-Mostert A.E.A., 1993 b. Partial coalescence in oil-in-water emulsions 2. Influence of the properties of fat, Coll. and Surf. A: Phys. Eng. Asp., 81, 139-151

Bossis G., Brady J.F., 1989. The rheology of Brownian suspensions, J. Chem. Phys., 91, 1866-1874

Chen L.B. et al., 1992. Structural changes and orientational order in a sheared colloidal suspension, Phys. Rev. Lett., 69, 688-693

Davies E., Dickinson E., Bee R., 2000. Shear stability of sodium caseinate emulsions containing monoglyceride and triglyceride crystals, Food Hydrocolloids, 14, 145-153

Freundlich H., Röder H.L., 1938. Dilatancy and its relation to thixotropy, Trans. Faraday Soc., 34, 308-316

Giermanska-Kahn J., Laine V., Arditty S., Schmitt V., Leal-Calderon F., 2005. Particle-stabilized emulsions comprised of solid droplets, Langmuir, 21 (10), 4316-4323

Heinrich J., Kessler H.G., 1997. Fat content of milk and cream and effect on fat globule stability, J. of Food Sc., 62 (5), 992-995

Hoffman R.L., 1972. Discontinuous and dilatant viscosity behaviour in concentrated suspensions. Observation of a flow instability, Trans. Soc. Rheol., 16, 155-173

Hoffman R.L., 1974. . Discontinuous and dilatant viscosity behaviour in concentrated suspensions. Theory and experimental tests, J. Colloid Interface Sci., 46, 491-506

Hoffman R.L, 1998. Explanations for the cause of shear thickening in concentrated colloidal suspensions, J. Rheol., 42, 111-123

Holmes C.B., Cates M.E., Fuchs M., Sollich P., 2005. Glass transitions and shear thickening suspension rheology, 49, 237

Legrand J., Chamerois M., Placin F., Poirier J.E., Bibette J., Leal-Calderon F., 2005. Solid colloidal particles inducing coalescence in bitumen-in-water emulsions, Langmuir, 21, 64-70

Lifshitz E.M., 1956. Sov. Phys., 2, 73-83

Mandelbrot B., 1975. Les objets fractals, forme, hasard et dimension, Ed. Flammarion, Paris

Maranzano B.J., Wagner N.J., 2001. The effects of particle size on reversible shear thickening of concentrated colloidal dispersions, J. Chem. Phys., 114, 10514-10527

Metzner A.B., Whitlock M., 1958. Flow behaviour of concentrated (Dilatant) suspensions, Trans. Soc. Rheol., 2, 239-254

Omari A., Chauveteau G., Tabary R., 2003. Gelation of polymer solutions under shear flow, Coll. and Surf. A: Phys. Eng. Asp., 225, 37-48

Ozon F., Narita T., Knaebel A., Debregeas G., Hébraud P., Munch J.P., 2003. Partial rejuvenation of colloidal glass, Phys. Rev. E, 68, 032401

Potanin A.A., 1991. On the mechanism of aggregation in the shear-flow of suspensions, J. Colloid Interf. Sc., 145, 140-157

Reiner M., 1949. Deformation and Flow, H.K. Lewis and Co., London

Trappe V., Prasad V., Cipelletti L., Segre P.N., Weitz D.A., 2001. Jamming phase diagram for attractive particles, Nature, 411, 772-775

Van Boekel M.A.J.S., Walstra P., 1981. Stability of oil-in-water emulsions with crystals in the dispersed phase. Coll. and Surf., 3, 109-118

Vanapalli S.A., Coupland J.N., 2001. Emulsions under shear – the formation and properties of partially coalesced lipid structures, Food Hydrocolloids, 15, 507-512

Weilenmann U., O'Meila C.R., Stumm W., 1989. Particle transport in lakes: Models and measurements, Limnol. Oceanogr., 34, 1-18

Westesen K., Siekmann B., 1997. Investigation of the gel formation of phospholipids-stabilized solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm., 151, 35-45

4 Propriétés d'encapsulation et de relargage des émulsions doubles cristallisables

Dans ce chapitre, notre objectif est d'explorer les processus d'encapsulation et de relargage des émulsions doubles cristallisables sous différentes conditions osmotiques.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'étude de la stabilité de ces systèmes au stockage sous conditions iso-osmotiques, pour un matériau dont la matrice est constituée de Suppocire DM.

Puis, nous étudierons l'évolution de ces matériaux lorsqu'ils sont soumis à un gradient de pression osmotique. En particulier, nous chercherons à mettre en évidence l'influence de la nature de la matrice sur la réponse du matériau à différents gradients de pression osmotique.

Enfin, l'influence de différents paramètres physico-chimiques sur la nature de la membrane et sur les propriétés d'encapsulation des émulsions doubles cristallisables sera étudiée.

4.1 Propriétés d'encapsulation au stockage

Notre étude porte dans un premier temps sur l'évolution du matériau au stockage. La phase interne de l'émulsion contient une solution en NaCl à 0.4M et l'équilibre osmotique est initialement établi grâce à une solution continue extérieure à 0.65M en glucose (cf. graphe équivalence Chapitre 2, 2.1.2).

Nous nous intéressons tout d'abord à la stabilité du matériau sous conditions iso-osmotiques, c'est-à-dire lorsque le potentiel chimique du solvant de la solution interne est égal au potentiel chimique du solvant du milieu continu. Nous qualifions ce régime de régime passif.

4.1.1 Description des matériaux

Pour cette étude, la cire utilisée est la Suppocire DM. L'émulsion double cristallisable est préparée selon la méthode présentée au chapitre 2. Les caractéristiques de ce matériau sont les suivantes :

- La fraction massique en gouttelettes interne, φ_i , est de 40%
- La fraction massique en globules, φ_g , est de 10%
- le diamètre des gouttelettes internes, d_i, est de 400 nm
- le diamètre des globules, d_g, est de 4 µm

Après fabrication, l'échantillon subit une trempe de 10 minutes dans un bain de glace sous une agitation modérée. D'après l'étude par DSC présentée au chapitre 2 (cf. Chapitre 2, 2.3.1), la matrice de cire se trouve alors dans son état solide.

Après la trempe, le matériau obtenu est directement placé à la température d'étude. La gamme de température de fusion de ce matériau s'étale de 23°C à 45°C. Ainsi, si la température d'étude est inférieure à 23°C, la matrice de cire est dans son état solide ; si elle est supérieure ou égale à 45°C, la matrice de cire est dans son état liquide.

La fin de l'étape de trempe est choisie comme le temps initial de la cinétique d'évolution du matériau à une température donnée.

4.1.2 Propriétés d'encapsulation du matériau en fonction de la température de stockage

4.1.2.a Mesure des cinétiques de libération du sel

La figure 4.1 présente l'évolution du pourcentage de sel libéré en fonction du temps, obtenue à différentes températures selon le protocole décrit au chapitre 2.

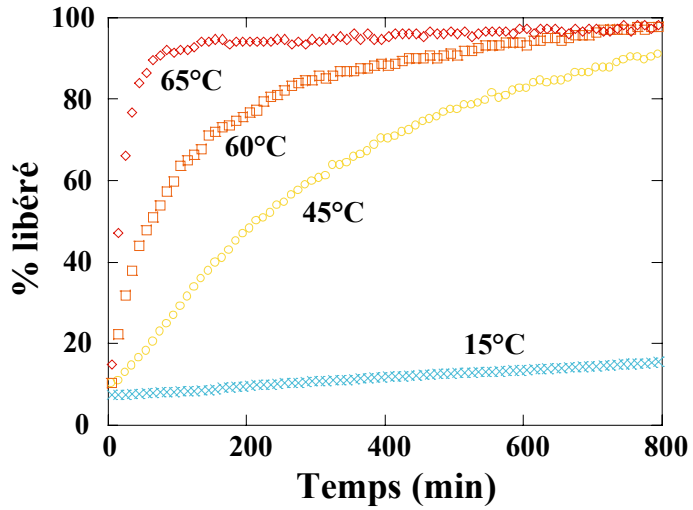


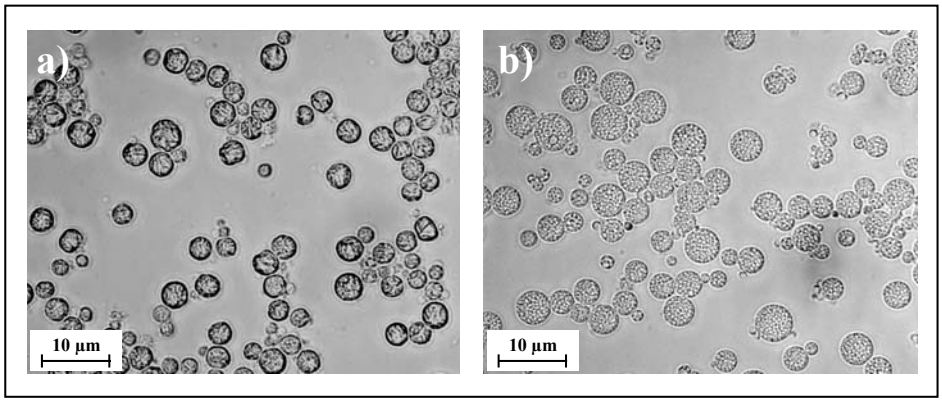
Figure 4.1
Cinétique de libération de NaCl en fonction de la température de stockage du matériau
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 10\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

La cinétique de libération du sel est beaucoup plus lente dans l'état solide (15°C) que dans l'état liquide (T ≥ 45°C). Le passage à l'état solide ralentit donc l'évolution du matériau sous conditions iso-osmotiques. On constate que toutes les cinétiques débutent à une valeur %lib(t=0) non nulle. La fin de l'étape de trempe est choisie comme temps initial de la cinétique. Or, le processus de fabrication pour ce matériau s'effectue à 65°C et à cette

température, comme nous le montre la cinétique, la fuite du marqueur est rapide. La quantité de sel perdue pendant la fabrication n'est donc pas négligeable et est, dans ce cas, d'environ 7%. Cette quantité sera fonction du temps de fabrication et donc de la quantité d'émulsion préparée.

4.1.2.b Evolution structurale de l'échantillon

Après 24 heures de stockage à 15°C, le matériau est observé à cette même température au microscope optique (Photos 4.1.a)): il ne présente pas d'évolution structurale. Afin de distinguer la structure interne, l'échantillon est chauffé au-delà de la plage de fusion de la cire et est immédiatement observé au microscope (Photos 4.1.b)). En première approximation, selon ces observations au microscope, les gouttelettes internes n'ont pas évolué : leur taille est conservée ainsi que leur nombre apparent. De la même manière, aucune évolution structurale n'est observée pour le matériau stocké dans l'état liquide (T≥45°C).



Photos 4.1
Photos en microscopie optique de l'émulsion double cristallisée après 24 heures de stockage à 15°C.
a) à 15°C ; b) réchauffée à 50°C

La libération du sel au cours du temps est donc due à un mécanisme n'impliquant pas de flux d'eau à travers la matrice solide puisque aucune évolution de taille des gouttelettes internes n'est observée : il ne s'agit donc pas de mûrissement d'Ostwald. En effet, un tel phénomène aurait entraîné une forte croissance de la taille des gouttelettes internes. De plus, ce processus de libération n'entraîne pas la rupture de films puisque le nombre de gouttelettes internes est conservé : il n'y a donc pas de coalescence goutte-globule. Il semble donc que la libération de l'espèce encapsulée durant le stockage soit liée au mûrissement de composition. Il est à noter que l'absence de gonflement de la structure interne au cours du stockage et donc l'absence de

flux d'eau suggèrent que le glucose diffuse également du milieu continu vers la phase interne, assurant l'équilibre des pressions osmotiques (cf. Chapitre 1, 1.4.2.b).

4.1.3 Approche théorique du mûrissement de composition dans les émulsions doubles

Considérons une émulsion double ayant une fraction volumique en goutte internes ϕ_i et en globules ϕ_g. L'émulsion est supposée monodisperse aussi bien au niveau des gouttes internes que des globules. On suppose également que cette émulsion double est stable d'un point de vue structural (pas de coalescence et pas d'évolution des diamètres des globules et des gouttes internes). On considère uniquement le passage d'une espèce contenue dans les gouttes internes vers la phase aqueuse externe, dans notre cas les ions chlorures. Ce passage est gouverné par l'équation de Fick qui s'écrit :

$$\boxed{J = -\frac{dN_i}{dt} = P \times S \times (C_i - C_e)} \qquad \textbf{Relation 4.1}$$

où S est la surface impliquée dans la « fuite » des ions,

J est le flux d'ions chlorures à travers cette surface,

N_i le nombre de moles d'ions chlorure dans les gouttes internes,

C_i et C_e sont respectivement les concentrations molaires en ions chlorures dans les gouttes internes et dans la phase aqueuse externe,

P est un coefficient qui caractérise la perméabilité de la membrane mise en jeu lors du passage : c'est le coefficient de perméabilité. P est un paramètre phénoménologique qui rend compte de tous les effets microscopiques associés à la perméation de l'espèce encapsulée. Il dépend entre autres de la nature chimique de l'espèce encapsulée, de la nature chimique de l'huile, des agents de surface mis en jeu…

La résolution de l'équation différentielle issue de la relation 4.1 conduit à l'expression suivante pour l'évolution de N_i avec le temps :

$$N_i = \frac{N_i^0}{1+\alpha}(\alpha + \exp(-P \times S \frac{1+\alpha}{V_i} t))$$

où N_i^0 est le nombre de mole dans les gouttes internes à l'instant initial et $\alpha = V_i / V_e$

avec V_i et V_e les volumes respectifs de phase aqueuse interne et externe que l'on suppose constants dans le temps. A partir de l'équation de conservation de la quantité totale d'ions, on en déduit le pourcentage libéré d'ions chlorures dans la phase externe :

$$\boxed{\%libéré(t) = 100\frac{C_e(t)}{C_\infty} = 100(1-\exp(-P\times S\frac{1+\alpha}{V_i}t))}$$ **Relation 4.2**

où $C_\infty = \dfrac{N_i^0}{V_i + V_e}$

C_∞ s'exprime en fonction des fractions volumiques en globules ϕ_g, de la fraction volumique en gouttes ϕ_i et de la concentration interne initiale C_i^0, par la relation suivante :

$$C_\infty = \frac{\phi_g \phi_i C_i^0}{(1-\phi_g) + \phi_g \phi_i}$$

Ce modèle prévoit donc une libération exponentielle des ions chlorures en fonction du temps. Dans l'hypothèse où la surface S est la surface totale des globules, le coefficient de perméabilité P se déduit de la pente initiale de la mono-exponentielle par la relation suivante :

$$\boxed{P = \frac{1}{100}\left(\frac{d(\%libéré)}{dt}\right)_{(t=0)} \frac{R_g}{3}\frac{\phi_i(1-\phi_g)}{(1-\phi_g)+\phi_g\phi_i}}$$ **Relation 4.3**

où R_g est le rayon des globules.

Le coefficient de perméabilité est donc un indicateur qui va nous permettre de quantifier et donc de comparer les fuites d'ions par mûrissement de compositions de différents systèmes.

4.1.4 Confrontation de la théorie avec l'expérience

La figure 4.2 montre que, quelle que soit la température, les cinétiques de libération sont décrites par une mono-exponentielle en accord avec le modèle présenté au paragraphe précédent. Le processus de destruction du matériau en régime passif est donc bien un mécanisme de mûrissement de composition. Cependant, pour décrire parfaitement ces cinétiques, il est nécessaire de tenir compte de la quantité initiale de sel perdue au cours du processus de fabrication. Ainsi, les courbes sont parfaitement décrites par l'équation :

$$\%lib = \%lib_0 + (100 - \%lib_0)\times(1-\exp(-\beta t)) \quad \text{avec} \quad \beta = PS\left(\frac{1+V_i/V_e}{V_i}\right)$$

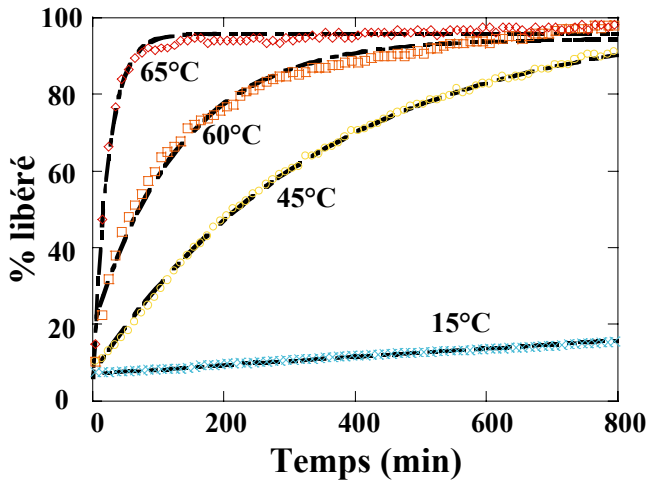


Figure 4.2
Cinétique de libération de NaCl en fonction de la température de stockage du matériau
φ_i = 40%, φ_g = 10%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l

Les courbes en noir représentent le meilleur paramétrage de la forme A + (100-A).(exp(-B.t)
les coefficients de corrélation sont de 0.999

Pour chaque température, il est possible de calculer le coefficient de perméabilité P, à partir de la pente initiale de la cinétique, des fractions volumiques en gouttes internes et globules et du rayon moyen des globules. En utilisant la relation 4.3, on obtient dans l'état solide, à 15°C : P= 4.9 10^{-13} m.s^{-1}. Dans l'état liquide, les perméabilités vont de 1.1 10^{-11} m.s^{-1} (45°C) à 1.7 10^{-10} m.s^{-1} (65°C). Ainsi, le passage de l'état liquide à l'état solide permet de réduire d'un facteur 100 à 1000 la perméabilité de la membrane.

Les perméabilités obtenues dans l'état liquide sont du même ordre de grandeur que celle d'une émulsion double liquide « classique ». En effet, pour une émulsion double présentant les mêmes caractéristiques structurales que notre système et dont la phase grasse est du dodécane, le coefficient de perméabilité pour des ions chlorures à travers la membrane est de 8 10^{-12} m.s^{-1} (Pays, 2000). Ceci confirme la validité de notre méthode de mesure.

Dans l'état liquide, nous constatons une dépendance de la perméabilité avec la température : plus la température est élevée, plus la libération du sel est rapide. La figure 4.3 présente l'évolution du logarithme de P avec l'inverse de l'énergie thermique k_BT. Même si cette variation n'est décrite que sur une faible gamme de température, on peut constater une évolution de la perméabilité selon une loi d'Arrhénius : $P = P_0 \exp(-\frac{E_a}{k_B T})$

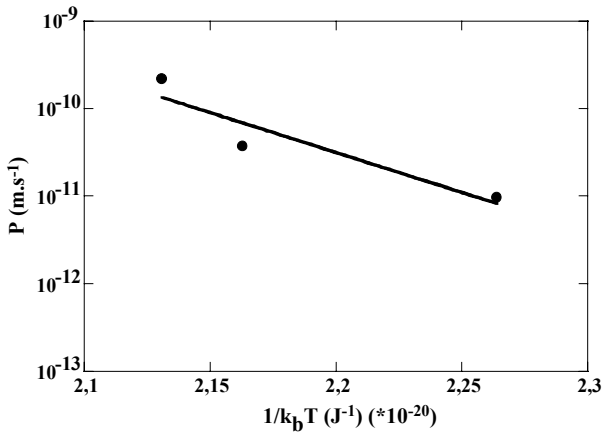


Figure 4.3
Variation de la perméabilité en fonction de $1/k_BT$ pour une émulsion double cristallisée
φ_i = 40%, φ_g = 10%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l

Cette variation est en accord avec les descriptions microscopiques du mûrissement de composition (Hamilton et al., 1990). En effet, au cours du mûrissement de composition, le passage transmembranaire des ions peut résulter d'un mécanisme par solubilisation puis diffusion ou bien d'un mécanisme par nucléation de trous à travers la membrane (cf. Chapitre 1, 1.4.2.b)). Dans les deux cas, ces approches aboutissent à un modèle phénoménologique décrit par la loi de Fick. De plus, dans ces deux cas, les modèles font apparaître l'existence d'une barrière d'activation et une dépendance exponentielle de la perméabilité avec la température. Dans le mécanisme de solubilisation-diffusion, la barrière d'activation est décrite par E_{d-s} , qui correspond au coût énergétique lié au passage de l'ion dans la phase hydrophobe. Cette énergie est la somme de plusieurs termes qui dépendent de la nature de l'espèce diffusante à travers la membrane ainsi que de la nature chimique de cette membrane. Le terme généralement prépondérant contenu dans E_{d-s} est l'énergie de Born qui représente l'énergie nécessaire au transfert d'un ion d'un milieu de haute constante diélectrique vers un milieu de basse constante diélectrique (Israelachvili, 1985). Dans le mécanisme de nucléation de trou, la barrière d'activation correspond à l'énergie nécessaire à la formation d'un canal dans la membrane, ce qui implique la tension de ligne, la tension de surface et les effets de courbures. Dans les deux cas, le mûrissement de composition est donc décrit comme un phénomène thermiquement activé avec une dépendance exponentielle de la perméabilité avec la température. Cependant, étant donnée la gamme très réduite de température (de 45°C à 65°C) sur laquelle le mûrissement de composition a été étudié dans l'état liquide, il n'est pas raisonnable de procéder à une interprétation des valeurs de P_0 et E_a et d'émettre à ce niveau des hypothèses sur l'origine microscopique du passage des ions Cl^- à travers la matrice dans l'état liquide.

4.1.5 Conclusion

Sous conditions iso-osmotiques, les émulsions doubles cristallisables présentent une cinétique de fuite lente lorsque la matrice grasse est dans son état solide, c'est-à-dire à une température inférieure à la plage de fusion. La libération du sel par mûrissement de composition est ralentie par la nature solide de la membrane à traverser. Dans l'état liquide, les valeurs de perméabilité obtenues sont du même ordre de grandeur que celles d'émulsions doubles liquides « classiques » : ceci confirme la validité de notre méthode de mesure. Ainsi, par simple variation de la température du système et par solidification de la matrice grasse, la perméabilité de la paroi est réduite d'un facteur 100.

En comparaison avec les émulsions doubles liquides sujettes à des processus de destruction rapide par coalescence et diffusion (cf. figure 4.4), les émulsions doubles cristallisables présentent donc des propriétés intéressantes pour le stockage sur le long terme :

- L'état solide de la matrice de cire empêche le déplacement des gouttes internes et leur adsorption puis coalescence à l'interface interne des globules ;
- la faible perméabilité de la paroi permet de ralentir les phénomènes de diffusion de l'espèce encapsulée par mûrissement de composition.

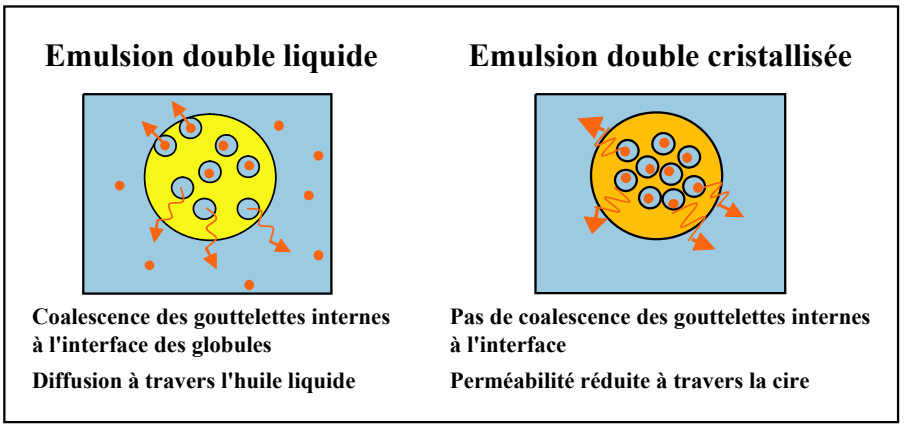


Figure 4.4
Récapitulatif des avantages des émulsions doubles cristallisables par rapport aux émulsions doubles « liquides » en régime passif

4.2 Propriétés d'encapsulation du matériau sous conditions hypo-osmotiques

Nous avons évoqué, dans le chapitre 1, l'influence des flux d'eau sur la stabilité des microréservoirs placés sous conditions hypo-osmotiques. Que ce soit dans le cas des liposomes ou des émulsions doubles, ces flux d'eau peuvent avoir des conséquences importantes sur la cohésion du matériau et sur les propriétés d'encapsulation du microréservoir. Dans le cas des émulsions doubles cristallisables, nous souhaitons déterminer le comportement du matériau sous conditions hypo-osmotiques et mettre en évidence les différents paramètres qui influencent la stabilité du matériau soumis à un gradient de pression osmotique.

4.2.1 Remarques préliminaires

Le régime hypo-osmotique est obtenu quand le potentiel chimique de l'eau dans la phase interne est inférieur au potentiel chimique de l'eau dans la phase externe. Nous qualifions ce régime de régime actif. Initialement, au début du processus de fabrication, les gouttelettes internes contiennent une solution de NaCl à la concentration $[NaCl]_{int0}$ et le milieu continu est une solution de glucose à la concentration $[Gluc]_{ext0}$. Ces deux concentrations assurent l'égalité des potentiels chimiques de la phase aqueuse interne et de la phase aqueuse externe.
Au cours du processus de fabrication, à 65°C, il a été mis en évidence qu'une quantité non négligeable de NaCl diffuse de la structure interne vers le milieu continu (de l'ordre de 10%). Après trempe, si on fait l'hypothèse que le volume des gouttes internes est conservé, la composition des différentes phases aqueuses est donc :

- pour la solution interne : $[NaCl]_{int0}' = [NaCl]_{int0} * (1-\%lib_0) = 0.36$ M
- pour la solution externe : $[NaCl]_{ext0}' = (\%lib_0)*[NaCl]_0*(\phi_g\phi_i)/(1-\phi_g) = 4\ 10^{-5}$ M

$$[Gluc]_{ext0} = 0.65 \text{ M}$$

où ϕ_g est la fraction volumique en globules et ϕ_i la fraction volumique en gouttelettes internes.

La quantité de sel libérée dans le milieu continu au cours du processus de fabrication reste donc négligeable par rapport à la concentration externe en glucose. Dans ces conditions, une dilution contrôlée de la phase externe permet de diluer la concentration en glucose et donc de créer un gradient osmotique contrôlé.

Pour rééquilibrer ce gradient de pression osmotique, l'eau doit pouvoir migrer du milieu continu vers l'intérieur des gouttelettes à travers la membrane afin de réduire la concentration interne en sel jusqu'au rééquilibrage des pressions. Dans le cas des émulsions doubles liquides, la membrane d'huile liquide est perméable à l'eau. Jager-Lezer et al. (1997) ont alors montré que sous conditions hypo-osmotiques, l'eau externe diffuse à travers la membrane. Les structures internes ainsi que le globule gonflent, conduisant à un amincissement du film d'huile entre les gouttelettes internes et l'interface du globule. Selon le gradient de pression osmotique, le gonflement est tel qu'il peut engendrer la rupture de ce film devenu fin et, en conséquences, la destruction de la structure double du matériau. La question que nous nous posons, à ce stade de notre étude, porte sur la perméabilité de la matrice de cire vis-à-vis de l'eau et sur le comportement des émulsions doubles cristallisées, que ce soit leur capacité de relargage ou leur évolution structurale sous conditions hypo-osmotiques.

Les différents matériaux étudiés sont préparés selon la méthode présentée au chapitre 2. Après fabrication, l'échantillon dilué à une fraction massique en globule φ_g de 20%, subit une trempe de 10 minutes dans un bain de glace. Immédiatement après cette étape de trempe, 1 g du matériau est dispersé dans 79g d'une solution de glucose à la concentration C_G à température contrôlée. La fraction massique en globule est alors de 0.25%, quantité suffisante pour mesurer un signal en potentiométrie. La concentration C_G sera ajustée afin d'obtenir la différence de pression osmotique, $\Delta\Pi$, souhaitée. L'instant de la dilution est choisi comme le temps initial pour les cinétiques mesurées.

4.2.2 Quelques considérations sur la pression osmotique

Initialement, la pression osmotique de la solution externe à la concentration C_1 = 0.65M en glucose vaut Π_1 et est égale à la pression osmotique de la solution interne à 0.4M en NaCl (cf. chapitre 2, 2.1.2). Après dilution d'un facteur f, la solution externe en glucose est à une concentration $C_2 = C_1/f$ correspondant à une pression osmotique Π_2. Chaque dilution de la solution externe en glucose correspond donc à une variation de la pression osmotique entre les réservoirs interne et le milieu continu :

$$\Delta\Pi = \Pi_1 - \Pi_2 = \left(\Pi(0.65M) - \Pi(0.65M/f)\right)$$

La valeur de la pression osmotique pour une solution en glucose à une concentration donnée est établie d'après la courbe expérimentale (données issues du Handbook of Chemistry and Physics) présentée sur la figure 4.5.

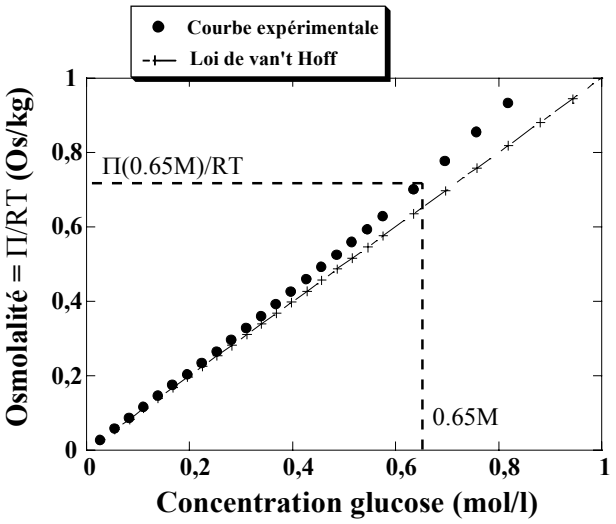


Figure 4.5
Variation de l'osmolalité d'une solution en fonction de la concentration en glucose de la solution. En gras, mesures expérimentales (données issues du Handbook of Chemitry and Physics). En pointillés, valeurs issues de la relation de van't Hoff.

La courbe représentée en gras correspond à la variation de l'osmolalité (Π/RT), mesurée expérimentalement, en fonction de la concentration en glucose de la solution. La courbe représentée en pointillée correspond au comportement qui décrit la pression osmotique, Π_1, d'une solution à la concentration C_1 par la relation (loi de van't Hoff) :

$$\Pi_1 = i \times C_1 \times RT$$

où i est le nombre de particules obtenues par dissociation du soluté, R la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin. Dans le cas du glucose, i=1.

Dans la gamme de concentrations en glucose où nous travaillons, nous observons, entre la courbe expérimentale et la loi de van't Hoff, une déviation, certes faible mais suffisante pour considérer que les approximations de gaz parfait ne sont pas tout à fait justes dans le cadre de nos expériences. Nous déterminerons donc systématiquement les valeurs de pression osmotique à partir de la courbe empirique.

4.2.3 Premières observations sur la Suppocire DM

4.2.3.a Suivi potentiomètrique du matériau sous conditions hypo-osmotiques

Nous étudions, dans un premier temps, le comportement sous conditions hypo-osmotiques du matériau obtenu à partir de Suppocire DM. Au cours de la dispersion, la concentration extérieure en glucose est diluée d'un facteur 100. La figure 4.6 compare la cinétique de libération du sel pour le matériau dans ce régime hypo-osmotique avec celle du même matériau sous conditions iso-osmotiques à 15°C.

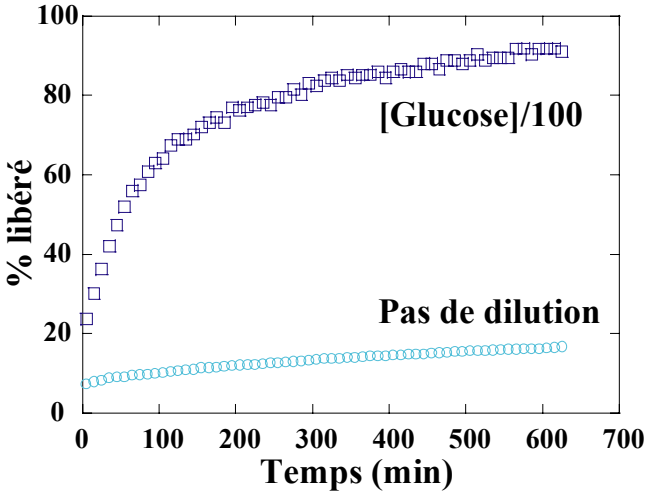


Figure 4.6
Cinétique de libération de NaCl en fonction des conditions osmotiques imposées à une émulsion double cristallisée à base de Suppocire DM, à 15°C
(φ_i = 40%, φ_g = 0.25%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l)

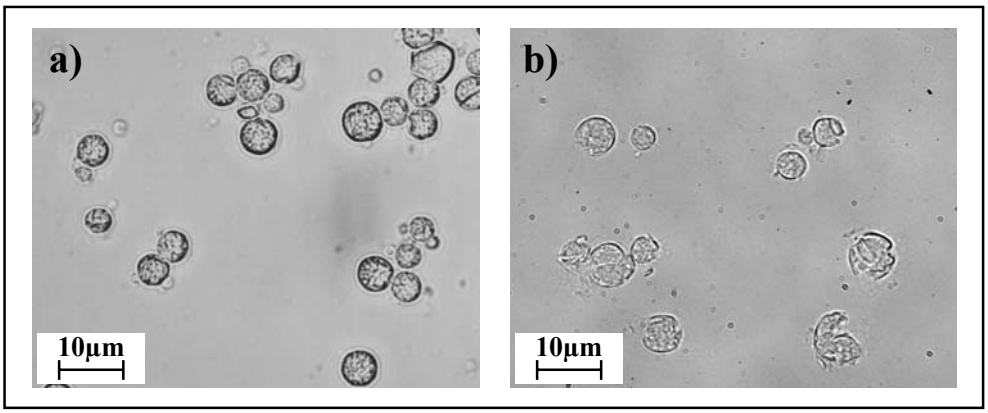
Pas de dilution du glucose : conditions iso-osmotiques ;
Dilution du glucose : conditions hypo-osmotiques

La cinétique de libération du sel est beaucoup plus rapide sous conditions hypo-osmotiques que sous conditions iso-osmotiques. Le temps de demi-vie, c'est-à-dire le temps au bout duquel 50% de l'espèce encapsulée ont été relargués, est de 45 minutes. De plus, alors que dans le cas du régime passif, les cinétiques sont très bien ajustées par une monoexponentielle, dans le régime hypo-osmotique, cet ajustement n'est plus possible.

4.2.3.b Evolution structurale du matériau

- Observation en microscopie optique

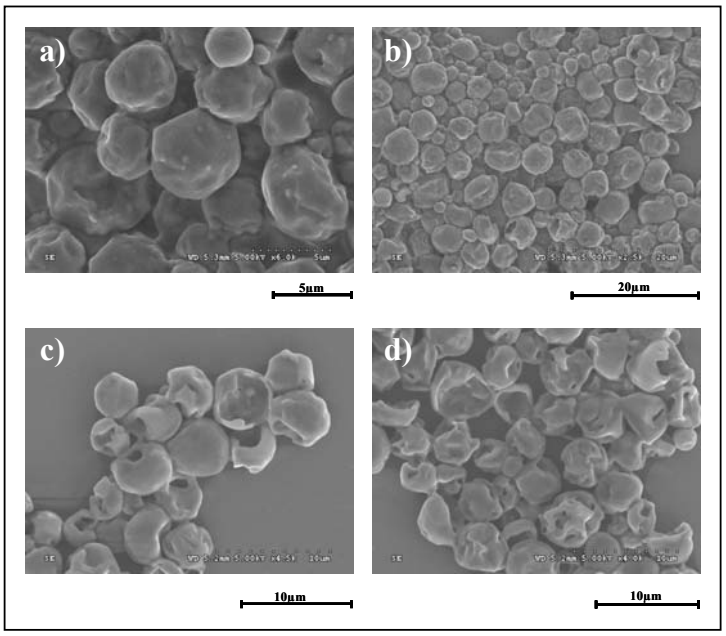
Après deux heures sous conditions hypo-osmotiques (facteur de dilution du glucose : 100), à 15°C, l'émulsion double cristallisée est observée entre lame et lamelle au microscope optique. Par rapport au matériau maintenu sous conditions iso-osmotiques (Photo 4.2.a)), le matériau a perdu sa cohésion : le globule est « déchiré » et présente d'importantes fractures (Photo 4.2.b)).



Photos 4.2
Observations en microscopie optique de l'émulsion double cristallisée à base de Suppocire DM à 15°C.
φ_i = 40%, φ_g = 2%, di = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l
a) Sous conditions iso-osmotiques; b) Sous conditions hypo-osmotiques ([Gluc] / 100)

- Observations au MEB

Le dépôt des échantillons est réalisé selon le protocole décrit en annexe A.2. L'échantillon de référence est l'émulsion double cristallisée maintenue sous conditions iso-osmotiques pendant deux heures (Photos 4.3 a) et b)) à une température de 15°C. En parallèle, la même émulsion est laissée pendant deux heures sous condition hypo-osmotiques (Photos 4.3 c) et d)) à la même température.



Photos 4.3
Observation au MEB de l'émulsion double cristallisée
φ_i = 40%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l
a) et b) Sous conditions iso-osmotiques; c) et d) Sous conditions hypo-osmotiques

Le matériau maintenu sous conditions iso-osmotiques présente une surface cristallisée, plissée mais homogène. En comparaison, le matériau laissé sous conditions hypo-osmotiques possède une structure « déchirée », présentant de nombreuses zones concaves. Des sortes de « coquilles » solides et vidées de leur contenu interne sont observées. Ainsi, au-delà du « déchirement » de la surface et de la perte de cohésion du globule, l'émulsion double cristallisée apparaît vidée de son contenu. Après quelques heures sous conditions hypo-osmotiques, les objets conservent uniquement une membrane solide et leur structure interne a disparu. Ces premières observations ont été réalisées pour une dilution d'un facteur 100 de la concentration extérieure en glucose, ce qui correspond à une différence de pression osmotique de 17 atm.

4.2.3.c Influence du gradient de pression osmotique

La figure 4.7 représente la cinétique de libération du sel pour le même matériau sous différents gradients de pression osmotique.

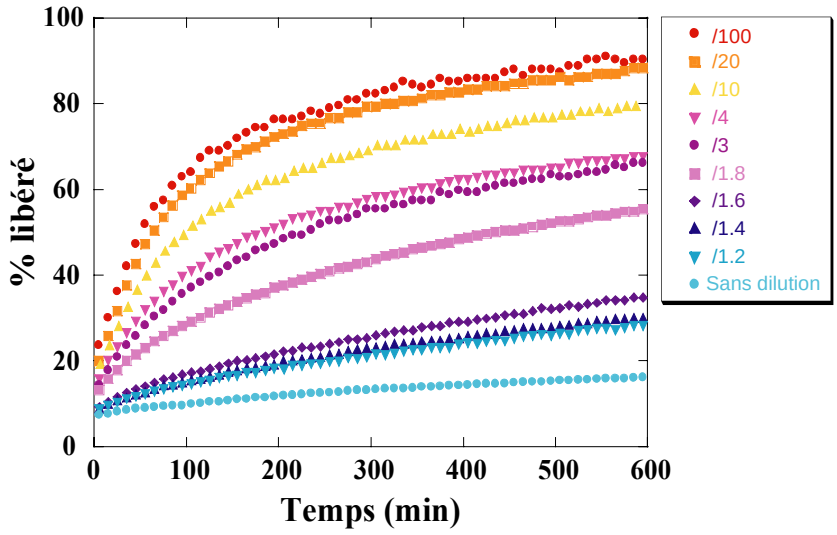


Figure 4.7
Cinétique de libération de NaCl en fonction du facteur de dilution du glucose extérieur pour une émulsion à base de Suppocire DM à 15°C.
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

La cinétique des processus mis en jeu est donc directement pilotée par le gradient de pression osmotique. Sous conditions hypo-osmotiques, le temps caractéristique de libération du sel dépend du facteur de dilution et donc du gradient de pression osmotique : plus la différence de

pression osmotique est importante, plus le temps de libération du sel est court. On constate, par exemple, que les temps de demi-vie sont de :

- 52 minutes sous une différence de pression, ΔΠ, de 17 atm (facteur de dilution de 100),
- 225 minutes sous 12 atm (facteur de dilution de 3)
- 2.5 jours sous 3 atm (facteur de dilution de 1.2).

4.2.3.d Ajustement des courbes de cinétique

Les courbes obtenues pour le même matériau sous différents gradients de pression osmotique ne peuvent pas être décrites par une mono-exponentielle comme c'est le cas en régime iso-osmotique. Le meilleur ajustement que nous avons trouvé est la somme de deux exponentielles :

$$\%lib = A + B \times (1 - \exp(-\alpha t)) + C \times (1 - \exp(-\beta t))$$ **Relation 4.4**

En effet, pour toutes les courbes (figure 4.8), l'écart type est de 0.999.

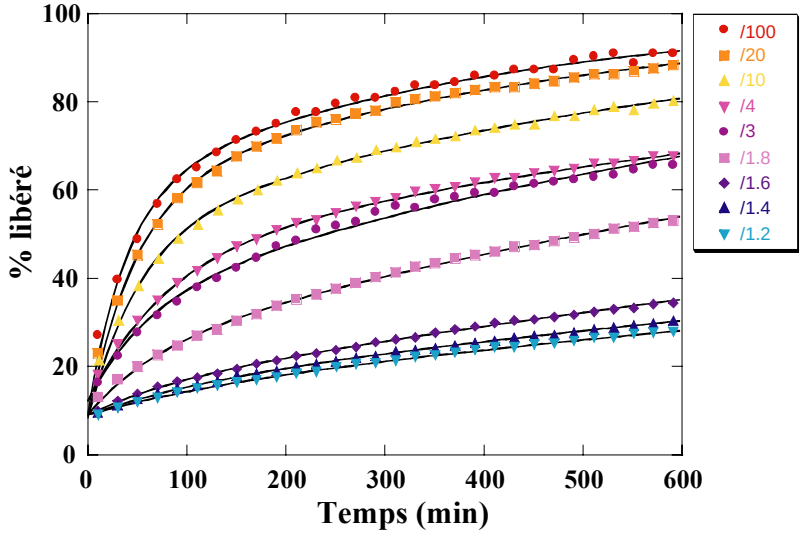


Figure 4.8
Cinétique de libération de NaCl en fonction du facteur de dilution du glucose extérieur pour une émulsion à base de Suppocire DM à 15°C.
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

Les courbes en noir représentent le meilleur paramétrage de la forme :
$A + B \times (1 - \exp(-\alpha t)) + C \times (1 - \exp(-\beta t))$

Le terme A correspond à la quantité de sel perdu au cours du processus de fabrication, $\%lib_0$. Quand les concentrations dans les phases aqueuses interne et externe sont égales, le relargage est considéré comme complet. Les constantes A, B et C doivent donc obéir à la relation :

$$A + B + C = 100$$

Pour ajuster les courbes, nous avons donc fixé le paramètre A, déterminé par l'ordonnée à l'origine de chacune de ces courbes et nous avons imposé $C = 100 - A - B$. Les paramètres ajustés sont donc les termes B, α et β. Pour comparer les deux mécanismes mis en jeu, nous définissons leurs temps caractéristiques : $t_1 = \frac{1}{\alpha}$ et $t_2 = \frac{1}{\beta}$

Le tableau 4.1 résume les coefficients de l'équation 4.4 et les temps de demi-vie obtenus par ajustement des cinétiques de destruction de l'émulsion double DM sous différentes conditions hypo-osmotiques.

Facteur de dilution	ΔΠ (atm)	A (%)	B (%)	C (%)	α (min^{-1})	β (min^{-1})	t1 (min)	t2 (min)
/100	17,0	9,00	49,90	41,10	2,59E-02	2,62E-03	**38**	**382**
/20	16,4	8,00	50,85	41,15	2,07E-02	2,14E-03	**48**	**467**
/10	15,6	8,00	42,40	49,61	1,90E-02	1,56E-03	**53**	**641**
/4	13,3	12,00	33,59	54,41	1,23E-02	8,90E-04	**81**	**1124**
/3	12,0	12,00	31,89	56,11	9,63E-03	8,48E-04	**104**	**1179**
/1,6	6,8	9,00	7,34	83,66	9,55E-03	4,18E-04	**105**	**2392**
/1,4	5,2	9,00	7,27	83,73	7,27E-03	6,09E-04	**138**	**1642**
/1,2	3,2	9,00	6,63	84,37	6,09E-03	2,71E-04	**164**	**3690**

Tableau 4.1 : Paramètres issus de l'ajustement des cinétiques de fuite pour une émulsion double formulée à base de Suppocire DM (φ_i = 40%, φ_g = 0.25%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l)

Donc, quel que soit le gradient de pression osmotique, deux processus, caractérisés par deux temps très différents, sont mis en évidence : un premier processus prédominant aux temps courts ; un deuxième aux temps longs. De plus, plus le gradient de pression osmotique est important, plus les temps caractéristiques des deux processus mis en jeu sont courts.

4.2.4 Influence de la nature de la cire sur les cinétiques de relargage

4.2.4.a Caractérisation des mélanges étudiés

Tous les matériaux étudiés sont préparés selon le processus décrit au chapitre 2. Ils présentent donc la même fraction en gouttelettes (φ_i = 40%), la même fraction en globules après dilution dans la solution de glucose à la concentration C_G (φ_g = 0.25%) et ont subi le même temps de trempe (10 minutes dans un bain de glace sous faible agitation).

La Suppocire DM est un mélange complexe de triglycérides qui présente une bande de fusion large (Figure 4.9 courbe en noir).

Le Dynasan 114, au contraire, est un triglycéride d'acide myristique de haute pureté dont le pic de fusion est centré sur 55°C (Figure 4.9 courbe en bleu).

- Caractérisation par DSC

Nous préparons différents mélanges de ces deux cires et leurs propriétés enthalpiques sont mesurées par DSC (Figure 4.9 et Figure 4.10).

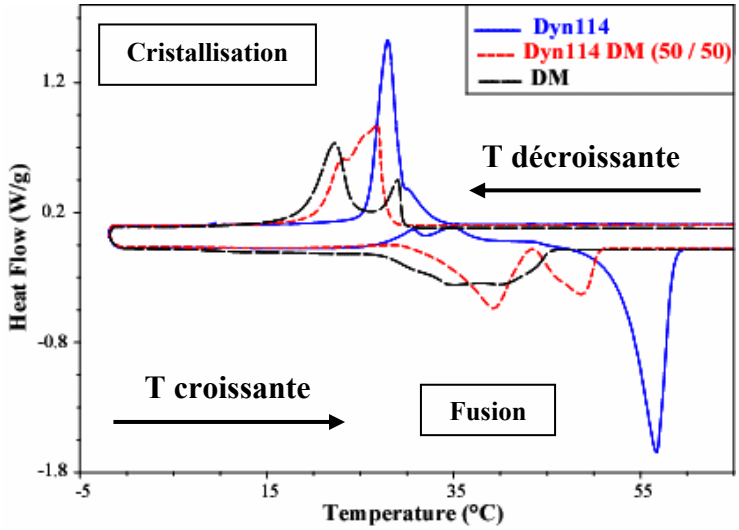


Figure 4.9
Caractérisation par DSC du Dynasan 114, de la Suppocire DM et d'un mélange (50/50) de Dynasan 114 et de Suppocire DM

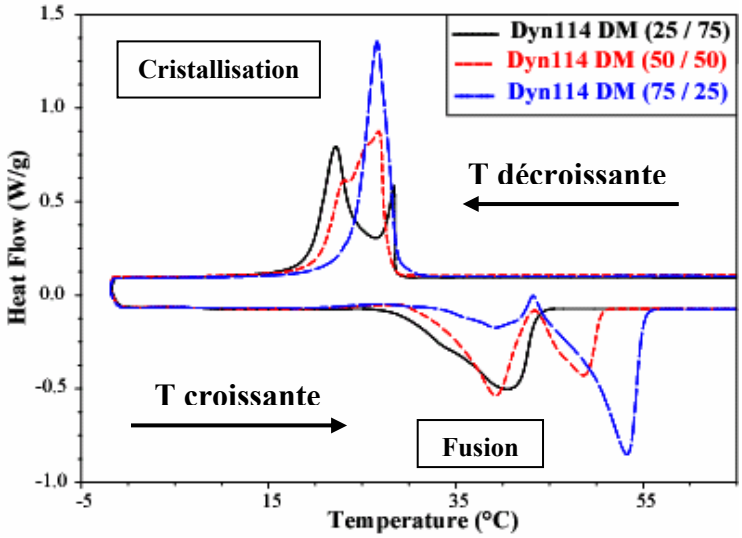


Figure 4.10
Caractérisation par DSC de mélanges de cire obtenus à partir de différentes proportions de Dynasan 114 et de Suppocire DM : 25/75 ; 50/50 ; 75/25

A partir de ces deux constituants, en variant leurs proportions au sein des différents mélanges, nous sommes donc capables de moduler l'allure des thermogrammes de DSC, c'est-à-dire moduler les enthalpies ainsi que les gammes de température de la cristallisation et de la fusion de ces mélanges. On constate, par exemple, que plus le pourcentage en Dynasan 114 augmente, plus la température de fusion est définie et se décale vers les températures élevées. Nous pouvons conclure qu'il est possible de varier continûment la signature DSC de ces mélanges. Cette variation est naturellement associée à une variation continue de l'organisation de l'état solide de ces mélanges. L'une des propriétés caractérisant cet état est probablement la proportion et la distribution spatiale des zones plus cristallisées par rapport aux zones amorphes.

- Comportement des mélanges sous conditions hypo-osmotiques

La figures 4.11 présente le pourcentage de sel libéré en fonction du temps, à 15°C, pour les émulsions doubles cristallisées préparées à partir des différents mélanges suppocire DM / Dynasan 114.

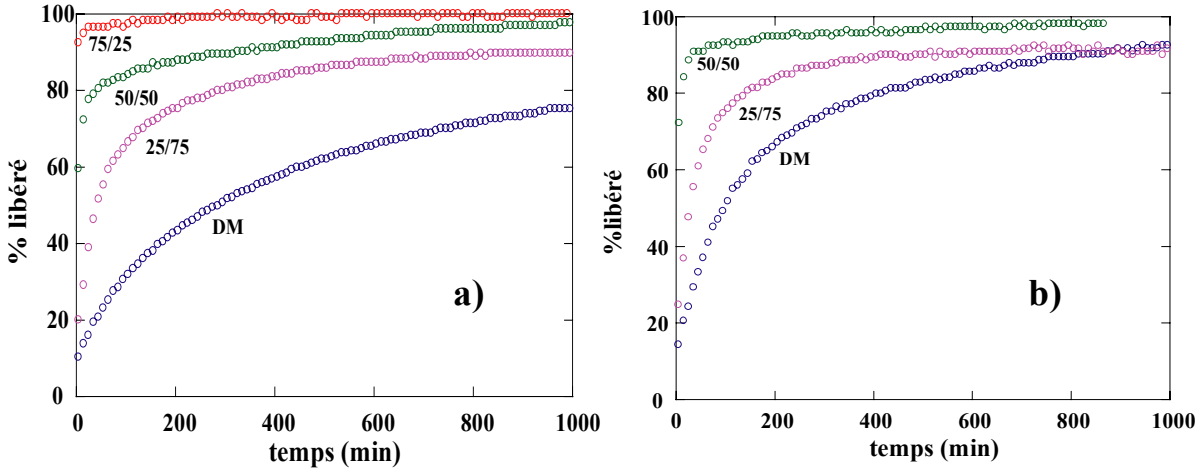


Figure 4.11
Cinétique de libération de NaCl en fonction de la proportion en Dynasan114 de la matrice à 15°C.
a) pour une dilution du glucose d'un facteur 5
b) pour une dilution du glucose d'un facteur 100

La figure 4.11.a) correspond à une dilution de la solution externe de glucose d'un facteur 5, soit une différence de pression osmotique estimée à environ 14 atm. La figure 4.11.b) correspond à une dilution de la solution externe de glucose d'un facteur 100, soit une différence de pression osmotique estimée à environ 17 atm. Plus la proportion en Dynasan 114 au sein du mélange est importante, plus la cinétique de libération du sel pour un gradient de pression osmotique donné est rapide.

4.2.4.b Influence du gradient de pression osmotique sur le mélange 50/50

La figure 4.12 représente la cinétique de libération du sel pour une émulsion double cristallisée dont la matrice est constituée d'un mélange 50/50 de Suppocire DM et de Dynasan 114, sous différentes conditions hypo-osmotiques, à 15°C.

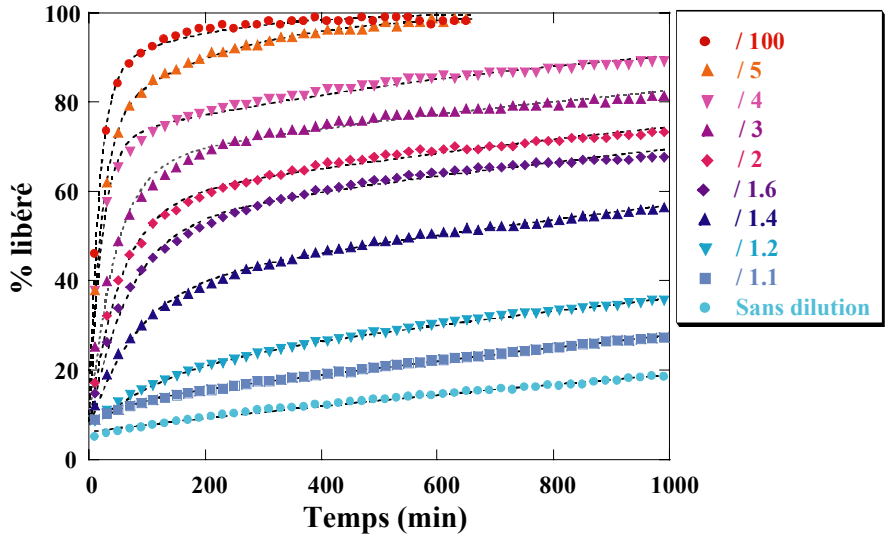


Figure 4.12
Cinétique de libération de NaCl en fonction du facteur de dilution du glucose extérieur pour une émulsion à base de Suppocire DM / Dynasan 114 (50/50) à 15°C.
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

Les courbes en noir représentent le meilleur paramétrage de la forme :
$$A + B \times (1 - \exp(-\alpha t)) + C \times (1 - \exp(-\beta t))$$

Comme dans le cas de la Suppocire DM pure (cf. 4.2.3.d), on constate que la cinétique de libération du sel dépend du gradient de pression osmotique. De plus, chacune de ces courbes est parfaitement ajustée par l'équation 4.4. La libération du sel sous conditions hypo-osmotiques résulte donc aussi de deux processus, dont l'un prédomine aux temps courts et l'autre aux temps longs. Les temps caractéristiques des deux phénomènes ainsi que les différents paramètres de l'équation 4.4 dans le cas du mélange 50/50 sont regroupés dans le tableau 4.2. Si on compare ces temps caractéristiques avec ceux obtenus dans le cas de la Suppocire DM pure, on constate que, pour un même gradient de pression osmotique, les processus de destruction sont beaucoup plus rapides dans le cas du mélange 50/50.

Facteur de dilution	ΔΠ (atm)	A (%)	B (%)	C (%)	α (min^{-1})	β (min^{-1})	t1 (min)	t2 (min)
/100	17,0	7,00	77,40	15,60	6,14E-02	6,36E-03	**16**	**157**
/5	14,0	7,00	67,33	25,67	4,96E-02	4,62E-03	**20**	**216**
/4	13,3	7,00	64,04	28,97	4,89E-02	1,14E-03	**20**	**877**
/3	12,0	7,00	58,79	34,21	2,32E-02	6,83E-04	**43**	**1464**
/2	9,0	7,00	49,99	43,01	1,88E-02	5,21E-04	**53**	**1919**
/1,6	6,8	7,00	45,19	47,81	1,46E-02	4,41E-04	**68**	**2267**
/1,4	5,2	7,00	31,00	62,00	1,23E-02	3,63E-04	**81**	**2755**
/1,2	3,2	7,00	12,86	80,14	8,04E-03	2,28E-04	**124**	**4386**
/1,1	1,7	7,00	5,32	87,68	1,82E-02	1,95E-04	**55**	**5128**

Tableau 4.2 : Paramètres issus de l'ajustement des cinétiques de fuite pour une émulsion double formulée à base d'un mélange 50/50 Suppocire DM/Dynasan 114
(φ_i = 40%, φ_g = 0.25%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l)

4.2.4.c Influence du gradient de pression osmotique sur la Suppocire NC

La Suppocire NC, comme la Suppocire DM, est un mélange de triglycérides mais ces deux types de mélanges se différencient par leur taux de fonction hydroxyle. D'après les données du fournisseur, la Suppocire NC présente un taux de fonction hydroxyle plus élevé que la suppocire DM. D'après le fournisseur, ce paramètre influence la vitesse de croissance des cristaux : plus le taux d'hydroxyle est élevé, plus la vitesse de croissance des cristaux est lente. Si on compare les mesures en DSC de la Suppocire DM et de la Suppocire NC, on constate que ces deux mélanges présentent des spectres différents : la zone de fusion de la Suppocire NC est légèrement plus étroite et mieux définie que celle de la Suppocire DM (figure 4.13).

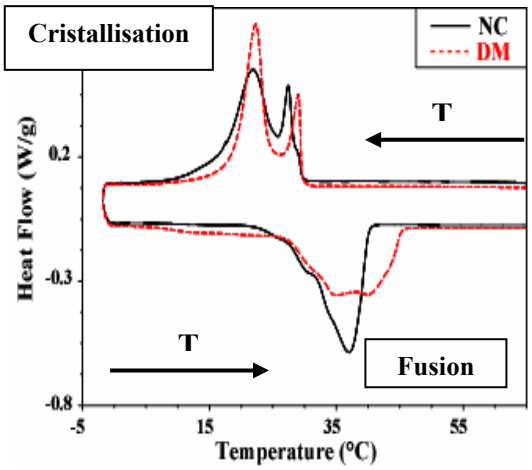


Figure 4.13
Caractérisation par DSC de la Suppocire NC et de la Suppocire DM

Les cinétiques de libération du sel des émulsion doubles cristallisées à base de Suppocire NC, sous différents gradients de pression osmotique, à 15°C, sont représentées sur la figure 4.14.

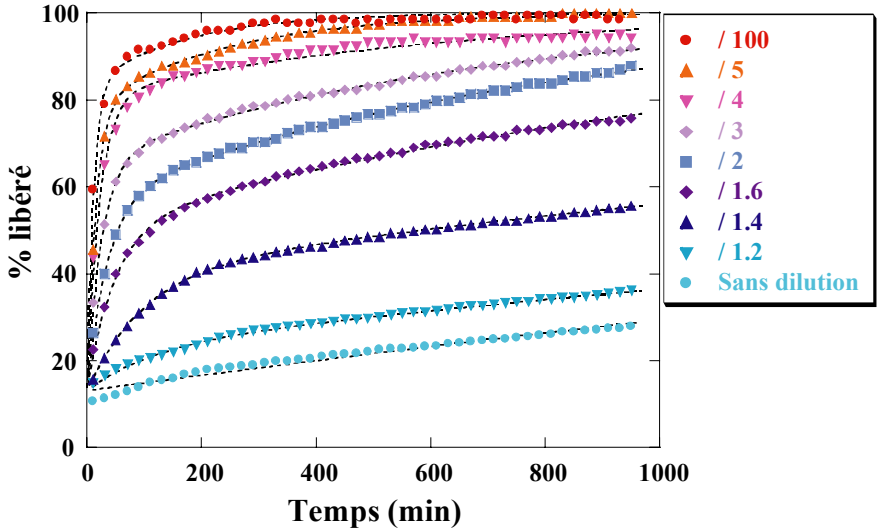


Figure 4.14
Cinétique de libération de NaCl en fonction du facteur de dilution du glucose extérieur pour une émulsion à base de Suppocire NC à 15°C.
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

Les courbes en noir représentent le meilleur paramétrage de la forme :
$$A + B \times (1 - \exp(-\alpha t)) + C \times (1 - \exp(-\beta t))$$

Comme précédemment, chacune de ces courbes est parfaitement ajustée par l'équation 4.4. La réponse du matériau, composé de Suppocire NC, fait donc aussi intervenir deux processus. Les temps caractéristiques ainsi que les différents coefficients de l'équation 4.4 sont rassemblés dans le tableau 4.3. On constate que les cinétiques sont plus rapides que dans le cas de la Suppocire DM mais comparables à celles obtenues avec le mélange 50/50.

Facteur de dilution	ΔΠ (atm)	A (%)	B (%)	C (%)	α (min^{-1})	β (min^{-1})	t1 (min)	t2 (min)
/100	17,0	13,00	70,13	16,87	8,97E-02	5,87E-03	**12**	**170**
/5	14,0	13,00	64,92	22,08	6,45E-02	4,15E-03	**16**	**241**
/4	13,3	13,00	67,72	19,28	4,53E-02	1,68E-03	**22**	**595**
/3	12,0	13,00	52,96	34,04	3,90E-02	1,46E-03	**26**	**685**
/2	9,0	13,00	43,83	43,18	2,80E-02	1,24E-03	**36**	**806**
/1,6	6,8	13,00	37,80	49,20	2,03E-02	7,74E-04	**49**	**1292**
/1,4	5,2	13,00	27,21	59,79	1,01E-02	3,08E-04	**99**	**3247**
/1,2	3,2	13,00	10,23	76,77	8,52E-03	1,89E-04	**117**	**5291**

Tableau 4.3 : Paramètres issus de l'ajustement des cinétiques de fuite pour une émulsion double formulée à base de Suppocire NC ($\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l)

4.2.5 Influence de la nature de la cire sur l'évolution structurale du matériau

Les premières observations du matériau composé de Suppocire DM, réalisées en microscopie optique et au MEB mettent en évidence un matériau déchiré et vidé de son contenu après 2 heures sous conditions hypo-osmotiques (cf. 4.2.3.b). Afin de comprendre les processus qui ont mené à la destruction de la structure solide des globules, l'évolution structurale des différents mélanges va être suivie pendant plusieurs heures sous conditions hypo-osmotiques entre lame et lamelle en microscopie optique.

Ces expériences sont directement réalisées entre lame et lamelle sous microscope: sur la lame, on dépose une goutte d'échantillon de volume V_{emul}, à la concentration externe en glucose $[Gluc]_0$ = 0.65M et une goutte d'une solution de glucose de volume V_G, à la concentration en glucose C_G (cf. figure 4.15 a)). Le mélange entre les deux gouttes et donc la dilution de la concentration externe en glucose, s'effectuent au moment du dépôt de la lamelle (figure 4.15 b)). La concentration en glucose du milieu continu de l'émulsion double cristallisée est diluée d'un facteur f tel que :

$$[Gluc]_{osm} = \frac{V_{émul} \times [Gluc]_0 + V_G \times C_G}{V_{émul} + V_G} = \left(\frac{V_{émul} + V_G \times d}{V_{émul} + V_G} \right) \times [Gluc]_0 = \frac{[Gluc]_0}{f}$$

où d est le rapport entre C_G et $[Gluc]_0$.

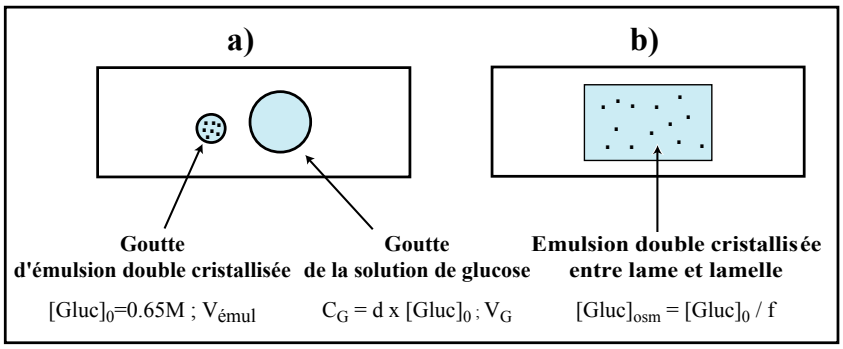
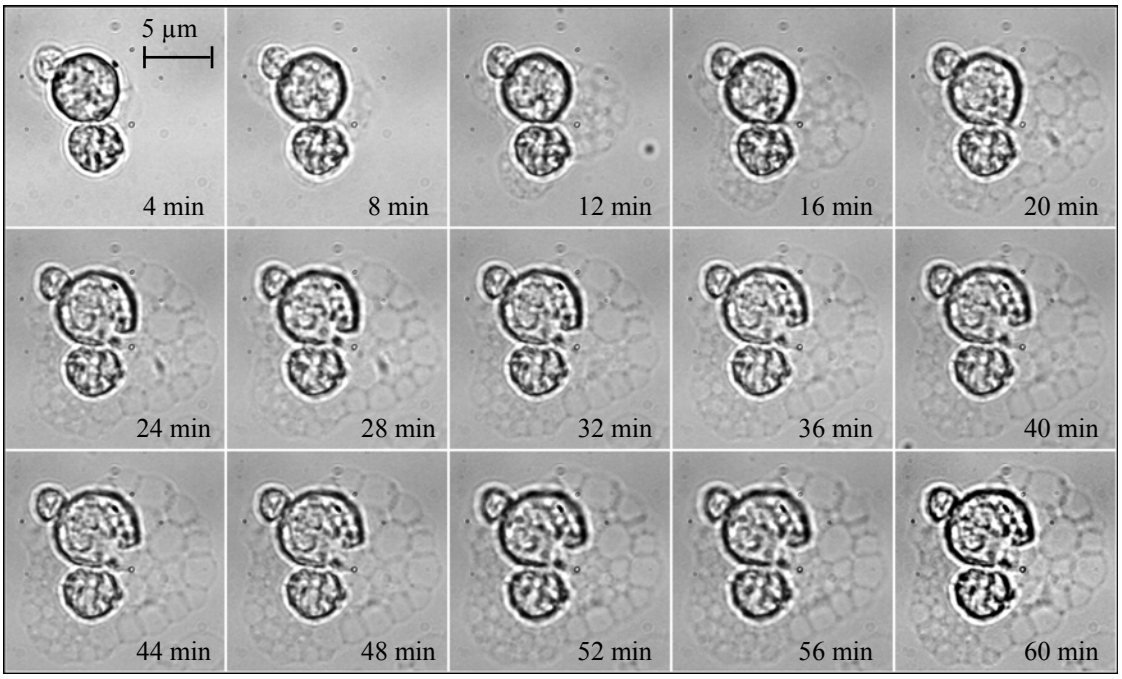


Figure 4.15
Représentation schématique de la réalisation entre lame et lamelle des conditions hypo-osmotiques pour une émulsion double cristallisée

4.2.5.a Matrice à base de Suppocire DM

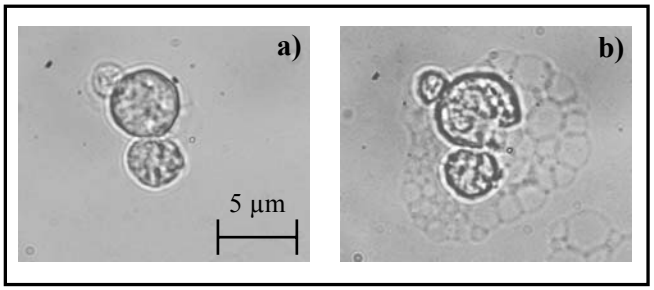
L'évolution structurale d'une émulsion formulée à partir de Suppocire DM est suivie en continu entre lame et lamelle, au microscope optique, pour un échantillon dont la

concentration externe en glucose a été diluée d'un facteur 100. Les photos 4.4 représentent l'ensemble des photos prises toutes les quatre minutes, pendant une heure.



Photos 4.4
Evolution structurale de l'émulsion double cristallisée à base de Suppocire DM dont la concentration externe en glucose a été diluée d'un facteur 100.
Durée de l'observation : 1 heure ; une photo toutes les quatre minutes. Observation en microscopie optique entre lame et lamelle.

Les photos 4.5 regroupent les photos prises après 4 minutes, puis après une heure sous conditions hypo-osmotiques.

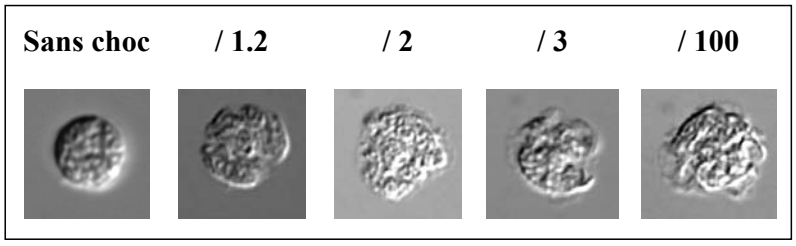


Photos 4.5
Emulsions doubles cristallisées à base de Suppocire DM sous conditions hypo-osmotiques ; a) Après 4 minutes ; b) Après 1heure

Sous conditions hypo-osmotiques, comme nous l'avons déjà évoqué au début de ce chapitre, l'évolution structurale des globules constitués de Suppocire DM est importante : dès les premières minutes, le globule se déforme et sa membrane se « déchire ». Chaque globule présente une ou plusieurs zones de fracture. De plus, dès que les conditions hypo-osmotiques sont établies, on observe l'apparition d'un ensemble de gouttes à la surface du globule dans le

milieu continu. Les interfaces entre ces gouttes sont fines et le contraste entre l'intérieur de ces gouttes et le milieu continu est très faible. L'ensemble de ces observations sont en accord avec une structure dite de « mousse biliquide », c'est-à-dire des gouttes d'eau séparées du milieu continu aqueux par une bicouche de tensioactifs.

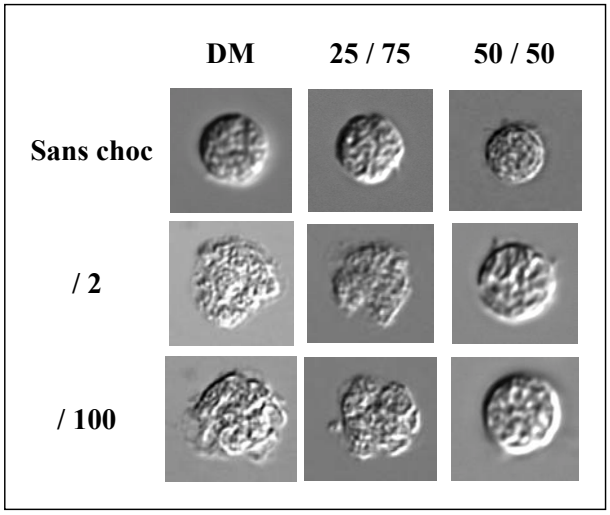
La même émulsion est laissée pendant deux heures dans des cellules thermostatées à 15°C, sous différentes conditions hypo-osmotiques. Après deux heures, un prélèvement de chacun des systèmes est réalisé et observé au microscope optique sous contraste différentiel à interférences, dit de Nomarski, qui permet une visualisation en relief des contours. Le facteur de dilution aggrave la destruction visualisée au microscope comme l'illustrent les photos 4.6.



Photos 4.6
Emulsions doubles cristallisées à base de Suppocire DM après 2 heures à 15°C sous différentes conditions hypo-osmotiques
Observation au microscope optique sous contraste Nomarski

4.2.5.b Mélange 25/75 et 50/50

Les mêmes expériences sont menées pour les différents mélanges. Les photographies 4.7 regroupent les observations faites en microscopie optique (sous contraste Nomarski) pour une dilution d'un facteur 2 et d'un facteur 100, pour les mélanges 25/75 et 50/50 (DM/Dynasan 114). Elles sont comparées aux photos obtenues dans le cas de la Suppocire DM pure.

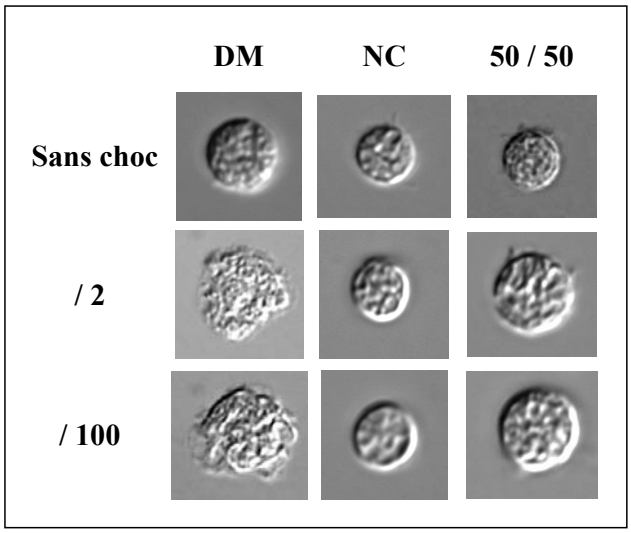


Photos 4.7
Influence de la proportion en Dynasan 114 sur le comportement des émulsions doubles cristallisées après 2 heures à 15°C sous différentes conditions hypo-osmotiques
Observation au microscope optique sous contraste Nomarski

Plus la proportion en Dynasan 114 au sein de la matrice augmente, moins les déformations subies par le matériau sont importantes. Dans le cas du mélange 50/50, quel que soit le gradient de pression osmotique, les globules ont conservé leur structure sphérique et il n'y a pas de rupture de la membrane, contrairement à la Suppocire DM ou au mélange 25/75.
De plus, la « mousse biliquide » dont la présence est caractéristique de l'évolution de la Suppocire DM, n'existe plus dans le cas du mélange 50/50. Elle persiste encore dans le cas du mélange 25/75 mais sa vitesse de formation est plus lente.

4.2.5.c Suppocire NC

Les mêmes observations sont réalisées sur le matériau à base de Suppocire NC. Son évolution structurale est très similaire à celle du mélange 50/50 : après deux heures, soumis à un gradient de pression osmotique, les globules conservent leur structure sphérique initiale et leur intégrité. Les photos 4.8 présentent les observations microscopiques (sous contraste Nomarski) réalisées dans le cas de la Suppocire NC et les compare à la Suppocire DM et au mélange 50/50.



Photos 4.8
Influence de la nature de la cire (DM, NC, Dynasan 114/DM (50/50)) sur le comportement des émulsions doubles cristallisées après 2 heures à 15°C sous différentes conditions hypo-osmotiques
Observation au microscope optique sous contraste Nomarski

Notons pour finir que les matériaux qui subissent les destructions les plus visibles sont ceux dont les temps de libération sont les plus longs.

4.2.6 Interprétation

4.2.6.a Identification des processus mis en jeu sous conditions hypo-osmotiques

Comme nous l'avons évoqué précédemment, pour rééquilibrer les potentiels chimiques, les espèces étant très peu solubles à travers la paroi cristallisée, l'eau doit pouvoir migrer à travers la matrice grasse afin de réduire la concentration interne en sel jusqu'à ce que le potentiel chimique de l'eau soit identique des deux côtés de la membrane. Dans le cas des émulsions doubles liquides, cet échange d'eau entraîne un gonflement de la structure interne et un amincissement des films qui peut conduire à leur rupture. Ce régime, nommé « swelling-breakdown » est complexe puisqu'il associe deux mécanismes en parallèle et indissociables (Genty et al., 2003 ; Tedajo et al., 2005). Dans le cas des émulsions doubles cristallisées, les gouttelettes internes sont prises dans une matrice rigide et ne peuvent pas a priori augmenter leur volume. Le rééquilibrage des potentiels chimiques ne peut donc se faire que par une diminution de la quantité interne en soluté et donc par une libération vers le milieu extérieur de l'espèce encapsulée.

Si la concentration externe en glucose est diluée d'un facteur, f , on a : $[Gluc]_{osm} = [Gluc]_{ext0}/f$
D'après la courbe d'équivalence entre les concentrations en glucose et en NaCl à l'équilibre osmotique (cf. chapitre2, 2.1.2), la concentration interne en chlorure de sodium nécessaire pour obtenir le rééquilibrage de la pression osmotique doit être de :

$$[NaCl]_{osm} = A*\ln(1- [Gluc]_{osm}/B) = A*\ln(1- [Gluc]_{ext0}/(B*f))$$

Avec A=-2.26 et B=4.09 (valeurs tabulées issues du HandBook of Chemistry and Physics)

Soit, un pourcentage libéré de chlorure de sodium de : $\%lib_{osm} = 1 - [NaCl]_{osm} / [NaCl]_0'$

avec $[NaCl]_0' = [NaCl]_0*(1-\%lib_0)$ (cf. 4.2.1)

Cette quantité correspond donc à la quantité théorique de sel qui devrait être libérée par le matériau afin de rétablir l'équilibre des pressions osmotiques entre les structures aqueuses internes et le milieu continu. Nous émettons l'hypothèse que le processus I correspondrait au rééquilibrage des potentiels chimiques des phases aqueuses et donc des pressions osmotiques.

- Cas du mélange 50/50 et de la Suppocire NC

Nous comparons, dans les tableaux 4.4 et 4.5, la valeur des préfacteurs de l'exponentielle caractérisée par un temps court avec la quantité théorique de sel nécessaire au rééquilibrage des potentiels chimiques pour le cas du mélange 50/50 et de la Suppocire NC.

Facteur de dilution	$\%lib_{osm}$ théorique DM/Dyn114 (50/50)	B DM / Dyn 114 (50/50)
/100	99	77,40
/5	80	67,33
/4	75	64,04
/3	67	58,79
/2	50	49,99
/1,6	37	45,19
/1,4	27	31,00
/1,2	14	12,86
/1,1	5	5,32

Tableau 4.4
Paramètres B issus de l'ajustement des courbes de cinétique dans le cas du mélange 50/50 (Suppocire DM / Dynasan 114) et %lib(osm) théorique pour un facteur de dilution donné

Facteur de dilution	$\%lib_{osm}$ théorique Suppocire NC	B Suppocire NC
/100	99	70,13
/5	79	64,92
/4	74	67,72
/3	65	52,96
/2	46	43,83
/1,6	32	37,80
/1,4	22	27,21
/1,2	8	10,23

Tableau 4.5
Paramètres B issus de l'ajustement des courbes de cinétique dans le cas de la Suppocire NC et %lib(osm) théorique pour un facteur de dilution donné

Dans le cas de ces matériaux, il y a une concordance entre les paramètres extraits de l'ajustement des courbes et les valeurs théoriques. Cette concordance est parfaitement vérifiée pour des dilutions de la concentration en glucose inférieur ou égal à 3 et est moins bien vérifiée pour des dilutions plus importantes. Le processus I correspond donc au rééquilibrage des pressions osmotiques. La fin du processus I marque la fin du régime actif : une fois l'équilibre osmotique entre la phase interne et le milieu continu rétabli, l'émulsion double cristallisée se retrouve dans le régime passif. Le gradient de concentration du sel entre les structures internes et le milieu continu devient alors la force motrice du processus II, c'est-à-dire la libération passive du sel par mûrissement de composition (rééquilibrage des potentiels chimiques des solutés).

La cinétique de libération de l'espèce encapsulée peut donc être décrite par l'équation:

$$\%lib(t) = \%lib_0 + \%lib(osm) \times (1 - \exp(-\alpha t)) + \%lib(Diffusion) \times (1 - \exp(-\beta t))$$

où %lib$_0$ correspond à la quantité de sel perdue au cours du processus de fabrication du matériau,

%lib(osm) correspond à la quantité de sel libérée afin de rééquilibrer les potentiels chimiques,

%lib(diffusion) correspond à la quantité de sel libérée par diffusion.

La figure 4.16 compare les données expérimentales avec l'ajustement par l'équation précédente dans le cas du mélange 50/50, pour une dilution d'un facteur 4 de la concentration externe en glucose.

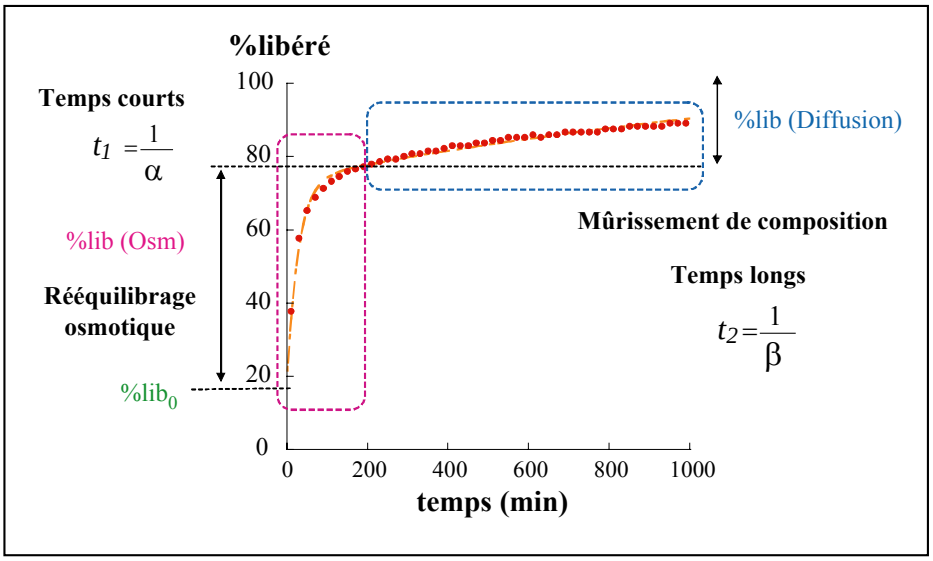


Figure 4.16
Ajustement de la cinétique de libération du sel pour le mélange 50/50 (Dynasan 114/Suppocire DM) pour un facteur de dilution de 4.
Illustration des prédominances dans le temps des deux processus et des quantités de sel libéré associées.

- <u>Cas de la Suppocire DM</u>

Dans le cas du matériau constitué de Suppocire DM pure, la concordance n'est plus vérifiée (cf. Tableau 4.6). Quel que soit le gradient de pression osmotique, la quantité de sel libérée aux temps courts reste inférieure à la quantité théoriquement nécessaire au rééquilibrage des potentiels chimiques de l'eau. Nous évoquons à ce stade au vue des images en microscopie

optique une certaine déformabilité du globule susceptible de modifier l'état final d'équilibre osmotique.

Facteur de dilution	$\%lib_{osm}$ théorique Suppocire DM	B Suppocire DM
/100	99	49,90
/20	95	50,85
/10	90	42,40
/4	74	33,59
/3	65	31,89
/1,6	35	7,34
/1,4	25	7,27
/1,2	12	6,63

Tableau 4.6
Paramètres B issus de l'ajustement des courbes de cinétique dans le cas de la Suppocire DM et %lib(osm) théorique pour un facteur de dilution donné

- <u>Dépendance de α avec le gradient de pression osmotique</u>

La cinétique du processus I peut être décrite par :

$$\%lib \propto \%lib_0 + \%lib(osm) \times (1 - \exp(-\alpha t))$$

La figure 4.17 représente l'évolution de la fréquence caractéristique du processus I, α, en fonction du gradient de pression osmotique, pour les trois systèmes décrits précédemment. Il apparaît clairement que la dépendance de α avec le gradient de pression n'est pas linéaire. Le meilleur ajustement de ces courbes est une loi exponentielle, comme le montre la figure 4.18, soit :

$$\alpha = \alpha_0 \exp(\frac{\Delta\Pi}{\Pi_0})$$

tel que Π_0 correspond à une pression caractéristique du matériau et α_0 correspond à la fréquence caractéristique du processus I.

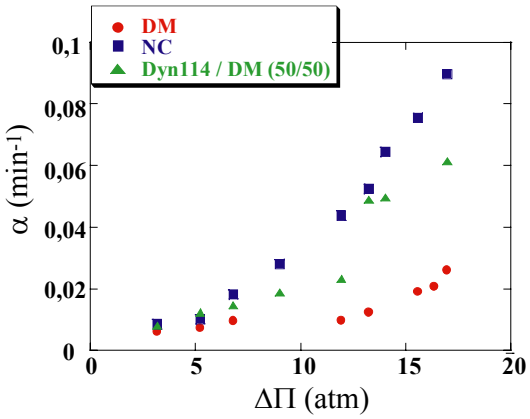


Figure 4.17
Evolution de la fréquence caractéristique α en fonction du gradient de pression osmotique. Représentation linaire-linéaire

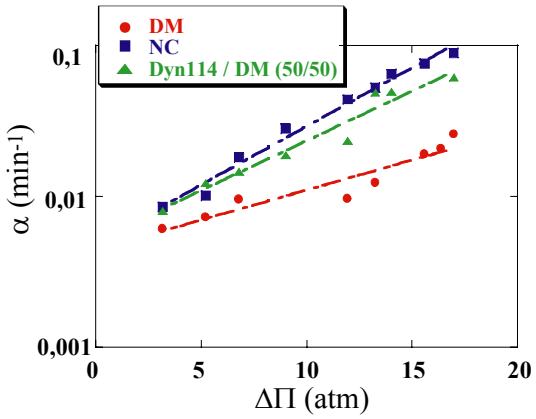


Figure 4.18
Evolution de la fréquence caractéristique α en fonction du gradient de pression osmotique. Représentation logarithme-linéaire

Pour la matrice composée de la Suppocire DM, on a : Π_0 (Suppocire DM) = 10.9 atm

Pour les deux autres matériaux, on a : Π_0 (Dyn/DM 50/50) = 6.6 atm

et Π_0 (Suppocire NC) = 5.6 atm

De fait,

$$\boxed{\Pi_0\,(\mathrm{DM}) > \Pi_0\,(\mathrm{Dyn/DM\ \ 50/50}) \approx \Pi_0\,(\mathrm{NC})}$$

<u>- Dépendance de β avec le gradient de pression osmotique</u>

Le processus II tend à équilibrer la concentration en sel entre la phase interne et le milieu continu. Sous conditions hypo-osmotiques, la cinétique de libération du sel selon ce processus peut être décrite par :

$$\boxed{\%lib \propto \%lib_0 + \%lib(Diffusion) \times (1 - \exp(-\beta t))}$$

La figure 4.19 représente l'évolution de la fréquence caractéristique du processus II, β, en fonction du gradient de pression osmotique, pour les trois systèmes.

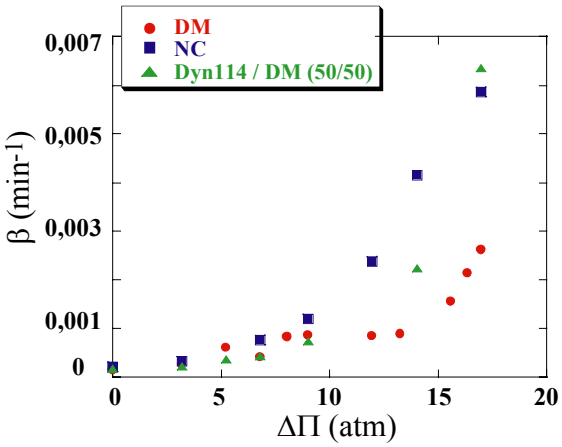


Figure 4.19
Evolution de la fréquence caractéristique β en fonction du gradient de pression osmotique.
Représentation linéaire-linéaire

Suite au processus I, le matériau a subi une évolution structurale d'autant plus importante que le gradient de pression osmotique est important. La diffusion du sel (et du glucose) étant fonction de la structure de la membrane à traverser, le processus II est fonction du processus I et plus précisément des conséquences structurales qu'aura subi le matériau au cours du processus I. Ceci est démontré par la figure 4.20 qui suggère une dépendance linéaire de β en

fonction de α avec un coefficient de proportionnalité qui augmente lorsque la cire devient plus amorphe. Notons bien entendu que la fonction β = f(ΔΠ) a une allure exponentielle (cf. figure 4.21).

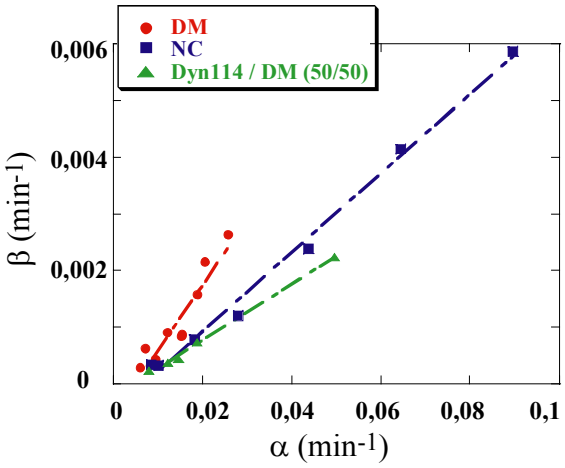


Figure 4.20
Evolution de la fréquence caractéristique β en fonction de la fréquence caractéristique α

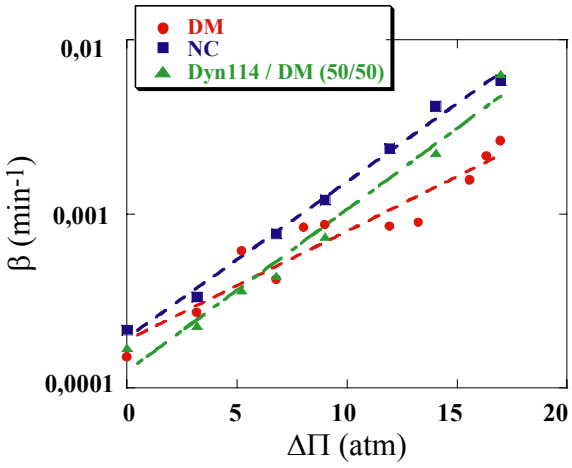


Figure 4.21
Evolution de la fréquence caractéristique β en fonction du gradient de pression osmotique. Représentation logarithme-linéaire

4.2.6.b Hypothèses et interprétations

Sous conditions hypo-osmotiques, l'eau doit pouvoir diffuser du milieu continu vers les structures internes. Au vue de l'accélération des cinétiques de libération du sel sous conditions hypo-osmotiques en comparaison avec celles obtenues sous un régime iso-osmotique, nous pouvons affirmer que, quelle que soit sa nature, la matrice de cire est perméable à l'eau. Nous émettons comme première hypothèse que cette perméabilité est due à la présence de « chemins », de zones de fractures perméables à l'eau au sein de la matrice de cire dans son état solide.

Une deuxième hypothèse consiste alors à dire que ces fractures perméables à l'eau, initialement présentes au sein de la matrice, se dilateraient et se transformeraient en pores ou en trous sous l'action du flux d'eau engendré par le gradient de pression osmotique. Le sel peut alors fuir rapidement à travers ces pores.

Ainsi, suite à ces hypothèses, nous pouvons supposer que, selon la composition de la matrice de cire, les fractures seront initialement plus ou moins nombreuses ou plus ou moins aptes à se propager à travers le matériau. Ceci traduit la dépendance de la pression caractéristique, Π_0, avec la nature du mélange, c'est-à-dire avec l'état solide initial de la matrice.

L'ensemble de ces considérations repose sur une analogie avec la science des matériaux. Il est, en effet, établi que la rupture d'un matériau sous contrainte est lié à la nucléation et la propagation d'une fracture. Afin de mettre en évidence cette analogie, nous souhaitons revenir sur quelques concepts et définitions.

Quand on applique une contrainte extérieure à un matériau, celui-ci subit une déformation entraînant un changement plus ou moins important de sa forme et de son volume. Si en supprimant la contrainte externe la déformation disparaît totalement, on dit alors que le matériau a un comportement élastique (Figure 4.22.a)) ; si par contre la déformation ne disparaît pas, on dit que le matériau a un comportement plastique (Figure 4.22.b)). Dans le régime élastique, pour les petites déformations, le rapport entre la contrainte appliquée au matériau et la déformation qui en résulte est constant. Il est défini comme le module d'Young ou module d'élasticité longitudinale, homogène à une pression, et représente une grandeur caractéristique du matériau. Au-delà d'une certaine contrainte, il va y avoir rupture du matériau. Si la rupture se produit dans le domaine élastique du matériau, on parle de comportement fragile (exemple : verre, céramique…) (Figure 4.22.a)) ; par contre, si la rupture intervient après une déformation plastique du matériau, on parle de comportement ductile (exemple : métaux) (Figure 4.22.b)).

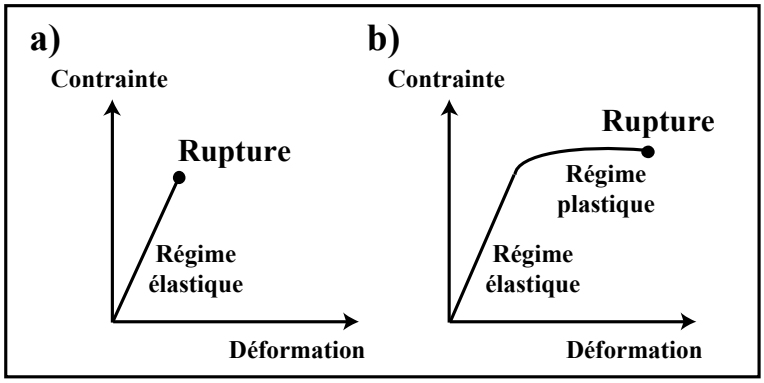


Figure 4.22
Contrainte en fonction de la déformation
a) Rupture fragile pour un matériau élastique
b) Rupture ductile pour un matériau plastique

La rupture d'un matériau soumis à une contrainte extérieure sera fonction, entres autres, de « l'ordre » régnant au sein du matériau et plus particulièrement de la présence de défauts ou de microfractures dans la matrice. Sous l'effet de la contrainte extérieure, ces microfractures peuvent alors se propager au sein du matériau. Dans le cas d'un matériau fragile, soumis à une contrainte, la propagation des microfractures est très rapide et requiert

peu d'énergie. La rupture d'un tel matériau se caractérise donc par l'absence de déformation plastique macroscopique. Un matériau ductile, au contraire est capable de résister à la propagation des fractures. Il va absorber l'énergie fournie par le milieu extérieur en se déformant plastiquement. La rupture d'un tel matériau nécessite davantage d'énergie.

Au vue de nos observations expérimentales, nous pouvons regrouper les différents matériaux en deux catégories :

- la Suppocire NC et le mélange Dynasan 114 / Suppocire DM (50/50) pour lesquels la pression caractéristique, Π_0, est la plus faible et qui ne présentent pas d'évolution structurale, soumis à un gradient de pression. Par souci de clarté, nous nommerons ce type de matériau, matériau A.
- la Suppocire DM dont la pression caractéristique, Π_0, est la plus forte et qui se déforme de manière importante, soumis à un gradient de pression. Nous le nommerons matériau B.

- <u>Matériau A</u>

Soumis à un gradient de pression, le matériau A ne se déforme pas. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce matériau présente initialement une distribution importante de chemins perméables à l'eau. Sous conditions hypo-osmotiques, la propagation de ces fractures initialement connectées au sein du matériau requiert peu d'énergie et n'engendre pas ou peu de déformations structurales. Le matériau A peut donc être décrit comme un matériau fragile, à travers lequel la propagation de fractures est rapide et n'engendre pas de déformation plastique du globule (Figure 4.23).

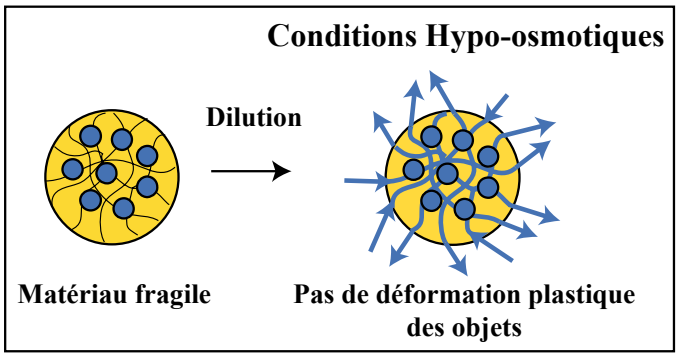


Figure 4.23
Illustration du comportement du matériau A sous conditions hypo-osmotiques

- Matériau B

Le matériau B, au contraire, se déforme de manière importante, soumis à un gradient de pression osmotique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce matériau présente initialement moins de chemins perméables à l'eau ou que la propagation de ces chemins à travers la matrice est plus difficile. Il peut donc être décrit comme un matériau ductile, capable de résister à la propagation de fractures au sein de sa matrice et qui s'accompagne d'une déformation plastique du globule (figure 4.24).

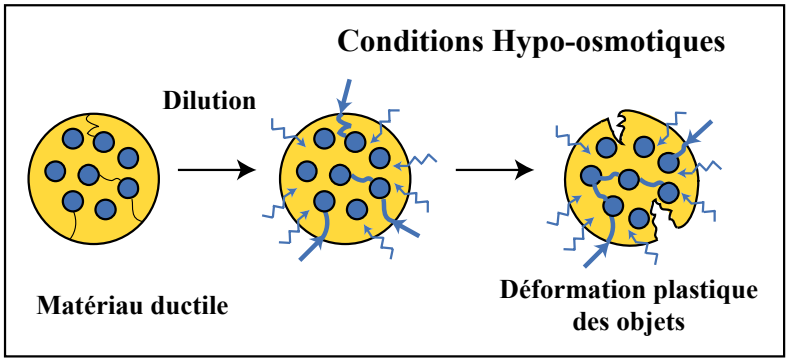


Figure 4.24
Illustration du comportement du matériau B sous conditions hypo-osmotiques

La pression caractéristique, Π_0, traduit la résistance intrinsèque du matériau face aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. La pression caractéristique du matériau B, au comportement ductile, est donc supérieure à celle du matériau A, au comportement fragile.

Cependant, hormis ces considérations générales sur l'origine de la résistance des matériaux, nous pouvons affiner le mécanisme microscopique de rupture relatif à ces objets particuliers. Nous allons utiliser les observations microscopiques (optique et électronique), susceptibles de contribuer à une description de ces scénarios.

Les observations au MEB du matériau B, après deux heures sous conditions hypo-osmotiques, mettent en évidence la conservation de « coquilles » solides et vidées de leur contenues (cf. 4.2.3.b). Les observations au microscope optique mettent en évidence une déformabilité importante du globule et l'expulsion progressive et localisée des gouttes internes (cf. 4.2.3.a et 4.2.5.a).

Ces observations suggèrent l'existence d'une coquille solide enrobant un amas de gouttelettes inverses, sans compartimentation solide entre elles. Un tel arrangement résulte probablement

des propriétés de mouillage de la cire sur l'eau et des interactions entre les gouttelettes d'eau à l'approche de la transition. Ce scénario est illustré sur la figure 4.25. La déformation associée à un gonflement initial de la structure interne permet de justifier la non-concordance entre la quantité de sel libérée au cours du processus I, déterminée expérimentalement, et la quantité théorique nécessaire au rééquilibrage osmotique (cf. 4.2.6.a). En effet, le gonflement de la structure interne engendre une dilution de la concentration interne en sel et contribue au rééquilibrage des pressions osmotiques. Ainsi, la quantité nécessaire à libérer par le matériau est plus faible.

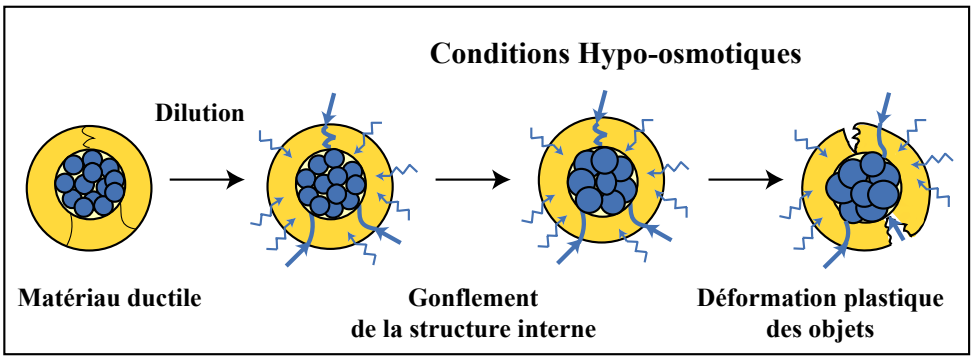


Figure 4.25
Illustration du comportement du matériau B sous conditions hypo-osmotiques en tenant compte du gonflement de la structure interne

Enfin, nous pouvons évoquer un mécanisme qui pourrait expliquer le transfert rapide des gouttes internes vers l'extérieur sous forme d'une mousse biliquide. Dès qu'une goutte interne est en contact avec une fracture de la membrane solide, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'elle s'engouffre dans cette brèche afin de relaxer sa pression. La vésicule aqueuse est alors en contact avec le milieu continu, séparée par un film fin de tensioactif (figure 4.26 a)). Le potentiel chimique de cette structure aqueuse est supérieur au potentiel chimique du milieu continu. L'eau diffuse à travers le film de tensioactif et gonfle la vésicule : une goutte d'eau se forme à l'interface externe du globule (figure 4.26 b)). Quand la taille de la goutte externe devient supérieure à la goutte interne, la différence de pression de Laplace engendre un flux de l'eau contenue dans la goutte interne vers la goutte externe (figure 4.26 c)). Nous résumons cette hypothèse sur la figure 4.26.

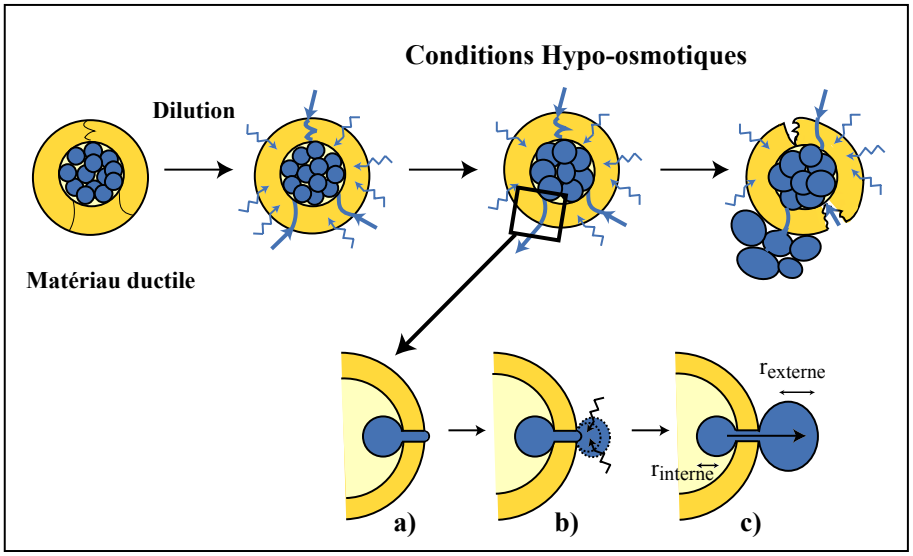


Figure 4.26
Illustration du comportement du matériau B sous conditions hypo-osmotiques en tenant compte de la formation de la « mousse biliquide »

Cette déstructuration du matériau et la formation de la mousse « biliquide » ne sont plus observées dans le cas du matériau A. Ce système plus cristallin peut être assimilé à un système poreux : les gouttelettes internes sont prises individuellement dans une matrice solide et ne peuvent pas gonfler. Elles sont connectées entre elles par une distribution importante de fractures à travers lequel le flux d'eau circule facilement et rapidement sans engendrer de déformation du globule.

4.3 Quelques arguments supplémentaires

La figure 4.27 représente les cinétiques de libération du sel pour des émulsions doubles cristallisées présentant différentes proportions en Dynasan 114 et en Suppocire DM, sous conditions iso-osmotiques à 15°C.

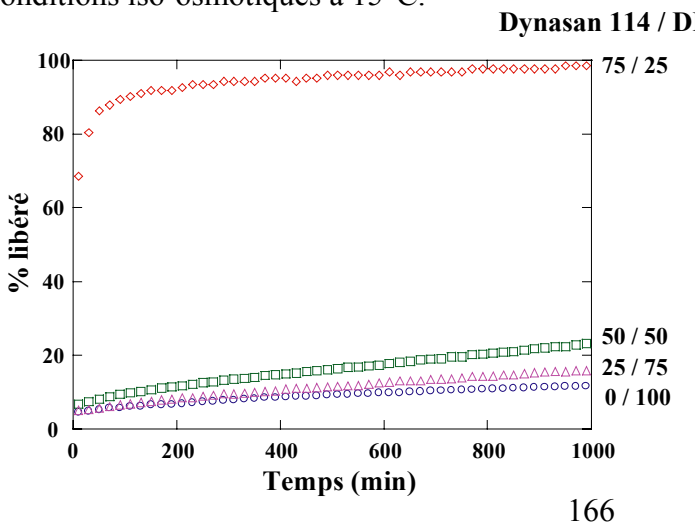


Figure 4.27
Cinétique de libération du sel sous conditions iso-osmotiques pour différentes proportions en Dynasan 114 et Suppocire DM
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

Plus la proportion en Dynasan 114 dans la matrice est élevée, plus la libération de l'espèce encapsulée par mûrissement de composition est rapide. Notre hypothèse selon laquelle augmenter la proportion en Dynasan 114 augmente la distribution en chemins perméables à l'eau au sein du matériau semble validée. En effet, si l'on considère que la diffusion du sel s'effectue par diffusion à travers un pore ou un canal présent dans la membrane, plus la distribution en pores au sein de la matrice est importante, plus la cinétique de libération est rapide. Inversement, on peut supposer que plus la proportion en Suppocire DM est importante, plus la proportion en zones amorphes au sein du matériau est importante. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces zones amorphes assurent une certaine « étanchéité » de la membrane en comparaison avec une matrice plus cristalline, plus fracturée et donc plus fragile.

La figure 4.28 représente la cinétique de libération du sel pour le matériau à base de Suppocire DM (matériau B), maintenu sous conditions iso-osmotiques à différentes températures, toutes inférieures à la plage de fusion de la cire (début de la fusion à 23°C).

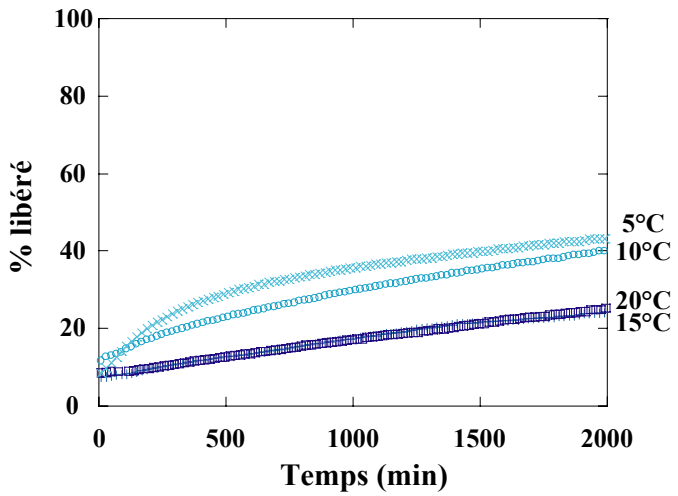


Figure 4.28
Cinétique de libération du sel sous conditions iso-osmotiques pour le matériau à base de Suppocire DM. Influence de la température de stockage dans l'état solide
φ_i = 40%, φ_g = 0.25%, d_i = 400 nm, d_g = 4µm, $[NaCl]_0$ = 0.4 mol/l

Une meilleure capacité d'encapsulation du matériau est observée à 15°C et 20°C plutôt qu'à 5°C ou 10°C. Il semblerait donc qu'aux températures les plus élevées, le matériau présente moins de zones de fracture et davantage de zones amorphes, limitant la diffusion du sel par mûrissement de composition. Le matériau à base de Suppocire DM présente donc une meilleure capacité d'encapsulation à une température plus proche de sa plage de fusion qu'à une température plus basse où la proportion de fractures semble alors plus importante.

La figure 4.29 représente les cinétiques de libération du sel pour le même matériau pour une dilution d'un facteur 5 et une dilution d'un facteur 100, à 5°C et à 15°C.

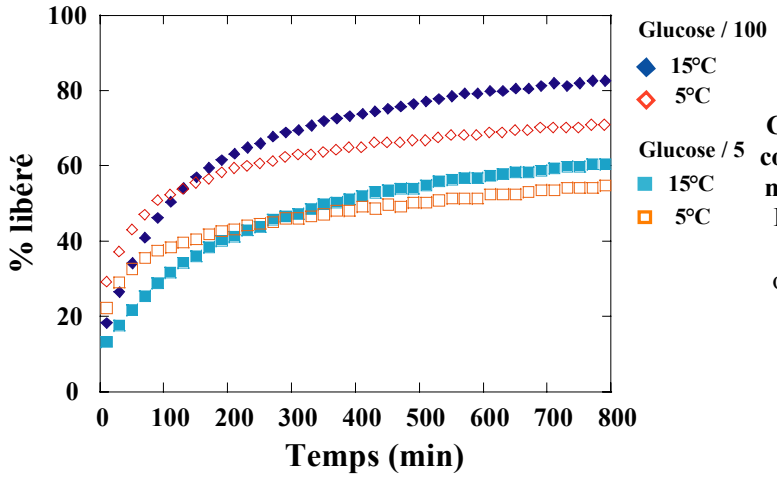


Figure 4.29
Cinétique de libération du sel sous conditions hypo-osmotiques pour le matériau à base de Suppocire DM. Influence de la température dans l'état solide
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

On constate que le processus I est plus rapide à 5°C qu'à 15°C. Nous pouvons donc conclure qu'à 5°C, le matériau présente davantage de zones de fractures qu'à 15°C, où l'organisation de sa matrice doit être raisonnablement plus amorphe.

La figure 4.30 représente les cinétiques de destruction du matériau amorphe pour une dilution d'un facteur 5 et d'un facteur 100, après une étape de trempe de 10 minutes ou de 24 heures.

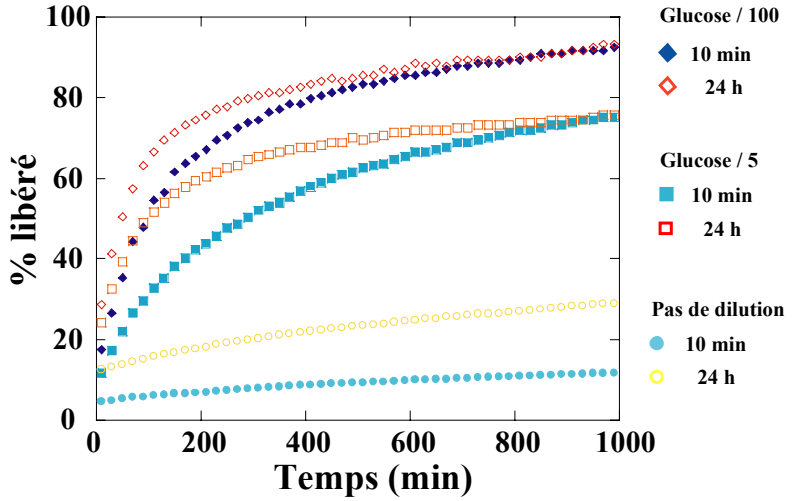


Figure 4.30
Cinétique de libération du sel sous conditions hypo-osmotiques pour le matériau à base de Suppocire DM. Influence de la durée de l'étape de trempe
$\varphi_i = 40\%$, $\varphi_g = 0.25\%$, $d_i = 400$ nm, $d_g = 4\mu m$, $[NaCl]_0 = 0.4$ mol/l

On constate que plus le matériau est maintenu longtemps dans la glace, plus les deux régimes passif et actif sont accélérés. Nous pouvons conclure que, plus le temps de trempe est important, plus la distribution en fractures au sein du matériau est importante.

Ainsi, nous démontrons grâce à l'ensemble de ces expériences que la nature de la cire ainsi que son histoire thermique influencent la capacité d'encapsulation du matériau. Nous retrouvons une tendance énoncée au paragraphe 4.2.6.a et illustrée par la figure 4.20 : lorsque le processus I est accéléré, alors le processus II suit cette même tendance. Le processus I se trouve accéléré dès lors que le mélange cristallisable est rendu plus cristallin (augmentation de la proportion de cire Dynasan 114, augmentation du temps de trempe, et diminution de la température de l'expérience). En effet, il est clairement démontré que l'état cristallin est toujours associé à l'existence de défauts et de fractures qui contribuent à accélérer les mécanismes I et II.

4.4 Conclusion

Les émulsions doubles cristallisables sont donc des matériaux perméables à l'eau et peu perméables aux espèces hydrophiles qu'elles encapsulent : la matrice de cire dans son état solide constitue donc une membrane semi-perméable.

Les conditions osmotiques permettent de contrôler de manière précise les propriétés d'encapsulation et de relargage du matériau. Sous conditions iso-osmotiques, la diffusion du sel par mûrissement de composition est lente du fait de la faible perméabilité de la membrane solide. Sous conditions hypo-osmotiques, la libération du sel est rapide et s'accompagne d'une déstructuration plus ou moins prononcée du matériau.

Nous avons mis en évidence que les propriétés d'encapsulation et de relargage de ce matériau et les cinétiques des processus mis en jeu, que ce soit sous conditions iso-osmotiques ou hypo-osmotiques, sont contrôlées par l'organisation de la membrane dans son état solide. La distribution initiale en fractures dans la matrice et la capacité du matériau, sous contrainte, à propager ces fractures sont les deux paramètres qui contrôlent les propriétés d'encapsulation et de relargage du matériau. Nous démontrons que ces paramètres peuvent être ajustés en variant la composition de la matrice ou en changeant l'histoire thermique d'un matériau de composition donnée.

BIBLIOGRAPHIE

Genty M., Couarraze G., Laversanne R., Degert C., Maccario J., Grossiiord J.L., 2003. Complex dispersions of multilamellar vesicles : a promising new carrier for controlled release and protection of encapsulated molecules, J. Control. Rel., 90, 119-133

Hamilton R.T., Kaler E.W., 1990. Alkali-metal ion-transport through thin bilayers, J. Phys Chem., 94, 2560-2566

Israelachvili J.N., 1985. Intermolecular and Surface forces, Academic Press.

Jager-Lezer N., Terrisse I., Bruneau F., Tokgoz S., Ferreira L., Clausse D., Seiller M., Grossiord J.L., 1997. Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion, J. Control. Release, 45, 1-13

Pays K., 2000. Les émulsions doubles : coalescence et mûrissement de composition, Th. de l'Un. de Bordeaux I

Tedajo G.M., Bouttier S., Forniat J., Grossiord J.L., Marty J.P., Seiller M., 2005. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion, Int. J. of Pharmac., 288, 63-72

Conclusion

Les émulsions doubles sont des colloïdes très attractifs pour encapsuler et véhiculer des espèces hydrophiles. Les avantages largement reconnus de ces matériaux sont : leur facilité et leur faible coût de production, leur taux d'encapsulation maximum, la flexibilité des compositions et des composants. Cependant, les lois qui régissent leur stabilité, bien comprises aujourd'hui, prédisent une réelle difficulté pour les mettre en œuvre dans des applications pratiques : fragilité vis-à-vis des phénomènes de coalescence et capacité limitée à prévenir les transports par diffusion passive.

Au cours de cette thèse, nous avons exploré la possibilité de remplacer l'huile qui compose le globule double par une autre huile dont la nature offre la possibilité de transiter vers un état solide à température ambiante. Les mélanges de triglycérides possèdent effectivement cette caractéristique tout en ayant des propriétés de biocompatibilité bien reconnues. Elles offrent aussi une grande diversité d'états solides selon l'histoire qui les a conduit dans cet état, leur pureté et bien sur leur nature chimique. Cette diversité est, à ce stade, une condition nécessaire car elle permettra au travers de son exploration de sélectionner les conditions optimales en regard du concept que nous envisageons.

Surmonter les difficultés précédement énoncées tout en préservant la possibilité de relarguer de manière contrôlée les actifs encapsulés devient envisageable si on dispose d'une structure semi-perméable solide. Le travail contenu dans cette thèse conduit à la première réalisation pratique d'un tel concept tout en maintenant un procédé de fabrication aussi simple que l'émulsification d'un liquide dans un autre.

Le passage à l'état solide du globule double génère cependant des conséquences en terme de stabilité colloïdale. Le chapitre 3 donne une description quantitative de ces effets et propose aussi des solutions pour éviter que ces instabilités se manifestent. Il s'avère en effet que le passage à l'état solide génère une adhésivité irréversible des interfaces qui devient accessible sous écoulement. Les forces visqueuses permettent simplement le franchissement plus aisé des barrières répulsives d'origine stérique et dont l'intensité est manifestement affaiblie dans l'état solide.

Concernant l'aptitude de ces matériaux à encapsuler durablement et relarguer de manière contrôlée, nos résultats indiquent que le concept d'une membrane semi-perméable solide est expérimentalement envisageable. De plus, la diversité des états solides accessibles à partir de ces matières premières permet de révéler une large gamme de comportements. Lorsque nous utilisons des matériaux dont l'état solide est plutôt amorphe, nous observons une plasticité résiduelle de cette membrane qui conduit à un scénario de relargage plutôt lent bien que exhibant au microscope de très amples modifications de structure. Par contre, lorsque les matériaux sont plutôt cristallins, nous constatons une plus grande fragilité associée à un relargage rapide sans modification de structure apparente. Dans tous les cas, la réponse de ces matériaux à un choc osmotique imposé, qui est révélé pour la première fois dans ce travail, offre des perspectives certaines.

Annexe 1 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une méthode d'analyse thermique dans laquelle la différence de quantité de chaleur nécessaire pour augmenter la température d'un échantillon par rapport à celle d'une référence est mesurée en fonction de la température.
L'appareil utilisé dans le cadre de notre étude est le TA Istrument 2920 Modulated DSC.

Une faible quantité (de l'ordre de 8 mg) de l'échantillon à étudier est placé dans une cellule en aluminium qui est scellée hermétiquement. La capsule contenant l'échantillon sera placé dans un des deux récipients de l'appareil ; dans l'autre récipient, une capsule vide sert de référence. La figure A.1.1 représente le schéma de principe de l'appareil.

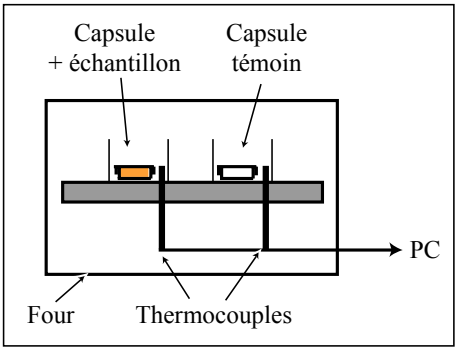


Figure A.1.1
Schéma de principe de la DSC

Les rampes de montée et de descente en température s'effectuent à une vitesse de 2°C par minute.

Annexe 2 Microscopie Electronique à Balayage

- Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface. Dans la pratique, les MEB actuels les plus conventionnels, c'est-à-dire équipés de détecteurs d'électrons secondaires permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm et un grossissement qui peut aller jusqu'à 300 000 fois.

La figure A.2.1 montre le schéma de principe d'un MEB. Un faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre les électrons et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

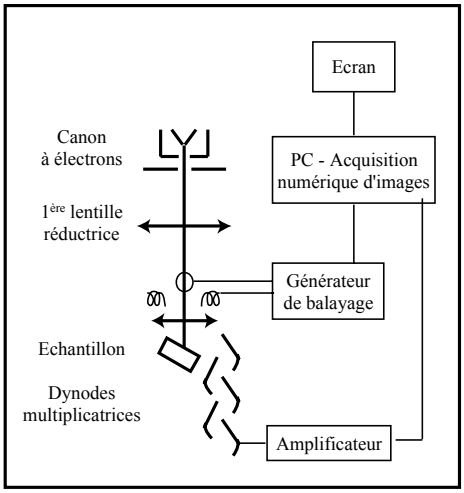


Figure A.2.1
Schéma de principe de la microscopie électronique à balayage

L'appareil utilisé dans le cadre de notre étude est le MEB S-3600N Hitachi. La résolution maximale est de 3 nm à 25 kV. La tension d'accélération peut varier de 0.3 kV à 30 kV. La gamme de grandissement varie d'un facteur 12 à un facteur 300 000.

- Préparation des échantillons

La qualité des images obtenues en microscopie électronique à balayage dépend grandement de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, de dimension relativement modeste (inférieure au centimètre) et surtout, il doit conduire l'électricité afin de pouvoir évacuer les électrons. Les émulsions doubles cristallisées sont des matériaux isolants. Une étape de métallisation est donc nécessaire avant toute observation au MEB.

Une pastille de silicium (5mm x 7mm) est collée sur un support métallique. Une goutte d'émulsion à une fraction massique de l'ordre de 1% est déposée sur la pastille. L'échantillon est laissé 12 heures à 18°C, période pendant laquelle l'eau du milieu continu s'évapore. L'échantillon est alors métallisé, en appliquant une couche d'or de 2.5nm, à l'aide d'un appareil Polaron 550 sous vide et sous balayage d'Argon, permettant un dépôt d'épaisseur homogène et contrôlée sur toute la surface des échantillons. Une tension d'accélération de 1 kV a été appliquée pendant 90 secondes.

Il est à noter que le faisceau d'électrons risque d'endommager l'échantillon cristallisable donc sensible à l'échauffement. Les temps d'observation d'une même zone sont donc limités. Les tensions d'accélération appliquées ne dépasseront pas 5 kV et les grossissements resteront inférieurs à 3500.

Annexe 3 Diffusion statique de la lumière

De façon très générale, lorsqu'un élément de matière est soumis à un rayonnement lumineux, certains rayons interagissent avec le moment dipolaire des molécules. Ces molécules sont alors excitées et répondent au champ électromagnétique par une oscillation de leur densité électronique. Chaque molécule se comporte alors comme un petit dipôle oscillant qui rayonne dans tout l'espace un champ électromagnétique diffusé : c'est un phénomène de diffusion du rayonnement.

Considérons un système modèle constitué de particules de même taille. Dans la technique de diffusion statique de la lumière, la moyenne temporelle de l'intensité diffusée I(θ) est mesurée dans une direction de l'espace, caractérisée par un angle de diffusion θ (cf. figure A.3.1).

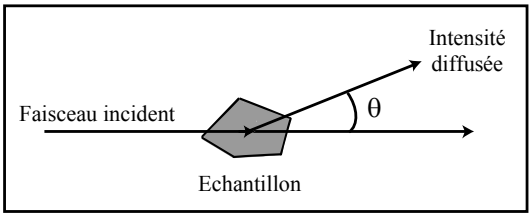


Figure A.3.1
Schéma de principe d'une expérience de diffusion

Cette moyenne temporelle de l'intensité diffusée I(θ) se décompose en un produit de trois termes : $I(\theta) = K \times P(\theta) \times S(\theta)$, où P(θ) est le facteur de forme, S(θ), le facteur de structure et K, une constante de proportionnalité indépendante de θ :

$K(\theta) \propto \frac{v\phi}{\lambda^4}$ où v est le volume d'une particule et ϕ la fraction volumique.

P(θ) est une fonction qui dépend de la forme, de la taille des objets diffusants et S(θ) une fonction rendant compte des interférences qui résultent des interactions entre les particules. Dans le cas d'un échantillon très dilué (ϕ → 0), il n'y a plus de corrélation spatiale entre les gouttes qui se comportent alors comme des émetteurs incohérents. Dans ce régime, le facteur de structure devient égal à 1 (S(θ)→ 1). La mesure de I(θ) permet alors de déterminer à une constante près, le facteur de forme P(θ) des particules.

En faisant coïncider le facteur de forme expérimental avec le facteur théorique, issu de la théorie exacte de MIE, le diamètre des gouttes peut être déterminé.

Dans le cas général, les échantillons ne sont pas monodisperses mais sont constitués d'un mélange de particules de diamètres différents : chaque particule diffuse la lumière, ce qui se traduit par un diagramme de diffusion Pi(θ), caractéristique de son diamètre di. L'intensité diffusée mesurée correspond donc à la somme des facteurs de forme pondérés par la fraction volumique des gouttes de diamètre di. Une déconvolution mathématique de ce signal complexe est réalisé par l'appareil pour obtenir la distribution granulométrique de l'échantillon.

Les deux grandeurs principalement utilisées pour caractériser la granulométrie des émulsions sont :

- Le diamètre moyen en volume, noté D[4,3], défini par :

$$D[4,3] = \frac{\sum_i V_i d_i}{\sum_i V_i} = \frac{\sum_i \phi_i d_i^4}{\sum_i \phi_i d_i^3}$$

où Vi et ϕi sont respectivement le volume et la fraction en volume des gouttes de diamètre di.

- Un indicateur de polydispersité de l'émulsion, l'uniformité en volume U_v, définie par :

$$U_v = \frac{1}{\overline{d}} \frac{\sum_i V_i \left| \overline{d} - d_i \right|}{\sum_i V_i}$$

où $\overline{d}$ est le diamètre médian de la distribution (50% en volume de la distribution possède un diamètre inférieur ou égal à $\overline{d}$).