



Émulsions stabilisées par des particules polymériques biodégradables : études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée

Faïza Laredj Bourezg

► **To cite this version:**

Faïza Laredj Bourezg. Émulsions stabilisées par des particules polymériques biodégradables : études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée. Polymères. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. <NNT : 2013LYO10128>. <tel-01202759>

HAL Id: tel-01202759

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01202759>

Submitted on 21 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE
DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue par

Faïza Laredj Bourezg

**Émulsions stabilisées par des particules
polymériques biodégradables : études
physico-chimiques et évaluation pour
l'application cutanée**

JURY :

Monsieur CHEVALIER Yves (directeur de thèse)

Madame BOLZINGER Marie-Alexandrine (co-directeur de thèse)

Monsieur HUMBERT PHILIPPE (rapporteur)

Monsieur AUVRAY LOIC (rapporteur)

Madame BRIANCON Stéphanie (président du jury)

Monsieur RICHARD JOEL (examineur)

Monsieur BROZE GUY (examineur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Yves Chevalier, de m'avoir encadré, enseigné, soutenue et apporté tant sur le plan humain que scientifique.

D'autre part, je remercie Marie Alexandrine Bolzinger pour m'avoir toujours encouragé et soutenue.

Je tiens également à remercier Pr Loic Auvray et Pr Philippe Humbert d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Bien évidemment, je remercie Dr Joël Richard, Dr Guy Broze d'avoir accepté de faire partie de mon jury thèse, ainsi que le Pr Stéphanie Briançon de m'avoir fait l'honneur de le présider.

Je souhaite remercier Pr Hatem Fessi de m'avoir accueilli au sein du LAGEP, où j'ai pu travailler dans de très bonnes conditions.

Je ne saurai remercier assez toutes les personnes que j'ai pu croiser durant ma vie de doctorante : Jocelyne, Nadia, Jean pierre, Géraldine, Delphine,...(liste non exhaustive).

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma mère, ma sœur et mon petit frère pour leur soutien infaillible, mon mari pour sa patience et sa gentillesse exemplaires.

Une pensée très particulière pour Maria, mon petit ange qui a changé ma vie et mes priorités.

Papa, là où tu es, j'espère que tu es fier de moi...

Table des matières

| | |
|--|----|
| Chapitre 1. Les émulsions de Pickering | 5 |
| 1.1. Définition des émulsions de Pickering | 5 |
| 1.2. Mécanismes de stabilisation | 7 |
| 1.3. Interactions entre particules à l'interface liquide/liquide | 11 |
| 1.4. Organisation des particules aux interfaces d'émulsions et mécanismes de stabilisation | 14 |
| 1.5. Déstabilisation des émulsions de Pickering | 21 |
| 1.6. Particules d'origine biologique pour la stabilisation de Pickering | 26 |
| | |
| Chapitre 2. L'application cutanée | 33 |
| 2.1. La peau humaine : généralités | 33 |
| 2.2. Structure de la peau | 35 |
| 2.2.1. L'épiderme | 35 |
| 2.2.1.1. La couche cornée ou stratum corneum | 35 |
| 2.2.1.2. L'épiderme viable | 36 |
| 2.2.2. Le derme | 38 |
| 2.2.3. L'hypoderme | 38 |
| 2.2.4. Les annexes cutanées | 39 |
| 2.3. Mécanismes de transport à travers la peau | 40 |
| 2.3.1. Aspects théoriques | 40 |
| 2.3.2. Structure de la peau et perméation | 43 |
| 2.3.3. Influence des propriétés physico-chimiques des actifs sur leur pénétration cutanée | 45 |
| 2.3.3.1. Etat physico-chimique | 45 |
| 2.3.3.2. Poids moléculaire / Taille moléculaire | 45 |
| 2.3.3.3. Degré d'ionisation | 45 |
| 2.4. Modulation de l'absorption cutanée | 46 |
| 2.4.1. Activité thermodynamique des actifs et pénétration dans la peau | 46 |
| 2.4.2. Supersaturation et pénétration cutanée | 47 |
| 2.4.3. Promoteurs d'absorptions | 48 |
| 2.4.3.1. L'eau | 51 |
| 2.4.3.2. Les sulphoxides | 51 |
| 2.4.3.3. Azone | 52 |
| 2.4.3.4. Pyrrolidones | 52 |
| 2.4.3.5. Les acides gras | 52 |
| 2.4.3.6. Les alcools | 53 |
| 2.4.3.7. Les surfactifs | 54 |
| 2.4.3.8. L'urée | 56 |
| 2.4.3.9. Les huiles essentielles, terpènes et terpénoïdes | 56 |
| 2.5. Formulations pour l'application cutanée | 57 |
| 2.5.1. Les émulsions pour l'application topique | 57 |
| 2.5.1.1. Influence du type d'émulsion | 58 |
| 2.5.1.2. Influence de la viscosité | 59 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.5.1.3. | Influence de la taille des gouttes | 59 |
| 2.5.1.4. | Influence des tensioactifs classiques | 60 |
| 2.5.1.5. | Influence des tensioactifs particuliers : Cas des émulsions de Pickering | 60 |
| 2.5.2. | Devenir d'une émulsion après application cutanée | 62 |
| 2.5.3. | Les particules | 64 |
| 2.5.3.1. | Mécanismes de pénétration suspectés | 66 |
| 2.5.3.2. | Facteurs influençant la pénétration | 68 |
| 2.6. | Enjeux et problématique des nanotechnologies appliquées à la peau | 75 |

Chapitre 3. Synthèse et caractérisation des copolymères à blocs 77

| | | |
|----------|--|----|
| 3.1. | Introduction | 77 |
| 3.2. | Partie expérimentale | 77 |
| 3.2.1. | Matériaux | 77 |
| 3.2.2. | Méthodes | 78 |
| 3.2.2.1. | Synthèse du copolymère à blocs polycaprolactone-polyéthylène glycol | 78 |
| 3.2.2.2. | Synthèse du copolymère à blocs acide polylactique-polyéthylène glycol | 79 |
| 3.2.2.3. | Caractérisation des copolymères par RMN du proton | 80 |
| 3.2.2.4. | Caractérisation des copolymères par chromatographie d'exclusion stérique | 81 |
| 3.2.2.5. | Caractérisation des copolymères par analyse thermique différentielle | 82 |
| 3.2.3. | Résultats et discussion | 83 |
| 3.3. | Conclusion | 84 |

Chapitre 4. Émulsions stabilisées par des particules de Polycaprolactone : physico-chimie et formulation 86

| | | |
|------------|--|----|
| 4.1. | Introduction | 86 |
| 4.2. | Partie expérimentale | 87 |
| 4.1.1. | Étude de formulation des particules de polycaprolactone stabilisées par un copolymère à blocs PCL-b-PEG. | 87 |
| 4.1.1.2. | Méthodes | 87 |
| 4.1.1.2.1. | Mesure de la taille des particules et du potentiel Zéta | 87 |
| 4.1.1.2.2. | Microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) | 87 |
| 4.1.1.3. | Résultats et discussion | 88 |
| 4.1.1.3.1. | Formulation des particules par nanopréciptation | 88 |
| 4.1.1.3.2. | Choix de la polycaprolactone comme constituant des particules | 89 |
| 4.1.1.3.3. | Choix du degré de polymérisation de la partie PEG du copolymère | 89 |
| 4.1.1.3.4. | Choix du degré de polymérisation de la partie PCL du copolymère | 89 |
| 4.1.1.3.5. | Choix du rapport massique (RM) copolymère/polymère | 90 |
| 4.1.1.3.6. | Influence du rapport massique sur la taille des particules obtenues | 91 |
| 4.1.1.3.7. | Influence du rapport massique sur le potentiel zéta des particules | 92 |
| 4.1.1.4. | Concentration des suspensions aqueuses de particules | 94 |
| 4.1.1.4.1. | Essais de lyophilisation | 94 |
| 4.1.1.4.3. | Optimisation du procédé de nanopréciptation | 96 |
| 4.1.2. | Formulation d'émulsions huile-eau stabilisées par des particules du type (polycaprolactone+PCL-b-PEG) | 98 |
| 4.1.2.1. | Matériaux | 98 |
| 4.1.2.2. | Méthodes | 98 |
| 4.1.2.2.1. | Formulation des émulsions | 98 |

| | | |
|--|---|-----|
| 4.1.2.2.3. | Technique de centrifugation | 99 |
| 4.1.3. | Résultats et discussion | 99 |
| 4.1.3.1. | Formulation des émulsions | 99 |
| 4.1.3.1.1. | Choix du type d'huile | 99 |
| 4.1.3.1.2. | Stabilité des émulsions | 101 |
| 4.3. | Conclusion | 105 |
| Chapitre 5. Formulation de nanoparticules à base de copolymères à blocs et caractérisation physico-chimique | | 106 |
| 5.1. | Introduction | 106 |
| 5.2. | Partie expérimentale | 108 |
| 5.2.1. | Matériaux | 108 |
| 5.2.2. | Méthodes | 108 |
| 5.2.2.1. | Fabrication des micelles de copolymères à blocs par nanoprécipitation | 108 |
| 5.2.2.2. | Détermination de la taille des particules | 109 |
| 5.2.2.3. | Analyse par diffusion des neutrons | 109 |
| 5.2.2.3.1. | Rappels théoriques | 109 |
| 5.2.2.3.2. | Mode opératoire | 113 |
| 5.2.2.4. | Caractérisation des micelles par RMN du proton | 114 |
| 5.2.2.5. | Étude de relaxation des micelles par RMN du ¹³ C | 114 |
| 5.2.2.5.1. | Rappels théoriques | 114 |
| 5.2.3. | Résultats et discussion | 115 |
| 5.2.3.1. | Caractérisation des copolymères par RMN du proton | 115 |
| 5.2.4. | Étude de relaxation en ¹³ C | 117 |
| 5.2.5. | Etude des micelles de copolymère à blocs en suspension aqueuse par diffusion de neutrons (SANS) | 119 |
| 5.2.6. | Mise en évidence de l'inversion de structure des micelles pendant le procédé de nanoprécipitation par diffusion de neutrons | 124 |
| 5.3. | Conclusion | 127 |
| Chapitre 6. Formulation d'émulsions stabilisées par des particules de PCL-b-PEG | | 128 |
| 6.1. | Introduction | 128 |
| 6.2. | Partie expérimentale | 129 |
| Chapitre 7. Formulation d'émulsions stabilisées par des particules de copolymères à blocs | | 130 |
| 7.1. | Introduction | 130 |
| 7.2. | Partie expérimentale | 131 |
| Chapitre 8. Application topique des nanoparticules de PCL-b-PEG et PLA-b-PEG | | 149 |
| 8.1. | Introduction | 149 |
| 8.2. | Partie expérimentale | 151 |
| Chapitre 9. Application topique des émulsions biodégradables | | 177 |
| 9.1. | Introduction | 177 |
| 9.2. | Partie expérimentale | 179 |
| Conclusion générale | | 198 |

Annexe : Dosage du copolymère résiduel par dosage de la partie de chaîne polyéthylène glycol 213

Références 216

Introduction générale

Les émulsions sont largement utilisées dans les formulations cosmétiques et pharmaceutiques du fait de leurs excellentes capacités de solubilisation des ingrédients actifs lipophiles et hydrophiles, et du fait de leur bonne tolérance.

Cependant, les nombreux tensioactifs utilisés pour les stabiliser ont été incriminés dans la perturbation des lipides de la peau ainsi que dans la génération de nombreux effets indésirables.

Une alternative à l'utilisation des tensioactifs dits classiques, est la stabilisation des émulsions par des particules solides.

Ces émulsions dites de Pickering ont connu un grand intérêt dans de nombreux domaines notamment en cosmétique. Leur facilité de production, la stabilisation forte que leur confèrent les particules adsorbées aux interfaces mais aussi leur capacité à véhiculer, voire protéger des actifs cosmétiques en font des formes très usitées.

Des émulsions stabilisées par de la silice, de l'oxyde de titane ou de l'oxyde de zinc ont ainsi été utilisées au sein de produits anti-solaires.

L'application de ces émulsions stabilisées par des particules inorganiques sur la peau, a mis en évidence leur pénétration plus ou moins profonde dans celle-ci.

La profondeur atteinte par ces particules, ainsi que les conséquences de leur présence dans les différentes couches de la peau sont controversées. Leur devenir incertain ainsi que leur rémanence dans la peau suscite la méfiance du corps médical et réglementaire.

Un des objectifs de cette thèse était de formuler des émulsions stabilisées par des particules biodégradables. Les émulsions biocompatibles obtenues sans l'utilisation d'aucun tensioactif chimique devaient être adressées aussi bien à l'application topique d'actifs cosmétiques qu'à des fins pharmaceutiques.

Dans ce contexte, nous avons essayé de fabriquer des particules biodégradables à base de Polycaprolactone et d'acide polylactique. Ces polymères sont connus et utilisés en reconstruction tissulaire ainsi que pour fabriquer des particules encapsulant des actifs divers. Leur biodégradabilité et innocuité envers les tissus ont également été intensivement étudiées et démontrées.

Trois types particuliers ont été testés pour la stabilisation d'émulsions huile/eau : 1) des particules de polycaprolactone stabilisées par un copolymère à blocs du type polycaprolactone-bloc-polyéthylène glycol (PCL-*b*-PEG); 2) des pseudo-micelles formées par l'auto-association du copolymère polycaprolactone-*bloc*-polyéthylène glycol (PCL-*b*-PEG); 3) des pseudo-micelles formés à partir du copolymère acide polylactique-*bloc*-polyéthylène glycol (PLA-*b*-PEG).

L'un des challenges de cette thèse était donc dans un premier temps de formuler ces particules polymériques sans l'ajout d'aucun tensioactif, dans le but d'obtenir des suspensions aqueuses assez concentrées pour stabiliser des émulsions huile-eau, puis d'étudier les paramètres physico-chimiques régissant leur adsorption aux interfaces. L'absorption cutanée d'actifs cosmétiques à partir de ces formes a également été investiguée.

La partie bibliographique comporte deux grandes sections. Tout d'abord, nous commençons par un chapitre traitant des émulsions de Pickering ainsi qu'un bref rappel des différentes notions physico-chimiques régissant leur stabilisation. L'utilisation croissante de particules organiques d'origine biologique, notamment en industrie alimentaire pour stabiliser ces émulsions est également décrite.

Le deuxième chapitre traite de la pénétration cutanée d'actifs à partir des émulsions dites « classiques », stabilisées par des tensioactifs chimiques mais aussi à partir d'émulsions de Pickering stabilisées par des particules. Une grande partie de ce chapitre traite également de la pénétration d'actifs à partir des particules, qu'elles soient inorganiques ou organiques. Cette partie du deuxième chapitre se veut un récapitulatif du nombre impressionnant d'études entreprises afin de mettre en évidence les mécanismes de pénétration et de délivrance des actifs encapsulés au sein de particules.

La partie expérimentale comporte six chapitres présentés pour la plupart en forme d'articles publiés ou soumis pour publication.

Le chapitre III traite de la synthèse organique des deux copolymères à bloc et leur caractérisation par RMN du proton et chromatographie d'exclusion stérique.

Le chapitre IV aborde la préparation de particules de polycaprolactone stabilisées par un copolymère di-bloc du type PCL-*b*-PEG. Cette partie décrit les différentes phases d'optimisation du procédé de nanopréciipitation afin d'obtenir des suspensions aqueuses concentrées en particules, ainsi l'étude des paramètres physico-chimiques régissant leur adsorption aux interfaces.

Le chapitre V décrit la fabrication de particules à base du copolymère à bloc PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG par nanopréciipitation. La structure des nanoparticules en suspension aqueuse est étudiée en RMN du ¹³C et par diffusion de neutrons. L'étude de l'inversion de structure des micelles en cours nanopréciipitation est également investiguée par diffusion de neutrons.

Le chapitre VI décrit la formulation et le mécanisme de stabilisation d'émulsions huile-eau par des particules PCL-*b*-PEG.

Le chapitre VII traite des paramètres de formulations d'émulsions huile-eau stabilisées par des particules de copolymères à bloc du type PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG. Cette partie décrit les deux méthodes différentes utilisées pour l'obtention d'émulsions stables ainsi que l'influence de paramètres tels que le procédé ou les différents constituants sur les caractéristiques des émulsions obtenues. L'organisation des nanoparticules adsorbées à l'interface dodécane-eau est visualisée par cryofracture mais également étudiée par diffusion de neutrons.

Les chapitres VIII et IX traitent de la pénétration cutanée du rétinol, choisi comme molécule modèle lipophile encapsulée au sein des particules de PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG en suspension dans l'eau mais aussi incorporée dans la phase huileuse des émulsions de Pickering. Celles-ci sont stabilisées par des particules biodégradables obtenues à partir de PCL-*b*-PEG et de PLA-*b*-PEG et fabriquées selon deux procédés différents.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Les émulsions de Pickering

1.1. Définition des émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering sont des mélanges de deux liquides non miscibles sous la forme de dispersion de gouttelettes liquides stabilisées par l'adsorption à l'interface de particules au lieu de tensioactifs classiques.

Dans plusieurs de ces systèmes, les particules participent à la stabilité en créant une barrière physique à la coalescence des gouttelettes formées. Ce type de stabilisation est communément appelé « stabilisation de Pickering » en référence aux travaux pionniers de Spencer Umfreville Pickering (Pickering 1907), qui en reprenant les travaux de Ramsden (Ramsden 1903) a démontré l'aptitude de particules colloïdales à stabiliser durablement des émulsions.

Grâce à la microscopie optique, Pickering observe l'adsorption des particules et relève le caractère rigide des interfaces. Cette étude pionnière est à l'origine de la terminologie actuellement utilisée pour désigner ces matériaux : **les émulsions de Pickering**.

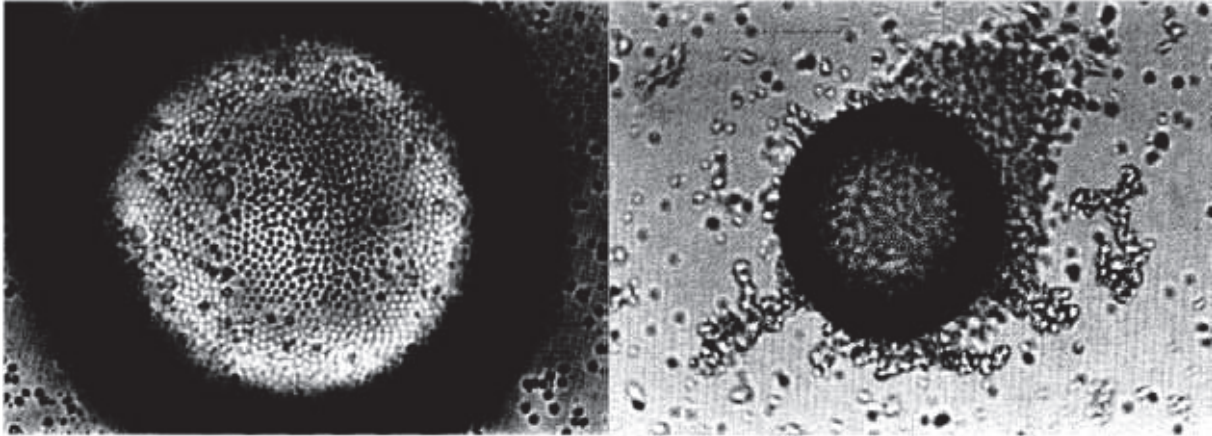


Figure 1. Images microscopiques de gouttelettes stabilisées par la silice. Droite : émulsion eau-dans-huile ; Gauche : émulsion huile-dans-eau. Schéma extrait de(Levine et al. 1989)

En fonction du caractère hydrophile ou hydrophobe de ces particules, les émulsions formées peuvent être soit huile-dans-eau (H/E) ou eau-dans-huile (E/H).

Ces systèmes décrits il ya plus d'un siècle ont connu un regain d'intérêt de la part des physico-chimistes grâce non seulement aux propriétés interfaciales des nanoparticules et microparticules utilisées mais aussi à leur mécanismes de stabilisation des gouttelettes liquides et bulles gazeuses (Bernard P Binks & Tommy S Horozov 2006; F. Leal-Calderon & V. Schmitt 2008; Bernard P. Binks et al. 2011).

Beaucoup de ces travaux récents se sont basés sur l'étude de systèmes modèles contenant des particules inorganiques telles les silices, latex, argiles, des oxydes métalliques... avec parfois une modification chimique de leur surface afin d'obtenir leur mouillage optimal et leur adsorption forte aux interfaces.

Les particules adsorbées à l'interface huile-eau confèrent une stabilité due à la barrière stérique créée à l'interface et non pas à l'abaissement de la tension interfaciale observée lors de l'utilisation des molécules tensioactives classiques (Vignati et al. 2003). L'efficacité de stabilisation d'une émulsion d'un type de particules dépend de la forme et taille de la particule mais aussi de sa mouillabilité et des interactions qui existent entre particules de même type (Aveyard et al. 2003). Certaines concentrations de particules utilisées favorisent soit l'empilement des particules voire leur floculation à l'interface permettant ainsi un accroissement de la stabilisation de Pickering (Simovic et al. 2003) mais aussi peuvent être à l'origine de la formation de ponts inter-gouttelettes (Abend et al. 1998; Tambe et al. 1994). Il existe une large gamme de tailles de particules pouvant être utilisées pour la stabilisation de Pickering. Elles varient de l'ordre du nanomètre (Binks et al. 2004) au micromètre (Wang et

al. 2004). Afin de réaliser une stabilisation efficace, il est nécessaire que la taille des particules soit largement inférieure à celle des gouttelettes dont elles stabilisent la surface (Tambe et al. 1993). Toutefois, aucune corrélation n'a été trouvée entre la taille des particules stabilisatrices et la taille des gouttelettes formées. En effet, des émulsions grossières de taille millimétrique ont pu ainsi être stabilisées par des particules, phénomène rarement observé avec les surfactifs classiques (Aveyard et al. 2003). Généralement, la stabilité des émulsions est inversement proportionnelle à la taille des particules, les particules ayant une très petite taille ayant une meilleure capacité d'empilement à l'interface et par conséquent une couche stabilisatrice beaucoup plus homogène (Binks et al. 2000; Garbin et al. 2012; Binks et al. 2001).

L'un des challenges majeurs de l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire est de produire des nanoparticules et microparticules capables à la fois d'agir comme des stabilisants de Pickering efficaces mais aussi acceptables au niveau réglementaire, toxicologique et commercial (Morris 2011).

Les mécanismes physico-chimiques régissant la stabilisation de Pickering ont été très largement décrits dans la littérature. D'excellents ouvrages décrivent plus particulièrement, l'impact du mouillage des particules sur le sens des émulsions obtenues mais aussi, les paramètres de formulation des émulsions. Un nombre important de particules de types et d'origine différentes ont aussi été utilisées pour la stabilisation d'émulsions. Ce chapitre se concentrera sur les travaux les plus récents, ayant pour principal objet la stabilisation des émulsions par des particules organiques.

1.2. Mécanismes de stabilisation

Le concept de stabilisation de Pickering repose sur un principe extrêmement simple : les particules dispersées s'adsorbent à l'interface liquide-liquide (dans le cas des émulsions par exemple) et forment une barrière à la coalescence par un mécanisme stérique.

L'efficacité de cette protection dépend de la densité d'empilement de ces particules à l'interface mais aussi de la force de désorption minimale nécessaire au détachement de ces particules de l'interface. L'efficacité de la stabilisation stérique dépend du mouillage des particules.

1.2.1. Angle de contact et stabilisation de Pickering

Pickering a été le premier à conclure que les particules solides mouillées préférentiellement par l'eau tendaient à stabiliser des émulsions H/E. Plus tard, (Schulman & Leja 1954) ont prouvé l'importance du mouillage des particules en mesurant les angles de contact dans des systèmes contenant du sulfate de baryum, du benzène, de l'eau et divers tensioactifs.

Les particules stabilisantes sont plus efficaces si elles sont mouillées de façon prédominante par la phase continue.

En pratique, le positionnement des particules à l'interface Huile-Eau est défini par l'angle de contact θ tel qu'illustré par la figure 2. Dans le cas des particules hydrophiles telles que des oxydes métalliques, l'angle de contact défini dans l'eau $\theta < 90^\circ$, les particules sont majoritairement mouillées par la phase aqueuse et le système obtenu est une émulsion huile-dans-eau. En revanche, pour des particules hydrophobes où $\theta > 90^\circ$, la majeure partie de chaque particule est immergée dans la phase huileuse, ce qui favorise la formation d'une émulsion eau-dans-huile.

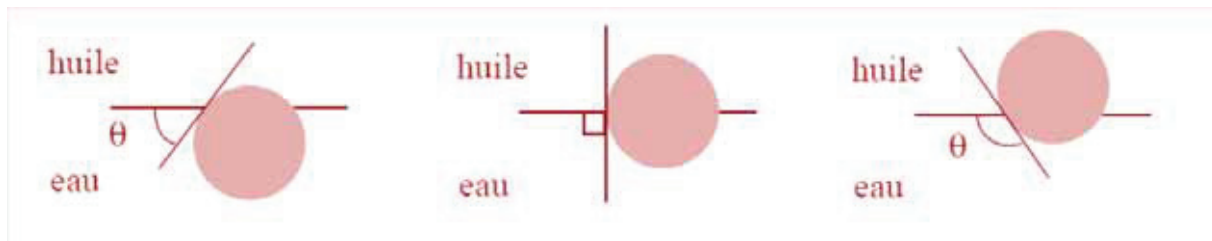


Figure 2. La position de particules sphériques à l'interface huile-eau pour des angles de contact θ : inférieur, égal ou supérieur à 90° .

D'un point de vue thermodynamique, l'angle de contact est relié à l'équilibre entre les énergies libres de surface aux interfaces suivantes : particule-eau, particule-huile et huile-eau (Binks & Horozov 2006).

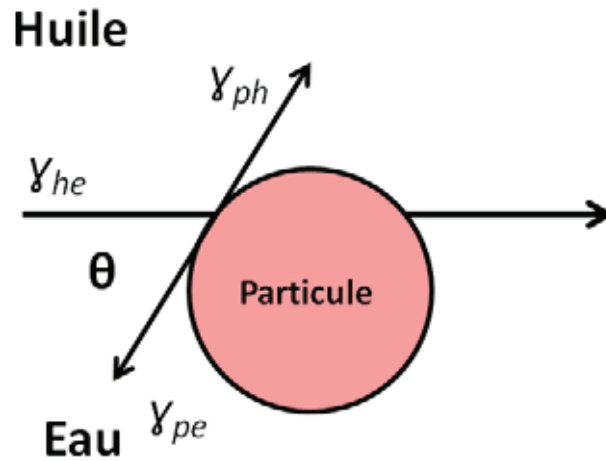


Figure 3. Représentation schématique de la stabilisation de Pickering à l'aide d'une particule hydrophile à l'interface huile-eau avec l'angle de contact θ formé à la jonction des trois phases.

L'équation de Young traduit l'équilibre des forces s'exerçant au niveau de la ligne de contact particule-interface (figure 3), soit :

$$\cos \theta = (\gamma_{ph} - \gamma_{pe}) / \gamma_{he} \quad (1)$$

Où γ_{ph} , γ_{pe} et γ_{he} sont les tensions interfaciales particule-huile, particule-eau et huile-eau respectivement. Pour des particules également mouillées par l'huile et l'eau, la valeur de l'angle de contact sera égal à 90° alors que pour celles à prédominance hydrophile ($\gamma_{ph} > \gamma_{pe}$) ou hydrophobe ($\gamma_{ph} < \gamma_{pe}$) l'angle de contact aurait des valeurs de 0 à 90° et de 90° et 180° respectivement (Casagrande et al. 1989).

1.2.2. Énergie de d'adsorption des particules à l'interface

Une particule de rayon r attachée à l'interface H/E avec un angle de contact loin de 0° ou de 180° est dite adsorbée de façon irréversible. Ceci est dû à la valeur très élevée de l'énergie libre d'adsorption comparée à l'énergie thermique kT :

$$\Delta G_d = \pi r^2 \gamma_{he} (1 \pm \cos \theta)^2 \quad (2)$$

À travers sa dépendance de l'énergie de surface γ_{he} , l'énergie d'adsorption est quelque peu influencée par les compositions respectives de l'huile et de la phase aqueuse utilisées.

Cependant, mis à part la valeur effective de l'angle de contact, le facteur le plus important permettant de contrôler l'énergie d'adsorption est le diamètre de la particule (figure 4).

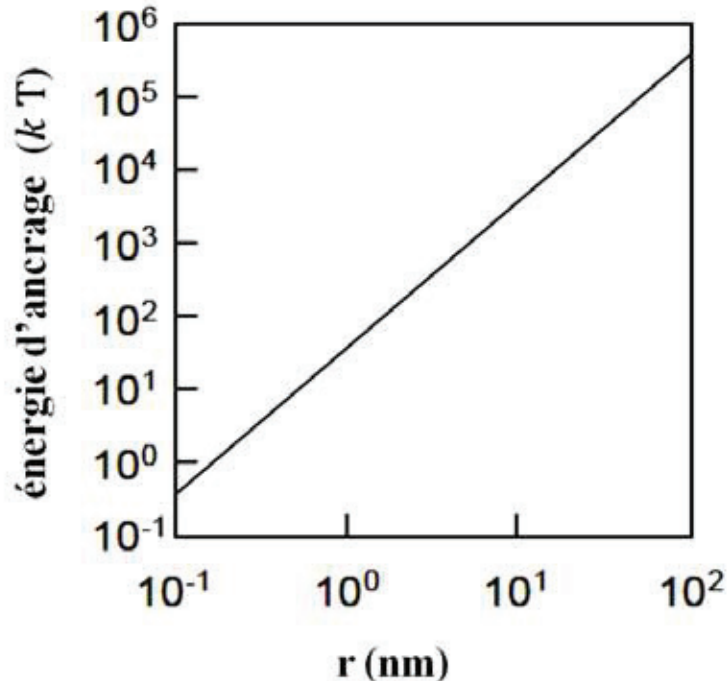


Figure 4. Évolution de l'énergie libre d'adsorption d'une particule sphérique de rayon a adsorbée à une interface plane eau/huile ($\gamma_{he} = 50 \text{ mN.m}^{-1}$) avec un angle de contact de 90° ($T = 298^\circ\text{K}$). Adapté de (B. P. Binks 2002).

En proposant des valeurs typiques pour γ_{he} et θ , la valeur de l'énergie d'adsorption pour une microparticule sphérique de rayon $r = 1 \mu\text{m}$ prédite par la théorie est de $\Delta G_d \sim 10^6 kT$, où k est la constante de Boltzmann et T est la température absolue ($= 300 \text{ K}$). La fiabilité de cette théorie a été confirmée dans une récente étude utilisant des sphères de polystyrène de $1.05 \mu\text{m}$ de diamètre et des particules d'or stabilisées par le (1-mercaptoundec-11-yl)tetra(éthylène glycol). Leur méthode de détermination de l'énergie libre d'adsorption se base sur des mesures de la décroissance de la tension au fur et à mesure que les particules s'adsorbent à l'interface huile-eau. L'étude a démontré que pour les particules d'or, l'énergie d'adsorption mesurée était de $\Delta G_d = 60 kT$ avec l'existence d'une barrière énergétique s'opposant à l'adsorption alors que pour les particules de polystyrène, l'énergie mesurée était de $\Delta G_d = 0.9 \times 10^6 kT$ donc en faveur d'une forte adsorption à l'interface huile-eau. L'étude a également mis en évidence que l'énergie libre d'adsorption des particules dépendait de la composition de

la phase huileuse et pouvait donc être contrôlée par la concentration en sels présents dans la suspension de particules (Du et al. 2010).

Il peut être conclu que même pour des particules relativement petites ($r \sim 5-10$ nm), le processus de leur adsorption à l'interface huile-eau est essentiellement irréversible ($\Delta G_d \gg 10 kT$) à condition que l'angle de contact ne soit pas trop proche de 0° ou 180° . Ceci constitue une différence majeure avec les molécules de tensioactif, qui s'adsorbent ou se désorbent réversiblement. Cette différence est à l'origine des propriétés originales des émulsions de Pickering.

Cette équation thermodynamique n'est applicable que dans le cas exclusif d'une particule parfaitement sphérique et ne présentant aucune aspérité à sa surface. Ceci est rarement le cas au sein des systèmes réels qui contiennent souvent des particules non sphériques co-existant avec d'autres espèces moléculaires à l'interface huile-eau. Plusieurs tentatives de modélisation de l'adsorption des nanoparticules aux interfaces et de la stabilisation de Pickering ont été effectuées afin d'étudier ces systèmes complexes. Ces approches statistiques et mécaniques se basent essentiellement sur des simulations informatiques (Luo et al. 2009; Ranatunga et al. 2011; Salari et al. 2011).

1.3. Interactions entre particules à l'interface liquide/liquide

Les interactions particule-particule aux interfaces contrôlent la formation d'une couche rigide de particules solides qui empêche la coalescence. Les phénomènes sont extrêmement complexes et plusieurs phénomènes observés expérimentalement demeurent encore inexplicables (David E. Tambe & Mukul M. Sharma 1993). Cependant, le principe de stabilisation peut être expliqué par la création de structures en réseaux de particules générant une barrière stérique s'opposant à la coalescence des gouttelettes.

1.3.1. Interactions dipôle-dipôle

Pieranski (1980) a montré que des dipôles se formaient suite à la création de charges asymétriques à la surface des particules se trouvant à l'interface huile-eau (Pieranski 1980).

Les charges électriques portées par les calottes immergées dans la phase aqueuse et dans le milieu non polaire ne sont pas identiques en raison des différences de polarisabilité (Levine et al. 1989). Cette dissymétrie dans la distribution des charges engendre un dipôle perpendiculaire à l'interface (figure 5). Les dipôles voisins se repoussent alors à travers la phase aqueuse et la phase non polaire (Stancik et al. 2003).

Les interactions dipôle-dipôle existent en association avec la répulsion générée par la double couche ionique entourant les particules plus connue sous le nom de potentiel d'interaction DLVO. Aussi, comme la neutralisation des charges est contrôlée par l'étendue de l'immersion de la particule dans la phase aqueuse, les particules hydrophobes présentent des interactions dipôle-dipôle plus importantes.

Pieranski a estimé cette interaction à partir d'un modèle simple. L'amplitude d'un dipôle est donnée par $Q\kappa^{-1}$, où $Q = Ze$ est la charge globale dissociée dans la phase aqueuse, et κ^{-1} est la longueur de Debye dans cette phase. Le potentiel d'interaction s'écrit :

$$U_{dip-dip}(r) = \frac{Z^2 e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{1}{\kappa^{-2}r^3} \quad (3)$$

Où ϵ est la constante diélectrique relative à l'interface. Cette dernière valeur est la moyenne des constantes diélectriques des deux milieux. En général, $\epsilon_{huile} \ll \epsilon_{eau} = 80$, donc $\epsilon = (\epsilon_{huile} + \epsilon_{eau})/2 = \epsilon_{eau}/2$.

Le calcul détaillé basé sur la linéarisation de l'équation de Poisson-Boltzmann³¹ donne :

$$U_{dip-dip}(r) = \frac{2Z^2 e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r} \left(\frac{\epsilon^2}{\epsilon^2 - 1} e^{-\kappa(r-2R)} + \frac{1}{\epsilon\kappa^2 r^2} \right) \quad (4)$$

Pour des distances $r < \kappa^{-1}$, le premier terme est négligeable et l'on obtient l'équation 1 à un facteur ϵ près. L'interaction résultante est donc une répulsion à longue portée ($\propto 1/r^3$) qui est à l'origine de l'ordre solide adopté par les particules colloïdales aux interfaces.

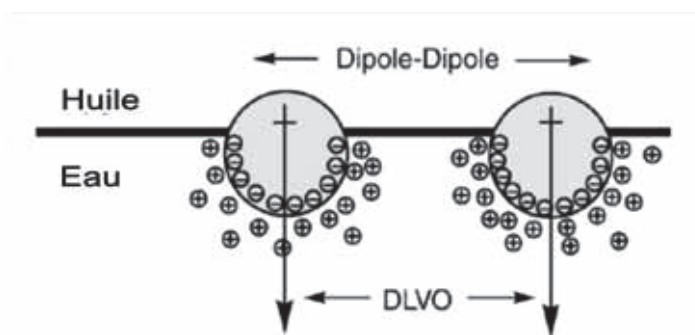


Figure 5. Schéma de particules à une interface eau/milieu non polaire. La dissymétrie des charges autour de la particule crée un moment dipolaire. Adapté de (Hunter et al. 2008).

1.3.2. Interactions capillaires

Les forces capillaires peuvent être soit de flottaison soit d'immersion. Les forces de flottaison apparaissent entre deux particules flottant dans le même liquide alors que les forces d'immersion apparaissent entre des particules partiellement immergées dans un film liquide.

Les interactions capillaires diffèrent des forces capillaires latérales conventionnelles existant entre deux particules flottantes par deux aspects : (i) elles opèrent avec des particules de très petites tailles (même inférieure à 10 nm) et (ii) apparaissent entre des particules partiellement immergées dans le film liquide.

L'origine des forces capillaires latérales est la déformation que subit la surface du liquide censée être plane en l'absence de particules. L'importance de la déformation créée par les particules s'accompagne de l'apparition de fortes interactions capillaires entre celles-ci. Il a déjà été démontré l'existence d'une attraction s'exerçant entre deux particules similaires flottant à une interface liquide (Chan et al. 1981; Fortes 1982; Danov & Kralchevsky 2010).

Cette attraction apparaît suite à l'apparition d'un ménisque liquide qui en se déformant induit la diminution de l'énergie gravitationnelle des deux particules qui se rapprochent. Par conséquent, le poids des particules est à l'origine de cette force additionnée de la force d'Archimède. Pour des particules de taille inférieure au micron, ces forces deviennent négligeables car le poids des particules n'est pas suffisant pour déformer l'interface. Si les particules sont situées sur un substrat solide ou dans un film liquide mince, l'interface est déformée par le mouillage. Les interactions attractives associées sont alors dites d'immersion et dépendent des propriétés de mouillage des particules. Elles subsistent même pour des particules de rayon inférieur au micron. Les forces de flottaison et d'immersion peuvent être soit de valeur positive ou négative. Ceci est déterminé par le signe des angles Ψ_1 et Ψ_2 (voir figure 6) formés par le ménisque liquide au contact de la partie immergée des deux particules : la force capillaire est attractive quand $\sin\Psi_1 \sin\Psi_2 > 0$ et répulsive quand $\sin\Psi_1 \sin\Psi_2 < 0$ (Kralchevsky & Denkov 2001).

Les signes de Ψ_1 et Ψ_2 sont définis par convention tel que suit $\Psi > 0$ ($\Psi < 0$) pour un ménisque convexe ou (concave). En présence de forces de flottaison, un angle Ψ supérieur à 0 s'observerait dans le cas de particules légères (y compris les bulles de gaz) alors que pour des particules lourdes on observerait plutôt un angle $\Psi < 0$.

Dans le cas de forces d'immersion créées entre deux particules émergent d'une couche fine aqueuse, l'angle de contact Ψ formé serait supérieur à 0 pour des particules hydrophiles et inférieure à 0 pour des particules dites hydrophobes. Le cas où l'angle de contact serait nul correspondrait à l'absence de déformation du ménisque et par conséquent aucune interaction capillaire n'existerait entre les particules. Ceci est observé quand le poids des particules est trop faible pour provoquer une déformation significative à l'interface.

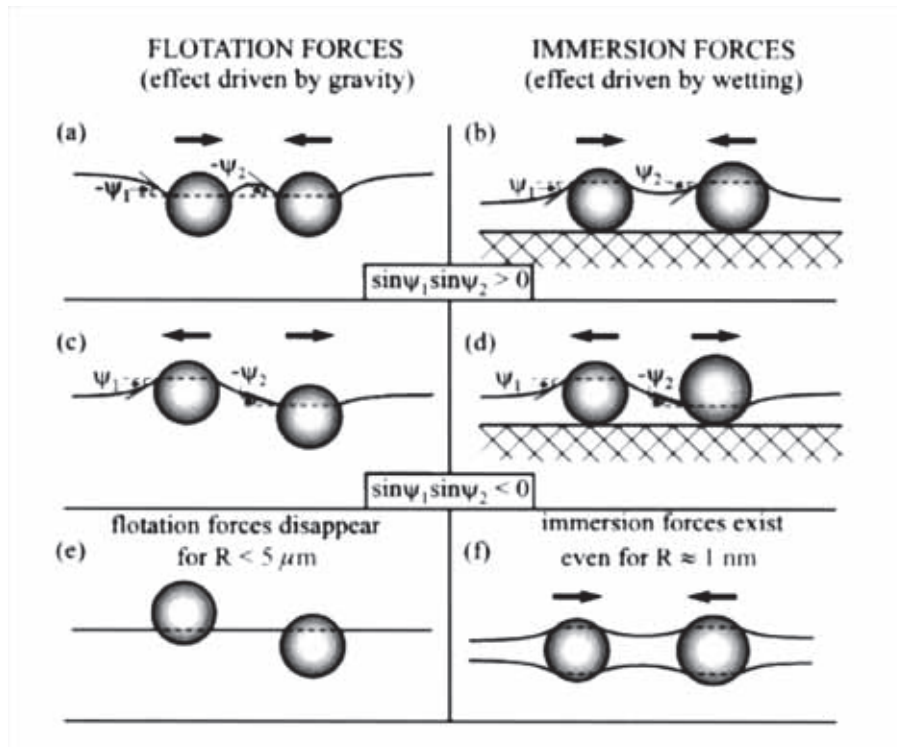


Figure 6. Comparaison entre les forces de flottaison (a, c, e) et d'immersion (b, d, f). Ψ_1 et Ψ_2 sont les angles de contact aux ménisques formés entre le liquide et les particules, α_1 et α_2 sont les angles de contact ; γ est la tension interfaciale. Schéma extrait de (Arditty et al. 2003).

1.4. Organisation des particules aux interfaces d'émulsions et mécanismes de stabilisation

Malgré les nombreuses publications consacrées à la configuration des particules aux interfaces ou dans des films modèles, il est difficile de proposer un schéma de comportement général tant la phénoménologie est riche et dépendante du système considéré (composition surfacique des particules, nature des phases, ...).

1.4.1. Etude des monocouches modèles

Les monocouches modèles de particules à l'interface huile-eau ont fait l'objet de nombreuses études en raison des éléments de compréhension qu'elles apportent sur les interactions inter-particulaires et le comportement et la stabilité des émulsions. L'objectif principal de ces études est la compréhension du comportement de phases des monocouches soumises à une compression.

La plupart des études expérimentales ont été menées avec des interfaces modèles où les particules constituent des monocouches. Cette situation n'est pas forcément représentative des conditions réelles. Dans les émulsions de Pickering, les particules sont adsorbées par agitation mécanique. L'état d'agrégation des particules dans le volume avant adsorption, ainsi que l'intensité de l'agitation influencent l'état final de la couche adsorbée. Ainsi, lorsque les particules sont floculées dans le volume et que l'agitation est faible, il est très probable que l'adsorption s'effectue à l'échelle des agrégats et non à l'échelle des particules individuelles. Seules quelques particules sont ancrées à l'interface, le reste du cluster étant immergé dans la phase continue. Ce cas de figure est analogue à celui d'un polymère dont l'adsorption globale est assurée par l'adsorption de quelques segments.

Stancik et coll., (2003) ont étudié la force d'empilement du réseau de particules à l'interface en soumettant les surfaces couvertes de particules à une force d'extension croissante (Stancik et al. 2003). Les réseaux de particules soumis à des forces d'élongation résistent aux changements conformationnels et finissent par adopter un arrangement rhombique lorsque l'intensité de la force dépasse un certain seuil.

Binks et coll., (2003) ont caractérisé l'état d'adsorption de particules de silice, partiellement hydrophobisées, à l'interface eau/toluène (Binks et al. 2003). Pour cela, une quantité variable de particules dispersée dans le méthanol est directement épanchée à l'interface entre l'eau et le toluène à l'aide d'une micro-seringue. Les auteurs décrivent ensuite l'état de la couche de particules à partir des mesures ellipsométriques. Dans ces conditions, il apparaît que les particules forment une monocouche d'autant plus compacte que la quantité de particule déposée est grande. Si la concentration est excessive, les particules tendent à former une bicouche, ou une monocouche « froissée » dont les « aspérités » ont une amplitude inférieure au rayon des particules, les mesures utilisées ne permettant pas de dissocier ces deux situations.

Simovic et Prestidge (2003, 2004) ont observé une différence de comportement des particules de silice hydrophiles à faiblement hydrophobes aux interfaces en utilisant le polydiméthylsiloxane (PDMS) comme huile modèle (Simovic et al. 2003; Prestidge et al. 2004). De façon prévisible, l'ajout de sels au système s'est traduit par une augmentation de la floculation des particules ce qui est compatible avec l'abaissement des forces de répulsion existant entre particules selon la théorie DLVO. Cependant, des différences majeures ont été observées en cryofracture dans la structure des floculats. Les particules de silice hydrophiles s'attachèrent aux interfaces de façon individuelle sans pré-floculation avérée ; tandis que les particules hydrophobes produisirent des mono et des multicouches même en présence de très faible concentrations en sels. Ceci montre l'existence d'une force additionnelle de type hydrophobe permettant la formation de structures floculées qui permet une meilleure stabilisation de l'interface. Les auteurs ont également observé que le mélange de particules hydrophobes présentant différents angles de contact donnait des émulsions stables alors que le mélange de particules hydrophiles et hydrophobes ne permettait pas stabiliser des émulsions de façon efficace. Ceci a été corrélé à l'existence de forces de répulsions latérales dues aux forces d'immersion (figure 6).

Les travaux de Horozov et Aveyards (2003) mettent en évidence le phénomène inverse. En utilisant des particules de silice de degrés d'hydrophobie variables, ils observèrent que les particules hydrophiles produisaient un réseau de particules agrégées de façon désordonnée alors celles très hydrophobes formaient au contraire un réseau ordonné hexagonal (Horozov et al. 2003).

1.4.2. Mécanismes de stabilisation des émulsions de Pickering

L'étude des interactions particule-particule peut fournir des éléments de compréhension sauf que dans la grande majorité des cas, le processus d'émulsification met en jeu une énergie telle qu'elle peut contrebalancer l'effet des interactions d'origine particulaire.

La figure 7 illustre 4 scénarios d'organisation possible des particules aux interfaces. Le cas (A) représente une monocouche où les particules forment un réseau hexagonal compact où les interactions particule-particule assurent une stabilité du réseau. Le cas (B) montre concrètement des ilots de particules préalablement floculées dans la phase continue et adsorbées dans un second temps à l'interface.

Le cas (C) montre la formation de chaînes latérales de particules à l'interface maintenues en contact grâce à de faibles forces d'attraction d'origine capillaire. Enfin, le cas (D) représente la formation de multicouches de particules agrégées. Les forces mises en œuvre dans cet empilement peuvent être attractives de type particule-interface ou être originaires d'une interaction avec la phase lipophile qui permet de surmonter la répulsion existant entre particules.

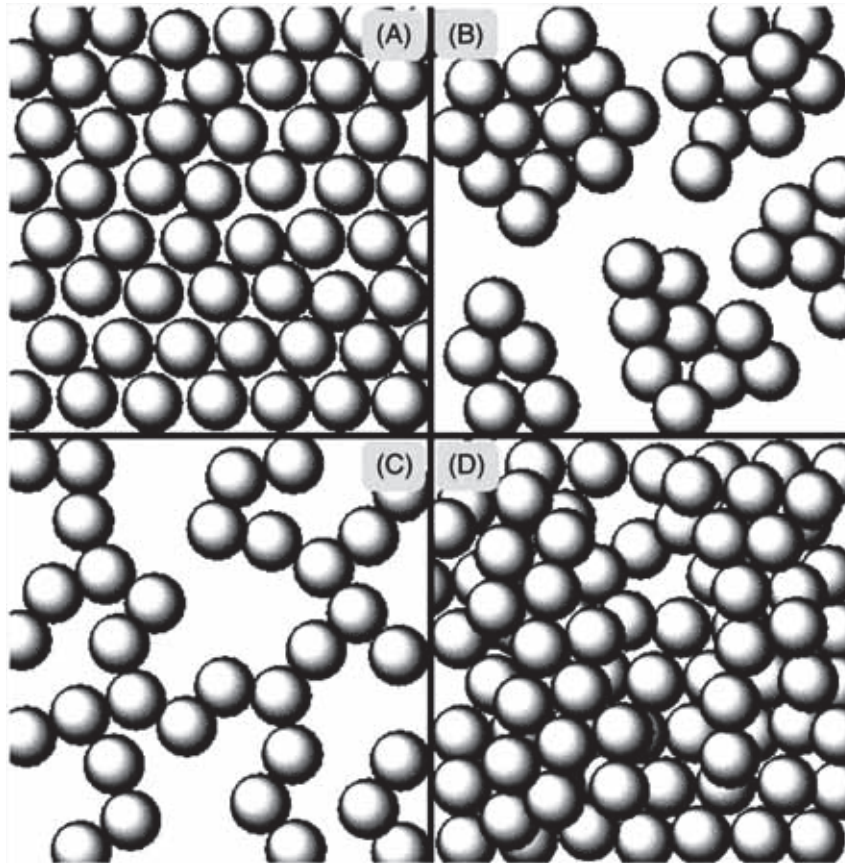


Figure 7. Configurations possibles de l'organisation des particules à l'interface: A) une monocouche avec empilement hexagonal compact de sphères au contact B) ilots de particules de faible concentration C) chaînes de particules de faible concentration disposées latéralement D) Formation de multicouches d'amas de particules en forte concentration. Schéma extrait de (Hunter et al. 2008).

1.4.3. Stabilisation en cas de faible taux de couverture

Vignati et coll.. (2003), ont montré que la stabilisation des émulsions de type huile-eau était possible même avec 15% de la surface recouverte de particules (Vignati et al. 2003). Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse d'un réarrangement des particules de silice aux interfaces. Ces particules sujettes au mouvement brownien sont capables de se mouvoir vers

la zone de contact entre deux gouttes et assurent de ce fait la stabilisation à chaque contact. L'origine de cette localisation préférentielle reste inexpliquée.

La stabilisation à des très faibles taux de couverture a également été décrite dans d'autres systèmes incluant des émulsions stabilisées par des spores de *Lycopodium clavatum* (Binks et al. 2005).

1.4.4. Stabilisation par pontage entre gouttelettes

Un autre mécanisme de stabilisation associé à une faible couverture de l'interface a été observé. Dans ce cas de figure, malgré une insuffisance de la couverture de l'interface, les particules présentes à l'interface d'une goutte peuvent interagir avec une goutte voisine permettant la stabilisation. En travaillant sur la stabilisation d'émulsions par un mélange de polymères à base de tensioactifs polyoxyéthylénés et de particules de silice, Gosa et Uricanu (2002) ont démontré que les chaînes de polymères pouvaient ponter les particules de silice se trouvant à l'interface de deux gouttes (Gosa & Uricanu 2002).

La stabilisation est assurée dans les zones de contact par formation d'une monocouche dense de particules mouillées par l'huile des deux gouttelettes assurant un rôle de pont (Figure 8).

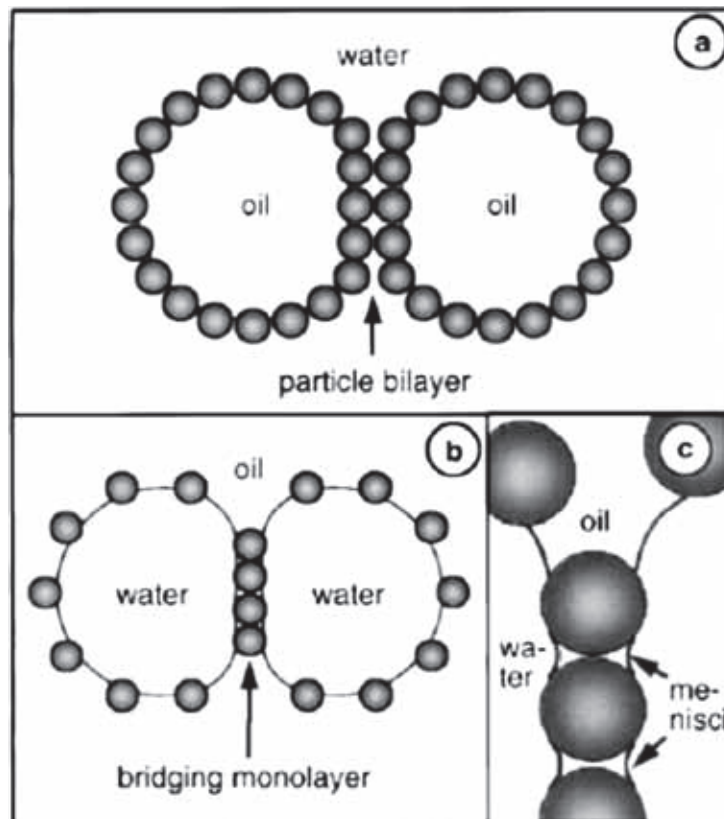


Figure 8. Mécanismes de stabilisation d'émulsions par des particules colloïdales : a) stabilisation stérique des gouttes par des monocouches denses, formant une bicouche au contact b) stabilisation par pontage, les gouttes sont couvertes par des monocouches diluées. Les particules dans les zones de contact forment un pont de particules en monocouche dense. Schéma extrait de (T. S. Horozov et al. 2005).

Vignati et Piazza (2003) ont aussi observé un pontage entre gouttes assuré par des particules sans utilisation de polymères de pontage additionnels.

Stancik et coll.. (2003,2004), ont également mis en évidence ce phénomène de pontage entre interfaces de gouttelettes voisines (Stancik et al. 2004; Stancik et al. 2003).

Leur expérience n'utilise pas de gouttelettes d'émulsion mais des gouttelettes d'huile ou d'eau montées au bout de tubes capillaires et mises en contact avec des surfaces planes. Ces gouttelettes recouvertes de particules mises en contact avec la surface donnent alors naissance à un espace vide entouré d'un anneau de particules qui ponte les surfaces du film. L'anneau se resserre à mesure que le film s'affine, jusqu'à former un disque où les particules s'organisent selon un réseau cristallin bidimensionnel. Cependant, les gouttes n'ont que partiellement coalescé et retrouvent leur intégrité dès séparation de la surface plane.

Horozov et coll. (2005), trouvèrent que des interfaces amenées au contact pouvaient subir un pontage assuré par des particules (T. S. Horozov et al. 2005). Ces dernières à la manière d'une fermeture éclair interfaciale ("interfacial zip") assurent la stabilité en créant une monocouche, serrée et structurée.

De façon remarquable, cette couche continue de "zipper" les particules avoisinantes situées aux deux interfaces, comprimant les particules et les rapprochant d'une façon analogue à la formation d'un cristal (figure 9).

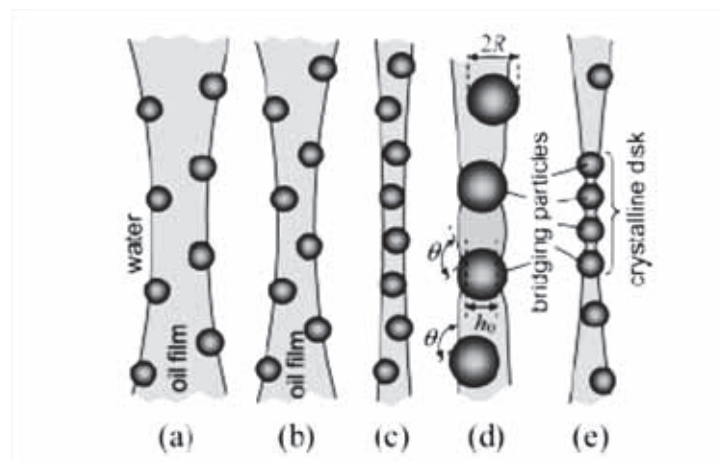


Figure 9. Schéma des « interfacial zips » formés par les particules aux interfaces de deux gouttes d'eau floquées. Schéma extrait de (Horozov et al. 2005).

1.5. Déstabilisation des émulsions de Pickering

1.5.1. Murissement d'Oswald

Le mûrissement d'Oswald est une conséquence de la tension interfaciale existant entre deux milieux non miscibles. Celle-ci engendre une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur appelée pression de Laplace. La pression étant supérieure dans les gouttes de faible rayon, la matière va donc spontanément diffuser des plus petites gouttes vers les plus grosses.

Le transfert de matière entre les gouttes de la phase dispersée s'effectue par diffusion moléculaire à travers la phase continue. Ce mécanisme se produit dès qu'il existe une légère solubilité (à l'échelle moléculaire) de la phase dispersée dans la phase continue.

Le mûrissement d'Oswald affecte très peu les émulsions de Pickering grâce à la très forte adsorption des particules aux interfaces. Cette adsorption quasiment irréversible produit une rigidité interfaciale s'opposant au phénomène.

1.5.2. La coalescence

La stabilité des émulsions de Pickering est contrôlée par la stabilité des films liquides qui séparent les gouttes.

Pour que la coalescence entre deux gouttelettes se produise au sein d'une émulsion de Pickering, il est observé d'abord à l'interface un amincissement du film interfacial ainsi que la formation de trous qui se dilatent jusqu'à causer l'instabilité et la rupture finale du film (Morrison & Ross 2002). Une gouttelette totalement recouverte par des particules, possède à sa surface une barrière énergétique qui doit être impérativement surmontée afin de porter atteinte au film interfacial et provoquer la coalescence. Par conséquent, la cinétique de coalescence peut être corrélée à l'énergie requise pour la formation de trous à l'interface (Simovic et al. 2004).

Lorsque la concentration en particules est faible, la portée des interactions électrostatiques répulsives est diminuée voire supprimée et les gouttelettes formées initialement lors de l'émulsification tendent à se rapprocher et à coalescer. Ce phénomène a pour but d'augmenter la densité des particules stabilisatrices à l'interface et d'assurer donc la stabilité du système.

L'énergie libre d'adsorption des particules à l'interface est tellement importante que les particules sont plus susceptibles de s'écarter latéralement lors du contact avec une autre gouttelette que d'être expulsées vers l'extérieur pendant l'amincissement du film interfacial (Stancik et al. 2004; Tambe et al. 1993; Velikov et al. 1998; Horozov 2008).

Si le contact entre les gouttelettes est forcé, l'anneau de particules formé à la périphérie de la zone de contact s'aplatit graduellement et peut éventuellement se rompre induisant la coalescence. Par conséquent, les forces interparticulaires telles que les forces de répulsions dues à la double couche électrique entourant la particule mais aussi à la répulsion dipôle-dipôle, aussi bien que les forces d'attraction de Van der Waals et les forces capillaires sont de la plus haute importance quant à la stabilisation des émulsions, et peuvent même dominer les interactions particule-interface.

1.5.3. La coalescence limitée

D'un point de vue thermodynamique, la coalescence de deux gouttelettes sphériques obéit à une force correspondant à la différence de pression de Laplace ΔP qui est inversement proportionnelle au rayon (R) de la gouttelette :

$$\Delta P = 2\gamma_{ow}/R \quad (5)$$

Lorsque deux gouttelettes stabilisées par des particules commencent à coalescer, il est possible que la pression de Laplace ne soit plus en mesure de contrebalancer la résistance à la déformation de la couche de particule stabilisatrice. Dans ce cas, le processus de coalescence s'en trouve limité menant à deux entités semi-coalescées de formes intermédiaires.

Ce phénomène de « **coalescence limitée** » caractéristique des émulsions de Pickering a été décrit pour la première fois par Wiley en 1954 (Wiley 1954). L'une des signatures caractéristiques de ce phénomène est qu'il engendre des distributions de taille très resserrées. Comme observé par Whitesides et coll. (1995), le simple fait que la coalescence soit ralentie du fait de la saturation de l'interface en particules ne permet pas d'expliquer la distribution étroite de taille des émulsions de Pickering obtenues très fréquemment (Whitesides & D. S. Ross 1995). Ces auteurs proposent donc une analyse théorique du phénomène de coalescence limitée en régime diffusionnel et turbulent. Dans leur modèle, la probabilité de coalescence au cours d'une collision entre deux gouttes est proportionnelle à la fraction de surface des

gouttes non recouvertes. Les simulations de Monte-Carlo donnent des distributions de tailles beaucoup plus resserrées que celles obtenues à partir d'une fréquence de coalescence unique, et cela en très bon accord avec les résultats expérimentaux. Une autre conclusion intéressante de ces travaux est que la distribution de taille finale est indépendante des conditions d'agitation et de la distribution de taille initiale.

D'une part, la coalescence favorise l'émergence de gouttes de diamètre supérieur à la moyenne pour les raisons expliquées précédemment. D'autre part, une fois formées ces mêmes gouttes seront mieux protégées de la coalescence que la moyenne. En effet, elles résultent de la fusion d'un nombre plus important de gouttes et ont de ce fait accumulé à leur surface une concentration plus élevée de particules solides pour les protéger. Ainsi, il faut s'attendre à ce que les gouttes de grande taille croissent à des vitesses plus faibles que la moyenne et soient rapidement "rattrapées". En d'autres termes, quand le taux de couverture augmente la diminution de la fréquence de coalescence atténue toute fluctuation "par le haut" de la distribution granulométrique.

Arditty et coll. (2003, 2004), montrent qu'effectivement la fréquence de coalescence diminue au cours du processus et que le taux de couverture dépend dans certains cas de l'agitation, notamment lorsque les particules colloïdales sont initialement agrégées (Stéphane Arditty et al. 2004; S. Arditty et al. 2003). À titre d'exemple, la figure 8 montre les courbes obtenues pour des émulsions de même formulation mais agitées de façon manuelle ou en régime turbulent (homogénéisateur haute pression). En mode turbulent, les agrégats de particules sont fragmentés et les émulsions sont cinétiquement stables lorsque le taux de couverture est égal à 0,86 très proche de l'empilement hexagonal compact en monocouche.

En mode d'agitation manuelle, les particules s'adsorbent sous forme d'agrégats et la couverture nécessaire pour atteindre la stabilité est égale à 8,20.

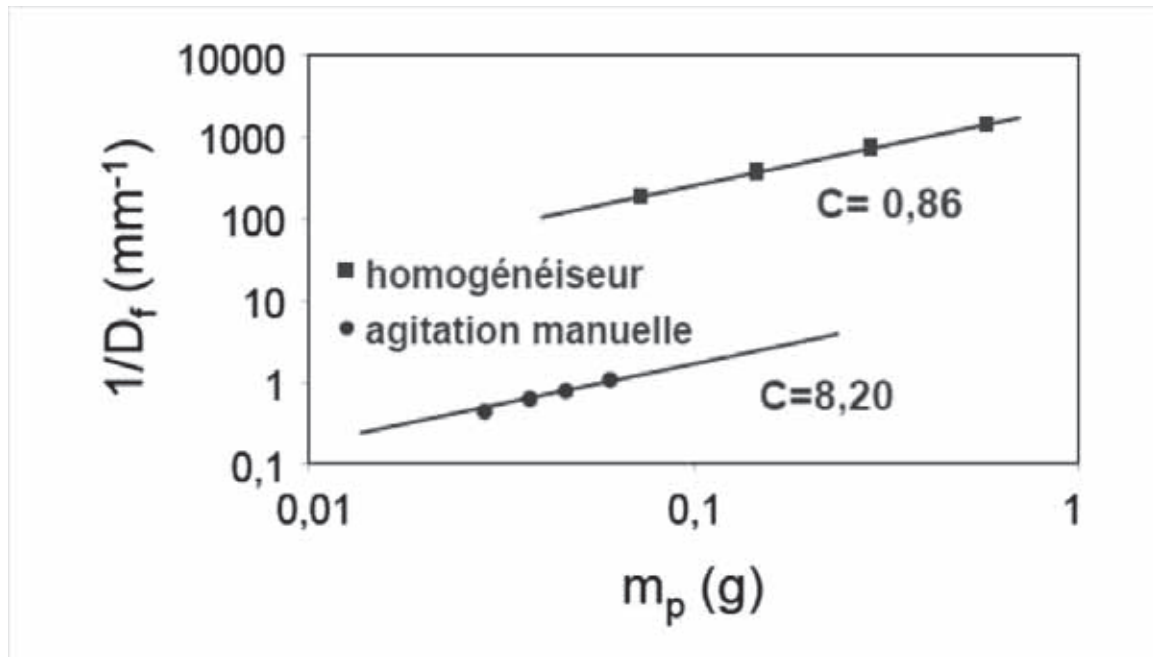


Figure 10. Courbes de coalescence limitée représentée par l'inverse du diamètre en fonction de la masse des particules montrant l'influence du mode d'agitation sur l'arrangement des particules à l'interface. Schéma extrait de (S. Arditty et al. 2003).

Ce processus de coalescence limitée des gouttelettes stabilisées par des particules, a récemment été démontrée *in-situ* par Pawar et coll. (2011). Ces auteurs ont récemment étudié ce phénomène *in situ* en utilisant une technique de micromanipulation (Pawar et al. 2011).

Dans cette étude, des particules de silice de 1.5 μm de diamètre ont été adsorbées à une interface hexadécane-eau avec un angle de contact de $\sim 70^\circ$. Les émulsions obtenues avaient un diamètre de 50 à 200 μm avec un taux de recouvrement variant de 30 à 90%. Ensuite, des gouttelettes individuelles d'hexadécane surmontant des embouts de micropipettes ont été rapprochées et leur comportement vis-à-vis de la coalescence a été étudié.

Pendant la coalescence, on observe une décroissance dans la surface interfaciale et une augmentation de la couverture en particules. Ce phénomène de coalescence continue jusqu'à transformation de l'interface souple et liquide en un film rigide solidifié par l'adsorption accrue de particules.

Le processus de coalescence est ainsi arrêté grâce à la formation de cette couche comportant des particules serrées à l'interface qui résistent à la pression de Laplace.

Il a été observé que le taux de recouvrement des gouttelettes était un paramètre crucial déterminant le timing de la coalescence arrêtée ainsi que la forme finale des deux gouttelettes partiellement coalescées. Ainsi la coalescence de deux gouttelettes de Pickering pouvait survenir suivant trois configurations possibles : une stabilité totale, une coalescence arrêtée ou une coalescence totale (figure 11).

En principe, pour des gouttelettes dont le diamètre est très largement supérieur à celui des particules qui la stabilisent, la couverture de sa surface peut prendre une valeur comprise entre 0 et 0.9.

La valeur supérieure correspondant approximativement à la densité maximum atteinte par des particules sphériques se trouvant dans un plan selon un arrangement compact bidimensionnel ($\phi = \pi/(2\sqrt{3}) = 0.907$).

Lorsque la surface des gouttelettes est complètement couverte par des particules (ϕ_1 et $\phi_2 \sim 0.9$), la coalescence est systématiquement inhibée grâce à la stabilisation stérique favorisée par les particules. Pour des taux de couverture très faible, le phénomène de coalescence observé est total. Pour des taux de couverture intermédiaires ($1.43 < \phi_1$ et $\phi_2 < 1.81$), le phénomène de coalescence arrêté est observé.

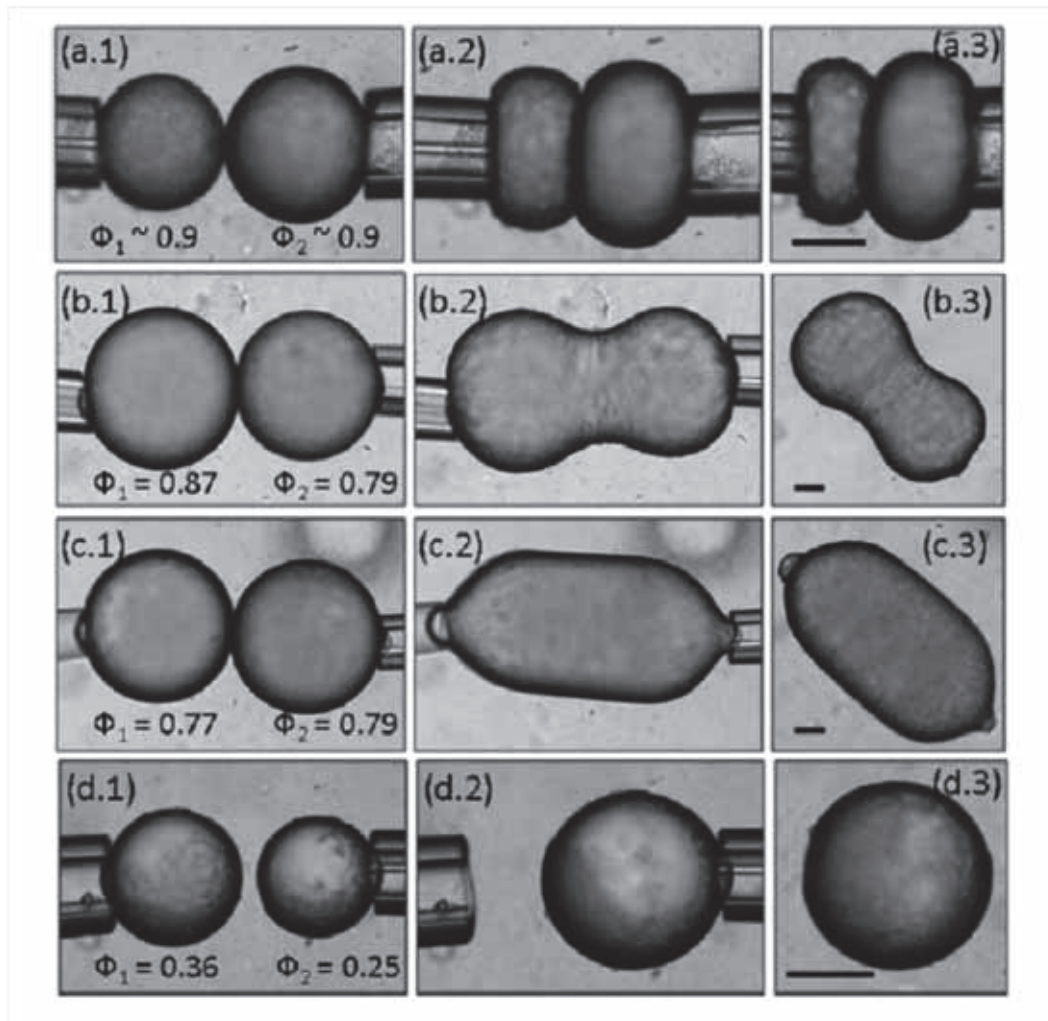


Figure 11. Comportement à la coalescence en fonction du taux de couverture des gouttelettes de Pickering. (a) Stabilité totale, (b) et (c) coalescence arrêtée, et (d) coalescence totale. Échelle = 50 μm . Schéma extrait de (Pawar et al. 2011).

1.6. Particules d'origine biologique pour la stabilisation de Pickering

Jusqu'à présent, la plupart des particules solides utilisées pour stabiliser des émulsions étaient d'origine synthétique (silices, oxydes métalliques, particules de microgels polymériques...). L'utilisation de particules d'origine biologique pourrait constituer une alternative intéressante lorsque les émulsions formulées sont destinées à l'application topique ou orale.

Le tableau 1 montre le nombre d'études entreprises pour exploiter le pouvoir stabilisant des particules d'origine biologique.

Parmi les études les plus récentes, on peut mentionner l'utilisation de spores (Binks et al. 2005), bactéries (Dorobantu et al. 2004), ou du virus de la mosaïque du niébé CPMV (Russell

et al. 2005) comme particules stabilisatrices d'émulsions. Des nanoparticules constituées de virus et d'autres matériaux biologiques sont mono disperse et peuvent même être fonctionnalisées de façon reproductible et robuste.

Les résultats de Dorobantu et coll. (2004) suggèrent que les cellules bactériennes permettent de stabiliser des émulsions en s'assemblant à l'interface huile-eau.

Tableau 1. Exemples de nanoparticules et microparticules d'origine biologique utilisées pour la stabilisation d'émulsion de Pickering de type Huile-Eau

| Nano/micro | Type de particules | Taille des particules | Références |
|------------------------|--|-----------------------|---|
| Nanoparticules | Nanocristaux de Cellulose | 850 nm × 10 nm | Kalashnikova, Bizot, Cathala and Capron (2011) Zoppe et al. (2012) |
| | Particules de flavonoïdes | ~100 nm | Luo et al. (2011) |
| | Nanocristaux de chitine | 240 nm × 20 nm | Tzoumaki et al. (2011) |
| Microparticules | Protéines de soja (produites par spray drying) | | Paunov et al. (2007) |
| | Particules d'amidon hydrophobes | ~5 µm | Yussof and Murray (2011) |
| | | 0.5-15 µm | Marku et al. (2012) |
| | | | Timgren et al. (2011) |
| | | | Murray et al. (2011) |
| | Particules de spores | | Binks, Clint, Mackenzie, Simcock and Whitby (2005); Binks, Boa, Kibble, Mackenzie and Roche (2011) |
| | Bactéries | ~20 µm | Dorobantu et al. (2004) |

Ces structures serrées de particules biologiques ont même été réticulées de différentes manières sans porter atteinte à l'intégrité des virus. Binks et coll. (2005) ont exploré le potentiel de spores de 30µm de diamètre de *Lycopodium clavatum* (figure 10) comme particules stabilisantes (Binks et al. 2005).

Ainsi des émulsions millimétriques ont été stabilisées par ces spores et qui résistent à la coalescence malgré un faible taux de couverture (< 20%).

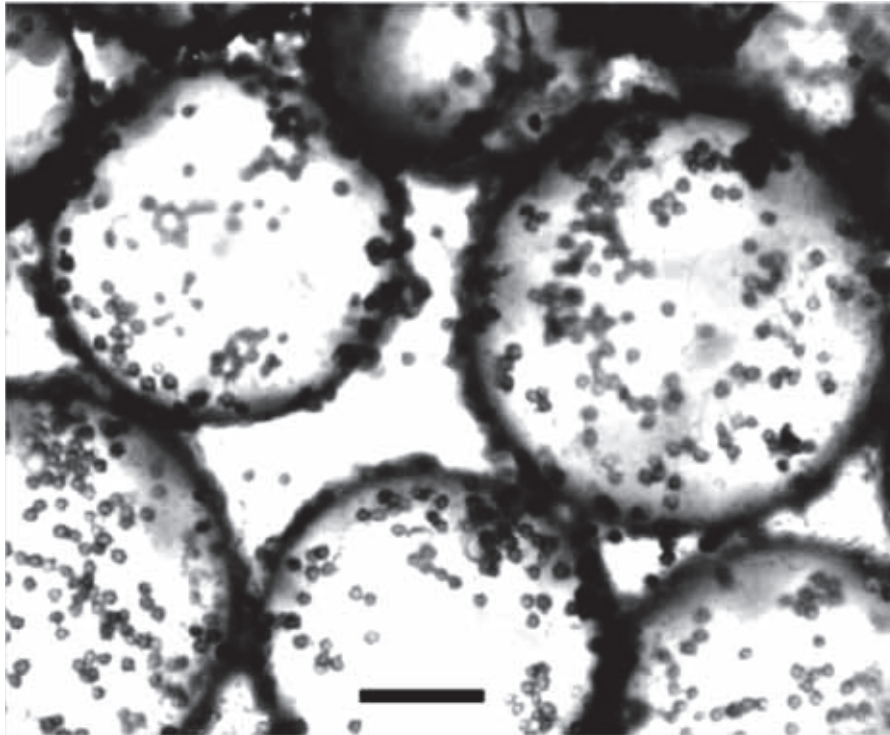


Figure 10. Cliché de microscopie optique d'une émulsion de myristate d'isopropyle stabilisée par des spores de *Lycopodium clavatum*, barre d'échelle = 200 µm. Schéma extrait de (B. P. Binks et al. 2005).

Beaucoup de travaux se sont concentrés sur l'utilisation de particules de grade alimentaire pour leur aptitude à stabiliser des émulsions (Dickinson 2010).

L'utilisation de polysaccharides comme l'amidon ou la cellulose représente une source inépuisable de matériaux particuliers potentiellement exploitables dans les industries alimentaire et cosmétique (Nilsson et al. 2007; Wege et al. 2008; Chen 2009; Murray et al. 2011; Yusoff & Murray 2011).

L'emploi de protéines telle que la caséine représente une approche intéressante pour la stabilisation de Pickering appliquée au domaine alimentaire.

Cette protéine amphiphile pouvant former des micelles et qui stabilise naturellement le lait peut être considérée comme le prototype des particules naturelles douées de propriétés interfaciales intéressantes (Murray et al. 2011).

Des particules d'amidon d'environ 10 μ m ont été utilisées pour stabiliser des émulsions (Murray et al. 2011; Yusoff & Murray 2011).

La surface de ces particules a été rendue partiellement hydrophobe par réaction avec de l'anhydride succinique octényle. Les émulsions de taille millimétrique obtenues subissent un crémage rapide mais montrent une excellente résistance à la coalescence. La figure 11 montre la coexistence de petites particules d'amidon et de leurs agrégats à l'interface huile-eau.

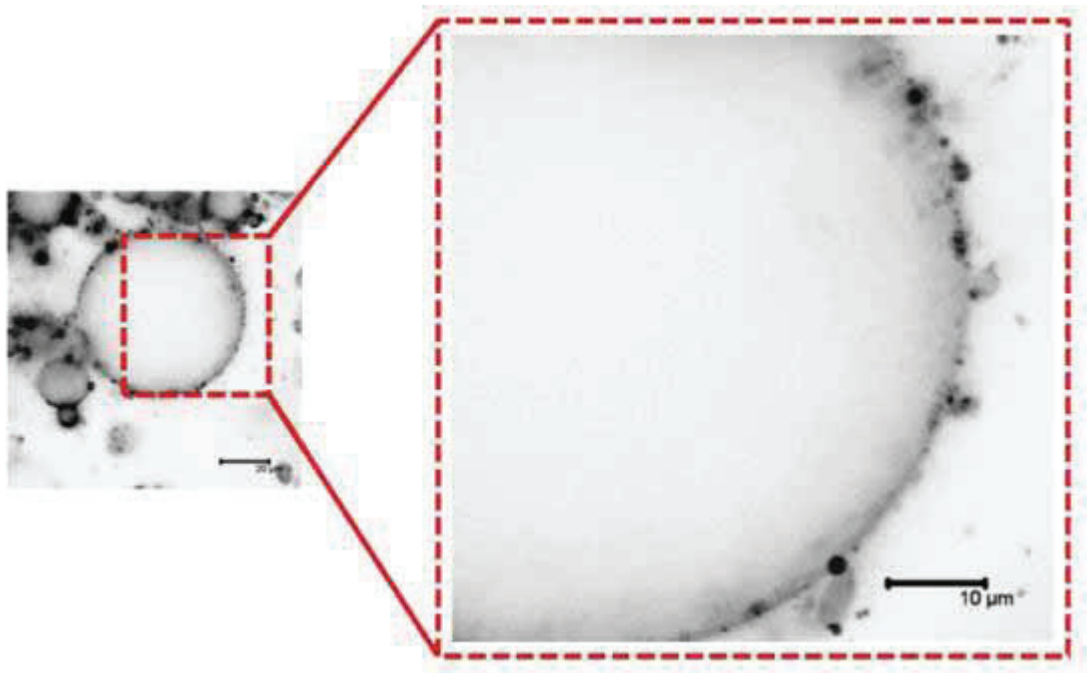


Figure 11. Stabilisation de Pickering d'une émulsion de tétra décane (20%) dans l'eau stabilisée par des particules d'amidon modifiées (3 wt%). Schéma extrait de (Yusoff & Murray 2011).

D'autres émulsions de Pickering potentiellement exploitables dans l'industrie alimentaire ont été récemment décrites. Les nanocristaux de chitine en forme de bâtonnets (20 \times 240 nm) utilisés comme particules stabilisatrices ont été préparés par hydrolyse acide de chitine brute constituant la carapace de crabes (Tzoumaki et al. 2011). Les auteurs ont observé une réduction de la taille des gouttelettes en augmentant la concentration en nanocristaux. En

effet, la taille des gouttes obtenues avec une émulsion composée de 10 wt% en phase interne fut réduite de 100 μm avec 0.01 wt% de chitine à 10 μm quand la concentration en chitine eut atteint 0.05 wt%.

Les émulsions montrèrent une bonne stabilité pendant 30 jours. Un autre mécanisme de stabilisation prit le relais en développant une microstructure de gel formé de gouttes d'huile floculées et piégées dans un réseau viscoélastique de chitine.

Chapitre 2

L'application cutanée

2.1. La peau humaine : généralités

La peau est l'organe le plus important de l'organisme, avec une surface d'environ 1,8 m² et un poids d'environ 4 kg pour un adulte de 70 kg (Roberts, et Walters 2008; Pannatier et al. 1978). C'est un organe hétérogène, composé de plusieurs couches et annexes. Structurellement, la peau est divisée en deux régions très différentes : l'épiderme comportant plusieurs strates cellulaires et le derme formé essentiellement de tissu conjonctif (Smith et Maibach 2006a; Monteiro-Riviere 2010).

La peau permet le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Elle agit comme une **barrière efficace** entre le milieu intérieur et l'environnement extérieur, et protège les organes internes des agressions externes. Elle prévient la perte en eau et empêche la pénétration des substances toxiques et pathogènes. De par son élasticité, elle protège aussi contre les chocs mécaniques.

La peau joue également un rôle essentiel dans la régulation de la température ; cette dernière est régulée par la transpiration et par le flux sanguin. Le flux sanguin 250-300 cm³.min⁻¹ peut augmenter jusqu'à 6000-8000 cm³.min⁻¹ en réponse à une élévation de la température (Cross et Roberts 2005).

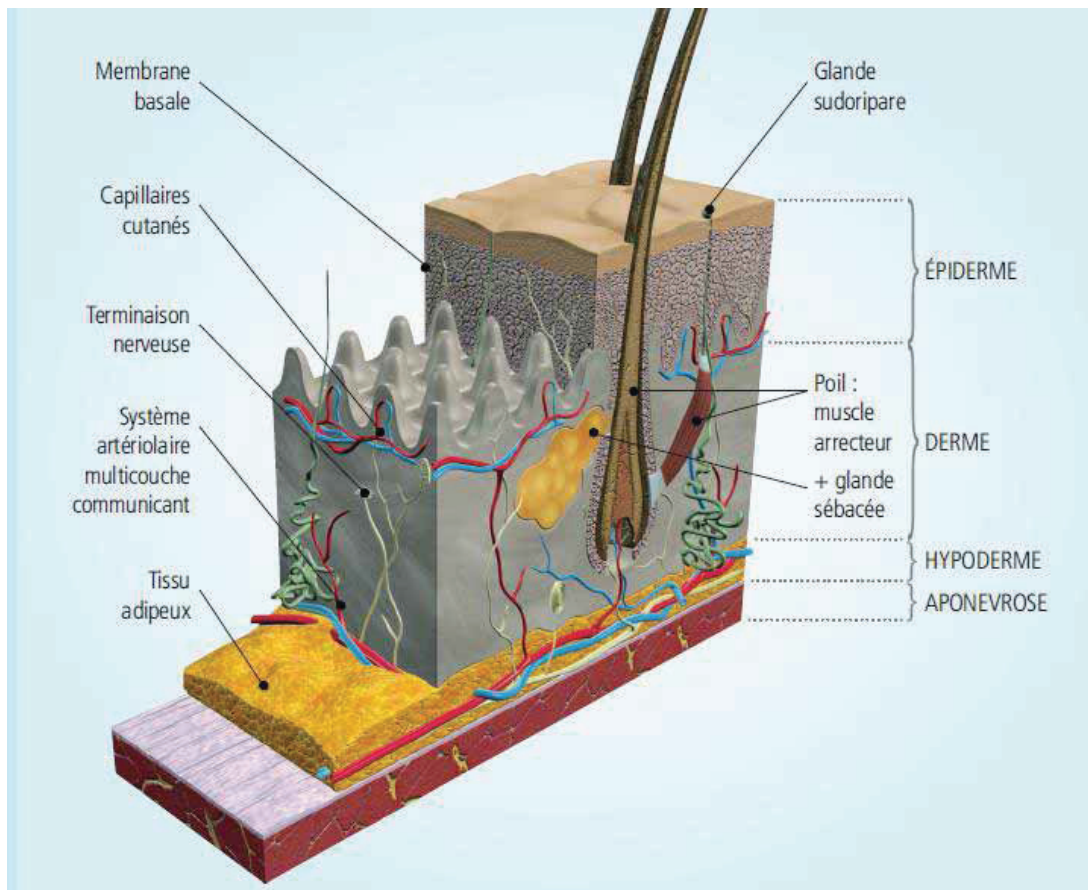


Figure 1. Schéma représentant les différents constituants de la peau.

La peau contient des structures qui confèrent la sensibilité au toucher (cellules de Merkel et nocirécepteurs), l'immunité (cellules de Langerhans), la protection contre les radiations UV (mélanocytes), la réparation et le métabolisme. Enfin, la peau est un organe vivant en continuelle régénération et réparation. Son renouvellement dure 28 jours. Il est continu et peut être accéléré en cas de blessures (Ackerman et Jacobov 1992).

2.2. Structure de la peau

La peau est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

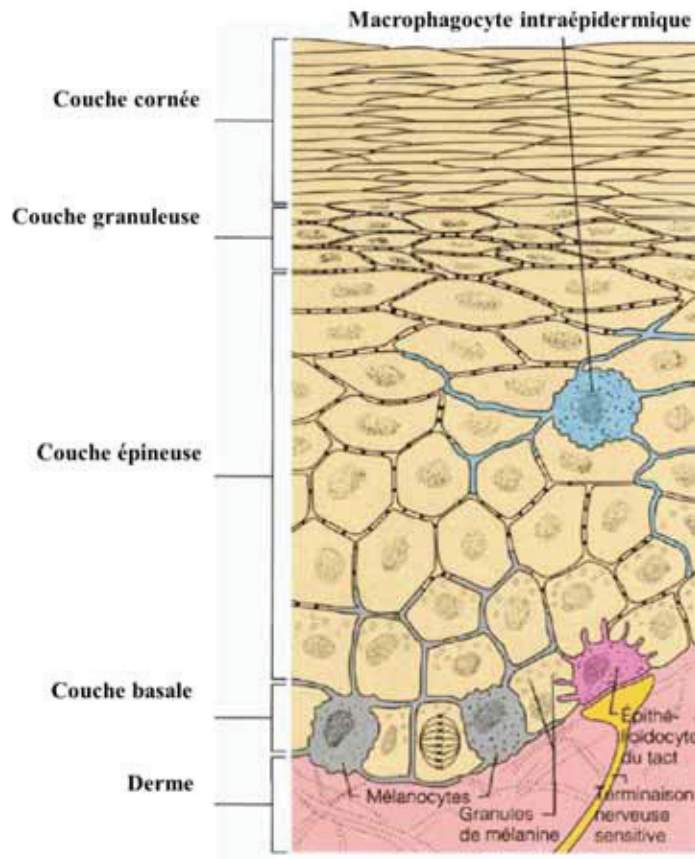


Figure 2. Schéma des différentes couches de l'épiderme.

2.2.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux pluristratifié et kératinisé en perpétuel renouvellement (estimé de l'ordre de 28 jours). De sa surface au derme on retrouve 5 ou 6 couches, basées sur les propriétés des cellules (figure 2). Le nombre de couches varie selon les localisations corporelles. La plupart des cellules épidermiques sont des kératinocytes qui sont formés par différenciation des cellules de la couche basale.

2.2.1.1. La couche cornée ou *stratum corneum*

La couche cornée est la couche la plus superficielle de la peau et son épaisseur est de 10 –20 μm . Elle est composée de cellules mortes, les cornéocytes, qui sont empilées sous forme de couches superposées. Ces cellules sont hexagonales, 40 μm en longueur et 0,5 μm d'épaisseur. Elles sont enveloppées d'une couche protéique qui est particulièrement insoluble et très stable à cause du degré élevé de liaisons des protéines (Madison 2003).

L'épaisseur de la couche cornée est variable selon sa localisation dans le corps. Elle est plus épaisse au niveau des paumes des mains et de la plante des pieds, où la densité de la couche

cornée est élevée (1,4 g.cm⁻³ de tissu sec) et le niveau d'hydratation est bas (15 – 20 %), par rapport au taux d'hydratation de 70 % retrouvés en moyenne pour les autres tissus. Les cellules de la couche cornée sont composées majoritairement de kératine (environ 70 %) et de lipides (environ 20 %), localisés aussi dans la membrane cellulaire (5 %) (Paige, Morse-Fisher, et Harper 1994). La cohésion des cellules est assurée par des desmosomes appelés cornéodesmosomes (Hafttek, Teillon, et Schmitt 1998). La couche cornée est une couche desquamante assurant un renouvellement chaque 2 à 3 semaines.

- la couche compacte (*stratum compactum*) est formée de cellules kératinisées étroitement soudées par les cornéodesmosomes formant une structure compacte. La cohésion cellulaire du *stratum compactum* est assurée par des cornéodesmosomes et des lipides. Cette couche assure la fonction barrière de l'épiderme.

- la couche desquamante ou *stratum disjunctum* est la couche la plus extérieure de la peau. Elle a une épaisseur de 5 µm et à sa surface les cornéocytes desquament. La desquamation est assurée d'une part par la destruction des cornéodesmosomes et d'autre part par le remaniement des lipides.

Les lipides remplissent les espaces intracellulaires entre les cornéocytes. Ces espaces ont une largeur moyenne de 0,1 µm. Ces lipides sont un mélange hétérogène et ils proviennent des corps d'Odland, organites lamellaires contenus dans les cellules du *stratum granulosum* (Madison 2003). Le mélange des lipides intercellulaires est constitué de 45 - 50 % de céramides, 25 % de cholestérol, 15 % d'acides gras à chaînes longues (majoritairement C22 et C24) et 5 % d'autres lipides (sulfate de cholestérol, esters de cholestérol, glucosylcéramides) (Downing, Strauss, et Pochi 1969; Bouwstra et Ponc 2006; Bouwstra et al. 1999; Coderch et al. 2003). Ces différents lipides jouent un rôle important dans la cohésion entre les cornéocytes (Menon et Ghadially 1997; Hafttek, Teillon, et Schmitt 1998).

2.2.1.2. L'épiderme viable

L'épiderme viable est composé de couches de kératinocytes de niveau de différenciation variable. L'épaisseur de l'épiderme viable est d'environ 150 µm (Holbrook et Odland 1975).

La membrane basale (ou lame basale) est située entre le derme et l'épiderme viable. Elle constitue la jonction dermo-épidermique. Elle consiste en de fins feuillets de matrice extracellulaire et est divisée en deux couches, visibles au microscope électronique: la lamina lucida et la lamina densa. Elles contiennent majoritairement des protéines comme le collagène de type IV, la laminine, le nidogène et la fibronectine. Les hémidesmosomes assurent la jonction avec les cellules de l'épiderme. Du côté du compartiment dermique, les fibres d'ancrage composées de collagène assurent la jonction avec le derme.

La couche basale (couche germinative, *stratum germinativum*) adhère à la membrane basale par des cellules spécifiques. Elle contient des kératinocytes qui possèdent une activité métabolique et sont capables de se diviser. Les cellules subissent la différenciation et progressent vers les couches les plus superficielles de l'épiderme : *stratum spinosum*, *stratum granulosum* et finalement *stratum corneum*.

La couche épineuse (*stratum spinosum*) est constituée de 3 à 4 couches de cellules au dessus de la couche basale. Ces cellules sont liées par des jonctions adhésives ou desmosomes (Brandner, Haftek, et Niessen 2010; Mahoney et al. 2010).

Dans cette couche on trouve des mélanocytes qui produisent : la mélanine le pigment principal de la peau humaine, des cellules de Langerhans ayant un rôle important dans le système immunitaire (Larsen et al. 1990; Merad et al. 2002) .

Les cellules de Merkel sont également présentes à ce niveau et ont un rôle de récepteur sensoriel du toucher.

Les cellules du *stratum spinosum* migrent vers la troisième couche de l'épiderme : couche granuleuse *stratum granulosum*. Ces cellules produisent les lipides extracellulaires de la couche cornée. La couche claire (*stratum lucidum*) est présente uniquement au niveau des paumes des mains et de la plante des pieds. Elle est composée de cellules aplaties et compactes. La dernière couche de l'épiderme viable est en contact avec des cellules mortes de la couche cornée.

2.2.2. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent des cellules, des fibres de collagène et des fibres élastiques. Son épaisseur est de 0,2 à 0,3 cm. Contrairement à l'épiderme le derme contient des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des nerfs.

Le derme est séparé en deux parties appelées derme papillaire (1/5^{ème} du derme) et situé immédiatement sous la jonction dermo-épidermique et le derme réticulaire qui occupe les 4/5^{ème} du derme.

C'est un tissu conjonctif composé de fibres de collagènes et d'élastine qui baignent dans une matrice extracellulaire composée de protéoglycannes, glycosaminoglycannes, protéoglycannes, de composants fibreux et de glycoprotéines de structure. Des glycosaminoglycannes (l'acide hyaluronique, entre autres) et protéoglycannes forment un gel souple très hydraté. La pression exercée par ce gel très hydraté s'oppose aux forces de compression. Les composants fibreux sont le collagène (70 %) et les fibres élastiques (élastine). Les glycoprotéines de structure sont la fibronectine et la ténascine.

La cellule dominante du derme est le fibroblaste. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse du matériel extracellulaire. Ils synthétisent le collagène, l'élastine, la substance fondamentale de la matrice extracellulaire et les glycoprotéines de structure. Leur activité est intense lors de la cicatrisation. Dans le derme on retrouve aussi des mastocytes, macrophages et leucocytes qui jouent un rôle dans les réponses inflammatoire et immunologique.

En plus de son rôle de soutien, le derme assure la nutrition de l'épiderme (de par sa riche vascularisation), mais aussi joue un rôle dans la régulation de la température, de la pression et de la sensation de douleur.

2.2.3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et constitue 15 à 20 % du poids corporel. C'est un réseau de cellules graisseuses (adipocytes) qui sont regroupées sous forme de lobules et attachées au derme par des fibres de collagène et d'élastine. On y trouve aussi

des fibroblastes et des macrophages. Elle agit comme isolant thermique, protège contre les chocs et constitue aussi un réservoir énergétique.

2.2.4. Les annexes cutanées

Dans le derme et dans la partie supérieure de l'hypoderme se trouvent les follicules pilosébacés, les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les phanères (ongles et cheveux). Les annexes sont présentes sur tout le corps mais leur nombre varie beaucoup selon l'endroit.

Des follicules pilosébacés sont des invaginations tubulaires épidermiques produisant les poils ou les cheveux et le sébum. Ils se trouvent sur le corps entier à l'exception des lèvres, de la paume des mains et la plante des pieds. La peau humaine contient 40 à 70 follicules pilosébacés par cm^2 .

Des glandes sudoripares excrètent la sueur. Elles ont une structure tubulaire. Chez l'homme en moyenne on trouve 200 à 250 glandes sudoripares par 1 cm^2 . On distingue deux types de glandes sudoripares:

- les glandes sudoripares eccrines, présentes sur toute la surface corporelle. Ces glandes sont responsables de la transpiration, dont la régulation dépend de l'état nerveux.

- les glandes sudoripares apocrines, annexées aux glandes sébacées et aux poils, sont abondantes dans les régions axillaires (aine, aisselle) et urogénitales. Leur rôle chez l'homme reste mal connu.

Les glandes sébacées sont des glandes acineuses en grappe, réparties dans le derme moyen sur toute la surface corporelle (sauf au niveau des paumes des mains et de la voûte plantaire).

Les glandes sébacées sont en nombre variable selon la région cutanée, pouvant aller jusqu'à 900 par cm^2 . Les lipides du sébum sont constitués de cires, de triglycérides, d'acides gras, de squalènes et en faible quantité, de cholestérol et d'esters de cholestérol. Le sébum protège et lubrifie la peau et maintient le pH de la peau autour de 5. La surface cutanée est recouverte d'un film hydrolipidique défini comme une émulsion sébum – sueur, la phase lipidique étant composée de sébum excrété par les glandes sébacées et la phase aqueuse ayant pour origine la sueur et l'eau provenant de la perte insensible en eau.

2.3. Mécanismes de transport à travers la peau

2.3.1. Aspects théoriques

Différents facteurs interviennent dans la diffusion d'une substance à travers la peau, tels que la constante de perméabilité et le coefficient de partage. De plus le transport d'une substance chimique à travers la peau peut être modélisé par la première loi de diffusion de Fick (Crank 1979).

$$j = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1)$$

Cette loi décrit le flux d'une molécule (exprimé en unité de masse/cm²) à un temps donné qui est proportionnel au gradient de concentration sur une distance donnée. Le signe négatif indique un flux net en direction d'une activité thermodynamique décroissante (représentée par la concentration).

La seconde loi de Fick décrivant le flux d'une substance traversant une membrane s'écrit :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Par ailleurs, la première loi de Fick peut être utilisée pour décrire le processus de diffusion dans les couches individuelles de la peau considérées dans ce cas comme des pseudo-membranes homogènes (Scheuplein et Blank 1971).

Ainsi, pour une membrane d'épaisseur h , le flux à l'équilibre donne :

$$J_{eq} = D(C_1 - C_2)/h \quad (3)$$

Où C_1 , C_2 sont les concentrations de l'actif aux deux faces de la membranes (à $x=0$ et $x=h$). D étant le coefficient de diffusion effectif dans une membrane hétérogène telles le stratum corneum.

De part sa structure, le *stratum corneum* contrôle l'absorption dermique des substances chimiques et la concentration à $x=h$ tend vers 0. Aussi, la concentration de l'actif à $x=0$ est en équilibre avec celle du véhicule : $C_1 = K_m C_v$ où K_m est le coefficient de partage de l'actif entre le véhicule et le stratum corneum (le plus souvent représenté par le coefficient de partage octanol/eau ou Log P) et C_1 sa concentration dans le véhicule. Sous ces conditions, l'équation 3 s'écrit :

$$J_{eq} = \frac{D \cdot K_m}{h} \cdot C_v = K_p \cdot C_v \quad (4)$$

Avec :

J_{Eq} : flux percutané d'une substance à l'équilibre exprimé en $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$

k_p : le coefficient de perméabilité exprimé en $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$

D : le coefficient de diffusion exprimé en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

h : la longueur de la voie de diffusion de la molécule exprimée en m

Le coefficient de perméabilité est une vitesse qui ne dépend pas de la concentration de la substance mais uniquement des caractéristiques du soluté et de la membrane. **Le coefficient de partage** est appliqué à la distribution d'une substance entre deux différentes phases adjacentes à l'équilibre. Une valeur élevée de K_m indique une affinité importante de la substance pour le *stratum corneum*, et par conséquent une meilleure diffusion.

Typiquement, le flux à l'équilibre et le coefficient de perméabilité sont déterminés à partir d'expériences de pénétration cutanée in vitro. La concentration dans le compartiment donneur est maintenue constante (conditions de doses infinies) alors que des conditions « *sink* » sont appliquées dans le compartiment receveur. Durant l'expérience, le flux J approche de l'équilibre, et la quantité cumulée pénétrant la peau augmente. La pente de la droite représentant la quantité cumulée en fonction du temps donne le flux à l'équilibre (Crank 1979; Scheuplein et Blank 1971).

D'après l'équation 4, le coefficient de perméabilité est le ratio du flux à l'équilibre et de la concentration de l'actif dans le véhicule.

Le temps de rétention du perméat ou « lag-time » résulte de l'extrapolation de la partie linéaire de la courbe à l'axe du temps (figure 3)

Le temps de rétention, lequel selon la deuxième loi de diffusion de Fick peut être mathématiquement exprimé par :

$$t_r = \frac{h^2}{6D} \quad (5)$$

Où t_r est le temps de rétention (h), D le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) et h l'épaisseur de la couche cornée (μm)

Le temps nécessaire pour que la perméation à travers une membrane puisse atteindre 95% du flux à l'équilibre a été estimé à 2.3 fois le temps de latence.

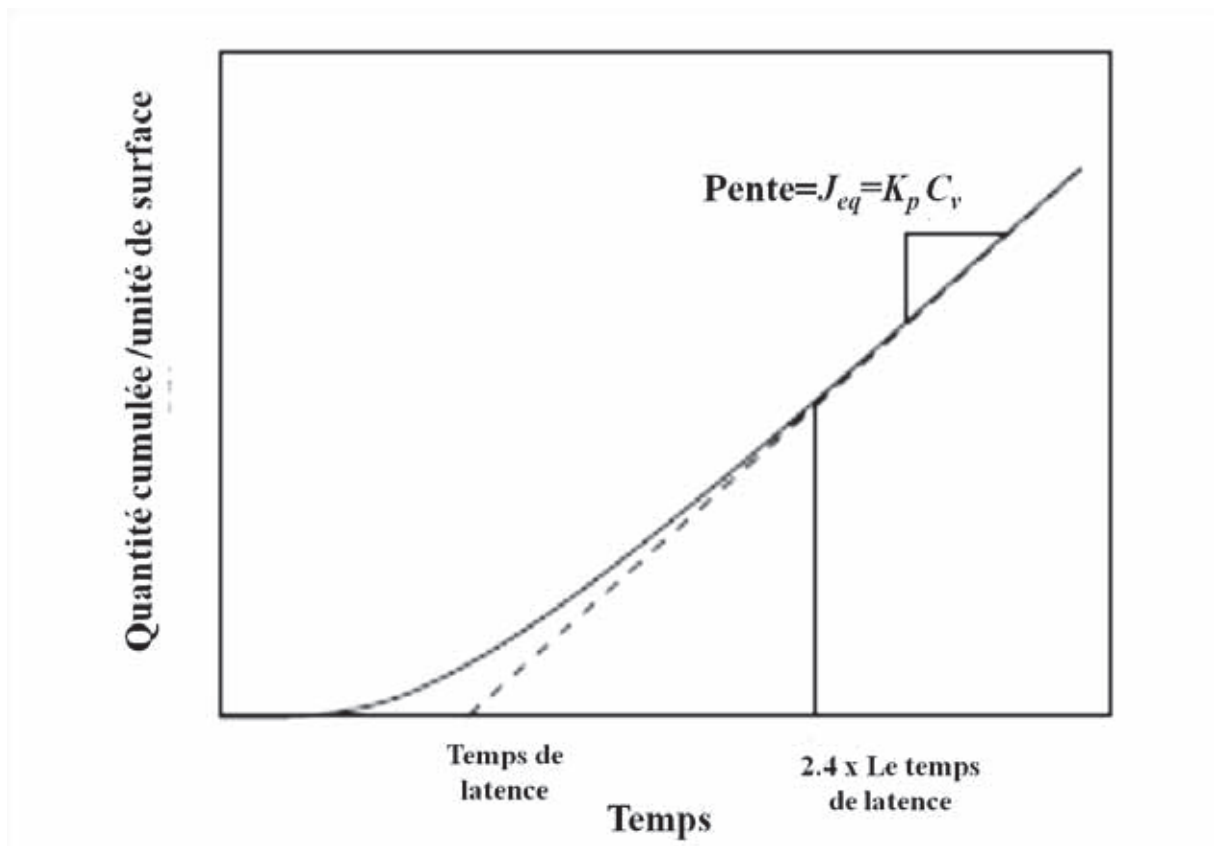


Figure 3. Illustration de la relation entre la quantité cumulée de substance pénétrant la peau par unité de surface avec : le flux à l'équilibre J_{eq} , le coefficient de perméabilité K_p et le temps de latence.

2.3.2. Structure de la peau et perméation

La fonction principale de la peau est de protéger le corps des agressions extérieures. Le *stratum corneum* joue un rôle majeur dans cette fonction barrière.

Le transport des molécules à travers la peau est un phénomène complexe résultant à la fois des propriétés de ces molécules mais aussi des interactions qu'elles peuvent développer avec les constituants de la peau.

Prenant en compte la structure et composition chimique de la couche cornée et les propriétés physico-chimiques du perméat, on distingue trois mécanismes majeurs de l'absorption cutanée :

- a. **Le passage transcellulaire** : la molécule active est transférée à travers les cornéocytes suite à son partage entre la kératine qui les constitue et le véhicule.
- b. **Le passage intercellulaire** : la molécule active emprunte un chemin entourant les cornéocytes via les régions riches en lipides. Ce passage dépend de manière prépondérante de l'organisation des lipides au sein du *stratum corneum* (J. Bouwstra et Ponc 2006; J.A Bouwstra et al. 1999; Jungersted et al. 2010).
- c. **Le passage par les annexes de la peau** : la molécule active contourne les cornéocytes en suivant une voie de shunt existant à la base du follicule pileux, des glandes sébacées ou des glandes sébacées. Malgré la faible surface qu'offrent ces structures (0.1-1% de la surface totale), ce mode de pénétration n'est pas considéré jouer un rôle prépondérant dans l'absorption de bon nombre d'actifs (Jonathan Hadgraft 2002). Cependant, cette voie peut s'avérer d'une importance significative lorsque les actifs sont appliqués sur le scalp, où la densité et la taille des follicules pileux sont importantes. Les annexes peuvent constituer des voies de "shunt", permettant le transport transcutané rapide pour de grandes molécules polaires (Scheuplein, 1967 ; Feldman et Maibach, 1967). Les glandes sébacées peuvent également agir comme des réservoirs pour certaines molécules actives (Scheuplein 1967; Agarwal, Katare, et Vyas 2000; Bernard, Dubois, et Wepierre 1997; Tregear 1961; Ogiso et al. 2008).

La perméation d'une substance obéit à un processus de diffusion. Pour de nombreux actifs hydrophiles, le *stratum corneum* lipophile constitue une barrière limitante de la diffusion. Pour des substances très lipophiles, c'est l'épiderme de nature hydrophile qui s'y oppose. Lorsqu'une substance chimique diffuse à travers l'épiderme et le derme, elle est résorbée par le système sanguin ou lymphatique. Si le flux sanguin est insuffisant, cette substance peut s'accumuler et constituer un réservoir dans l'épiderme viable ou dans les tissus profonds.

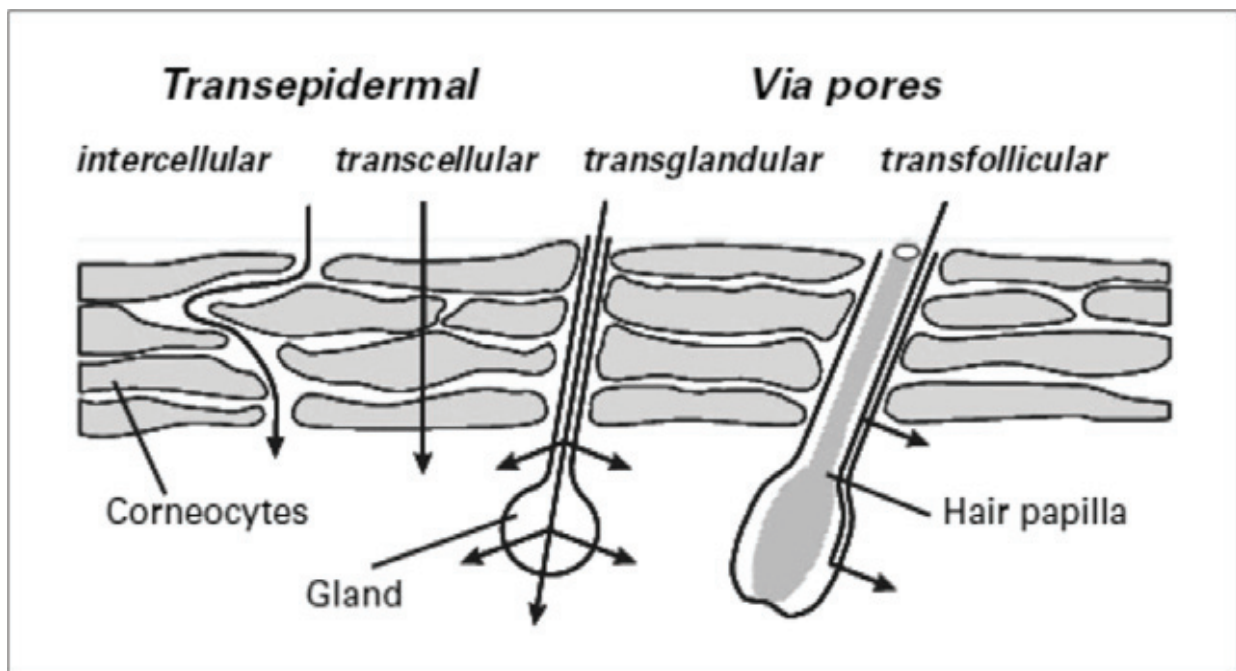


Figure 4. Voies de perméation à travers la peau. Adapté de (Trommer et Neubert 2006a).

Une fois la substance dans la couche cornée, celle-ci diffuse ensuite vers les couches viables de la peau (l'épiderme viable et le derme) selon un gradient de concentration. Le deuxième procédé de passage se produit : à partir des lipides bien structurés dans l'espace intercellulaire de la couche cornée vers un tissu majoritairement hydrophile. La solubilité dans l'eau est en effet nécessaire pour qu'une molécule puisse pénétrer dans cette couche hydrophile de la peau. Ensuite, la diffusion de la substance dans les couches viables de la peau se produit. Les molécules de caractère lipophile modéré diffusent facilement.

2.3.3. Influence des propriétés physico-chimiques des actifs sur leur pénétration cutanée

2.3.3.1. Etat physico-chimique

La disponibilité d'un actif pour la peau varie selon qu'il soit sous forme solide ou en solution. L'absorption à partir de poudres peut survenir même en l'absence d'hydratation de la peau (Romonchuk et Bunge 2006). Cependant, l'absorption d'actifs en solution est rapide que sous forme de poudre.

2.3.3.2. Poids moléculaire / Taille moléculaire

La taille moléculaire d'une substance est un facteur important pour sa perméation à travers une membrane (Cussler 1997). Théoriquement, le volume moléculaire d'une substance peut constituer un meilleur moyen de prédiction que le coefficient de perméation K_p (Patel, Berge, et Cronin 2002). Les équations utilisées pour estimer celui-ci ont été dérivées de bases de données établies avec principalement des hydrocarbures. Le ratio du poids moléculaire sur le volume moléculaire est relativement constant pour la plupart des hydrocarbures, ce qui rend l'estimation du K_p (basée sur le poids moléculaire) assez fiable.

Il a été démontré une décroissance exponentielle du flux en fonction du poids moléculaire (Magnusson et al. 2004). Ainsi, l'absorption de molécules dont le poids moléculaire dépasse 500 daltons à travers une peau normale est très faible (Bos & Meinardi 2000).

2.3.3.3. Degré d'ionisation

Les espèces ionisées pénètrent très peu la peau. Les coefficients de perméabilité dans le *stratum corneum* des composés à l'état non ionisé sont 1 à 2 fois supérieurs à ceux mesurés pour les mêmes composés à l'état ionisés (Hadgraft 2002).

Cependant, l'effet de l'ionisation d'une molécule est moins marqué lors de l'estimation des flux maximaux (Magnusson et al. 2004). La relation entre les formes ionisée et non ionisée d'une molécule dépend de la lipophilie de la forme non ionisée, et en particulier du véhicule et de l'existence du sel correspondant. Certains auteurs affirment que les effets d'ionisation sont différents pour les acides et les bases (Abraham et Martins 2004). Ils font valoir que K_p pour la forme neutre [K_p (n)] d'un acide est beaucoup plus grande que K_p de la forme ionisée [K_p (I)]. Cette faible perméation des molécules ionisées est expliquée par leur diffusion lente à travers le *stratum corneum* (Zhang et al. 2012).

2.4. Modulation de l'absorption cutanée

D'après l'équation 4 (voir 2.3.1.), le flux percutané (J) d'une substance à travers une membrane d'épaisseur (h) est gouverné par le coefficient de diffusion (D) de celle-ci dans le stratum corneum, de sa concentration effective (C_v) dans le véhicule ainsi que de son coefficient de partage (K_m) entre la formulation et le *stratum corneum*.

Ainsi, le flux des substances actives dans la peau peut être optimisé par :

- Une activité thermodynamique maximale du perméant dans son véhicule ;
- L'utilisation des actifs dans un état de supersaturation ;
- L'incorporation de promoteurs de pénétration qui agissent par augmentation de la solubilité du perméant dans la peau ou par stimulation de la diffusivité à travers la peau.

2.4.1. Activité thermodynamique des actifs et pénétration dans la peau

L'activité thermodynamique d'un perméant est à l'unité quand le perméant est à saturation dans le véhicule. Il a été démontré qu'en l'absence d'interactions entre la peau et le véhicule, le flux d'une substance active était le même à partir de différents véhicules où elle se trouvait dans un état de supersaturation. Cependant, le transport transmembranaire d'une substance était linéairement proportionnel au degré de supersaturation (Davis et Hadgraft 1991; P. Santos et al. 2011).

Dans des systèmes sous saturés, l'activité thermodynamique des actifs se trouve diminuée et dépend du gradient de concentration (simplifiée à la concentration) dans le véhicule mais aussi du coefficient d'activité du perméant (Otto, Du Plessis, et Wiechers 2009).

La corrélation entre l'activité thermodynamique et la concentration est donnée par l'équation 6.

$$a_v = \gamma_v c_v \quad (6)$$

Où a_v est l'activité thermodynamique, γ_v est le coefficient d'activité et c_v la concentration du perméant dans le véhicule. Dans des solutions diluées où les interactions entre les molécules actives et le véhicule sont négligeables, l'activité thermodynamique est égale à la concentration. Cependant, dans des systèmes plus concentrés et des formules plus complexes,

les interactions entre molécules, mais aussi entre molécules et véhicule environnant ne peuvent plus être négligées. Il s'ensuit une diminution de l'activité thermodynamique du perméant qui devient inférieure à la concentration et dépendra du coefficient d'activité γ_V .

En substituant c_V dans l'équation 4, et en déterminant que le coefficient de partage est défini comme le rapport entre le coefficient d'activité du perméant dans le véhicule et dans la peau ($K = \gamma_V/\gamma_P$), le flux du perméant dans le véhicule en fonction de l'activité thermodynamique est donné par l'équation 4 (HIGUCHI 1960).

$$J = \frac{Da_V}{h\gamma_S} \quad (7)$$

Un autre facteur crucial influençant l'activité thermodynamique d'une substance appliquée sur la peau est sa solubilité. En effet, en comparant deux véhicules sursaturés contenant la même substance active, il a été observé que l'activité thermodynamique était augmentée lorsque l'actif était faiblement soluble dans son véhicule. Ce résultat intéressant permet de prédire la tendance d'un actif à quitter son véhicule (son activité thermodynamique) seulement en connaissant sa solubilité dans le véhicule et en la corrélant au flux.

Cette corrélation n'est admise qu'en l'absence d'interactions entre le véhicule et la peau (Shahi et Zatz 1978).

La théorie de la solubilité prône que si les paramètres de solubilité dans le véhicule et la peau sont similaires, le flux de la substance active dans la peau s'en trouve optimisé.

2.4.2. Supersaturation et pénétration cutanée

La formulation d'un principe actif en supersaturation dans une formule induit une activité thermodynamique supérieure à l'unité avec une augmentation du flux proportionnelle au degré de saturation (P. Santos et al. 2011; Moser, Kriwet, Froehlich, et al. 2001).

Par conséquent, la réalisation d'une supersaturation dans une formule appliquée à la peau peut être une approche intéressante afin d'optimiser le passage transdermique sans affecter les propriétés de barrière de la peau (Pellett et al. 1997).

Un des inconvénients majeurs de l'utilisation de ces véhicules super saturés en principes actifs est l'instabilité des formules dans le temps à cause de la recristallisation des substances

actives. Ceci amène à une perte de leur rôle dans l'optimisation de la perméation et rend leur conservation problématique. Pour cela, des systèmes où la super saturation est obtenue *in situ* après application en utilisant des solvants volatils a été explorée. Ceci a notamment été réalisé en utilisant un système aérosol délivrant de la beclomethasone dipropionate dans des formules contenant de l'éthanol. L'application de ces formules sur la peau a permis d'augmenter la perméation de la beclomethasone suite à la super saturation induite par l'évaporation de l'éthanol. Il a cependant été observé que selon le pourcentage en éthanol de la formule pulvérisée (10 ou 20%) le temps de latence pour créer une super saturation voire induire une recristallisation était différent. En effet, dans le cas de 10% en éthanol, la supersaturation n'était obtenue qu'après 30 minutes de latence. L'augmentation du pourcentage d'éthanol a permis de réduire ce temps de latence mais causait une recristallisation rapide de l'actif *in situ* (Reid, Jones, et Brown 2009). D'autres approches ont été testées pour éviter la recristallisation des substances actives présentes dans un état de super saturation dans les formules pour application cutanée. L'une d'elles consiste à utiliser des agents anti-nucléation tels l'hydroxypropylmethyl cellulose (Raghavan et al. 2001), la carboxymethyl cellulose (Moser, Kriwet, Kalia, et al. 2001b), et la polyvinyl pyrrolidone (Megrab, Williams, et Barry 1995). D'autres auteurs ont démontré la possibilité de créer une super saturation et par conséquent améliorer la pénétration des actifs à travers la peau en utilisant soit des actifs sous leur forme amorphe (Inoue et al. 2005), ou par la formation de complexes avec l'hydroxypropyl cyclodextrine (Iervolino, Raghavan, et Hadgraft 2000) ce qui eut pour effet d'augmenter la solubilité des actifs utilisés.

2.4.3. Promoteurs d'absorptions

Un effet promoteur de l'absorption cutanée des substances actives peut être réalisé en utilisant différents composés (figure 5).

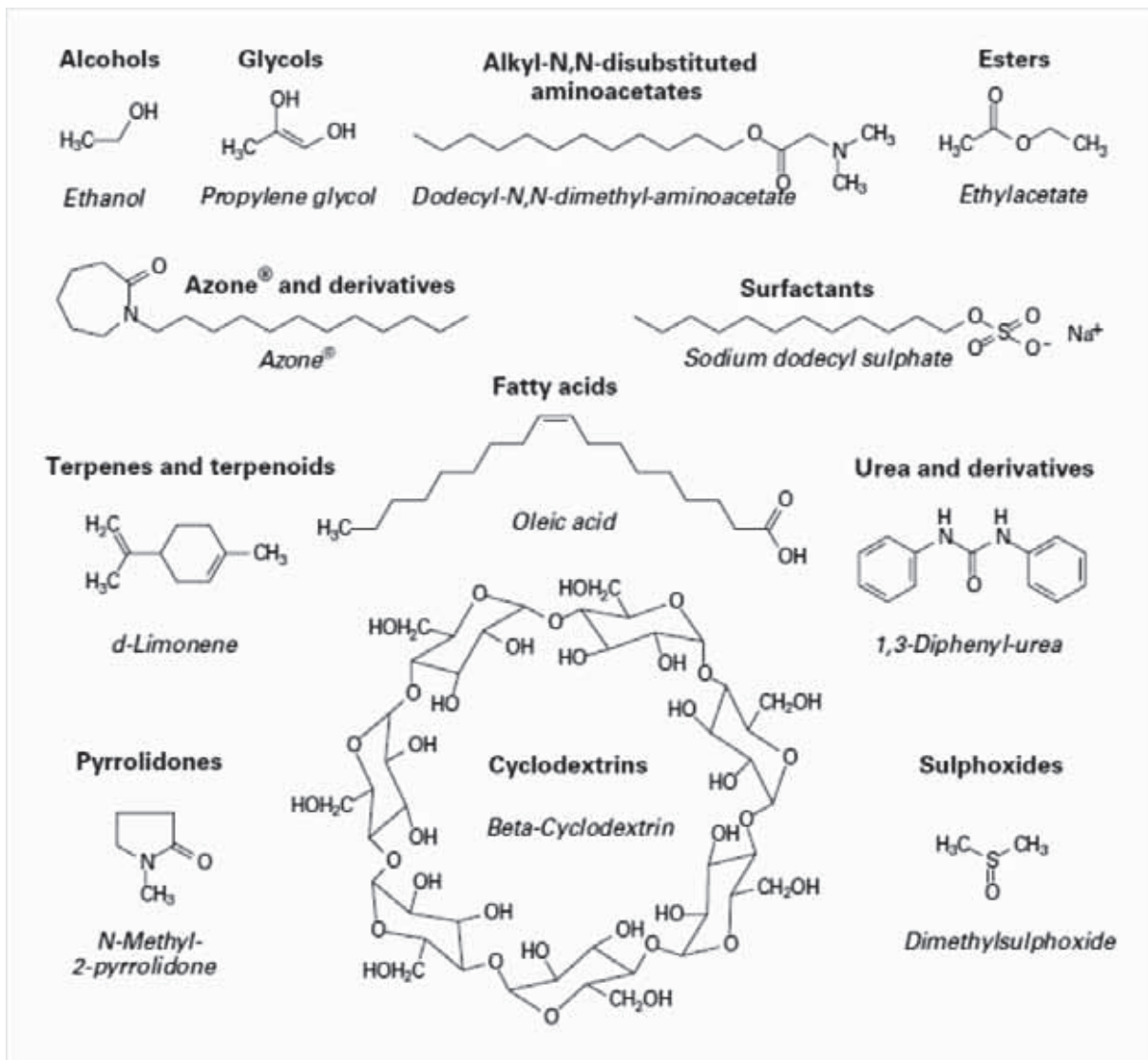


Figure 5. Catégories des différents composés promoteurs d'absorption avec un exemple type de structure chimique pour chaque groupe. Adapté de (Trommer et Neubert 2006b).

Les mécanismes d'action de ces molécules sont variés (figure 6). Une des possibilités est l'interaction de ces molécules avec les têtes polaires des lipides provoquant une perturbation dans leur organisation. Il en résulte une facilitation de la diffusion des molécules hydrophiles (Walker et Smith 1996). Une interaction avec les chaînes hydrocarbonées des lipides, en augmentant leur fluidité et facilitant ainsi la pénétration des actifs lipophiles est également possible. Cette fluidisation des chaînes hydrocarbonées peut également influencer l'ordre des têtes polaires expliquant la perméation accrue de molécules hydrophiles lors de l'utilisation de promoteurs d'absorption lipophiles (Neubert et al. 1998).

Certains promoteurs d'absorption nécessitent d'être incorporés dans des véhicules ou co-solvants afin d'atteindre les parties polaires des lipides et y exercer leur action (Prausnitz, Mitragotri, et Langer 2004).

L'augmentation de la solubilité des molécules actives et l'amélioration de leurs coefficients de partition *stratum corneum*/véhicule peut aussi être un mécanisme explicatif de l'action des promoteurs d'absorption (Hadgraft 2001).

Le *stratum corneum* peut également devenir plus perméable suite à l'extraction des lipides qui le constituent par certaines substances possédant un effet promoteur d'absorption (Trommer et Neubert 2006a).

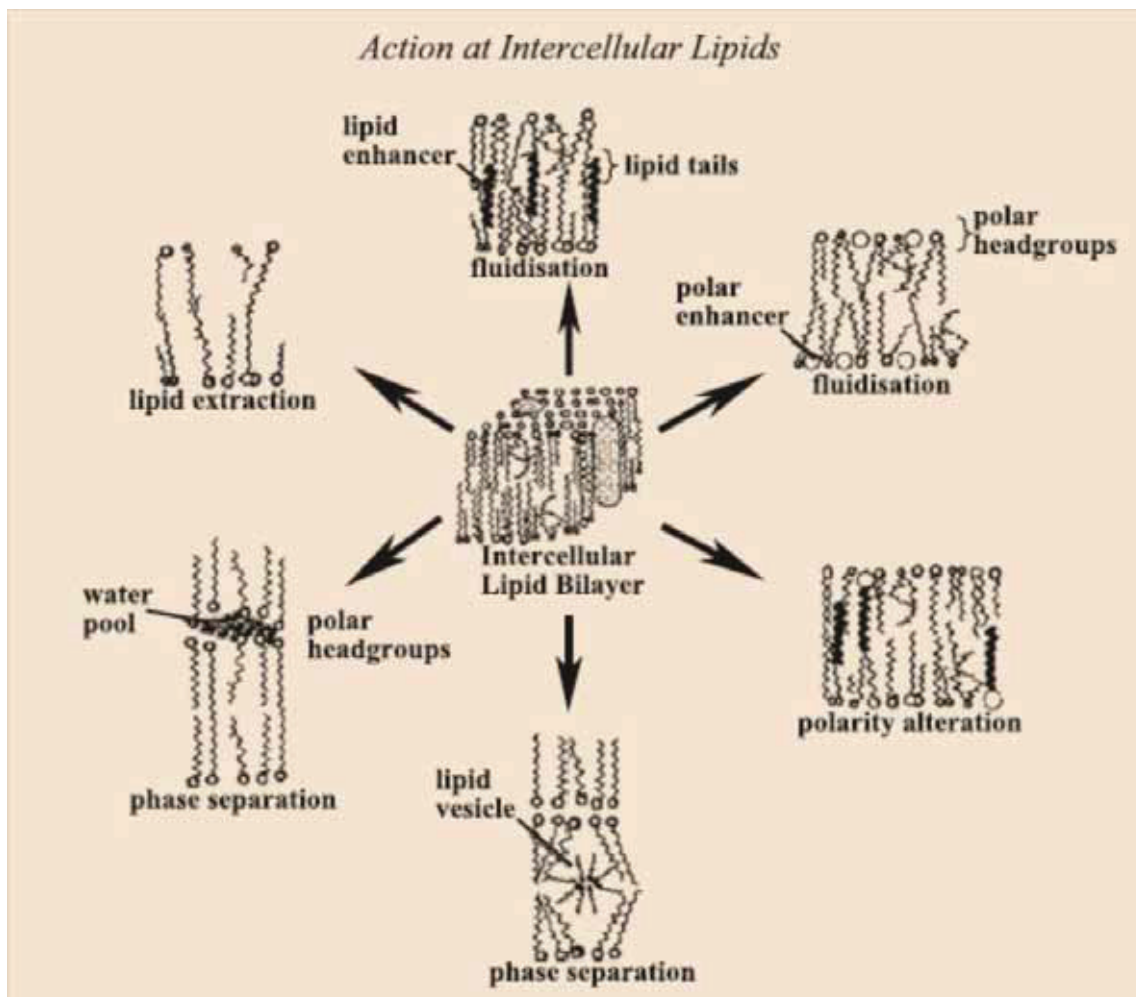


Figure 6. Actions des promoteurs d'absorption sur les lipides du *stratum corneum*. Adapté de (Williams et Barry 2012).

2.4.3.1. L'eau

L'eau est un promoteur d'absorption des plus efficaces. Le contenu en eau du *stratum corneum* est compris entre 15-20% du poids en tissu sec, mais il peut varier considérablement après immersion de la peau dans l'eau ou en l'exposant à des taux d'humidité très forts. Ceci peut typiquement être obtenu lors de l'application de conditions d'occlusion où le contenu en eau peut alors approcher les 400% du poids en tissu sec ou par l'utilisation de substances hydratantes telle l'urée. L'hydratation de la peau peut ainsi augmenter la diffusion de d'actifs hydrophiles mais aussi d'actifs hydrophobes par perturbation. Les mécanismes d'action de l'eau sont cependant controversés. Bouwstra et coll. ont démontré que l'eau ne provoquait pas de modifications dans l'organisation des bicouches lipidiques de la peau (Joke A. Bouwstra et al. 2003) . Les observations en cryofracture de la structure hydratée des lipides de la peau montrent l'existence de petites réserves d'eau incluses entre les bicouches lipidiques intercellulaires sans distorsion des domaines lipidiques.

(Elias et al. 2002) ont envisagé l'existence hypothétique de pores dans le *stratum corneum* correspondant à des lacunes (sites de dégradation des cornéodesmosomes) emprisonnées au sein des bicouches lipidiques. Lorsqu'elles sont soumises à des conditions de stress (hydratation excessive, iontophorèse ou application d'ultra-sons), celles ci s'élargissent, se connectent et forment un chemin diffusionnel continu permettant d'augmenter la diffusion des actifs dans la peau (Elias et coll.. 2002).

2.4.3.2. Les sulphoxides

Le diméthyl sulphoxide (DMSO) est fréquemment utilisé comme co-solvant ou véhicule au sein de préparations commerciales contenant de l'Idoxuridine, un actif pour le traitement des affections causées par herpes simplex. Le DMSO a également été utilisé par voie topique pour le traitement des inflammations.

Le DMSO est un solvant aprotique avec un fort pouvoir dissolvant des sels et des molécules polaires (Adrian C Williams et Barry 2004).

Le DMSO est ainsi capable de générer des espaces remplis de solvant dans le *stratum corneum*, permettant la solubilisation de certaines substances actives. De plus, l'organisation de la barrière lipidique peut se trouver perturbée par le DMSO lorsque celui-ci est administré à une concentration dépassant 60%. Dans ce dernier cas, le DMSO en forte proportion peut provoquer des érythèmes cutanés et dénaturer les protéines du *stratum corneum*. En effet, le

DMSO est capable de changer la conformation de la kératine et la faire passer d'une forme hélice alpha à une forme en feuillet bêta (Adrian C Williams et Barry 2004).

2.4.3.3. Azone

L'azone et ses dérivés ont été utilisés comme promoteurs d'absorption de nombreuses molécules telles que les stéroïdes, des antibiotiques et des agents antiviraux.

L'efficacité de l'azone a été démontrée concentration et véhicule dépendante.

L'azone est plus efficace à basses concentrations (entre 0.1% et 5%). Son mécanisme promoteur de la pénétration réside probablement dans son interaction avec les lipides du stratum corneum.

La dimension de sa chaîne carbonée (formée de 12 carbones) est comparable à celle du cholestérol. Une diminution des interactions entre molécules de cholestérol ou entre molécules de cholestérol et céramides peuvent survenir en présence d'Azone. La fluidité du stratum corneum s'en trouverait augmentée et la résistance à la pénétration de certaines substances actives serait réduite (J. Hadgraft 2001).

Les molécules d'Azone peuvent également s'intégrer au sein de la couche lipidique ou dans des domaines séparés.

2.4.3.4. Pyrrolidones

Les pyrrolidones ont été utilisés comme promoteurs d'absorptions pour de nombreuses molécules hydrophiles (telles le mannitol, 5-fluorouracile et sulphaguanidine) et lipophiles (telles la betaméthasone-17-benzoate, l'hydrocortisone et progestérone). Leur mécanisme d'action réside dans leur bonne répartition dans le stratum corneum, créant des réservoirs au sein de la peau. Ces réservoirs offrent un potentiel intéressant de libération prolongée des actifs à partir du stratum corneum. Cependant, l'usage des pyrrolidones se trouve restreint à cause de certaines manifestations allergiques et érythèmes qu'ils pourraient induire (Jungbauer, Coenraads, et Kardaun 2001).

2.4.3.5. Les acides gras

La molécule la plus connue est l'acide oléique. En général, les acides gras saturés sont moins efficaces que leurs homologues insaturés. Un nombre élevé de doubles liaisons dans un acide gras est synonyme d'efficacité élevée à promouvoir l'absorption cutanée. De plus, les acides gras avec une configuration *cis* sont plus efficaces que ceux possédant une configuration *trans*. Des études spectroscopiques utilisant de l'acide oléique deutéré ont révélé que celui-ci

à fortes concentrations était capable de former des domaines séparés au sein des bicouches lipidiques, facilitant ainsi la perméation de composés hydrophiles à travers le *stratum corneum* (Kobayashi et al. 1986).

Les effets de l'acide oléique sur l'ultra structure du *stratum corneum* ont également été investigués par microscopie électronique. Les résultats ont montré une perméabilité épidermique accrue par perturbation des bicouches lipidiques, ainsi que la formation de lacunes au sein du *stratum corneum* (Jiang et Zhou 2003).

2.4.3.6. Les alcools

L'éthanol est utilisé dans de nombreuses formulations transdermiques, notamment les patches. Il est également utilisé comme co-solvant dans le liquide récepteur pour assurer des conditions sink pendant les études de perméation.

L'éthanol diffuse très rapidement dans la peau avec un flux à l'équilibre de $1\text{mg}\cdot\text{cm}^2/\text{h}$ (Berner et al. 1989).

L'éthanol a été utilisé afin d'augmenter le flux du levonorgestrel, de l'estradiol, de l'hydrocortisone et du 5-fluorouracile à travers la peau de rat (Friend et al. 1988).

Cependant, dans un mélange ethanol/eau, l'effet promoteur de l'éthanol semble dépendre de sa concentration. Ainsi la diffusion de l'ion salicylate à travers une membrane épidermique humaine a été augmentée pour une composition ethanol/eau supérieure à 0.63 alors que des concentrations plus élevée d'éthanol ont produit l'effet inverse (Kurihara-Bergstrom et al. 1990).

Des résultats similaires ont été trouvés avec la nitroglycerine (Berner et al. 1989), l'estradiol (Megrab, Williams, et Barry 1995) et la zidovudine (Thomas et Panchagnula 2003). Il est probable que les taux élevés en ethanol entraînent une déshydratation des membranes biologiques, réduisant ainsi la perméation de ces actifs.

L'éthanol peut exercer son effet promoteur de l'absorption de différentes manières. Sa qualité de solvant lui permet d'augmenter la solubilité d'un actif dans son véhicule, même si le flux à l'équilibre d'un perméant à partir de son véhicule, saturé ou non, comprenant ou non un promoteur d'absorption semble équivalent (Pershing, Lambert, et Knutson 1990).

De plus, la perméation de l'éthanol dans le *stratum corneum* peut altérer les propriétés de solubilité des tissus avec une amélioration du partage des molécules actives vers la peau (Megrab, Williams, et Barry 1995). Un autre effet de l'éthanol sur l'absorption des actifs est sa capacité à rapidement s'évaporer du compartiment donneur, ce qui modifie l'activité

thermodynamique de l'actif dans la formulation (Moser, Kriwet, Kalia, et al. 2001a; Moser, Kriwet, Froehlich, et al. 2001).

2.4.3.7. Les surfactifs

Les tensioactifs ioniques agissent principalement en interagissant avec la kératine des cornéocytes. Ils sont aussi soupçonnés améliorer l'absorption cutanée en perturbant la couche lipidique du *stratum corneum* (Walters, Bialik, et Brain 1993).

La propriété d'altération de la peau produite par les tensioactifs dépend de leur structure. En effet, les deux parties du tensioactif (hydrophile et hydrophobe) montrent un comportement structure-activité dépendant.

En effet, une étude a démontré que les tensioactifs possédant une chaîne alkyl linéaire supérieure à C₈ et une chaîne oxyde éthylène inférieure à E14 ont permis une augmentation significative du flux du methyl nicotinate alors que les tensioactifs avec une partie hydrophobe présentant des branchements ou des noyaux aromatiques semblaient inefficaces sur l'absorption du même actif (Walters, Bialik, et Brain 1993).

Une autre étude montre que les dimethyldialkylammoniums possédant une chaîne alkyl relativement courte, formant très peu de micelles et existant plutôt sous forme de monomères en excès favorisaient leur interaction avec la peau (Walters, Walker, et Olejnik 1988).

Les tensioactifs anioniques interagissent avec la kératine et les lipides. Le lauryl sodium sulfate peut pénétrer dans la peau et coll.térer la fonction barrière de la peau (Lee et al. 1994). Un mécanisme supplémentaire impliqué dans l'effet promoteur de ce tensioactif est l'interaction hydrophobe entre sa chaîne alkyle et la peau permettant l'exposition du groupement sulfate. Ceci amène à la création de forces répulsives qui forcent la séparation de la matrice protéique de la peau et augmentent par conséquent le degré d'hydratation de la peau (Rhein, Robbins, et Fernee 1986; Seto et al. 2010).

Kushla et coll. ont étudié la pénétration de la lidocaine dans l'épiderme humain en incorporant des tensioactifs cationiques avec différentes longueurs de chaîne de la chaîne alkyle (Kushla et Zatz 1991). Une augmentation de la pénétration cutanée de cet actif a été observée pour des longueurs de chaînes variant entre 12 et 14 carbones.

Les tensioactifs non ioniques agissent comme promoteurs d'absorption suivant deux mécanismes. Le tensioactif pénètre dans les régions intercellulaires du *stratum corneum*, et y provoque une fluidification voire une solubilisation/extraction des composés lipidiques

(Nokhodchi et al. 2003). Le surfactant peut également diffuser dans la matrice intercellulaire, établir des liaisons avec la kératine et provoquer une perturbation des cornéocytes.

De plus, cette classe de tensioactifs est capable d'émulsifier le sébum et par conséquent augmenter le coefficient thermodynamique des actifs pour une pénétration intracellulaire plus efficace. Les polysorbates notamment ont permis une augmentation de la perméation de l'octanol jusqu'à 13 fois dans la peau de souris (Cappel et Kreuter 1991).

Le Sorbitan monopalmitate, sorbitan trioleate, polyoxyl 8 stearate, polyoxyethylene 20 cetyl ether, polyoxyethylene 2 oleyl ether 10% (w/w) ont induit une augmentation significative de l'acide flufenamique et du salicylate de sodium appliqués en pommades (Shen, Danti, et Bruscato 1976; Hwang et Danti 1983).

Le HLB du tensioactif utilisé peut jouer un rôle dans l'effet promoteur d'absorption. Le Tween 20 qui est plus hydrophile que le Span 20 a été prouvé moins performant dans l'absorption transdermique du 5-fluorouracile (López et al. 2000).

Certains auteurs ont décrit l'effet promoteur d'absorption de la chaîne polyoxyéthylénée des tensioactifs. En effet, des tensioactifs possédant une chaîne oxyde d'éthylène de 2-5 unités et une chaîne alkyle de C16-C18 ont permis de promouvoir le transport cutané de l'ibuprofène (Park et al. 2000).

Okuyama et coll. (1999) ont prouvé une relation parabolique entre l'absorption cutanée du piroxicam et la longueur de la chaîne polyoxyéthylène d'un tensioactif non ionique. Une longueur de chaîne de 5 à 15 semble mieux augmenter la pénétration cutanée (Okuyama et al. 1999).

D'autres travaux ont montré que le flux maximum de la benzocaïne dans la peau était accéléré par une chaîne POE de 9 unités suivie de POE(12), POE(30) et POE(50) (Dalvi et Zatz 1981). La pénétration de la quercétine et de la rutine incorporées dans des émulsions huile-eau, a été testée sur une membrane liposomale modèle, en utilisant 3 différents éthers cetostéaryliques avec différentes longueurs de chaîne oxyéthylénées (12, 20 et 30) (Oborska et al. 2013).

L'absorption du rétinol a également été améliorée grâce à des tensioactifs à chaîne polyoxyéthylénée courte. L'utilisation de la microscopie confocale Raman a montré que la solution de rétinol dans un mélange dodécane-PEG₆ C_{18:1} permettait la meilleure pénétration dans la peau comparée aux émulsions équivalentes (Förster et al. 2011).

2.4.3.8. L'urée

L'urée est un agent hydratant utilisé dans le traitement d'affections comme le psoriasis, l'ichthyosis et d'autres hyperkératoses de la peau. Appliquée à des volontaires humains, dans une émulsion eau/huile, l'urée seule ou en combinaison avec le lactate d'ammonium produit une hydratation significative du stratum corneum comparée à l'émulsion blanche (Gloor et al. 2001).

L'urée possède aussi des propriétés kératolytiques lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec l'acide salicylique.

Son effet promoteur d'absorption résulte probablement de l'augmentation de l'hydratation cutanée.

2.4.3.9. Les huiles essentielles, terpènes et terpénoïdes

Les terpènes sont des substances très lipophiles possédant un coefficient de partage octanol/eau très élevé. Ce sont des composés non aromatiques dont l'effet promoteur d'absorption réside dans leur interaction avec les lipides intercellulaires. Les co-solvants tels le propylène glycol ou l'éthanol ont des effets synergiques lorsqu'ils sont administrés avec des terpénoïdes.

Les terpènes sont retrouvés dans les huiles essentielles. De nombreux terpènes ont été utilisés comme des parfums, arômes ou des médicaments. Le menthol a longtemps été utilisé dans des préparations pharmaceutiques pour inhalation, ou comme antiprurigineux dans des préparations émollientes.

Les huiles essentielles d'eucalyptus, de chenopodium et d'ylang ylang ont été montrées améliorer la pénétration cutanée du 5-fluorouracile in vitro (A.C. Williams et Barry 1989). L'effet promoteur d'absorption le plus élevé a été obtenu avec l'huile essentielle d'eucalyptus avec une augmentation de 34 fois du coefficient de perméabilité.

Le L-menthol a été utilisé pour promouvoir la perméation du chlorhydrate de morphine à travers la peau de rat nu (Morimoto et al. 2002) et du chlorhydrate d'imipramine à travers la peau de rat (Jain, Thomas, et Panchagnula 2002).

L'oxyde de limonène et de pinène ont été utilisés (5% m/v) pour étudier la pénétration de l'halopéridol dans la peau à partir de l'éthanol (50% m/v) et du propylène glycol (100% m/v). Les résultats montrent une perturbation des lipides du *stratum corneum* permettant une meilleure pénétration de l'actif (Vaddi et al. 2003). Cependant, les résultats semblent

ininterprétables vu la présence de fortes concentrations d'éthanol et de propylène glycol, qui possèdent également des propriétés de promoteurs d'absorption.

2.5. Formulations pour l'application cutanée

Le développement de systèmes thérapeutiques pour la voie topique/transdermique se trouve considérablement limité par la barrière à la pénétration extrêmement efficace que constitue le *stratum corneum* (Brown et al. 2008; Moser et al. 2001).

Afin de surmonter cette barrière, plusieurs tentatives de pénétration active ou passive ont été menées. Les méthodes dites actives telles que l'iontophorèse, l'électroporation ou les microaiguilles peinent à démontrer leur sécurité et leur rentabilité à long terme malgré les études qui ont démontré leur efficacité dans la pénétration d'actifs à travers la peau (Moser et al. 2001; Heather A.E. Benson 2005).

Les principales méthodes de pénétration passive testées incluent l'utilisation de promoteurs d'absorptions (Smith et Maibach 2006b), de systèmes super saturés (Pellett et al. 1997), de prodrogues (Sloan et Bodor 1982; Sung, Fang, et Yoa-Pu Hu 2000), de liposomes (Jung et al. 2006), d'émulsions (Otto, Du Plessis, et Wiechers 2009; J. m. Wiechers et Barlow 1999), de microémulsions (Naoui et al. 2011; Heuschkel, Goebel, et Neubert 2008) et de suspensions de particules (Luengo et al. 2006; Abramovits, Granowski, et Arrazola 2010). L'utilisation de systèmes vésiculaires tels que les liposomes (Moghimi et Patel 1993; G. M. El Maghraby, Barry, et Williams 2008), transférosomes (SchÄtzlein et Cevc 1998), éthosomes (Touitou et al. 2000), ou niosomes (Niemiec, Ramachandran, et Weiner 1995) est souvent limitée par un manque de stabilité et d'insuffisance en matière de compréhension des mécanismes de pénétration à travers la peau.

Nous n'aborderons dans ce chapitre que l'administration topique de principes actifs inclus dans des émulsions et des systèmes particuliers.

2.5.1. Les émulsions pour l'application topique

L'émulsion est la forme galénique la plus souvent utilisée dans l'application topique. Ce type de formulation présente l'avantage d'associer dans la même formulation des substances solubles dans l'eau et dans l'huile, de donner un toucher agréable, de protéger certains

principes actifs et de modifier le profil de libération et de perméation de principes actifs (Bettinger, Gloor, et Gehring 1994; Magdassi 1997).

2.5.1.1. Influence du type d'émulsion

Il a longtemps été présumé que la pénétration d'un actif était supérieure lorsqu'il était dissous dans la phase continue d'une émulsion (J. W. Wiechers et al. 2012).

A titre d'exemple, l'administration dermique du methoxycinnamate d'éthyl hexyl, un filtre solaire lipophile a montré une meilleure pénétration à partir d'émulsions eau-huile comparé à des émulsions huile-eau. Ce résultat s'expliquerait aussi par l'effet occlusif de la phase huileuse (Jimenez et al. 2013).

D'autres auteurs ont montré que la perméation des parabènes lipophiles était au contraire meilleure *via* des émulsions huile-eau, avec les flux diminuant lorsque le caractère lipophile du conservateur augmentait (Pozzo et Pastori 1996).

Une autre étude a permis d'explorer l'effet de différentes formulations sur l'application dermique et transdermique d'actifs possédant des degrés de lipophilie variés.

Les résultats montrent de façon inattendue une pénétration similaire de ces différents composés à partir d'émulsions huile-eau ou eau-huile. Cependant, la perméation dermique de ces composés était supérieure quand les actifs étaient dissous dans la phase dispersante.

Une autre étude a montré l'influence du type d'émulsions (huile-eau, eau-huile et eau-huile-eau) sur le passage transcutané du glucose. Après 24h d'exposition, il a été démontré que le passage du glucose (substance hydrophile, $\text{LogP} = -2.2$) à partir d'émulsions huile-eau était 4 fois supérieur à son passage à partir de l'émulsion eau-huile et presque 3 fois supérieur à son absorption percutanée à partir de l'émulsion multiple. Les auteurs ont expliqué ce résultat par une concentration supérieure du glucose dans la phase externe de l'émulsion huile-eau et ceci dans des conditions de dose finie ou infinie (Ferreira et al. 1995).

Le métronidazole pris comme molécule modèle de polarité intermédiaire ($\text{log P} = -0.15$) a montré une pénétration différente à partir des émulsions selon qu'il était appliqué en dose finie ou infinie (tu n'as jamais défini ces paramètres) quel que soit le type d'émulsion utilisé.

Dans des conditions de dose infinie, le flux à l'équilibre était similaire entre l'émulsion huile-eau et l'émulsion multiple eau-huile-eau. Cependant, les deux formules montraient une pénétration supérieure du métronidazole comparée à celle d'une émulsion eau-huile (Ferreira et al. 1994).

2.5.1.2. Influence de la viscosité

La viscosité de la formulation influence également la libération du principe actif. (Welin-Berger, Neelissen, et Bergenståhl 2001) ont étudié des émulsions H/E contenant un médicament anesthésique liposoluble, avec et sans agent épaississant à différentes concentrations. La viscosité des émulsions était comprise entre 0,3 et 5 Pa.s. L'émulsion la plus visqueuse a donné le pourcentage d'absorption de l'anesthésique le plus faible et donc l'effet thérapeutique obtenu était la plus faible. Ceci est dû probablement à la libération retardée du principe actif.

2.5.1.3. Influence de la taille des gouttes

L'influence de la taille des gouttelettes sur la pénétration des actifs a été controversée.

En effet, certaines études mettent en avant que des émulsions à granulométrie fine permettent une meilleure pénétration cutanée des actifs (Schwarz, Weisspapier, et Friedman 1995; Ktistis et Niopas 1998).

L'argument avancé est que l'interface créée lors de l'émulsification permet d'augmenter la surface d'échange entre la formule et la peau améliorant ainsi la pénétration des actifs incorporés.

Une étude plus récente a montré que contrairement à ce qui a été reporté, la taille des émulsions n'avait pas d'influence réelle sur la pénétration de la tétracaïne dans la peau (Izquierdo et al. 2007).

Pour cela, deux séries d'émulsions ont été formulées: une renfermant des émulsions de composition identique avec différentes granulométries (3 macro-émulsions avec une taille de gouttes $>1 \mu\text{m}$ et 3 nano-émulsions avec une taille de gouttes $<100 \text{ nm}$), une autre en gardant une concentration en tensioactifs constante dans la phase aqueuse et en faisant varier la concentration totale en tensioactifs dans l'émulsion.

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la taille des gouttelettes et la pénétration cutanée de la tétracaïne.

Ce résultat contradictoire s'explique par la comparaison souvent faite par différents auteurs entre des formules très souvent de compositions différentes ou renfermant des concentrations

différentes en principes actifs. Ces différences permettent très rarement d'isoler l'effet exact d'une réduction de la taille des gouttelettes.

L'augmentation de l'absorption à partir des microémulsions peut être due non seulement à la petite taille des gouttelettes mais aussi à la concentration élevée de tensioactifs qu'elles renferment.

2.5.1.4. Influence des tensioactifs classiques

L'influence des molécules tensioactives sur la pénétration cutanée a déjà été décrite dépendante de sa distribution entre la phase aqueuse et la phase huileuse mais aussi de la formulation dans laquelle elles sont incorporées.

Dans le cas des tensioactifs non ioniques, l'influence de la longueur de chaîne polyoxyéthylénée a donné lieu à des résultats contradictoires sur la pénétration d'actifs dans la peau.

La disparité des résultats obtenus peut s'expliquer par le très grand choix d'émulsifiants et d'huiles testées sur la peau. D'autres facteurs comme les changements affectant l'activité thermodynamique dans le véhicule ou les interactions survenant entre les molécules actives et les émulsifiants peuvent aussi affecter leur effets sur la perméation.

Les structures que peuvent former les tensioactifs dans une émulsion peuvent avoir une grande influence sur la pénétration cutanée des actifs. En effet, ces molécules amphiphiles sont capables de s'organiser en phases cristallines dans certaines conditions de concentrations. Les structures lamellaires formées par trois tensioactifs : triéthanolamine stearate, le système sorbitane stearate/sucrose cocoate et le système steareth-2/-21 au sein d'une émulsion huile-eau ont permis une amélioration du flux de la 4-benzophenone (molécule hydrophile) comparé à des émulsions dont les tensioactifs ne forment pas de structures lamellaires (exemple du polysorbate 60). L'hypothèse avancée met en avant l'apparition d'un partage de l'actif entre la phase cristalline et le *stratum corneum* alors que dans une émulsion sans structure cristalline, l'actif incorporé se partage entre la phase aqueuse et la peau.

2.5.1.5. Influence des tensioactifs particuliers : Cas des émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering décrites au chapitre 1, sont des émulsions huile-eau ou eau-huile dont l'interface est stabilisée par des particules solides (Binks 2002; Chevalier et Bolzinger 2013).

La stabilisation par des particules solides confère une grande résistance à la coalescence des émulsions obtenues.

L'adsorption forte des particules aux interfaces joue le rôle d'une barrière s'opposant à la diffusion des substances actives. Les gouttelettes ainsi stabilisées agissent alors comme de véritables capsules, protégeant les actifs labiles encapsulés (Tan et al. 2009; Ghouchi et al. 2009; Simovic et Prestidge 2007).

Ces émulsions offrent l'avantage de s'affranchir de l'usage des tensioactifs chimiques dont l'usage peut provoquer des sensibilisations cutanées, ce qui en fait des formulations très attrayantes pour des applications cosmétiques ou pharmaceutiques.

Le potentiel de ce type d'émulsions pour la voie topique a été exploré. Frelichowska et al. 2009, ont étudié l'absorption cutanée de la caféine (actif hydrophile modèle) incorporée dans une émulsion eau-huile stabilisée par la silice, sur la peau de flanc de porc. L'objectif de ce travail était de confiner l'actif dans la phase dispersée de l'émulsion afin d'étudier l'influence de l'interface solide sur le passage de l'actif comparativement à une émulsion classique avec une interface liquide. Tous les paramètres des émulsions (Pickering et classique) étaient les mêmes (viscosité, taille des gouttelettes de phase dispersée, concentration en actif...), les émulsions ne se différenciant que par la nature de l'interface. L'émulsion de Pickering a permis une absorption rapide de la caféine comparée à une émulsion classique.

Cette diffusion rapide de la caféine a été attribuée à une plus forte adhésion des gouttelettes stabilisées par la silice sur la peau. Les particules de silice ont également été incriminées dans le passage transcutané de la caféine. En effet, des images de microscopie à balayage de strips effectués dans le *stratum corneum* après 24h de contact, ont permis de retrouver des particules jusqu'à 50% de son épaisseur. Des émulsions de Pickering huile-eau stabilisées par des particules d'amidon ont également été testées pour le transport transcutané du méthyl salicylate (Marku et al. 2012). Les résultats montrent un flux de pénétration deux fois supérieur à celui obtenu avec les suspensions de particules. L'absorption cutanée du rétinol a également été étudiée à partir d'émulsions de Pickering huile-eau (Frelichowska et al. 2009). Toutes les formulations utilisées (émulsion de Pickering, émulsion à base de tensioactif, solution huileuse de rétinol) ont montré une accumulation du rétinol dans le *stratum corneum*.

Cependant, l'émulsion de Pickering a permis une pénétration cutanée totale plus élevée de rétinol comparée aux autres formulations avec un transfert moins important vers l'épiderme viable.

Le mécanisme mis en cause est la lipophilie élevée du rétinol ($\text{Log } P = 5.68$) mais aussi un effet des particules de silice utilisées. Celles-ci, retrouvées dans les couches superficielles du *stratum corneum* ont pu contribuer à la rétention de l'actif dans celui-ci.

Ghouchi et coll. ont observé une augmentation de la pénétration d'une substance fluorescente lipophile, l'acridine orange 10-nonyl bromide (AONB), à partir d'émulsions stabilisées par système mixte : particules de silice/lécithines, comparées aux solutions de lécithines testées dans les mêmes conditions (Ghouchi et al. 2010).

Le milieu d'incorporation des particules à l'émulsion a été montré influencer la pénétration et la distribution de AONB à partir de ces émulsions.

L'inclusion des particules de silice via la phase huileuse a augmenté de façon significative la rétention de l'AONB dans la peau (profondeur atteinte 100-205 mm) alors que leur incorporation par la phase aqueuse de l'émulsion a permis d'atteindre une profondeur plus élevée (268 mm).

Les auteurs ont expliqué ce phénomène par l'existence d'interactions de type électrostatique entre les particules de silice dans l'eau et l'AONB permettant une pénétration profonde de celui-ci.

2.5.2. Devenir d'une émulsion après application cutanée

Afin de mieux comprendre l'influence des émulsions sur le transport cutané, il est essentiel d'étudier son comportement suite à son application sur la peau.

Lors de l'application sur la peau, des phénomènes de transition de phase, d'inversion, de floculation voire de coalescence peuvent apparaître suite à l'évaporation des substances volatiles (Friberg et Langlois 1992).

Le changement de composition est alors défini par la pression de vaporisation des phases huileuse et aqueuse et peut faire l'objet de diagrammes de phases (Friberg 1990).

Les phénomènes de transition de phase qui surviennent lors de l'évaporation affectent à leur tour le taux d'évaporation. A titre d'exemple, le taux d'évaporation de l'eau d'une émulsion hexadécane-eau change brusquement lors de l'inversion de phase en eau-huile (Stig E. Friberg et Langlois 1992). Le taux d'évaporation peut également se trouver ralenti lorsque l'eau se trouvant dans une phase lamellaire est évaporée (Strathclyde 1990), ou lors de l'apparition d'une phase lamellaire dans une émulsion huile-eau (Langlois et Friberg 1993).

Par ailleurs, il était intéressant de déterminer la structure du véhicule au sein de la formule appliquée suite à une évaporation totale. Les propriétés du film résiduel ont montré posséder une grande influence sur la pénétration transdermique des actifs incorporés.

Des études d'évaporation ont été menées sur des émulsions l'huile végétale stabilisées par un mélange steareth-2/ceteareth-20 (O. D. H. dos Santos et al. 2006).

Les résultats montrent un changement dans l'organisation de la phase cristalline liquide pendant l'évaporation de l'eau. Cette phase lamellaire a persisté malgré l'élimination totale de l'eau.

Friberg et Brin ont montré que pendant l'évaporation de l'eau à partir d'une émulsion huile-eau renfermant 17% de lécithine et 80% d'eau, la vitamine E (3% de la formule initiale) était progressivement absorbée dans la phase cristalline liquide de l'émulsion (Friberg et Brin 2013).

Le film résiduel obtenu à la surface de la peau se constituait essentiellement d'une phase lamellaire contenant de l'acétate de tocophérol vitamine E acétate possédant une activité thermodynamique similaire ou même supérieure à celle de l'acétate de tocophérol pure.

En fonction de la pression de vapeur relative de l'huile ou de l'eau, la composition de l'émulsion varie pendant et après évaporation.

Ainsi une huile peut contenir des micelles inverses de tensioactif, une solution aqueuse de micelles ou une phase cristalline lamellaire qui peuvent disparaître pendant ou après l'évaporation. Ces différentes compositions interagissent différemment avec le *stratum*

corneum , étant établi que les cristaux liquides interagissent moins avec les lipides du *stratum corneum* comparés à une solution huileuse de micelles (STIG E Friberg 1990).

2.5.3. Les particules

Les particules sont classées selon leurs tailles en nanoparticules (tailles entre 1 et 100 nm), particules sub-micronique (tailles entre 100 et 1µm), microparticules (tailles entre 1µm et 1mm).

En fonction des matériaux constitutifs et de la taille, plusieurs classes de particules ont été utilisées pour l'application d'actifs par la voie topique (tableau 1). Cette classification basée sur la composition des particules permet de distinguer un comportement de pénétration et d'accumulation cutanée qui peuvent être similaires pour des particules de taille voisines, et ceci malgré la différence dans leur composition.

Tableau 1. Types particulières utilisées pour l'application topique.

| Type particulaire | | | Taille des particules | Mécanisme/voie de pénétration dans la peau | Références |
|-----------------------|-----------------------|---|-----------------------|--|--|
| Particules lipidiques | Systèmes vésiculaires | Liposomes | 90-600 nm | Effet promoteur d'absorption des constituants des vésicules | (Zellmer, Pfeil, et Lasch 1995; Maghraby, Williams, et Barry 1999). (Kirjavainen et al. 1996) (González-Rodríguez et Rabasco 2011) (Pierre et Costa 2011) |
| | | Liposomes élastiques (Transférosomes) | | Pénétration de la vésicule intacte dans la peau | (Gregor Cevc et Blume 2004; Gregor Cevc, Schätzlein, et Richardsen 2002; Gregor Cevc et Blume 2001) (Benson 2010) (G. El Maghraby et Williams 2009) |
| | | Les nanocapsules lipidiques (NLC) | 100-400 nm | Solubilisation dans les lipides du <i>stratum corneum</i> | R.H. Müller, Radtke, et Wissing 2002; Mehnert et Mäder 2001) (Müller et al. 2007) (Zheng et al. 2013) |
| | Particules solides | Les nanoparticules solides lipidiques (SLN) | 100-300 nm | Occlusion dépendante de la taille Augmentation de l'hydratation cutanée Modification de la structure cristalline des lipides après étalement avec expulsion des actifs | (Radomska-Soukharev 2007). (Müller, Radtke, et Wissing 2002; Wissing, Lippacher, et Müller 2001) (Teeranachaideekul et al. 2008) |

| Type particulaire | | Taille des particules | Mécanisme/voie de pénétration dans la peau | Références | |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|--|---|---|
| Particules polymériques | Polymères biodégradables | Chitosan | 179 nm | Accumulation dans les follicules pileux | (Cui et Mumper 2001) |
| | | Ethylcellulose | 100 nm | Pénétration par répulsion électrostatique entre les particules et les lipides du <i>stratum corneum</i> | (Abdel-Mottaleb et al. 2012) (Azarbayjani et al. 2011) |
| | | Acide polylactique | 0.67-1.07 µm 164-207 nm | Accumulation dans le <i>stratum corneum</i> et libération prolongée Instabilité des particules en fonction du caractère lipophile ou hydrophile de l'actif encapsulé | (Vettor et al. 2010) (Rancan et al. 2012) |
| | | Polycaprolactone | 250-300 nm | Accumulation dans le <i>stratum corneum</i> | (Alvarez-Roman et coll.. 2004) |
| | | Micelles de MPEG-dihexPLA | 70 et 165 nm | Pénétration transfolliculaire | (Bachhav et al. 2011) |
| | | Micelles de PEG-b-PLA | 100 nm | Pénétration à travers les glandes sudoripares et transfolliculaire | (Li et al. 2008) |
| | Polymères non biodégradables | Micelles de PCL-b-PEG | 40 et 130 nm | Pénétration transfolliculaire | (Shim et al. 2004) |
| | | Polystyrène | 20 et 200 nm | Pénétration transfolliculaire | (Alvarez-Román et coll.. 2004) |
| | Particules minérales | Ecrans solaires | Polyméthacrylate | <100 nm | Accumulation dans et autour du follicule pileux |
| Particules de dioxyde de titane | | | 20-100 nm | Accumulation dans le <i>stratum corneum</i> | (Gontier et al. 2008) |
| | Particules d'oxyde de zinc | | (Cross et al. 2007) | | |
| Particules métalliques | | Particules d'argent | 7-20 nm | Propriétés anti-microbienne de surface | (Jain et coll.. 2009; Tian et coll.. 2007) |

2.5.3.1. Mécanismes de pénétration suspectés

La question de pénétration des particules dans la peau a souvent été abordée. Plusieurs études montrent que la perméation des actifs incorporés dans les particules administrées par voie topique s'effectue par libération graduelle à la surface de la peau. Très peu de particules ont été retrouvées dans la peau (Alvarez-Roman et coll.. 2004a) et s'accumulaient soit dans le *stratum corneum* ou dans les follicules pileux (Lademann et al. 2007).

D'autres font état d'une pénétration des particules à travers la peau par les voies intercellulaires. C'est notamment le cas des liposomes ultraflexibles (Gregor Cevc, Schätzlein, et Richardsen 2002).

Hansen et coll., décrivent deux mécanismes impliqués dans l'absorption cutanée des actifs à partir des particules (Hansen et Lehr 2012) (figure 6):

- *Via* les espaces intercellulaires : ce type de transport concerne des particules rigides très fines (<10 nm) mais aussi des liposomes ultraflexibles qui outre passant leur grande taille, sont capables de se déformer pour glisser à travers les canaux intercellulaires.
- *Via* le follicule pileux : ce phénomène a été démontré diamètre-dépendant. En effet la profondeur atteinte par les particules est fonction de leur taille.

Prow et al. 2011 parlent d'un mécanisme supplémentaire consistant en l'internalisation de nanoparticules par les cellules de la peau majoritairement utilisée pour la vaccination par voie topique.

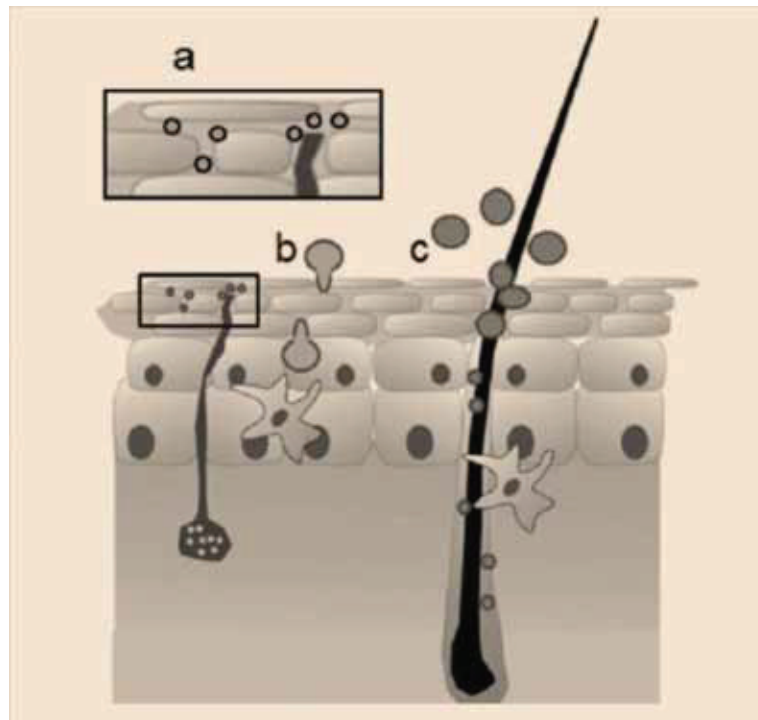


Figure. 6. Voies de l'absorption cutanée à partir des nanoparticules. (a) absorption *via* les espaces intercellulaires de particules dont la taille < 10 nm. (b) déformation et translocation des liposomes ultra flexibles dans les espaces intercellulaires. (c) accumulation des particules dans les follicules pileux (processus dépendant de la taille des particules). Tiré de (Hansen et Lehr 2012).

Une fois ces particules renfermant des actifs appliqués, il est essentiel que leur libération se fasse dans un laps de temps approprié. Selon la composition des matériaux particuliers, on peut opter pour des systèmes poreux ou biodégradables pour assurer une libération continue des actifs. Il est également possible d'administrer en une seule fois un mélange de particules, l'une renfermant l'actif et l'autre renfermant un agent permettant (une fois la profondeur souhaitée atteinte) d'attaquer les parois des particules pour en libérer le principe actif. Mak et coll. (2012), ont administré en même temps deux types de particules dont la taille était de l'ordre de 516-530 nm : des particules de sérum albumine bovine renfermant de la fluorescéine isothiocyanate comme actif et des particules de carbonate de calcium renfermant une protéase marquée de rhodamine. Les résultats (figure 6) ont montré que la protéase fut capable de libérer la fluorescéine de façon efficace dès application sur la peau. La fluorescence a été détectée dans le follicule pileux à une profondeur de 866 ± 62 nm (Mak et al. 2012). Une interaction supplémentaire avec les glandes sébacées a également été observée fournissant une approche intéressante dans le développement des traitements pour pathologies cutanées.

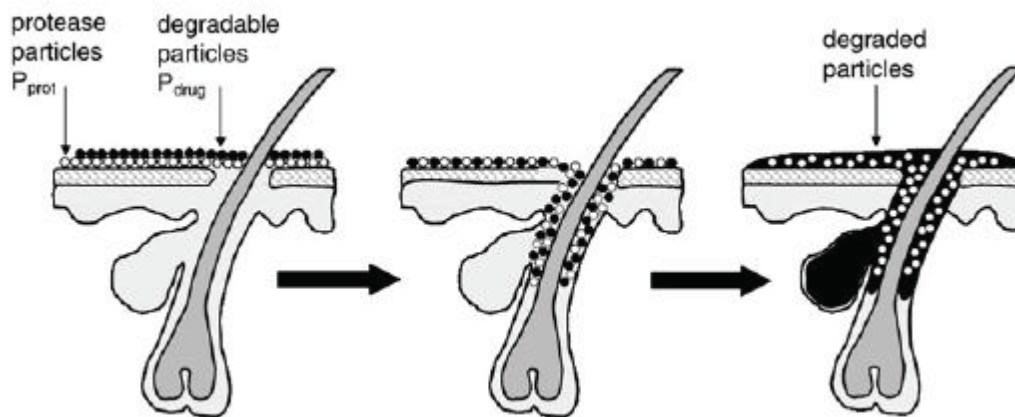


Figure 7. Schématisation de la pénétration et de la libération d'actifs après interaction avec la protéase. Tiré de (Mak et al. 2012).

2.5.3.2. Facteurs influençant la pénétration

Il existe différents paramètres physicochimiques pouvant affecter les propriétés des particules à la surface de la peau. Ces propriétés gouvernent alors les interactions particules-peau ainsi que les différents phénomènes biologiques qui modulent la libération des actifs encapsulés (Bolzinger, Briançon, et Chevalier 2011). Ces propriétés incluent la morphologie (taille, forme, porosité, surface spécifique), la solubilité dans les lipides de la peau ou la faculté de les

solubiliser, l'altérabilité et l'activité biologique des particules (interaction avec le système immunitaire, pouvoir irritant, toxicité).

2.5.3.2.1. Influence de la taille des particules sur leur pénétration

La voie de pénétration cutanée choisie peut aussi être fonction de la taille des particules.

Schaefer et coll.. (1990), ont montré que des microparticules polymériques avec un diamètre compris entre 3 et 10 μm pénétraient de façon sélective à travers le follicule pileux alors que des particules plus volumineuses ($>10\mu\text{m}$) restaient à la surface de la peau (Schaefer et al. 1990).

Les particules possédant un diamètre plus petit ($< 3 \mu\text{m}$) se retrouvaient distribuées dans les follicules pileux et le *stratum corneum*. D'autres études ont montré que seules les particules (particules d'or, quantum dots,...) dont la taille était $< 20 \text{ nm}$, étaient capables de traverser la peau (Huang et al. 2010; Sonavane et al. 2008).

Cependant, ces particules restaient bien souvent confinées dans le *stratum corneum* sans atteindre l'épiderme viable (Ryman-Rasmussen, Riviere, et Monteiro-Riviere 2007; Baroli et al. 2007).

Les particules dont la taille est supérieure à 20 nm semblent préférer le follicule pileux. Ainsi, Vogt et coll., ont travaillé sur des particules de différentes tailles (40, 750 et 1500 nm) à des fins de vaccination transcutanée (Vogt et al. 2006).

Les résultats ont montré que seules les particules de 40 nm s'accumulaient de façon préférentielle dans les follicules pileux, où elles subissaient un phénomène de translocation vers l'épiderme viable avant d'être internalisées par des cellules CD1a⁺ (cellule de Langerhans ayant une protéine de surface CD1a médiant la présentation d'antigènes) présentes dans l'épiderme.

Alvarez et coll.. ont observé en microscopie confocale que l'octylmethoxycinnamate et le rouge nile (substances de nature lipophile) appliqués à partir de nanoparticules de polystyrène sur la peau (20 et 200 nm) pénétraient indépendamment de leurs transporteurs (Alvarez-Roman et al. 2004b). Cette pénétration semblait liée à la taille des nano vecteurs utilisés. Les nanoparticules de petite taille se sont plutôt accumulées dans les régions folliculaires sans aucune évidence de pénétration intracellulaire (Alvarez-Román et al. 2004b).

Lekki et coll.. ont entrepris de visualiser la pénétration de produits antisolaires contenant des particules de dioxyde de titane de 20 nm de diamètre (Lekki et al. 2007).

Ces particules ont été trouvées à une profondeur de 400 μm dans le follicule pileux introduits plus probablement grâce à un processus mécanique que par diffusion passive. Aucune particule n'a été observée dans les tissus vitaux ou dans les glandes sébacées.

Lademann et coll.. ont comparé le passage transfolliculaire sur la peau d'oreille de porc, d'un actif fluorescent incorporé dans des particules de 320 nm et sous forme de solution (Lademann et al. 2007).

Les résultats montrent que les particules pénètrent de façon plus importante dans les follicules pileux lorsqu'un massage est appliqué, comparativement à la forme non particulaire testée dans les mêmes conditions. Les particules permettant une pénétration transfolliculaire possédaient des tailles incluses entre 320 et 750 nm.

Des investigations supplémentaires concernant de particules constituées de matériaux différents et de tailles différentes ont mené Patzelt et coll., à conclure que des tailles allant de 300 à 600nm permettaient une pénétration plus profonde dans les follicules pileux (Patzelt et al. 2011).

La comparaison entre particules de PLGA (figure 8) et de silice a montré des résultats de pénétration similaires avec des profondeurs de pénétration comparables pour la même taille testée (300 nm PLGA/300 nm silice; 643 nm PLGA/646 nm silice). Cependant, les particules de silice pénètrent plus profondément comparées aux particules de PLGA de taille avoisinante.

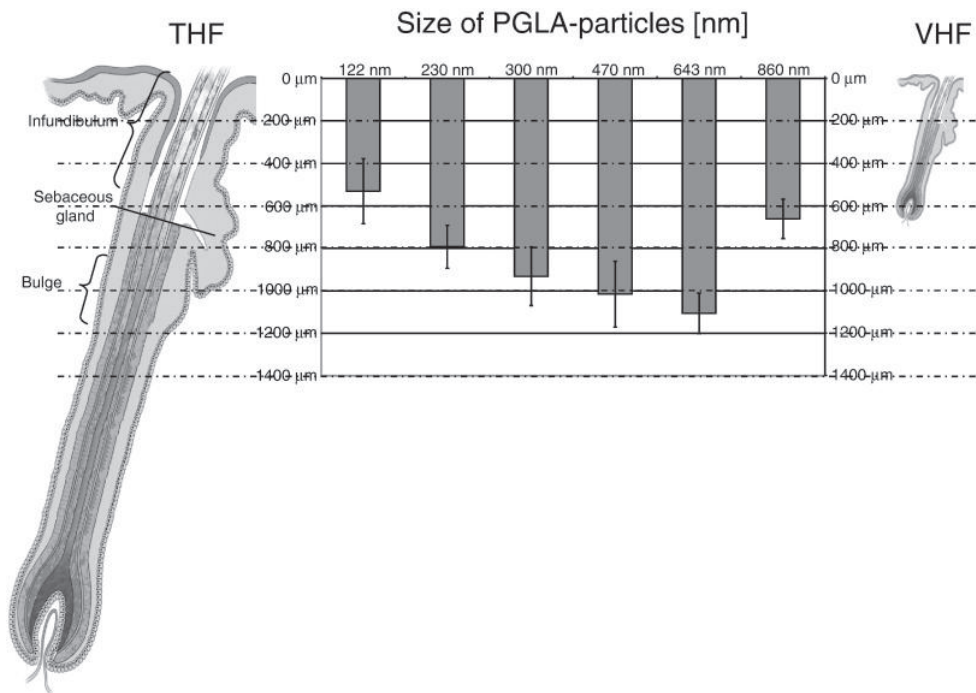


Figure. 8. Profondeurs (en μm) de pénétration des particules de PLGA de différentes tailles. Tiré de (Patzelt et al. 2011).

Ces résultats étonnent car ils montrent la capacité des particules de tailles intermédiaires à pénétrer profondément, alors que celles plus petites ou plus grosses restent à des profondeurs plus superficielles.

Ces résultats étant obtenus avec des particules différentes, ils ont été attribués à un effet mécanique plutôt qu'à un effet spécifique des particules.

Ces travaux ont également posé l'hypothèse que la structure même du cheveu (déterminée par l'épaisseur des cellules de kératine qui le constituent-environ 530 nm chez l'homme et 320 nm chez le porc) agissait comme un système de pompage qui pousse les particules vers le follicule pileux. Ce mouvement des cheveux peut être induit alors *in vitro* par l'application d'un massage (Lademann et al. 2009; Lademann et al. 2007).

Ainsi des particules ayant la même taille que l'épaisseur de la kératine pénètrent plus profondément.

L'encapsulation d'actifs dans ces particules représenterait une opportunité intéressante de thérapeutique via le follicule pileux. Ainsi, une fois leur cible en profondeur atteinte les

particules pourraient libérer les actifs qui traverseraient à ce moment-là la barrière intacte du follicule pileux (Mak et al. 2012).

Ces résultats ont été confirmés par Mak et coll., qui ont montré que la diminution de la taille des particules à base de carbonate de calcium (643 nm, 470 nm, 300 nm, 230 nm et 122 nm), induisait une profondeur de pénétration décroissante (Mak et al. 2011).

Un avantage certain de ce type de transporteurs est l'amélioration de l'efficacité de la thérapeutique appliquée grâce aux quantités croissantes d'actifs pouvant être encapsulées (Schäfer-Korting et al. 2010; X. Wu et al. 2010).

2.5.3.2.2. Charge à la surface des particules

Marro et coll., ont démontré que la pénétration des particules de charge positive était favorisée par la charge négative existant à la surface de la peau (Marro, Guy, et Begoña Delgado-Charro 2001). Au contraire, Kohli et coll., ont observé que seules des particules de latex négativement chargée de 50 et 500 nm de diamètre) traversaient la peau et se retrouvaient dans le liquide récepteur (Kohli et Alpar 2004).

Les auteurs ont expliqué leur résultats par l'apparition d'une force de répulsion entre les groupements chargés négativement à la surface des particules et les lipides de la peau chargés négativement. Cette répulsion permet une ouverture temporaire des espaces intercellulaires permettant ainsi la pénétration des particules.

Il en découle l'hypothèse d'une charge négative seuil qui lorsqu'elle est atteinte permet le passage des particules.

Cette pénétration des particules chargées négativement à travers la peau a également été soutenue par Cui et Mumper (2001, 2002). Ils ont montré une meilleure efficacité des particules de chitosan chargées négativement à induire des concentrations élevées en cytokines dans la peau comparées à des particules positivement chargées (Cui et Mumper 2001; Cui et Mumper 2002).

Ce phénomène n'a pas pu être expliqué par les auteurs à cause de la complexité des phénomènes pouvant être impliqués. En effet, une meilleure pénétration peut être due effectivement à la charge des particules en question ou à une stimulation supérieure du système immunitaire induite par la composition même des particules testées.

Cependant, les auteurs ont proposé un chemin de pénétration de ces particules via les follicules pileux et les glandes sudoripares.

De Jalon et coll. (2001) ont montré que la pénétration des microparticules fluorescentes à base de PLGA contenant un agent anti-viral dans l'épiderme était due à leur charge négative. (De Jalón et al. 2001).

2.5.3.2.3. Déformabilité

Des vésicules de tensioactifs déformables ont aussi été testées pour leur aptitude à traverser la peau (Van den Bergh et al. 1999; Honeywell-Nguyen et al. 2003; Honeywell-Nguyen, Gooris, et Bouwstra 2004).

Il a été suggéré par plusieurs études que des particules élastiques de 100-150 nm étaient capables de pénétrer le *stratum corneum* via des canaux spécifiques et y rester confinées.

Parmi ces vésicules, on peut citer les liposomes ultraflexibles. Les liposomes conventionnels sont des vésicules formées de glycérophospholipides rigidifiées par l'inclusion de cholestérol (Lilia Romero et Morilla 2011).

Cette pénétration serait rendue possible par la présence d'un « gradient trans épidermique naturel en eau » (Figure 9). L'hydrophilie des phospholipides les pousserait à éviter les environnements secs. En conséquence, les liposomes suivraient le gradient d'hydratation en se déplaçant vers les couches les plus profondes, plus hydratées de la peau (Gregor Cevc et Gebauer 2003; G. Cevc et Blume 1992).

L'ajout de tensioactifs ou d'éthanol (éthosomes) à la structure classique des liposomes permet d'obtenir des structures ultra flexibles capables de se glisser dans les pores du *stratum corneum* (Gregor Cevc et Blume 2004). Durant ce passage, les vésicules restent intactes protégeant les actifs incorporés (Gregor Cevc, Schätzlein, et Richardsen 2002). Ce mécanisme

de translocation les amène près de l'épiderme où elles peuvent délivrer les actifs (Loan Honeywell-Nguyen et al. 2002).

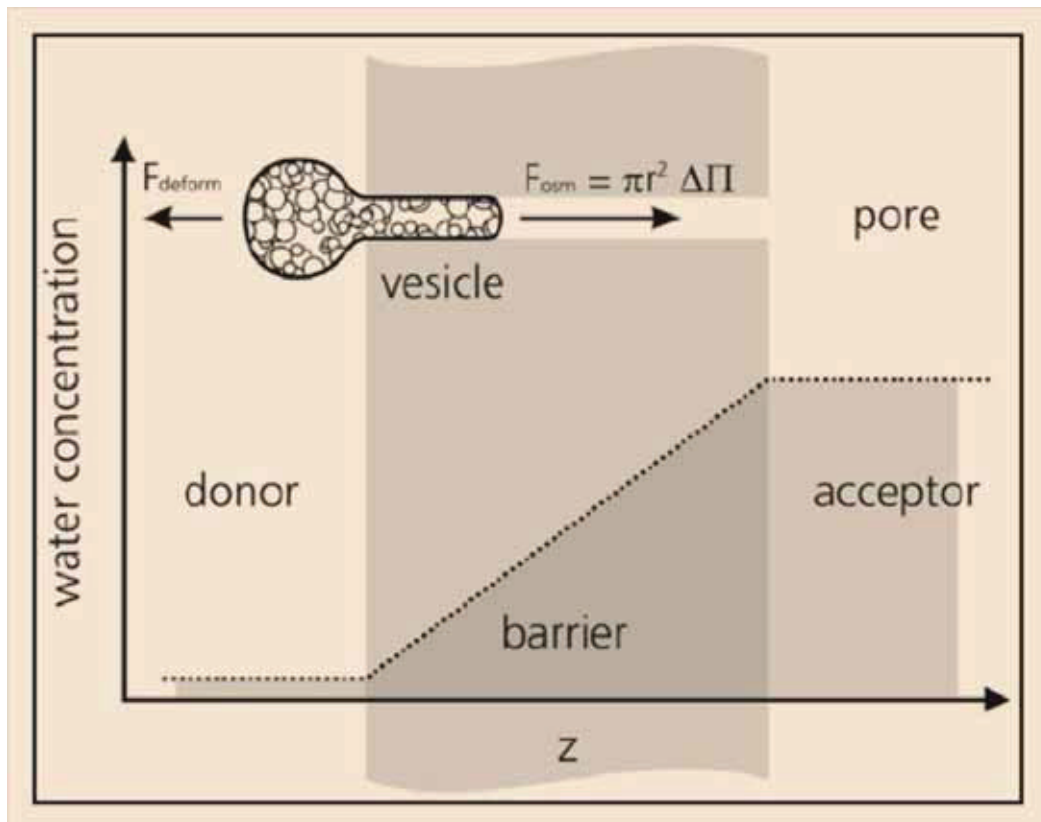


Figure 9. Schéma représentant le passage de liposomes déformables au travers de petits pores grâce au gradient d'hydratation, la vésicule pénètre dans le pore si la force générée par la pression osmotique excède sa résistance à la déformation. Tiré de (Schneider et al. 2009).

De plus, l'éthanol contenu dans les éthosomes peut fluidifier les lipides intercellulaires du *stratum corneum* permettant leur transport facilité dans la peau (Chin et Goldstein 1981).

Des polymersomes de nature polymérique résultats de l'auto association d'un copolymère à bloc de type poly(caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) ont également été étudiés (Rastogi, Anand, et Koul 2009). Ces vésicules de 122 ± 20 nm caractérisées par microscopie électronique à transmission (TEM) microscopie à force atomique se composent d'une double couche déformable dite en forme de « pancake » avec une épaisseur de 25 nm.

Les études de pénétration cutanée de ces vésicules marquées par fluorescence ont permis leur visualisation dans *stratum corneum* après 2h d'application.

2.6. Enjeux et problématique des nanotechnologies appliquées à la peau

Ces dernières années, une attention toute particulière a été accordée aux nanotechnologies appliquées à la l'administration cutanée. Même si les mécanismes de pénétration des systèmes particuliers dans la peau restent parfois controversés, la réduction de taille de ces systèmes fait apparaître une nouvelle problématique qui est celle de leur capture cellulaire (Panyam et Labhasetwar 2003; Prabha et al. 2002; DeLouise 2012) et dans le cas des particules anti solaires de réagir en créant des composés oxygénés quand elles sont exposées aux radiations UV (Newman, Stotland, et Ellis 2009; Nohynek, Dufour, et Roberts 2008).

Ces dernières années, quelques études ayant pour objet la toxicité éventuelle du ZnO ont mis en évidence une possible réactivité de ces nanoparticules (taille~20nm) avec les fibroblastes du derme humain menant à leur apoptose. Ce phénomène a été observé même à des doses en nanoparticules très faibles (Meyer et al. 2011).

Cette apoptose est médiée par l'activation d'enzymes (P38 MAP kinases) agissant en cas de stress génotoxique.

La phototoxicité de particules d'oxyde de zinc (taille 60 nm, 550 nm) a également testée chez un nématode vivant (*Caenorhabditis elegans*) (Ma et al. 2011).

Les résultats montrent que la photo toxicité de ces particules est particulièrement élevée après exposition au soleil surtout pour les particules les plus petites.

D'autres études ont montré que les nanoparticules contenant du TiO₂ ou du ZnO pouvaient catalyser la génération de radicaux libres après exposition au soleil. Cependant, appliqués à une peau saine, ces nanoparticules restaient confinées dans les couches supérieures du *stratum corneum* sans effets toxiques observés (Faunce et al. 2008).

La disparité des résultats obtenus peut être due à la grande variété d'espèces animales testées (souris, lapins, porc, nématode...). Ces animaux diffèrent notamment par l'épaisseur de leur peau ce qui rend la généralisation des résultats extrêmement difficile et leur application aux humains hasardeuse.

Les problématiques de toxicité et de sécurité des nanoparticules non biodégradables accumulées dans la peau ont fait émerger un besoin croissant de les remplacer par des matériaux moins rémanents notamment en dermatologie (Newman, Stotland, et Ellis 2009).

Les particules biodégradables représentent une alternative d'un grand intérêt dans le développement de matériaux particuliers à visée dermatologique de par la découverte d'un possible phénomène de translocation voire d'accumulation de systèmes particuliers dans la peau. Ces transporteurs polymériques offrent non seulement une protection des actifs labiles mais aussi une libération contrôlée dans le temps par modification de la composition du polymère (Alvarez-Roman et al. 2004b; Arias et al. 2009; Xiao Wu, Price, et Guy 2009). Les particules polymériques peuvent être préparées à partir de polymères naturels ou synthétiques.

Ces particules sont incapables de dépasser les couches superficielles de la peau où elles relarguent leurs actifs qui diffusent plus profondément. De plus, ces particules peuvent s'accumuler dans les follicules pileux et créent un effet réservoir en principes actifs qui diffusent vers les couches viables de la peau

Partie expérimentale

Chapitre 3

Synthèse et caractérisation des copolymères à blocs

3.1. Introduction

Les copolymères à blocs biodégradables sont des biomatériaux prometteurs en raison de la possibilité de manipuler leur comportement amphiphile, et leurs propriétés physiques et mécaniques en ajustant les longueurs relatives des blocs, ou en ajoutant des nouveaux blocs de propriétés adaptées (Letchford et al. 2007; Kumara et al. 2001).

Ce chapitre concerne la synthèse organique et la caractérisation de deux copolymères à bloc : le Polycaprolactone-*bloc*-polyéthylène glycol (PCL-*b*-PEG) et le polylactide-*bloc*-Polyéthylène glycol (PLA-*b*-PEG).

3.2. Partie expérimentale

3.2.1. Matériaux

Nous avons procédé au séchage de l'épsilon-caprolactone (ϵ -CL) (Sigma-Aldrich) par distillation sur de l'hydrure de calcium (CaH_2 , Acros Organics). Ce dernier a été désactivé après refroidissement par ajout de quelques gouttes de méthanol (Sigma-Aldrich) puis d'eau désionisée.

Le 3,6-Diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione (sigma-Aldrich) a été recristallisé dans l'Acétate d'éthyle (Sigma-Aldrich) puis séché sous pression réduite.

Le monométhyl ether de poly(éthylène glycol) (mPEG) de masse molaire 5000 g.mol^{-1} (Sigma-Aldrich) en solution dans le toluène (toluène anhydre, Sigma-Aldrich) a été également déshydraté par distillation. Le dichlorométhane (Acros Organics), le diéthyle éther (Sigma-Aldrich), l'octanoate d'étain [stannous 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), Sigma-Aldrich], le chloroforme deutéré (Sigma-Aldrich) ont été utilisés tels quels. L'eau désionisée de résistivité $18 \text{ M}\Omega.\text{cm}^{-1}$ produite au laboratoire a été utilisée.

3.2.2. Méthodes

3.2.2.1. Synthèse du copolymère polycaprolactone-*bloc*-polyéthylène glycol

Le but est de synthétiser un copolymère di-blocs PCL-*b*-PEG par polymérisation de la ϵ -caprolactone amorcée à partir d'un monométhyl éther de poly (éthylène glycol) commercial.

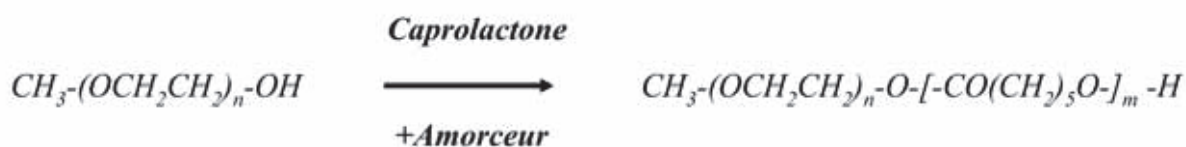


Figure 1. Schéma réactionnel pour la synthèse du copolymère di blocs PCL-*b*-PEG.

La caprolactone additionnée d'hydrure de calcium est distillée pour éliminer des traces éventuelles d'eau. Le mPEG est pesé et dissous dans le toluène. Sa déshydratation s'effectue par distillation d'une partie du toluène qui entraîne l'eau résiduelle sous la forme d'un azéotrope.

La synthèse est amorcée par ajout au mPEG en solution dans le toluène de la quantité adéquate de ϵ -caprolactone distillée et de l'octanoate d'étain (≈ 0.1 % de la masse molaire de la ϵ -caprolactone) (Diab et al. 2010; Shen et al. 2008).

Le degré de polymérisation souhaité est adapté par la quantité de motifs ϵ -caprolactone ajoutés au milieu réactionnel.

La réaction de polymérisation s'effectue sous agitation à une température de 130°C pendant 12 heures.

Après refroidissement, le polymère est précipité dans un grand volume de diéthyle éther froid sous agitation, filtré sous vide. La purification du copolymère est effectuée par dissolution dans le dichlorométhane, re-précipitation dans un grand volume de diéthyle éther puis filtration. Cette opération a été renouvelée afin d'éliminer les chaînes libres de polycaprolactone ou de poly (éthylène glycol) éventuellement présentes.

Le séchage du copolymère se fait sous vide pendant 48 heures. Le copolymère obtenu est insoluble dans l'eau.

3.2.2.2. Synthèse du copolymère poly(lactide-*b*-Polyéthylène glycol)

Le copolymère PLA-*b*-PEG a été synthétisé par ouverture de cycle du 3,6-Diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione (D,L-lactide) recristallisé dans l'acétate d'éthyle. La synthèse est amorcée par ajout de celui-ci au mélange du mPEG en solution dans le toluène additionné d'octanoate d'étain. La polymérisation s'est poursuivie à 120°C pendant 6h (Zhu et al. 1990).

L'agitation est ensuite stoppée et le mélange est laissé à température ambiante pendant 24h.

Le solvant est évaporé sous pression réduite à 70°C. 40ml de Dichlorométhane sont ajoutées au résidu et le mélange filtré sur verre fritté.

Les méthodes de purification du copolymère décrites dans la littérature spécifient l'introduction de cette solution soit dans un grand volume d'eau chauffée à 60°C (Basile et al. 1995; Sasatsu et al. 2005) soit dans du méthanol (Dong & Feng 2004) provoquant l'évaporation du dichlorométhane et la précipitation du copolymère.

Ces deux méthodes ont donné de très faibles rendements au laboratoire (de l'ordre de 10-20% m/m)

D'autres ont utilisé de l'éther de pétrole (Riley et al. 2003) sans amélioration notable dans le rendement et l'aspect du polymère obtenu.

Nous les avons donc remplacé par du diéthyle éther. La solution de copolymère dans le dichlorométhane est donc introduite dans un grand volume de diéthyle éther froid sous agitation. Le copolymère précipite instantanément puis est récupéré par filtration. Une deuxième purification est effectuée par re-dissolution dans le dichlorométhane, précipitation dans le diéthyle éther et filtration. Le polymère ainsi obtenu est séché sous vide pendant 48h.

Le rendement de cette méthode de purification était de 90-95% (m/m).

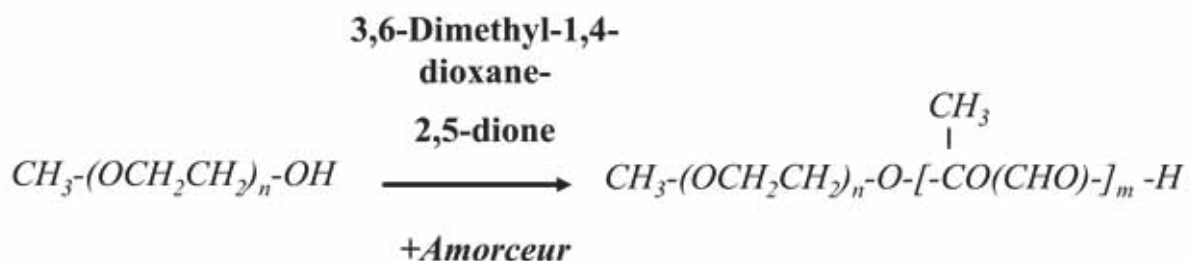


Figure 2. Schéma réactionnel pour la synthèse du copolymère di blocs PLA-*b*-PEG.

3.2.2.3. Caractérisation des copolymères par RMN du proton

Le produit de la polymérisation des deux copolymères a été vérifié par RMN du ^1H dans le chloroforme deutéré en utilisant un spectrophotomètre de type Bruker DRX 300 opérant à 300 MHz. Les déplacements chimiques exprimés en ppm ont été calculés par rapport à un étalon interne TMS.

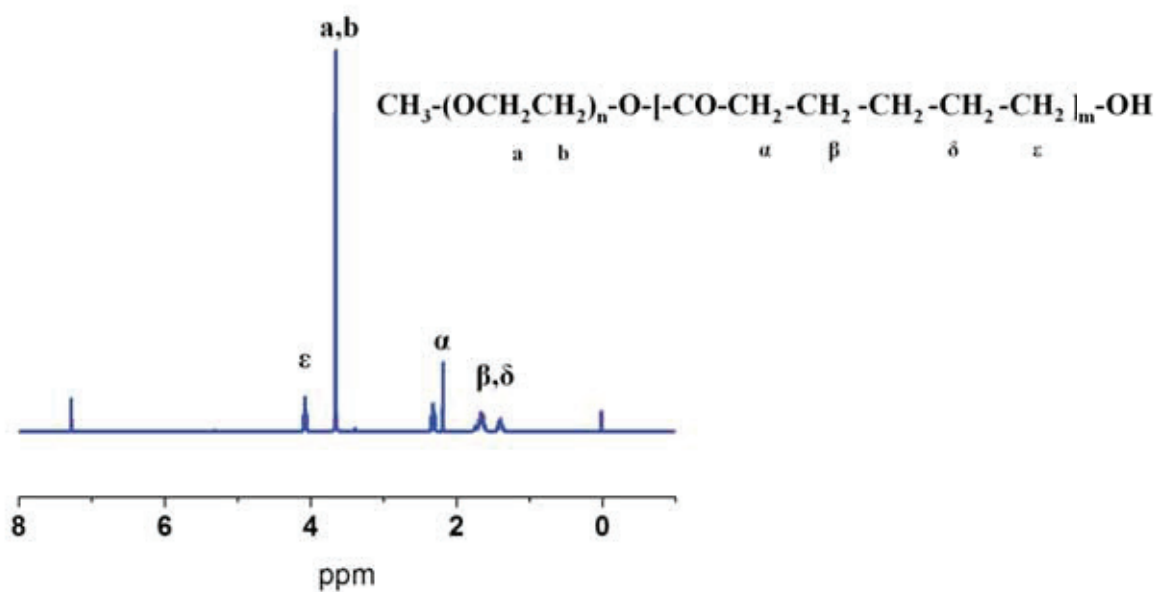


Figure 3. Spectre RMN du proton du PCL-*b*-PEG avec assignation des pics.

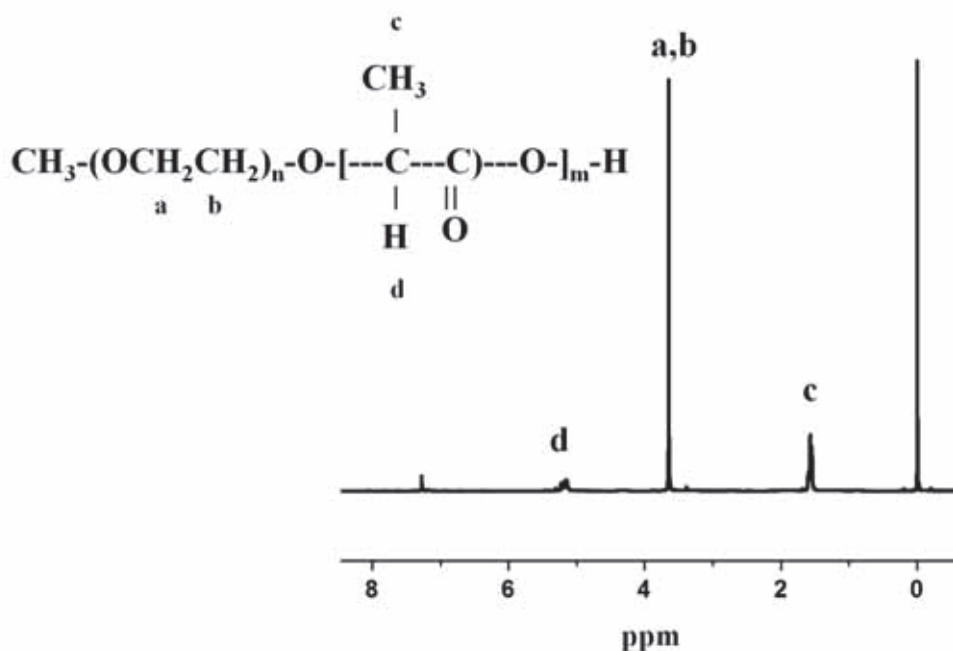


Figure 4. Spectre RMN du proton du PLA-b-PEG avec assignation des pics.

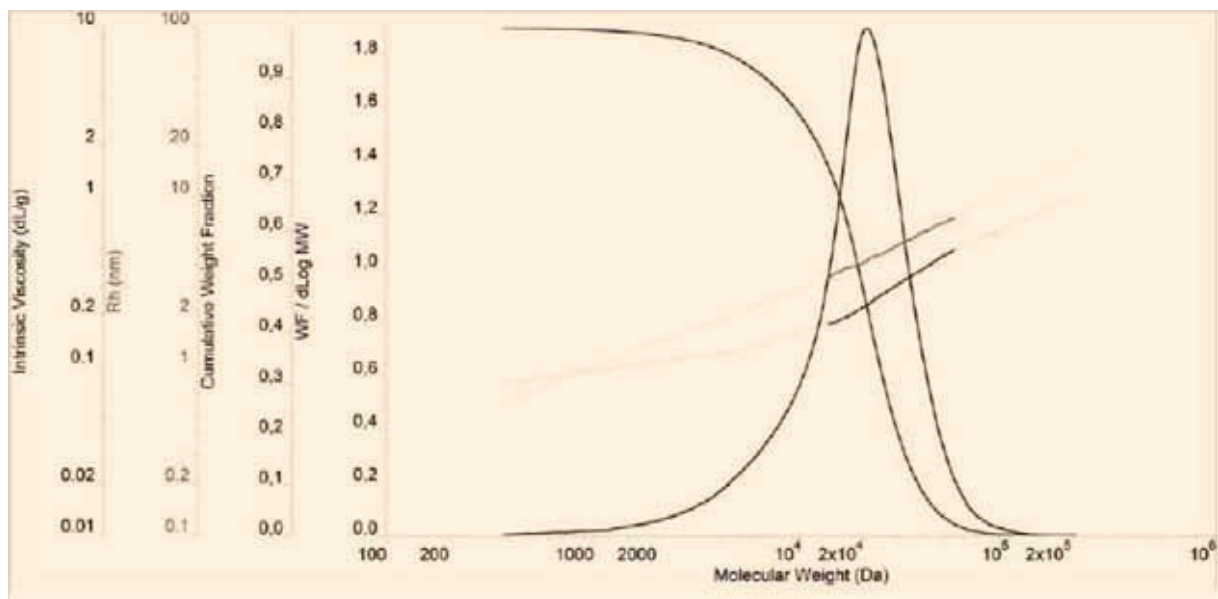
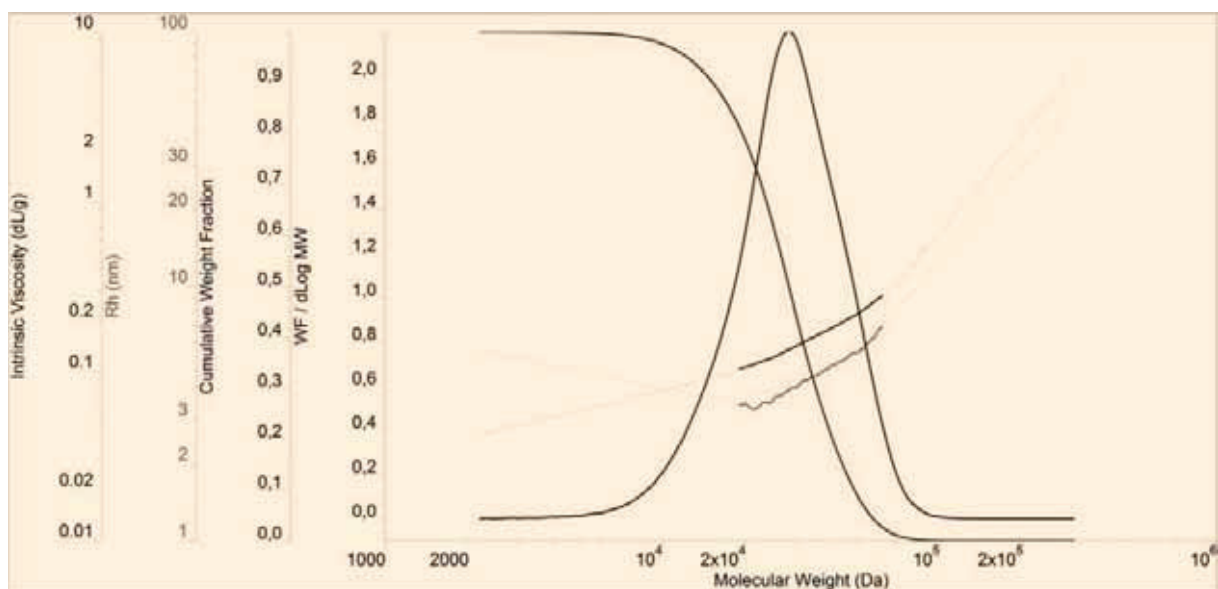
3.2.2.4. Caractérisation des copolymères par chromatographie d'exclusion stérique

Les mesures en chromatographie d'exclusion stérique ont été effectuées en utilisant un système Viscotek TDA_{max} (Malvern Instruments). Il se compose de 3 éléments : le module GPCmax de pompage et d'échantillonnage et le logiciel OmniSEC, un Tetra Détecteur (TDA) composé d'un réfractomètre, un viscosimètre, un détecteur de diffusion statique de la lumière (LALS- Low Angle Light Scattering) et un détecteur UV à barrette de diodes (PDA ou DAD). Le THF a été utilisé comme phase mobile avec un débit de 1 ml.min⁻¹. Toutes les solutions de polymère ont été filtrées en utilisant des filtres 0.45 µm.

La séparation a été effectuée à l'aide de 3 colonnes dédiées à la séparation des polymères [3×PLgel 5µm mixed C (300×7.5 mm)] et une pré-colonne de type PL gel 5 µm.

Les colonnes et les détecteurs ont été maintenus à 40°C. Le logiciel OmniSEC 4.6 a été utilisé pour le traitement du signal et l'analyse des résultats.

La masse molaire absolue a été calculée en combinant les signaux obtenus par les détecteurs à indice de réfraction et en diffusion de la lumière. L'incrément spécifique d'indice de réfraction dn/dC a été mesuré en ligne par le réfractomètre en injectant des solutions de polymères à différentes concentrations.

Figure 5. Chromatogramme SEC du copolymère PCL-*b*-PEG dans le THF.Figure 6. Chromatogramme SEC du copolymère PLA-*b*-PEG dans le THF.

3.2.2.5. Caractérisation des copolymères par analyse thermique différentielle (DSC)

Une analyse thermique a été réalisée sur les deux copolymères ainsi que les matériaux réactionnels de départ (PEG 5000, D,L-Lactide et caprolactone) afin d'étudier les propriétés des nouveaux produits obtenus. Ces études ont été réalisées grâce à DSC Q200 V23.10 (Build 79 Module DSC Standard Cell FC) opérant sous atmosphère azote. Le cycle programmé pour tous les produits allait de -60°C à 150°C avec une vitesse de chauffe de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

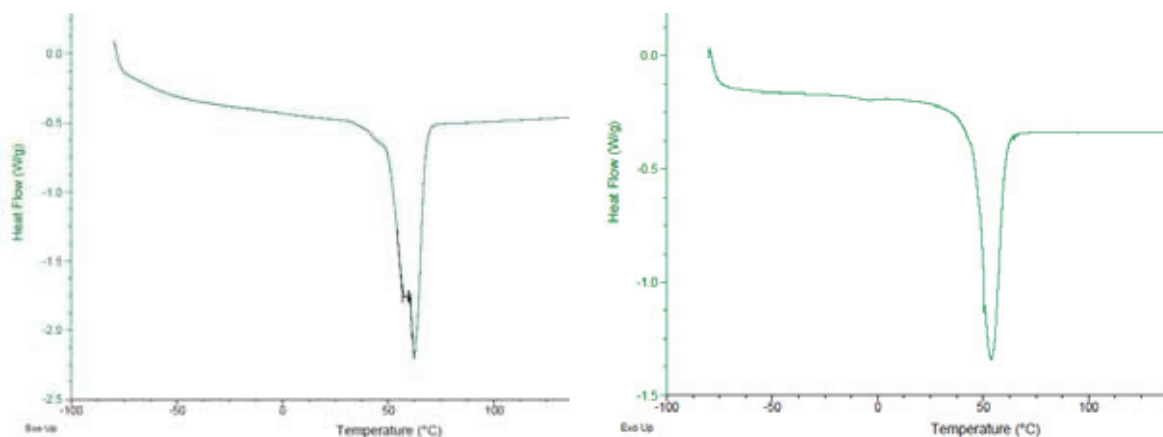


Figure 7. Thermogrammes DSC des deux copolymères. A droite : PLA-*b*-PEG, A gauche : PCL-*b*-PEG.

3.2.3. Résultats et discussion

L'efficacité de la synthèse organique des deux copolymères à blocs a été vérifiée par RMN du proton et par DSC. Les résultats montrent des produits possédant des caractéristiques physico-chimiques intermédiaires des produits purs.

Le tableau 1 résume les principales caractéristiques des copolymères di blocs PCL₇₄₁₀-*b*-PEG₅₀₀₀ et PLA₁₅₀₀₀-*b*-PEG₅₀₀₀ synthétisés au laboratoire.

La masse molaire a été déterminée par RMN du proton en intégrant les pics caractéristiques de la polycaprolactone et l'acide polylactique, mais aussi par chromatographie d'exclusion stérique après solubilisation dans le tétrahydrofurane (THF).

Le HLB des deux copolymères calculé selon la formule de Griffin pour les tensioactifs comportant des motifs polyoxyéthylénés

$$HLB = 20 \left(\frac{M_n \text{ PEG}}{M_n \text{ copolymère}} \right)$$

Tableau 1. Caractérisation du copolymère di-blocs PCL-*b*-PEG par RMN du ¹H et par chromatographie d'exclusion stérique de solutions dans le THF.

| | M_w^a (g.mol ⁻¹) | M_{NMR}^b (g.mol ⁻¹) | M_{SEC}^c (g.mol ⁻¹) | PdI^d | m^e | dn/dC^f (cm ³ .g ⁻¹) | T_{fusion} (°C) | Tg (°C) | HLB^g |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|-------|--|----------------------|--------------|---------|
| PCL- <i>b</i> -PEG | 12410 | 12992 | 11180 | 1.12 | 54 | 0.068 | 60 | 38 | 8.95 |
| PLA- <i>b</i> -PEG | 15080 | 21128 | 18 234 | 1.045 | 127 | 0.04 | 52.5 | 45 | 4.04 |

^a Masse molaire théorique calculée à partir des quantités mises en œuvre dans la réaction.

^b Masse molaire calculée à partir de l'intégration des pics de PCL de RMN situés à 4.07 ppm, du PLA situé à 4.9 ppm et du PEG à 3.65 ppm.

^c Masse molaire moyenne en nombre Mn mesurée par chromatographie d'exclusion stérique en combinant des détections réfractométrique et par diffusion de la lumière.

^d Indice de polymolécularité (polydispersity index) (PdI) mesuré par chromatographie d'exclusion stérique.

^e Degré de polymérisation du bloc PCL/PLA (m) calculé à partir des résultats de la chromatographie d'exclusion stérique.

^f Calculé par chromatographie d'exclusion stérique.

^g Calculé à partir de la masse molaire en nombre mesurée par chromatographie d'exclusion stérique.

3.3. Conclusion

Dans cette étude, deux copolymères biocompatibles, possédant une partie polyéthylène glycol hydrophile et une partie hydrophobe constituée de Polycaprolactone ou d'acide polylactique ont été synthétisés et caractérisés. La formation de ces copolymères à blocs a été vérifiée par RMN du proton et DSC. Les copolymères obtenus possèdent des caractéristiques différentes des produits réactionnels. Leurs masses molaires ont été également déterminées par RMN et chromatographie d'exclusion stérique. Les résultats concordent avec les masses molaires attendues des quantités mises en œuvre.

Les copolymères di-blocs obtenus possèdent un caractère amphiphile. En effet, ils sont composés d'une partie hydrophile : Polyéthylène glycol et d'une partie hydrophobe : la polycaprolactone ou l'acide polylactique avec un rapport massique PEG-PCL de 1 : 1 et PEG-PLA de 1 : 3.

Le degré de polymérisation de la partie polycaprolactone/acide polylactique détermine la solubilité du copolymère dans l'eau et son HLB. En effet, il a été démontré que seuls les

copolymères PCL₁₁₄₀-*b*-PEG₅₀₀₀ (Chausson et al. 2008) et le PLA₂₀₀₀-*b*-PEG₅₀₀₀ (Heald et al. 2002) étaient solubles dans l'eau. Pour des degrés de polymérisation supérieurs, les copolymères obtenus étaient insolubles dans l'eau et formaient via le procédé de nanopréciipitation des micelles sphériques (dans l'eau) dont le cœur hydrophobe était constitué de polycaprolactone ou de acide polylactique entouré par une couronne de PEG gonflée d'eau (Letchford et al. 2007; Huang et al. 1997). Les concentrations micellaires critiques décrites dans la littérature sont de l'ordre de 10⁻⁶-10⁻⁷ M pour des copolymères de tailles similaires (Fairley et al. 2008; Choi et al. 2006). Les HLB calculés montrent que le copolymère PLA-*b*-PEG est plus hydrophobe que le PCL-*b*-PEG. Ceci peut être du à une chaîne hydrocarbonée plus longue dans le cas du premier.

La formulation de particules avec ces copolymères à blocs, leur caractérisation ainsi que leur utilisation comme stabilisants potentiels d'émulsions H/E vont être traitées dans la suite de notre travail.

Chapitre 4

Émulsions stabilisées par des particules de Polycaprolactone : physico-chimie et formulation

4.1. Introduction

L'objectif de cette partie était d'utiliser des particules biodégradables composées de poly (ϵ -caprolactone) de haute masse molaire stabilisées par un copolymère à blocs polycaprolactone-*bloc*-poly(éthylène glycol) PCL-*b*-PEG pour stabiliser des émulsions huile-dans-eau.

On a donc testé l'efficacité de stabilisation de la polycaprolactone ($M_n = 80000$ g/mole) en utilisant plusieurs copolymères à blocs avec des degrés de polymérisation différents pour la partie polycaprolactone ($Dp_{\text{Caprolactone}} = 25-100$), la partie polyéthylène glycol ($M_n = 5000$ g/mole, $n_{\text{OE}} = 113$) étant constante.

Ce type de copolymères à blocs a déjà été testé comme stabilisant lors des travaux déjà publiés au sein du laboratoire (Chausson et al. 2008) où des copolymères à blocs de type PCL-*b*-PEG avec un degré de polymérisation de la partie PCL allant de 10 à 40 ont été utilisés avec succès pour stabiliser des suspensions de particules de polycaprolactone. Hormis le copolymère PCL(10)-*b*-PEG(113) soluble dans l'eau, les autres copolymères avec $n_{\text{CL}} > 20$ sont insolubles dans l'eau.

Cependant le procédé de nanoprecipitation utilisé permettait d'obtenir des suspensions de particules dont la concentration ne dépassait pas 0.6% (m/v). Ces faibles concentrations en particules étaient insuffisantes pour stabiliser des émulsions concentrées.

L'enjeu était donc de produire des particules de polycaprolactone de l'ordre de 150-200 nm avec un indice de polydispersité inférieur à 0.1 ($PdI < 0.1$) :

- sans l'ajout d'aucun autre tensioactif classique,
- en suspension suffisamment concentrée afin de pouvoir les utiliser pour stabiliser des émulsions de Pickering.

On a donc procédé à une modification du procédé de nanopréciipitation classique (Fessi et coll. Brevet Français 1986, Brevet Européen 1987, Brevet US 1992) afin de concentrer au maximum ces suspensions en particules en conservant une distribution granulométrique satisfaisante.

La deuxième étape de ce travail était de stabiliser des émulsions de type huile-dans-eau en utilisant ces particules, d'étudier les paramètres de formulation régissant la taille des émulsions et leur stabilité dans le temps.

4.2. Partie expérimentale

4.1.1. Étude de formulation des particules de polycaprolactone stabilisées par un copolymère à blocs PCL-*b*-PEG.

4.1.1.1. Matériaux

Nous avons utilisé le copolymère à blocs PCL-*b*-PEG ($M_{NMR} = 12992$ g/mole) dont la synthèse est la caractérisation sont décrites dans le chapitre 3 et la polycaprolactone (M_n 70,000-90,000 g/mole, Sigma-Aldrich). L'acétone (Sigma-Aldrich) et l'eau désionisée (purifiée au laboratoire, résistivité 18 M Ω .cm) ont été utilisés tout au long de l'étude.

4.1.1.2. Méthodes

4.1.1.2.1. Mesure de la taille des particules et du potentiel Zéta

Les mesures de tailles des nanoparticules formulées ont été effectuées par diffusion dynamique de la lumière à l'aide du Nanosizer ZS (Malvern instruments). Cette technique permet de mesurer des particules et des macromolécules entre 1 nm et 2 μ m.

Le Nanosizer ZS permet également de déterminer le potentiel Zéta des particules obtenues.

La mobilité électrophorétique est obtenue en appliquant un champ électrique sur l'échantillon (grâce aux deux électrodes présentes sur la cellule) et en mesurant la vitesse des particules.

4.1.1.2.2. Microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB)

Les particules ont été observées à la plateforme technique de l'Université de Lyon 1 (Centre Technologique des Microstructures CT μ). Les suspensions de particules ont été déposées soit sur des

grilles de carbone pour être observées directement en MET (microscope PHILIPS CM120, 60-120 kV) ou sur des plots suivi d'une métallisation au Palladium-Or (BaltecMED020) pour être observées en MEB (microscope Hitachi S800 FEG, 1-30 kV).

4.1.1.3. Résultats et discussion

4.1.1.3.1. Formulation des particules par nanopréciipitation

Le procédé de nanopréciipitation a été choisi pour sa facilité de mise en œuvre. Cependant, les concentrations obtenues en nanoparticules étaient trop faibles pour espérer stabiliser des émulsions par la suite.

En effet, la méthode classique précédemment utilisée dans le laboratoire consistait concrètement à solubiliser 0.2 g de polycaprolactone de haute masse molaire ($M_n = 70000-90000$ g/mole, Sigma-Aldrich) avec 0.1 g de copolymère (rapport massique copolymère/polymère = 1/2) dans l'acétone (Laurylab, 25 mL). La nanopréciipitation (figure 2a) s'effectuait par introduction graduelle sous faible agitation de la phase organique dans la phase aqueuse (eau désionisée, 50 mL). L'élimination du solvant organique s'effectuait par la suite sous pression réduite (Figure 2b). La concentration en nanoparticules obtenues était de l'ordre de 0.6 % m/v.

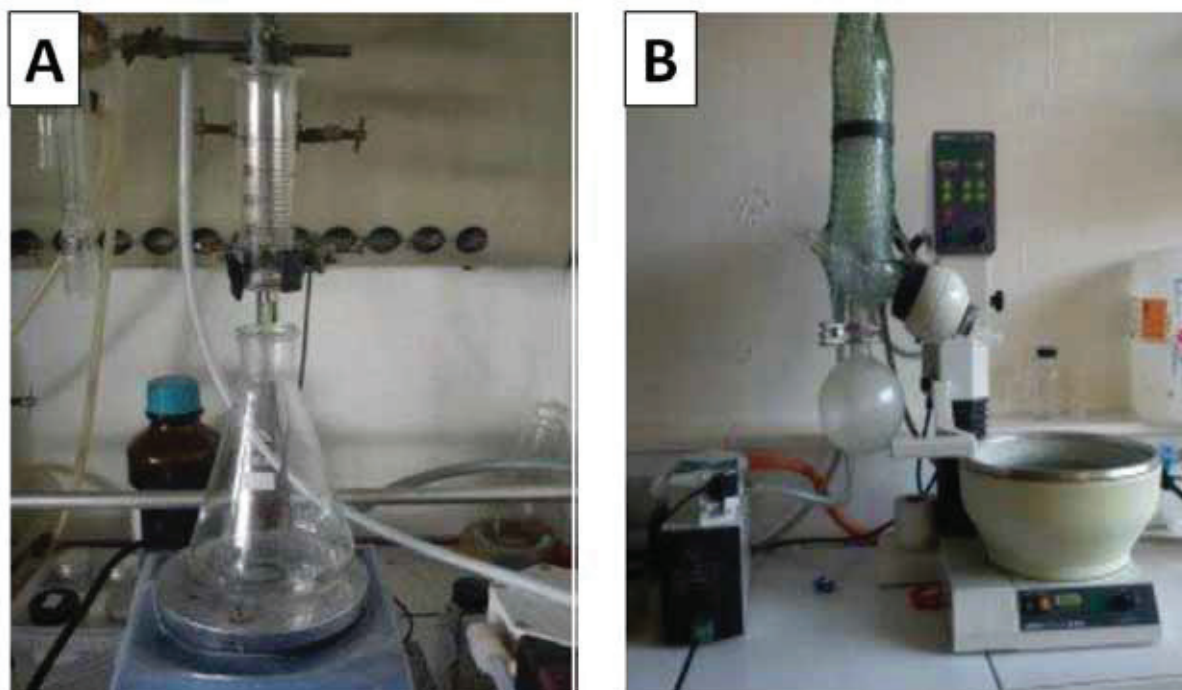


Figure 2. Images du procédé de nanopréciipitation. (a) : montage pour le procédé de nanopréciipitation ; (b) : montage utilisé pour l'évaporation du solvant organique par évaporation sous pression réduite.

4.1.1.3.2. Choix de la polycaprolactone comme constituant des particules

Nous avons choisi de la polycaprolactone comme polymère principal constituant les particules. La polycaprolactone est un polymère semi-cristallin avec une température de transition vitreuse de l'ordre de -60°C et une température de fusion voisine de $+60^{\circ}\text{C}$. La masse molaire élevée du polymère permettait d'assurer non seulement la robustesse et la répétabilité du procédé, mais allongeait également la durée de dégradation de nos particules.

4.1.1.3.3. Choix du degré de polymérisation de la partie PEG du copolymère

Le polyéthylène glycol a été choisi pour constituer la partie hydrophile de nos particules. Ce polymère hydrosoluble et biocompatible a déjà été utilisé pour assurer la furtivité dans le corps de particules biodégradables encapsulant des substances actives. Les chaînes de polyéthylène glycol constituant ces particules remplissaient plusieurs rôles dont : la formation d'une couronne entourant les particules assurant leur stabilité par répulsion stérique, mais aussi en augmentant le temps de circulation de ces nano-vecteurs en inhibant leur capture par le système réticuloendothélial.

Dans notre cas, les copolymères dont la chaîne PEG était plus courte ($D_p < 113$) n'ont pas permis d'obtenir des particules stables. En utilisant le procédé précédemment décrit, une agrégation importante au cours du procédé de nanoprecipitation était observée accentuée pendant l'évaporation de l'acétone. Pour cela, tous les copolymères utilisés par la suite avait une longueur de chaîne du polyéthylène glycol fixe ($D_p = 113$, $M_n = 5000$ g/mole) et seul le D_p de la polycaprolactone a été varié.

4.1.1.3.4. Choix du degré de polymérisation de la partie PCL du copolymère

Nous avons utilisé le copolymère di-blocs PCL-*b*-PEG comme stabilisant avec différents degrés de polymérisation de la partie polycaprolactone ($D_p = 10-100$).

Tableau 2. Tailles des particules obtenues en faisant varier le D_p de la polycaprolactone constituant le copolymère à blocs PCL-*b*-PEG.

| D_p Polycaprolactone | 10 | 25 | 40 | 65 |
|---|----------------------|----------------------|---------|------|
| Taille des particules (nm) ¹ | Formation d'agrégats | Formation d'agrégats | 160-170 | 130 |
| Pdl^2 | > 1 | > 1 | 0.06 | 0.07 |

1. Déterminée par diffusion de la lumière (Malvern[®] NanoZS)

2. Indice de polydispersité calculé par la méthode des cumulants (en diffusion de la lumière)

Le Tableau 2 présente des résultats de la nanoprécipitation de la polycaprolactone en utilisant des copolymères di-blocs PCL-*b*-PEG de D_p différents. Les tailles des particules ont été déterminées en diffusion de la lumière en utilisant un Nanosizer^R, Malvern Instruments.

Il a été démontré que des copolymères avec un $D_p < 25$ sont inefficaces pour l'obtention de particules avec des distributions granulométriques étroites. En effet, des agrégats importants apparaissent en cours de nanoprécipitation et leur nombre s'accroît pendant l'évaporation du solvant organique.

Par contre, des copolymères di-blocs avec un $D_p > 25$ (40, 65, > 70), ont permis d'obtenir une meilleure stabilisation des particules de polycaprolactone.



Figure 3. Suspension de particules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère à blocs PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃.

4.1.1.3.5. Choix du rapport massique (RM) copolymère/polymère

Nous avons cherché à tester différents rapports massiques PCL-*b*-PEG/PCL afin de déterminer l'influence de ce paramètre sur la taille et la stabilité des nanoparticules obtenues.

Le but de cette étude est de définir la quantité minimale de copolymère à blocs nécessaire à la stabilisation des particules de polycaprolactone.

Pour ce faire, les rapports massiques PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃/Polycaprolactone ($M_n = 80000$ g/mole) allant de 0 à 2 ont été testés.

4.1.1.3.6. Influence du rapport massique sur la taille des particules obtenues

La polycaprolactone formulée sans l'adjonction de copolymère stabilisant donne de grosses particules avec une agrégation importante suivie d'une précipitation au fond du récipient de conservation (Figure 4).



Figure 4. Agrégation des particules de polycaprolactone en l'absence de copolymère à blocs.

Une diminution de la taille des particules (Figure 5) a été obtenue en augmentant le rapport massique (RM) $PCL_{65}\text{-}b\text{-}PEG_{113}/PCL$ de 0 à 2.

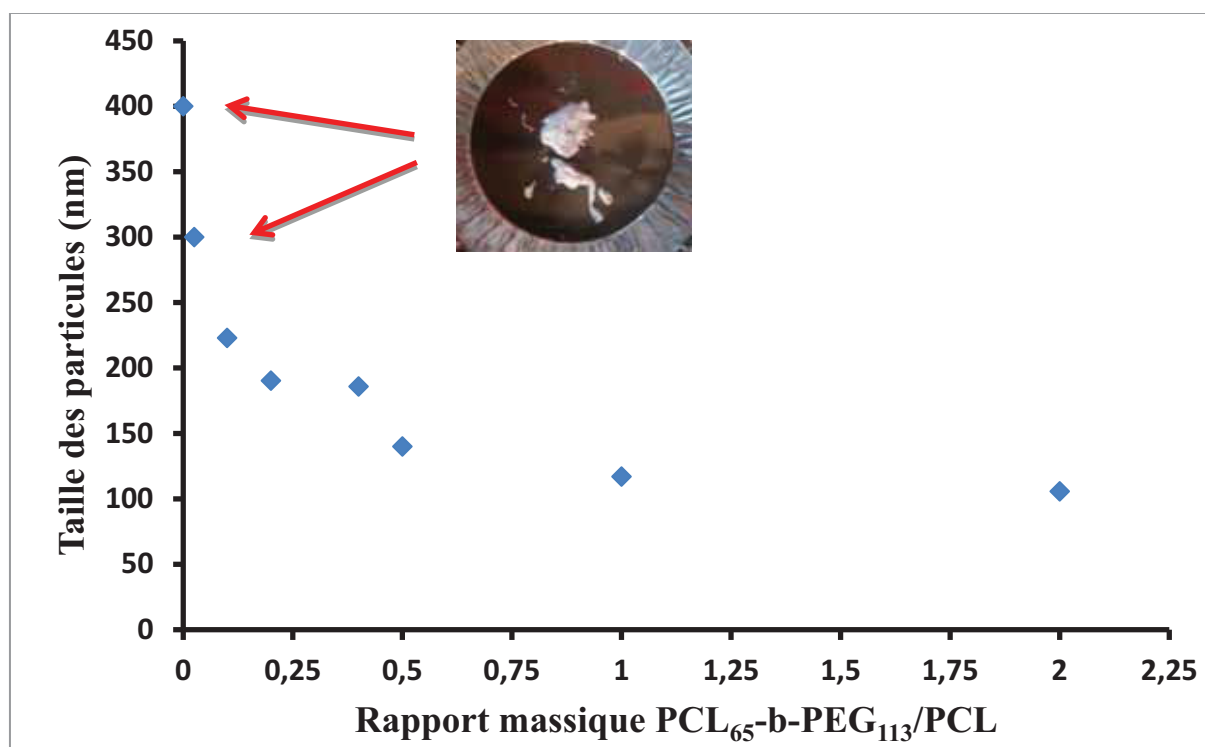


Figure 5. Influence du rapport massique RM ($PCL\text{-}b\text{-}PEG/PCL$) sur la taille des particules obtenues.

Les $RM < 0.1$ n'ont pas permis d'obtenir des suspensions stables de particules. En effet, une agrégation importante des particules obtenues a été observée. Les particules avec un RM de 0,1, 0,2 et 0,5 ont été soumises à une étude de stabilité pendant une durée de 1 mois à 25°C. Les résultats montrent une bonne stabilité des nanoparticules dans la phase aqueuse. Il semble que la quantité optimale de copolymère à blocs nécessaire à la stabilisation des particules de polycaprolactone s'accompagne d'un $RM = 0.1$. Toutefois, seule les particules formulées avec un $RM = 1/2$ ont été prouvées stables pour une durée de 2 ans à 25°C. Ce rapport massique sera utilisé par la suite dans les phases d'optimisation de la méthode de nanopréciipitation et de concentration des suspensions de particules.

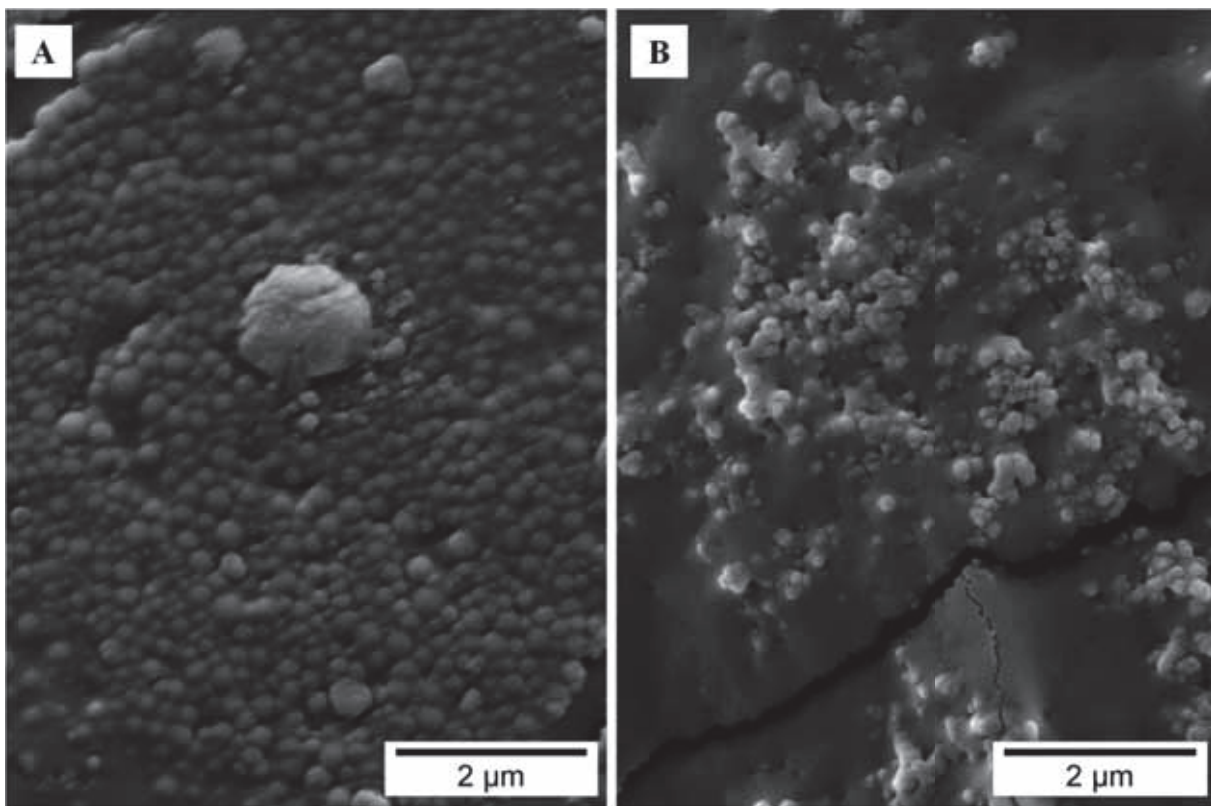


Figure 6. Images de microscopie électronique à balayage de particules de polycaprolactone/PCL-*b*-PEG. A : $RM = 0.25$, B : $RM = 0.5$.

4.1.1.3.7. Influence du rapport massique sur le potentiel zêta des particules

La mesure du potentiel zêta renseigne sur la modification de surface de la polycaprolactone induite par l'adsorption des molécules de copolymère à blocs. L'évolution de la structure des particules est suivie en mesurant le potentiel de surface en fonction de l'ajout de quantités croissantes du copolymère à blocs.

Les particules de polycaprolactone utilisée seule ont un potentiel zêta fortement négatif (= -30 mV). L'ajout dans le milieu de nanoprécipitation de quantités croissantes de copolymères à blocs (accroissement de RM de 0 à 2) s'accompagne d'une diminution de la valeur absolue du potentiel zêta. Les particules ainsi obtenues sont formées d'un cœur hydrophobe constitué par la polycaprolactone et entourées d'une couronne hydrophile constituée par le PEG. La variation continue du potentiel zêta en fonction de RM montre que l'adsorption des molécules de copolymère à blocs est progressive.

Le potentiel négatif des particules vient de la charge négative des extrémités de chaînes de la PCL. Le potentiel électrocinétique a évidemment le signe de la charge des particules. Cependant ce potentiel n'est pas le potentiel de surface des particules mais le potentiel au "plan de cisaillement nul" qui se trouve à une petite distance de la surface des particules. En effet, la mesure consiste en une détermination de la mobilité électrophorétique des particules, c'est à dire de la vitesse des particules. Le potentiel qui est déduit est donc le potentiel à la surface de l'objet qui se déplace sous le champ électrique. Cet objet contient les particules accompagnées d'éventuelles molécules adsorbées et des molécules de solvant entraînées dans le mouvement. Le recouvrement des particules de PCL par les copolymères à blocs non-ioniques PCL-*b*-PEG repousse le plan de cisaillement nul plus encore dans l'eau à cause de la formation d'une couche de PEG hydrophile adsorbé à la surface. Le potentiel mesuré est donc plus faible, bien que la charge électrique n'ait probablement pas changé. Le potentiel zêta atteint des valeurs très faibles (que l'instrument mesure comme étant nulles) quand l'épaisseur de la couche de PEG adsorbées est plus grande que la longueur de Debye qui caractérise l'épaisseur de la double couche électrique.

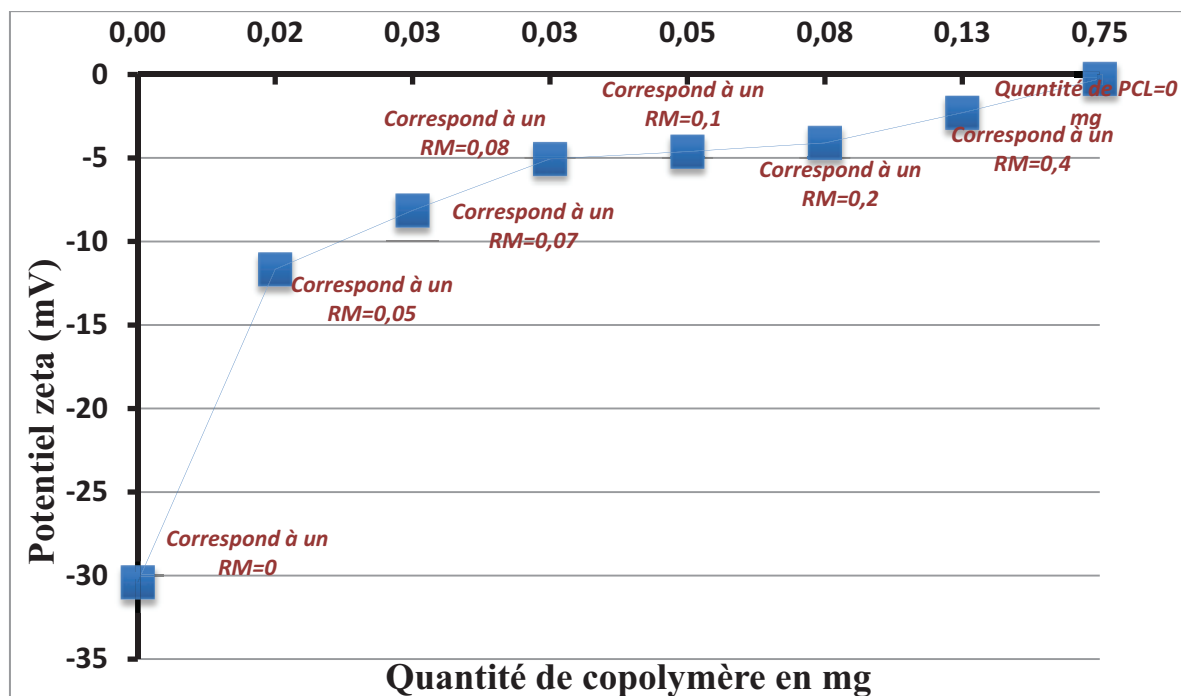


Figure 7. Potentiel zêta des particules de polycaprolactone en fonction de la quantité de copolymère à blocs PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃.

4.1.1.4. Concentration des suspensions aqueuses de particules

Les concentrations en particules obtenues (< 1% m/v) étaient encore incompatibles avec une stabilisation d'émulsions huile-dans-eau. Des essais de séchage par la lyophilisation ont été entrepris, ainsi que des essais d'optimisation du procédé de nanopréciipitation.

4.1.1.4.1. Essais de lyophilisation

Dans un premier temps, la lyophilisation des suspensions de particules a été envisagée afin de recueillir des particules sous forme de poudre permettant de les utiliser directement comme stabilisant des émulsions. Leur utilisation dans le processus d'émulsification serait préalablement précédée par une simple dispersion dans l'eau.

La mise au point d'un procédé de lyophilisation dans ce cas précis nécessitait :

- l'utilisation de températures de dessiccation primaire très basses (< -45°C) et ceci à cause principalement de la température de transition vitreuse de la polycaprolactone qui est de l'ordre de -60°C ;
- l'utilisation d'une quantité minimale de substances cryoprotectrices afin d'éviter que ces substances soient incriminées ultérieurement dans la stabilisation des émulsions.

Les cryoprotecteurs utilisés en premier lieu étaient le mannitol et le sucrose à des concentrations allant de 1 à 10% m/v. Les particules ont été préparées en utilisant de la polycaprolactone stabilisées par le copolymère di-blocs PCL₄₀-*b*-PEG₁₁₃. 1 mL (concentration en particules = 1%) de cette suspension a été introduit dans des flacons pour effectuer la lyophilisation. La suspension a été additionnée de la quantité de cryoprotecteur testé.

Les conditions opératoires consistent en une congélation à -80°C pendant 4 h, suivie d'une dessiccation primaire à -50°C (pression réglée = 0.11 mbar) pendant 20 h. Le processus de lyophilisation secondaire s'est déroulée pendant 4 h à +15°C (pression dans l'enceinte = 0.09 mbar). Le Tableau 3 résume les différentes conditions de lyophilisation obtenues ainsi que les tailles des particules obtenues après lyophilisation en présence du mannitol. La dispersion a été effectuée en ajoutant aux flacons 1 mL d'eau distillée et passage au vortex 1 min.

Tableau 3. Résultats de la remise en suspension des particules après lyophilisation en présence du mannitol.

| Mannitol (%) | Avant lyophilisation | Après lyophilisation et dispersion dans 1 mL d'eau | | | |
|--------------|----------------------|--|------|-----|------|
| | 0 | Lyophilisat sans cryoprotecteurs | 1 | 2 | 5 |
| Taille (nm) | 163 | 3992 | 1115 | 947 | 301 |
| <i>Pdl</i> | 0.07 | >1 | 0.6 | 0.2 | 0.17 |

La lyophilisation en présence du mannitol n'a pas permis d'obtenir une bonne dispersion des particules de départ. Pour cela, le mannitol a été remplacée par du sucrose à des concentrations de 2.5, 5, 10% m/v.

Les résultats présentés dans le Tableau 4 montrent qu'avec le même mode opératoire précédemment décrit, une concentration en sucrose de 10% permettait d'obtenir une redispersion optimale dans l'eau après lyophilisation avec une distribution de taille des particules relativement inchangée.

Tableau 4. Résultats de la remise en suspension des particules après lyophilisation en présence de sucrose.

| Mannitol (%) | Avant lyophilisation | Après lyophilisation et dispersion dans 1 mL d'eau | | | |
|--------------|----------------------|--|------|------|-------|
| | 0 | Lyophilisat sans cryoprotecteurs | 2.5 | 5 | 10 |
| Taille (nm) | 163 | 3992 | 199 | 185 | 171.8 |
| <i>Pdl</i> | 0.07 | >1 | 0.23 | 0.19 | 0.09 |

Malgré de bons résultats au niveau de la redispersion des nanoparticules après lyophilisation en présence de sucre, la lyophilisation n'a pas été exploitée pour les raisons suivantes :

- le taux de sucre nécessaire à la conservation des propriétés de taille et dispersion des particules a été jugé trop élevé dans la préparation et donc pouvant interférer dans les propriétés de stabilisation des émulsions huile-dans-eau par la suite.
- Le procédé de lyophilisation utilisé était long et peu pratique pour obtenir des quantités suffisantes de nanoparticules en poudre.

Pour cela, nous nous sommes tournés vers la modification du procédé de nanoprécipitation utilisé pour fabriquer les nanoparticules.

4.1.1.4.2. Optimisation du procédé de nanoprécipitation

Les essais de concentration des suspensions (Tableau 5) obtenues ont commencé par un allongement du temps d'évaporation suivant la nanoprécipitation. Le but était d'évaporer sous pression réduite le solvant organique ainsi qu'une grande partie de l'eau mise en œuvre dans le procédé.

Les résultats permettaient d'augmenter la concentration jusqu'à une valeur seuil de 2% (m/v) avec au-delà, le risque de formation d'agrégats importants. Cette solution rendait le procédé dépendant du temps d'évaporation qui s'en trouvait non seulement allongé mais surtout très peu reproductible.

On s'est alors tourné vers une modification du procédé de nanoprécipitation en réduisant la quantité d'eau mise en œuvre de 50 à 25 mL. Le volume d'acétone et la quantité en polymères (polycaprolactone + copolymère) restant constants. Les résultats obtenus avec le PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃ sont intéressants. En effet des particules parfaitement stables et une distribution granulométrique étroite ont été obtenues. La concentration finale en particules dans l'eau est passée de 0.6% à 1.2%.

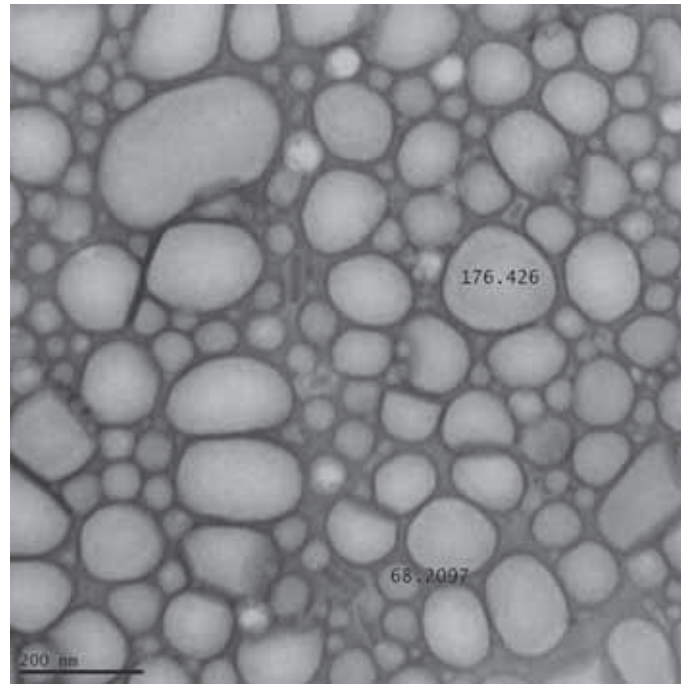


Figure 8. Image de microscopie électronique à transmission de nanoparticules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère di-blocs $PCL_{65}\text{-}b\text{-}PEG_{113}$ ($RM=0.5$).

Ensuite, toujours dans un souci d'augmenter encore cette concentration les quantités en polymères a été augmentée 2.5 fois par rapport à la formule de départ. Afin d'assurer la solubilisation de ces polymères, le volume d'acétone est passé de 50 à 100 mL. La concentration finale après évaporation de solvant a été élevée à de 3% (m/v) accompagnée cependant d'une augmentation de la taille des particules.

Enfin, la quantité d'eau a encore été réduite de 25 mL à 15 mL pour obtenir une suspension de particules concentrée à 5% (m/v) avec un rapport massique copolymère/polymère toujours de 1/2 et une taille de particules équivalente à celle obtenues au départ.

Tableau 5. Étapes d'optimisation de la méthode de nanopréciipitation en vue d'augmenter la concentration en nanoparticules des suspensions aqueuses obtenues.

| Optimisation de la nanopréciipitation | Méthode classique | Etape 1 ² | Etape 2 ² | Etape 3 | Formule optimisée |
|---|-------------------|----------------------|----------------------|---------|-------------------|
| Eau | 50 | 25 | 25 | 25 | 15 |
| Acétone | 25 | 50 | 50 | 100 | 50 |
| Masse copolymère PCL ₆₅ - <i>b</i> -PEG ₁₁₃ | 0.1 | 0.2 | 0.25 | 0.5 | 0.25 |
| Masse polycaprolactone | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 1 | 0.5 |
| Concentration en particules ¹ (% m/v) | 0.6 | 2.4 | 3 | | 5 |
| Taille des particules (nm) | 133 | 137 | 145 | 215 | 160 |
| <i>Pdl</i> | 0.07 | 0.04 | 0.03 | 0.245 | 0.09 |

¹ en suspension aqueuse, après évaporation du solvant organique

² Procédé de concentration dépendant du temps d'évaporation du solvant organique et de l'eau → Risques d'agrégation et de filmification importants.

4.1.2. Formulation d'émulsions huile-eau stabilisées par des particules du type (polycaprolactone+PCL-*b*-PEG)

Les suspensions de particules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère à blocs PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃ vont être utilisées dans la suite de ce chapitre afin de stabiliser des émulsions huile-dans-eau.

4.1.2.1. Matériaux

Nous avons préparé des suspensions de particules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère à blocs PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃ selon le procédé mis au point dans la partie 2.1 et concentrées à 5% m/v. Les huiles testées sont : un mélange de triglycérides à chaînes moyennes de type Myritol 312, de l'huile silicone, stéarate d'éthylhexyle et de la paraffine lourde.

4.1.2.2. Méthodes

4.1.2.2.1. Formulation des émulsions

Nous avons réalisé une série d'émulsions formulées avec la suspension à 5 % en poids de polycaprolactone/PCL-*b*-PEG, où nous avons fait varier la quantité d'huile de 10 à 50 % et la quantité de particules de 2.5 à 5%.

Les nanoparticules ont été préparées selon la méthode de nanopréciipitation optimisée dans la partie 2.1 et leur taille a été mesurée par diffusion de la lumière (Zetasizer^R, Malvern instruments).

On a réalisé l'émulsification à l'aide d'un mélangeur de type rotor-stator Ultra-Turrax[®] T25 (Ika-Janke-Kunkel, Allemagne), avec une tige de 10 mm de diamètre et à une vitesse de 22500 rpm. Pour les mélanges de 10 g, l'agitation dure 5 minutes.

4.1.2.2.2. Mesure de la granulométrie des émulsions

Un granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern instruments) a été utilisé. Il permet la mesure de la distribution granulométrique de 0,04 à 2000 μm , nous permettant ainsi de mesurer la taille des particules dans les suspensions (inférieure à 1 μm) et la taille des gouttelettes d'émulsion (supérieure à 1 μm). La mesure de taille a été réalisée immédiatement après la préparation des émulsions et 3 semaines plus tard afin de déterminer la formation d'agrégats et donc la présence d'un phénomène de floculation.

4.1.2.2.3. Technique de centrifugation

L'ultracentrifugeuse Optima MAX-XP a été utilisée pour les étapes de centrifugation des suspensions aqueuses de particules. Les suspensions de particules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère à blocs PCL-*b*-PEG ont été introduites dans des tubes et centrifugées à 40000 trs/min pendant 40 min.

4.1.3. Résultats et discussion

4.1.3.1. Formulation des émulsions

4.1.3.1.1. Choix du type d'huile

Dans un premier temps, nous avons testé le pouvoir stabilisant des particules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère di-blocs PCL-*b*-PEG en utilisant des huiles ayant une tension interfaciale eau-huile différentes.

Le but de cette étude était d'explorer le sens des émulsions qui pouvaient être obtenues avec les particules.

Une suspension de nanoparticules renfermant 5% m/v a été utilisée pour stabiliser des émulsions renfermant 5 et 50% m/v d'huile.

Ces nanoparticules ont été formulées avec le procédé de nanopréciipitation optimisé avec un rapport massique copolymère/polymère $RM = 1/2$.

Les émulsions obtenues subissaient étaient toutes du type huile-eau et présentaient un crémage réversible par simple agitation pour les faibles proportions d'huile. Les mesures de tailles à $t = 0$ et après 2 mois à 40°C (Tableau 6) ont montré une très bonne stabilité de ces émulsions même en présence d'une forte proportion d'huile.

Tableau 6. Résultats de stabilité des émulsions obtenues avec différentes huiles.

| Huile | % huile | Stabilité après préparation | Stabilité après 2 mois à 40°C | Taille moyenne $D(4,3)$ (μm) |
|------------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|---|
| Myritol 312 | 10% | Stable | Stable | 5 |
| | 50% | Stable | stable | 37 |
| Huile silicone 20 cSt | 10% | Stable | Stable | 12.5 |
| | 50% | Stable | Stable | 17 |
| Stéarate d'éthylhexyle | 10% | Stable | Stable | 13 |
| | 50% | Stable | Stable | 26 |
| Paraffine lourde | 10% | Stable | Stable | 18 |
| | 50% | Stable | Stable | 34 |

Les émulsions étant à visée cosmétique voire pharmaceutique, le Myritol 312 ou ses équivalents (Miglyol 812...) de viscosité faible et qui a donné les émulsions les plus fines a été retenu pour le reste de l'étude.

Nous avons formulé des émulsions en utilisant les triglycérides à chaînes moyennes comme phase interne et une suspension de particules de polycaprolactone/copolymère concentrée à 5% m/v en phase aqueuse.

L'émulsification a été réalisée par un agitateur de type UltraTurrax avec une tige N°10, à 22500 trs/min pendant 5 min. La proportion d'huile a été variée de 10 à 50% m/v. Les tailles des émulsions ainsi obtenues ont été caractérisées à $t = 0$ et après conservation à $T = 25^{\circ}\text{C}$ et 40°C .

Tableau 7. Taille des gouttelettes obtenues avec le Myritol 312.

| - % Huile | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% |
|--|------|------|------|------|------|
| - % particules dans l'émulsion | 4.5% | 4% | 3.5% | 3% | 2.5% |
| <i>D</i>(0.1) (µm) | 1.4 | 1.4 | 1.6 | 2.0 | 4.0 |
| <i>D</i>(0.5) (µm) | 3.9 | 4.5 | 7.9 | 13.6 | 24 |
| <i>D</i>(0.9) (µm) | 10.6 | 15 | 30 | 37 | 97 |
| Span* | 2.4 | 3.0 | 3.6 | 2.6 | 3.9 |
| Moyenne en volume <i>D</i>(4.3) | 5.1 | 13.5 | 20 | 23 | 37 |

* Span = $D(0.9)-D(0.1)/D(0.5)$

4.1.3.1.2. Stabilité des émulsions

4.1.3.1.2.1. Influence de la proportion en phase interne

La Figure 10 montre le suivi de stabilité des émulsions formulées avec une suspension aqueuse de 5% (m/v) de nanoparticules et 10, 20, 30, 50% (m/v) d'huile de triglycérides à chaînes moyennes de type Myritol 312. Les résultats montrent que les tailles des gouttelettes d'huile obtenues exprimées en $D(0.5)$ et $D(0.9)$ (tailles en µm de 50% et 90% de la population respectivement) variaient très peu au cours du temps.

Ces émulsions même renfermant une très forte proportion en huile se montrent donc très stables au cours du temps.

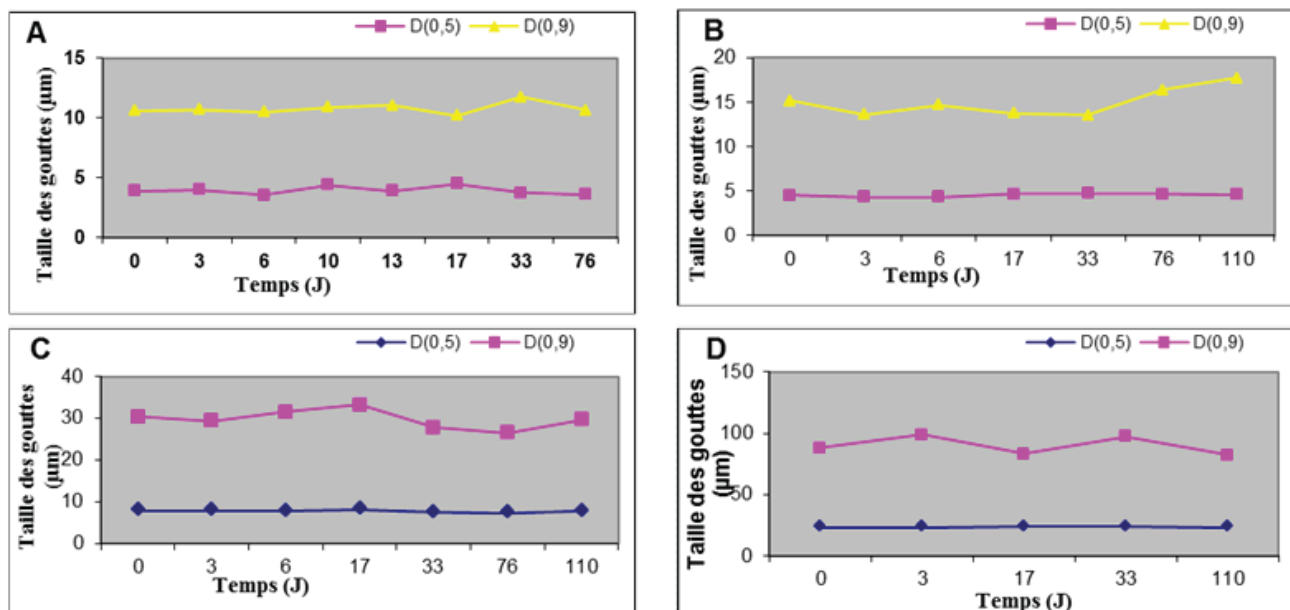


Figure 10. Évolution du $D(0.5)$ (μm) et du $D(0.9)$ (μm) en fonction du temps pour une émulsion renfermant 5% (m/v) en nanoparticules et (A) 10% (m/v) de Myritol 312, (B) 20% (m/v) de Myritol 312, (C) 30% (m/v) de Myritol 312, (D) 50% (m/v) de Myritol 312.

Toutes les émulsions obtenues sont stables à 25°C et à 40°C. Elles présentent cependant un crémage dépendant de la proportion en phase interne. Ce crémage est réversible par simple agitation.

4.1.3.1.2.2. Influence du rapport massique Copolymère/polymère sur la stabilité des émulsions

Nous avons également préparé des émulsions en faisant varier le rapport massique copolymère/polymère dans les suspensions de particules obtenues par nanopréciipitation.

Des suspensions de nanoparticules de polycaprolactone ont été préparées en faisant varier le RM copolymère/polymère de 0.1 à 0.5.

Les émulsions ont été réalisées avec 10% (m/v) de Myritol 312, à l'aide d'un UltraTurrax et une tige S25N18G de 18 mm de diamètre. L'émulsification a été maintenue pendant 1 minute à 22000 trs/min.

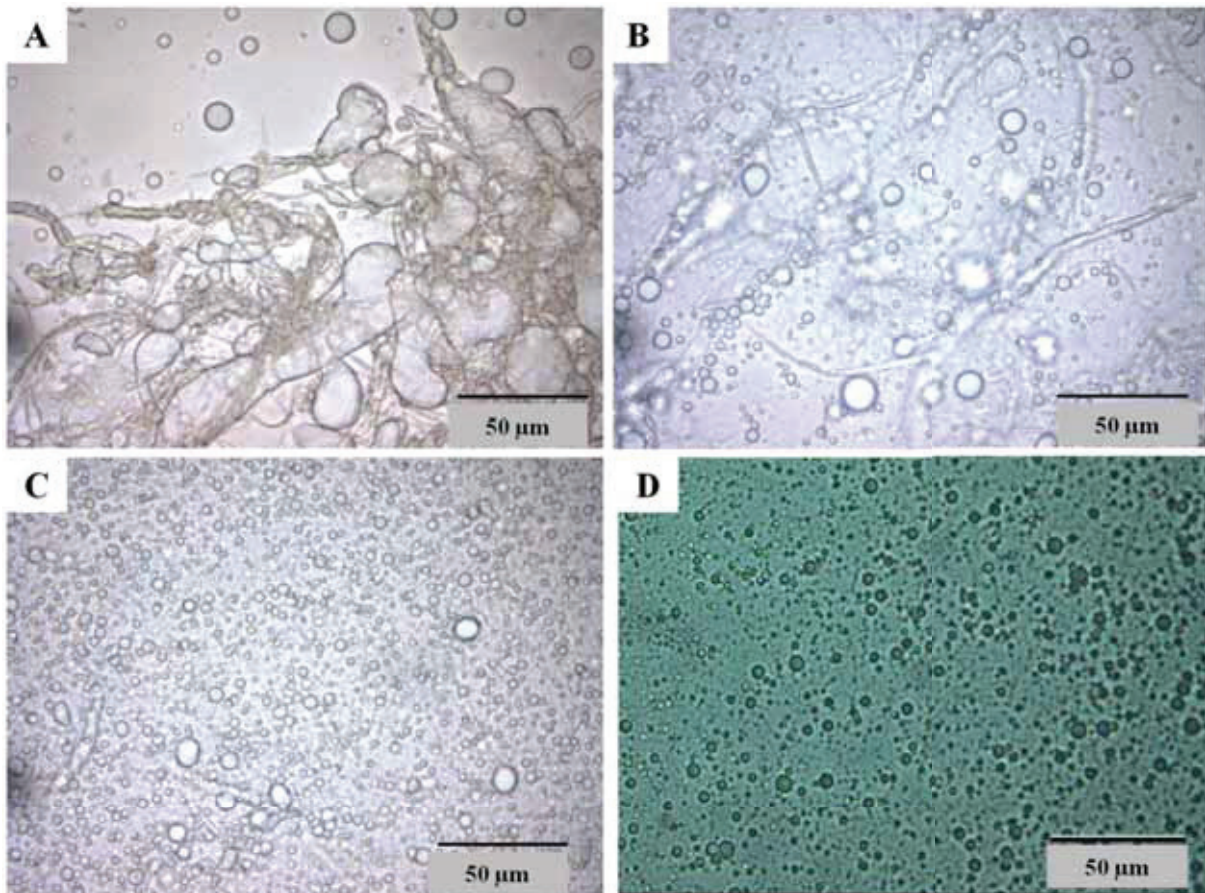


Figure 11. Images de microscopie optique d'une émulsion obtenue avec 10% en phase interne et une suspension de particules formulées avec un rapport massique de : (A) 0.1, (B) 0.15, (C) 0.2, (D) 0.5.

Les mesures de taille des gouttelettes formulées avec 5% (m/v) de Myritol 312 et des suspensions de nanoparticules concentrées à 5% (m/v) de RM 0.1, 0.15, 0.2 et 0.5 ont montré une grande différence dans l'aspect et les propriétés finales des préparations obtenues. En effet, des émulsions n'ont pu être obtenues que pour des $RM > 0.2$. Les $0.1 < RM < 0.2$ ont donné des préparations instables où l'huile a été expulsée à la surface tandis que l'on a observé une très forte agrégation des particules polymériques. Les observations faites en microscopie optique montrent pour ces préparations la formation de filaments polymériques au contraire des émulsions formulées avec un $RM > 0.2$ où l'on a pu observer des gouttelettes d'huile parfaitement individualisées.

Ces résultats indiquent que pour des $RM < 0.2$, les particules présentes sont incapables de stabiliser les gouttelettes d'huile.

Ces résultats surprenants nous ont fait penser à l'hypothèse qu'il pouvait exister dans nos suspensions aqueuses plus d'un type particulière. En effet, le RM de 0.1 a été identifié précédemment comme celui correspondant à une quantité optimale de copolymère di-blocs nécessaire à la

stabilisation des particules de polycaprolactone. Donc pour un $RM > 0.1$, le copolymère di-blocs ajouté en excès dans le milieu étant insoluble dans l'eau pourrait former des micelles et permettrait peut-être d'assurer la stabilité des émulsions formulées.

4.1.3.1.2.3. Mise en évidence de la formation de micelles de copolymère à blocs PCL-*b*-PEG pendant la nanoprécipitation

À la lumière des résultats précédents, les suspensions de particules de polycaprolactone formulées par nanoprécipitation à une concentration de 5% (m/v) avec des RM allant de 0.05 à 0.5 ont été centrifugées 40 min à 40000 trs/min et le surnageant récupéré.

Après dilution préalable avec de l'eau désionisée, le copolymère à blocs a été dosé par formation d'un complexe iodé entre l'iode et le PEG constituant le copolymère (Annexe 1).

La Figure 12 montre les résultats obtenus en fonction du RM copolymère/polymère. De façon surprenante, les résultats montrent la coexistence des particules de polycaprolactone avec des micelles de copolymères à blocs.

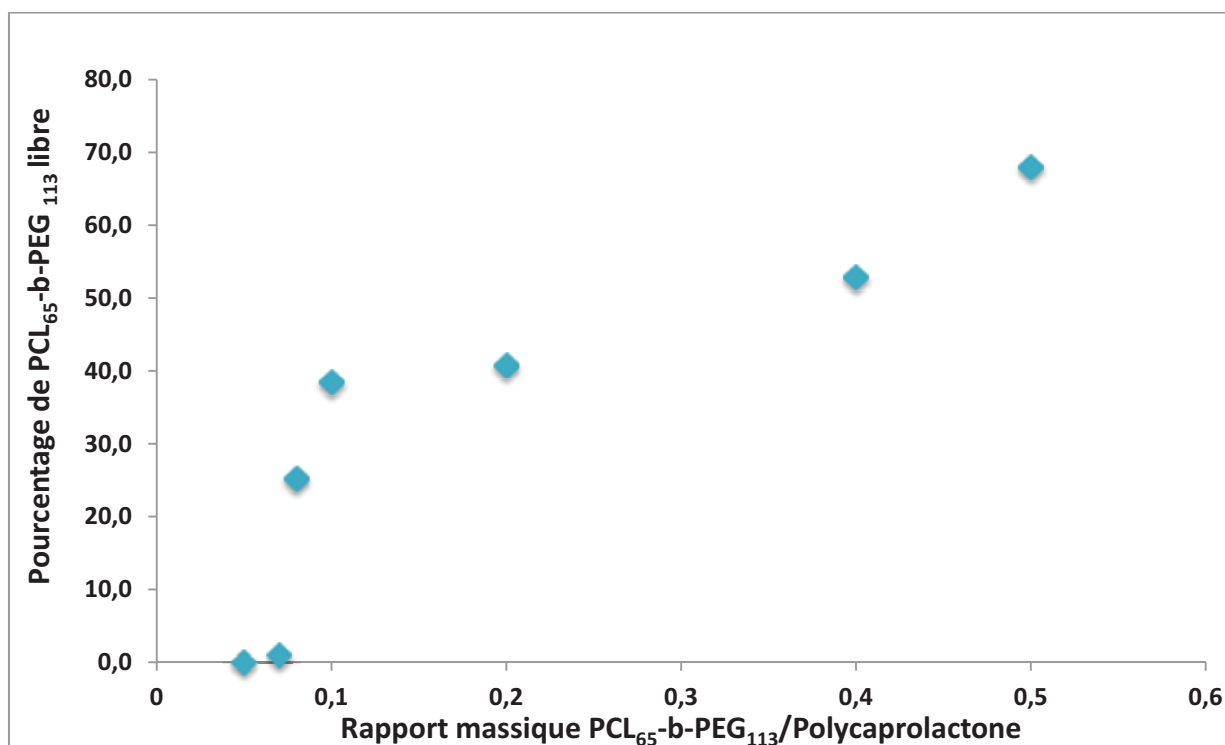


Figure 12. Pourcentage de copolymère sous forme de micelles libres en fonction du rapport massique PCL-*b*-PEG/Polycaprolactone utilisé dans la formulation des nanoparticules par nanoprécipitation.

Le pourcentage de copolymère à blocs sous forme de micelles augmente au fur et à mesure que le RM augmente. Ainsi, au-delà d'un RM de 0.07, ce pourcentage passe de 25% de la quantité de copolymère mise en œuvre dans le procédé de nanopréciipitation à 68% pour un RM de 0.5.

4.3. Conclusion

Cette partie nous a permis de définir différents paramètres nécessaires à la préparation de particules biodégradables à base de polycaprolactone et du copolymère à blocs PCL-*b*-PEG.

Tout d'abord, le degré de polymérisation de ce dernier a été choisi de manière à obtenir des particules de taille nanométrique avec une distribution granulométrique resserrée. Le procédé de nanopréciipitation classiquement utilisée a été modifié de manière à accroître la concentration en particules des suspensions aqueuses obtenues et ceci en s'affranchissant des paramètres liés au procédé tels que l'évaporation ou la lyophilisation dont les résultats se sont avérés peu reproductibles. La concentration en particules ainsi obtenues a été multipliée par 8.

Afin d'utiliser une quantité minimale de copolymère à blocs, différents rapports massiques copolymère/polymère ont été testés. Les résultats montrent que les $RM < 0.1$ ne permettent pas d'obtenir des suspensions stables en particules. Une valeur de RM de 0.1 a été identifiée comme un seuil à partir duquel l'obtention de particules stables était possible. De plus l'augmentation du RM de 0.1 à 2 a été accompagnée d'une réduction de la taille des particules alors que le phénomène contraire a été observé en stabilisant des particules de polystyrène à l'aide d'un copolymère polystyrène-PEG (Budijono et al. 2010). De plus, au-delà d'une certaine concentration, la formation de micelles de copolymère polystyrène-PEG a été observée.

Les nanoparticules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère PCL₆₅-*b*-PEG₁₁₃ ($RM = 1/2$, concentration en particules = 5% m/v) obtenues par le procédé de nanopréciipitation modifié ont été utilisées avec succès pour stabiliser des émulsions de Myritol 312 dans l'eau. Ainsi des émulsions renfermant de 10 à 50% m/v ont montré une très bonne stabilité à la coalescence après conservation à 25 et 40°C.

Des nanoparticules avec un rapport massique $< 1/2$ ont également été testées pour leur capacité à stabiliser des émulsions huile/eau. Les résultats ont montré que pour un $RM < 0.2$, il n'était pas possible d'obtenir des émulsions stables.

Ces résultats surprenants nous ont poussés à investiguer la nature des particules réellement stabilisatrices. Ainsi la centrifugation des suspensions de particules et le dosage du PEG constituant le copolymère a montré la coexistence au-delà d'un RM de 0.07, de particules de polycaprolactone (130-160 nm) mais aussi de micelles de copolymère de tailles de l'ordre de 30-40 nm.

Un RM copolymère/polycaprolactone de 0.1 était la valeur minimale nécessaire pour obtenir des particules non fusionnées. Ainsi, il est impossible d'obtenir des particules de polycaprolactone stables en l'absence de micelles de PCL-*b*-PEG en excès.

Ces micelles en excès permettent de stabiliser la polycaprolactone émulsifiée et à partir d'un RM de 0.1 mais ne permettent de stabiliser des émulsions huile/eau qu'à partir d'un RM de 0.25.

Ce résultat intéressant met en évidence non seulement le potentiel de ces micelles en excès à stabiliser des émulsions huile-dans-eau, tel qu'il a été démontré dans ce chapitre mais aussi la capacité des deux types particulaires co-existants à encapsuler et vectoriser des actifs thérapeutiques.

Chapitre 5

Formulation de nanoparticules à base de copolymères à blocs et caractérisation physico-chimique

5.1. Introduction

Nous aborderons dans ce chapitre la formulation par nanopréciipitation des micelles de copolymères à blocs synthétisés dans le chapitre 3. La formation de ces systèmes est essentiellement basée sur des interactions de type non polaire et hydrophobe existant au sein du cœur hydrophobe de la particule. Ces agrégats pseudo-micellaires coexistent dans un état de non équilibre thermodynamique suite à l'élimination du solvant organique et seront donc assimilés à des particules solides (Zhang et Eisenberg 1996). En effet, ils diffèrent des micelles formées par tensioactifs classiques de faible poids moléculaire dont l'équilibre thermodynamique est assuré par un échange perpétuel des molécules tensioactives entre la micelle formée et l'extérieur. Ces derniers forment spontanément des micelles dès leur introduction dans l'eau, tandis que les copolymères à blocs utilisés insolubles dans l'eau (CMC très faible) ne s'organisent en micelles qu'après dissolution dans un solvant organique approprié et introduction dans l'eau (Gohy 2005).

En fonction de la longueur de la partie hydrophobe, plusieurs morphologies peuvent être rencontrées. Des micelles sphériques sont formées lorsque le copolymère comporte une chaîne hydrophobe plus petite que la partie hydrophile. Dans le cas contraire, plusieurs formes non sphériques peuvent être rencontrées comme des lamelles ou des aiguilles (Zhang & Eisenberg 1996).

Plusieurs méthodes de préparation de ces micelles ont été retrouvées dans la littérature. Ces méthodes de préparation ont été démontrées avoir un impact non seulement sur le diamètre des particules obtenues mais également sur leur organisation (Letchford et Burt 2007).

Des micelles de copolymères à blocs ont ainsi été préparées par dissolution dans un solvant organique et précipitation dans l'eau. Le solvant organique est ensuite éliminé par dialyse (Shi et al.

2005; Choi et al. 2006; Tuzar et Kratochvil 1976) ou par nanoprécipitation en présence de tensioactifs, le solvant organique est dans ce cas évaporé à pression atmosphérique (Heald et al. 2002). Un procédé basé sur la lyophilisation d'une solution organique de copolymère a également été développé. Les particules étaient obtenues par dispersion du lyophilisat dans l'eau (Dufresne et al. 2003).

Nous avons choisi de préparer ces pseudo-micelles de copolymères à blocs par nanoprécipitation sans l'ajout d'aucun tensioactif. La structure interne des pseudo-micelles a été investiguée par RMN du proton et par RMN du ^{13}C . La formation des pseudo-micelles a aussi été suivie pendant le procédé de nanoprécipitation dans l'eau par diffusion des neutrons.

5.2. Partie expérimentale

5.2.1. Matériaux

Nous avons utilisé les deux copolymères à blocs synthétisés dans le Chapitre 3. Le Tableau 1 est un récapitulatif de leurs principales caractéristiques.

L'acétone (Laurylab) et l'eau désionisée ont été utilisées pendant le procédé de nanoprécipitation. Le Chloroforme deutéré (Sigma-Aldrich), l'acétone deutéré (Sigma-Aldrich) ainsi que l'eau deutérée (Sigma-Aldrich) ont été utilisés pour les expériences de RMN et diffusion de neutrons.

Tableau 1. Principales caractéristiques des copolymères à blocs PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG utilisés.

| | Mn SEC ^a (g.mol ⁻¹) | PdI ^b | Masse du bloc hydrophobe ^c | Masse du bloc hydrophile ^d | m ^f |
|-------------------------------|---|--------------------|---|---|------------------|
| PCL- <i>b</i> -PEG (6 :5) | 11180 | 1.12 | 6180 | 5000 | 54 |
| PLA- <i>b</i> -PEG (13 :5) | 18 234 | 1.045 | 13234 | 5000 | 127 |

^a Masse molaire moyenne en nombre Mn mesurée par chromatographie d'exclusion stérique en combinant des détections réfractométrique et par diffusion de la lumière.

^b Indice de polymolécularité (polydispersity index) (PdI) mesuré par chromatographie d'exclusion stérique.

^c Masse molaire moyenne en nombre calculée à partir de la masse totale du copolymère et de masse du PEG commercial mis en œuvre dans la polymérisation.

^d Masse molaire du mPEG utilisé dans les réactions de polymérisation.

^f Degré de polymérisation du bloc PCL/PLA (m) calculé à partir des résultats de la chromatographie d'exclusion stérique.

5.2.2. Méthodes

5.2.2.1. Fabrication des micelles de copolymères à blocs par nanoprécipitation

Les particules de copolymères à blocs ont été synthétisées par un procédé de nanoprécipitation optimisé pour obtenir des suspensions aqueuses concentrées (Figure 1).

Cette méthode peut être subdivisée en deux grandes étapes : dissolution des polymères dans un solvant organique complètement miscible à l'eau, puis introduction goutte à goutte dans l'eau sous faible agitation. Le polymère insoluble dans l'eau précipite instantanément formant des pseudo-

micelles solides. Le solvant organique est ensuite évaporé sous pression réduite à 45°C. Concrètement, le copolymère à blocs (1.4 g) est dissous dans l'acétone (50 mL). Cette solution est introduite dans un faible volume d'eau (20 mL) sous agitation. L'acétone est ensuite évaporée sous pression réduite à 45°C. Une suspension limpide avec des reflets bleutés est obtenue avec une concentration en polymère de 7% (m/v).

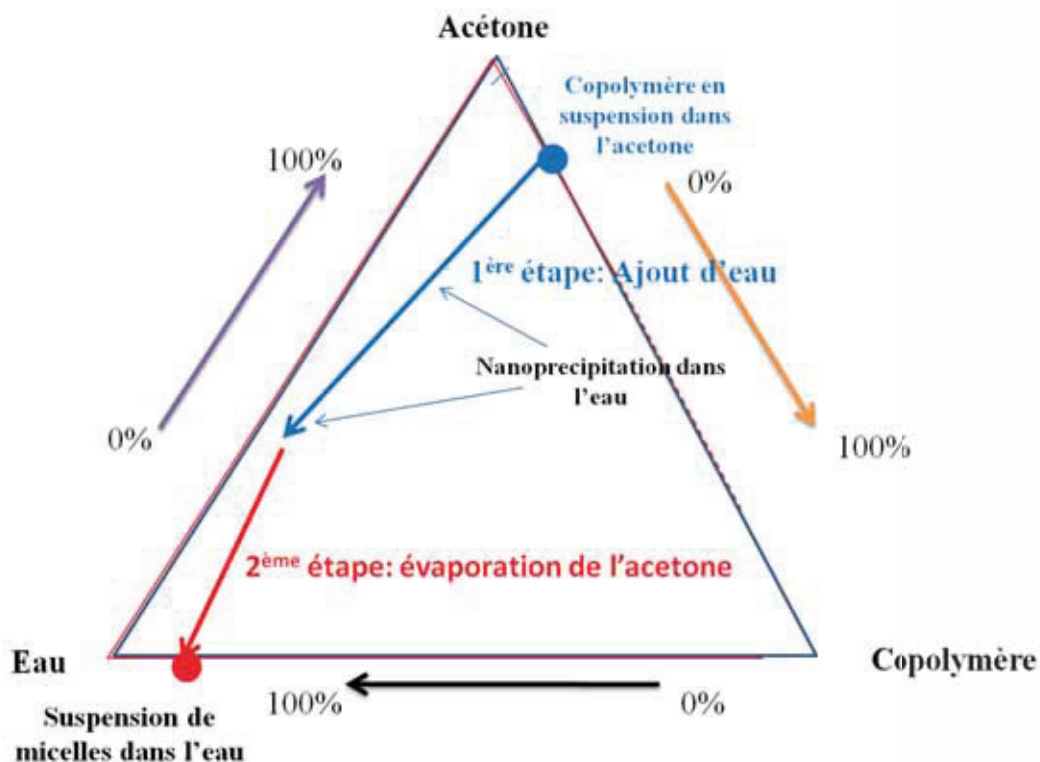


Figure 1. Schéma mécanistique du procédé de nanoprecipitation utilisé pour la synthèse des nanoparticules de copolymères à blocs.

5.2.2.2. Détermination de la taille des particules

La taille des particules en suspension aqueuse ainsi que l'index de polydispersité ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière en utilisant un appareil NanoZS[®] (Malvern, UK).

5.2.2.3. Analyse par diffusion des neutrons

5.2.2.3.1. Rappels théoriques

Les techniques de diffusion élastique de rayonnement permettent d'accéder aux propriétés statiques de la matière, la façon dont les objets qui la constituent occupent l'espace, s'organisent et interagissent. Le terme de diffusion concerne des techniques sondant ces propriétés à une échelle plus grande que celle des distances interatomiques qui sont le domaine de la diffraction et de la

cristallographie. La diffusion de neutrons est bien adaptée à l'étude des solutions dites colloïdales qui contiennent des particules de taille nanométrique plongées dans un solvant plus ou moins continu et complexe. Il s'agit d'extraire du spectre de diffusion (intensité diffusée fonction de l'angle de diffusion) des informations individuelles sur les colloïdes (taille, forme,...) et des informations collectives (arrangement local des particules les unes autour des autres, interaction colloïdale) (Lairez 2003; Cotton et Benoit 1975). Lors d'une expérience de diffusion de rayonnement, l'échantillon étudié est placé sur le trajet d'une onde plane, monochromatique de longueur d'onde λ , dont l'équation de propagation s'écrit :

$$\psi(x, t) = \psi_0 \cdot e^{i(\omega t - k_0 x)} \quad (1)$$

où ω est la pulsation et $k_0 = 2\pi/\lambda$ la norme du vecteur d'onde. Cette onde peut être vue comme un ensemble de particules (neutrons) se déplaçant à la même vitesse et dans des directions parallèles. Lorsque cette onde interagit avec un atome de l'échantillon, elle est diffusée dans toutes les directions. L'onde diffusée est sphérique (Figure 2).

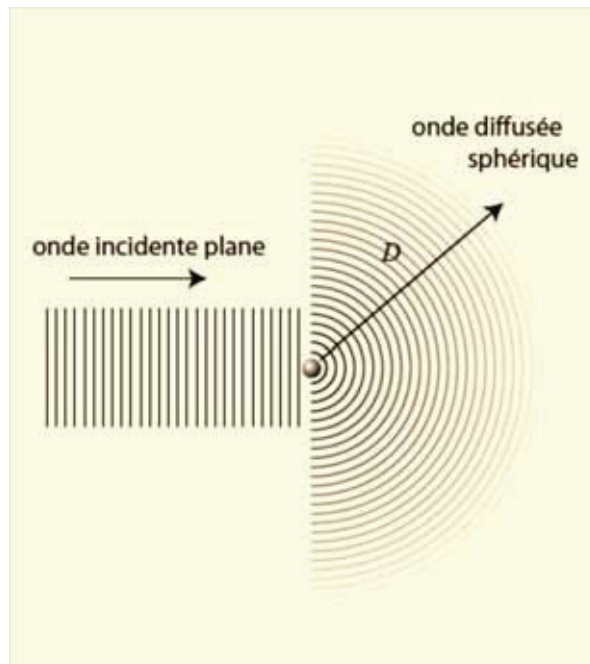


Figure 2. Diffusion sphérique de l'onde incidente après interaction avec un atome.

On supposera une diffusion élastique, c'est-à-dire que les ondes incidente et diffusée ont la même longueur d'onde. La probabilité qu'un neutron soit diffusé est proportionnelle à l'aire σ d'une surface caractéristique de l'interaction entre l'atome et le rayonnement considéré. Cette aire est la section

efficace de diffusion, elle correspond à la surface de l'atome « vue » par ce rayonnement. L'intensité de l'onde diffusée sur 4π stéradians (nombre total de neutrons diffusés par unité de temps) est :

$$I_{tot} = \Phi\sigma \quad (2)$$

où Φ est le flux de neutron incident. La section efficace peut s'écrire sous la forme $\sigma = 4\pi b^2$, où b est appelé longueur de diffusion de l'atome caractérise la portée des interactions entre les particules et l'atome. Pour un détecteur d'aire s situé à une distance D de l'atome diffuseur, l'intensité I recueillie est proportionnelle au rapport des aires :

$$\Omega = s/4\pi D^2 \quad (3)$$

soit l'angle solide formé par le détecteur vu depuis le centre diffuseur :

$$I = \Phi\sigma\Omega = \Phi(b/D)^2 s \quad (4)$$

Cette intensité est le carré de l'onde qui s'écrit :

$$\psi = \psi_0 \frac{b}{D} e^{i(\omega t - kD)} \quad (5)$$

Dans le cas de la diffusion de lumière ou des rayons X, la longueur de diffusion est une propriété du cortège électronique des atomes. Par contre dans le cas des neutrons, l'interaction est nucléaire. La longueur de diffusion dépend de l'isotope que l'on considère ce qui permet d'utiliser des techniques de marquage.

Les ondes diffusées par plusieurs atomes interfèrent (figure 3). Le résultat de ces interférences sur le détecteur dépend des différences de phase des ondes diffusées. Par rapport à une origine O, l'onde de vecteur \vec{k}_1 diffusée par un atome situé en M tel que $\vec{OM} = \vec{r}$ est déphasée de $\vec{r}(\vec{k}_1 - \vec{k}_0) = \vec{r} \cdot \vec{q}$. Le vecteur $\vec{q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ est le vecteur de diffusion, sa norme est

$$q = \sin(\theta/2) 4\pi/\lambda \quad (6)$$

où θ est l'angle de diffusion. Le vecteur de diffusion permet de superposer des figures d'interférence obtenues à des angles ou à des longueurs d'ondes différentes. Sa norme est homogène à l'inverse

d'une longueur. C'est à cette longueur à laquelle il est fait référence lorsque l'on parle d'échelle d'observation.

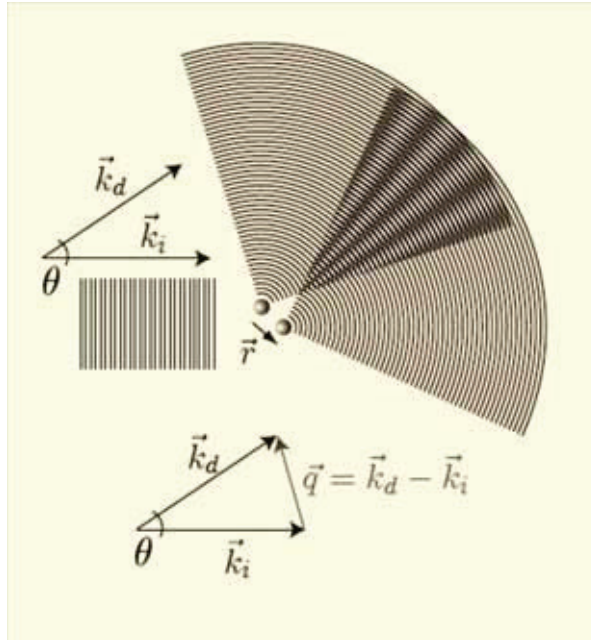


Figure 3. Interférences de plusieurs ondes diffusées par plusieurs atomes. Notion de vecteur de diffusion q .

Pour que l'expérience aboutisse, deux conditions essentielles doivent être remplies (Hennion et Mirebeau 1999):

- 1- le domaine de valeurs du vecteur de diffusion q doit être du même ordre de grandeur que celui de l'inverse des distances à mesurer. Comme les valeurs des longueurs d'onde des neutrons sont comprises entre 0.1 et 2 nm, les valeurs de q intéressantes ne peuvent être obtenues que pour des angles θ inférieurs à 5° environ. C'est l'origine du nom diffusion aux petits angles.
- 2- l'intensité diffusée ne doit pas être négligeable, c'est à dire que le contraste de la particule dans son milieu doit être suffisant.

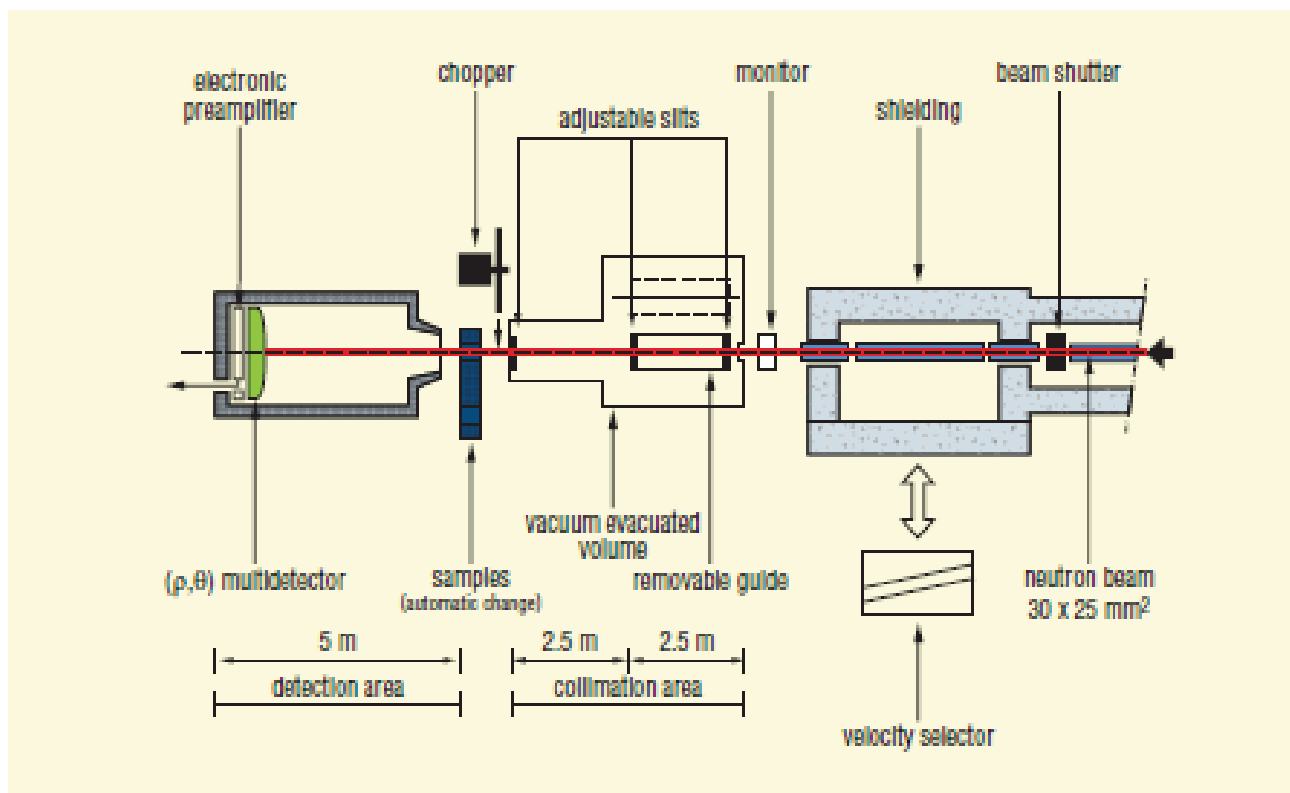


Figure 4. Schéma fonctionnel du PACE, LLB, Saclay.

5.2.2.3.2. Mode opératoire

Les analyses de diffusion de neutrons ont été effectuées à 20°C sur le PACE du Laboratoire Léon Brillouin, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France. PACE (Figure 4) est un spectromètre destiné à l'étude de la diffusion isotrope aux petits angles. Il a une symétrie cylindrique dont l'axe est celui du faisceau. Il est équipé d'un multicompteur formé de 30 anneaux concentriques. Il permet d'enregistrer l'intensité diffusée dans le domaine 2.10^{-3} à $5.10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. La collimation incidente est définie par deux diaphragmes (diamètre = 1 cm) séparés soit de 2.50 m, soit de 5 m. Cette dernière distance de collimation est obtenue en escamotant 2.50 m de guide dans le collimateur. La collimation émergente est définie par la distance de 1 cm entre les compteurs (1^{er} anneau à 3 cm, dernier anneau à 32 cm) et par la distance entre le compteur et l'échantillon, variable de 1 à 5 m. Le multi-détecteur se déplace sous vide. L'ensemble est situé à l'extrémité du guide G1. Les diagrammes de diffusion sont ensuite regroupés radialement, soustrait du bruit de fond et mis à l'échelle absolue selon les procédures classiques propres à l'instrument.

Les suspensions aqueuses de nanoparticules de PLA-*b*-PEG et PCL-*b*-PEG ont été préparées dans l'eau deutérée afin d'obtenir un contraste favorable entre les nanoparticules protonées et l'eau. La

concentration en copolymères était de 6.4 % (m/v) dans l'eau deutérée avec une fraction volumique de 7% (m/v) dans l'eau.

Les particules de copolymères à blocs ont été synthétisées par nanoprecipitation en utilisant l'acétone et de l'eau deutérée. Des solutions de copolymères à 28 mg/ml ont été préparées, dans l'acétone deutéré. Ensuite, des volumes croissants d'eau deutérée ont été ajoutés faisant varier la teneur totale de l'eau de 2.5 à 67% (v/v) sans évaporation de l'acétone. Une solution de chaque copolymère dans le chloroforme deutéré a également été réalisée. Les mesures ont été effectuées dans des cellules en quartz Hellma d'épaisseur 2 mm placées dans un passeur d'échantillons.

5.2.2.4. Caractérisation des micelles par RMN du proton

Les suspensions de particules de copolymères à blocs ont été synthétisées par le procédé de nanoprecipitation décrit précédemment en utilisant de l'eau deutérée. L'analyse a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre de type Bruker DRX 300 opérant à 300 MHz.

5.2.2.5. Étude de relaxation des micelles par RMN du ^{13}C

5.2.2.5.1. Rappels théoriques

Dans une expérience de mesure de temps de relaxation T_1 ou T_2 , on sort le système de spins de son équilibre sous l'action extérieure d'un champ radiofréquence. Puis on le laisse relaxer sous la seule action des champs fluctuants naturellement créés par le système étudié.

Les interactions magnétiques générées naturellement par un système de spins sont de différentes natures. On en distingue essentiellement cinq :

- Interaction dipôle-dipôle
- Interaction quadripolaire
- Interactions d'anisotropie de déplacement chimique
- Couplage scalaire
- Spin-rotation.

À chaque type d'interaction correspondent des temps de relaxation T_1 et T_2 . Le temps de relaxation spin-réseau d'un système est la somme des différentes contributions dues aux différentes interactions magnétiques.

La relaxation des méthylènes constitutifs du copolymère PCL-*b*-PEG a été étudiée dans l'eau deutérée. Le temps de relaxation longitudinal (T_1) ainsi que l'Effet Nucléaire Overhauser (NOE) ont

été mesurés pour les particules du copolymère PCL-*b*-PEG en suspension dans l'eau deutérée (10% m/v). Ces mesures ont été effectuées à partir des spectres du RMN en ^{13}C obtenus à 25°C, en utilisant deux spectrophotomètres de type Bruker, à deux fréquences de Larmor du ^{13}C différentes : 75 MHz et 125 MHz.

5.2.3. Résultats et discussion

Les particules de PCL-*b*-PEG et de PLA-*b*-PEG ont été formulées par nanoprécipitation. Ce procédé a été optimisé par inversion des volumes respectifs d'acétone et d'eau afin d'obtenir des suspensions aqueuses concentrées. Les suspensions aqueuses obtenues étaient limpides avec des reflets légèrement bleutés. Les tailles mesurées en diffusion de la lumière étaient de 30 nm ($PdI = 0.1$) et 50 nm ($PdI = 0.2$) pour le PCL-*b*-PEG et le PLA-*b*-PEG respectivement.

5.2.3.1. Caractérisation des copolymères par RMN du proton

Les spectres RMN du proton réalisées montrent une résolution complète des pics lorsque les copolymères sont dissous dans le chloroforme deutéré CDCl_3 . Ceci est caractéristique des polymères en solution. Ces copolymères étant insolubles dans l'eau, la fabrication de micelles de copolymères à bloc se fait par nanoprécipitation.

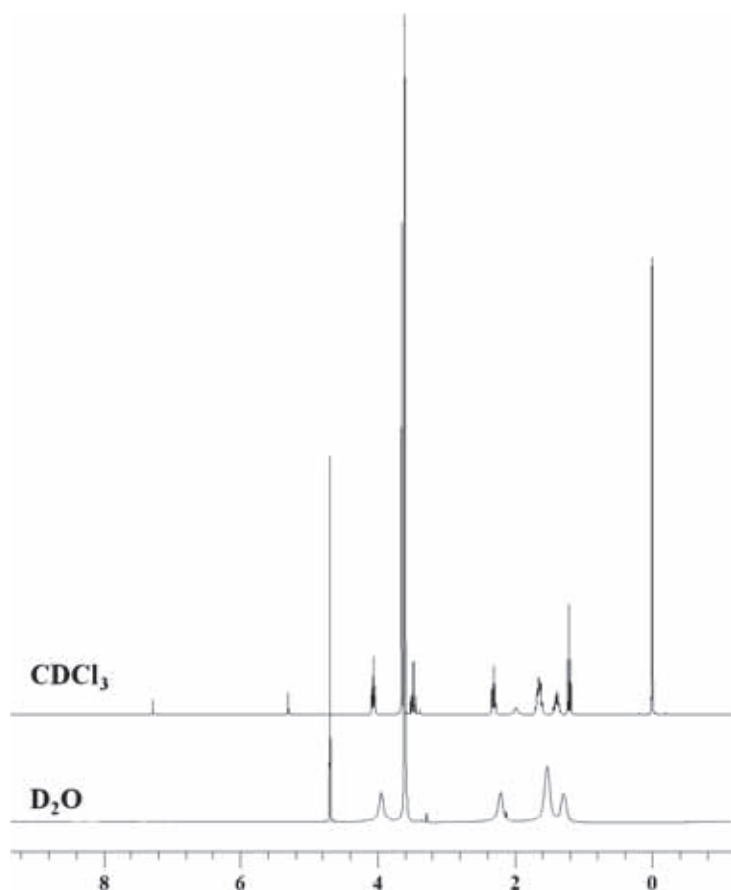


Figure 5. Spectre RMN du copolymère PCL-*b*-PEG dans le chloroforme deutéré (CDCl₃) et dans l'eau deutérée (D₂O).

Les spectres RMN du proton de ces pseudo-micelles montre une résolution parfaite de la partie PEG gonflée d'eau. Par contre, les pics correspondant au PCL (Figure 5) sont présents mais aplatis traduisant des mouvements moléculaires ralentis caractéristiques d'un polymère à l'état fondu. Ceux correspondant au PLA (Figure 6) sont inexistant montrant que les mouvements moléculaires sont extrêmement ralentis caractéristiques d'un polymère à l'état solide. Le caractère liquide de la PCL est dû à sa température de transition vitreuse (T_G) basse (-60°C). Les micelles de PLA-*b*-PEO ont un cœur solide à température ambiante car la T_G du PLA est $+60^\circ\text{C}$.

Les spectres RMN montrent également l'organisation adoptée par les deux segments des copolymères. Elles confirment une organisation en micelles directes avec un cœur constitué par les parties hydrophobes minimisant ainsi leur interaction avec l'eau, entouré par une couronne de chaînes PEG.

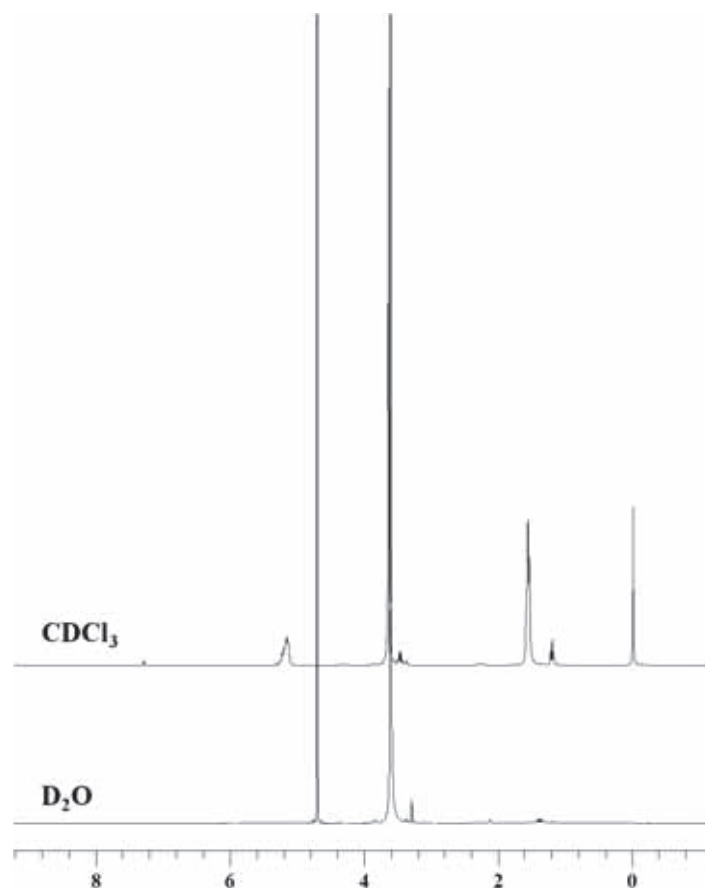


Figure 6. Spectre RMN du proton du copolymère PLA-*b*-PEG dans le chloroforme deutéré (CDCl₃) et dans l'eau deutéré (D₂O).

5.2.4. Étude de relaxation en ¹³C

Les valeurs de T_1 et NOE mesurées par voie expérimentales et listées dans le tableau 2 ont également été calculées en utilisant un modèle décrivant des mouvements isotropes de polymères fondus. Une distribution avec un seul temps de corrélation n'était pas suffisante pour rendre compte des résultats expérimentaux. Pour cela, une distribution Cole-Cole des temps de corrélation a été utilisée. T_1 , NOE et les densités spectrales sont données par les formules :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} N \gamma_H^2 \gamma_C^2 \hbar^2 r_{CH}^{-6} [J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)] \quad (7)$$

$$NOE = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \frac{6 J_2(\omega_H + \omega_C) - J_0(\omega_H - \omega_C)}{J_0(\omega_H - \omega_C) + 3 J_1(\omega_C) + 6 J_2(\omega_H + \omega_C)} \quad (8)$$

$$J(\omega) = \frac{1}{2\omega} \frac{\cos[(1-\gamma)(\pi/2)]}{\cos h(\gamma \ln \omega \tau_R) \sin[(1-\gamma)(\pi/2)]} \quad (9)$$

où τ_R est le temps de corrélation moyen et γ est un paramètre caractérisant la largeur de la distribution.

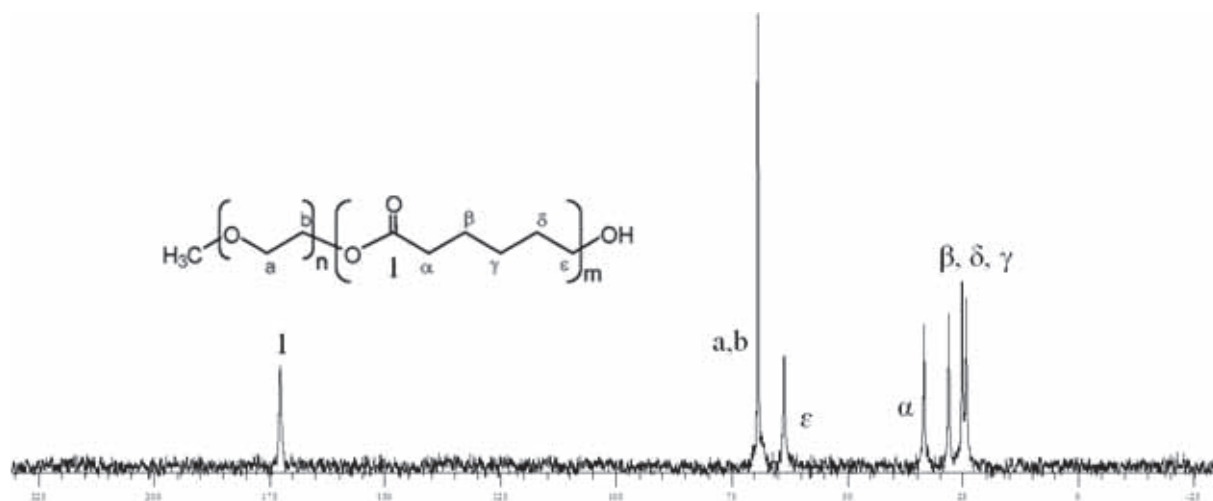


Figure 7. Spectre RMN du ^{13}C du copolymère PCL-*b*-PEG dans le chloroforme deutéré avec attribution des pics caractéristiques.

Les résultats montrent :

- Des mouvements de chaîne ralentis pour la partie polycaprolactone. Les temps de corrélation sont de l'ordre de la nanoseconde. Ceci est plus lent que le temps de corrélation mesuré pour les chaînes alkyle d'un tensioactif classique et plus rapide que le temps nécessaire à la rotation d'une micelle sur elle-même (de l'ordre de la microseconde).
- Le modèle choisi montre des résultats en adéquation avec les résultats expérimentaux obtenus pour la partie polycaprolactone. Les carbones constitutifs de cette chaîne montrent des valeurs de T_1 similaires donc des temps de corrélation voisins.
- Les résultats obtenus avec la chaîne de poly(éthylène glycol) montrent une assez bonne adéquation avec le modèle à 125 MHz mais pas à 75 MHz.

Ceci peut être dû à l'extrême mobilité de cette chaîne en contact avec de l'eau. Ce degré de mobilité est cependant différent tout au long de la chaîne de PEG avec un degré de liberté moindre pour l'extrémité liée à la polycaprolactone beaucoup moins mobile que celle en bout de chaîne gonflée d'eau. Cette différence de mobilité peut expliquer que le modèle choisi ne soit pas adapté pour décrire les mouvements moléculaires de cette chaîne polyoxyéthylénée.

Les mouvements moléculaires au sein de micelles PLA-*b*-PEG ont également fait l'objet d'études de relaxation du ^{13}C (Heald et al. 2002). Les résultats montraient des mouvements moléculaires très ralentis dans le cœur hydrophobe solide. Cependant, les méthyles situés dans la région interfaciale à la périphérie du cœur et à la jonction avec le mPEG montraient une certaine mobilité donnant lieu à un signal très aplati en RMN.

Les T_1 n'ont pu être mesurés pour le PLA constitutif du cœur à cause de son état solide. Ceux mesurés pour les méthyles situés à la périphérie du cœur hydrophobe montraient une mobilité bien inférieure à celles des protons du PEG. Ces derniers évoluent dans un environnement plus mobile leur permettant une relaxation plus rapide.

Tableau 2. Comparaison des T_1 et NOE expérimentaux et calculés pour la partie polycaprolactone et poly(éthylène glycol).

| | Déplacements chimiques ^{13}C NMR | Résultats théoriques | | Fréquence du spectromètre | | | | | | | |
|----------------------|---|----------------------|--------------|---------------------------|--------------------|------|-------------------------|------|--------------------|------|--|
| | | | | 75 MHz | | | 125 MHz | | | | |
| | | | | Résultats expérimentaux | Résultats calculés | NOE | Résultats expérimentaux | | Résultats calculés | | |
| Attribution des pics | ppm | γ | τ_R (s) | T_1 (s) | T_1 (s) | NOE | T_1 (s) | NOE | T_1 (s) | NOE | |
| Polycaprolactone | 33,63 | 0,35 | 9,00E-10 | 0,20 | 0,16 | 1,76 | 0,27 | 1,7 | 0,27 | 1,70 | |
| | 28,29 | 0,41 | 2,00E-10 | 0,20 | 0,17 | 2 | 0,25 | 1,55 | 0,25 | 1,91 | |
| | 25,37 | 0,33 | 5,00E-10 | 0,23 | 0,182 | 1,82 | 0,29 | 1,7 | 0,29 | 1,76 | |
| PEG | 69,599 | 0,2 | 4,00E-09 | 0,17 | 0,31 | 1,70 | 0,53 | 1,7 | 0,53 | 1,7 | |

5.2.5. Etude des micelles de copolymère à blocs en suspension aqueuse par diffusion de neutrons (SANS)

La structure des nanoparticules de copolymères à blocs a été étudiée par diffusion de neutrons (Chevalier et Zemb 1990).

Les spectres de diffusion étaient caractéristiques des suspensions concentrées en particules (Glatter et Kratky 1982). Une décroissance du signal en q^{-4} aux grands angles a été observée aux grands angles ($q > 0,03 \text{ \AA}^{-1}$) correspondant à la loi de Porod, et signature caractéristique de la présence d'interfaces nettes entre le cœur des nanoparticules et le milieu aqueux.

Le pic de l'intensité diffusée observé à $q \approx 0.016 \text{ \AA}^{-1}$ a pour origine un réarrangement spatial des nanoparticules présentes en forte concentration. Ce pic a permis de montrer que les nanoparticules de copolymère à blocs étaient très bien séparées les unes des autres à cause de la répulsion stérique provenant des couronnes hydrophiles de PEG les entourant.

Les spectres de diffusion ont été interprétés en utilisant un modèle de particules sphériques comportant une structure cœur-couronne. Le cœur des particules étant formé par la partie polyester (PLA ou PCL) et la couronne par les chaînes de PEG gonflées d'eau.

L'intensité diffusée donnée en fonction de l'amplitude diffusée par des particules isolées $F(q)$ moyennée sur une distribution de taille et le facteur de forme $S(q)$ exprimant l'organisation des particules s'écrit (Degiorgio et Corti 1985):

$$I(q) = [\langle F(q)^2 \rangle + \langle F(q) \rangle^2 (S(q) - 1)] \quad (10)$$

Pour des particules monodisperses, des expressions analytiques simples permettent de calculer l'intensité diffusée. On donne ces expressions bien que les calculs aient été faits pour des particules polydisperses pour lesquelles les expressions sont plus complexes. On les trouve dans des ouvrages de référence (Glatter & Kratky 1982; Hayter 1985).

Pour des particules monodisperses, l'expression de l'intensité diffusée se réduit à

$$I(q) = nP(q)S(q) \quad (11)$$

où n est la densité de particules (nombre de particules par unité de volume) et $P(q)$ est le facteur de forme :

$$P(q) = \langle F(q)^2 \rangle = \langle F(q) \rangle^2 \quad (12)$$

Pour des particules sphériques de structure cœur-écorce, $F(q)$ a l'expression suivante

$$F(q) = 4\pi R_1^3 (\rho_1 - \rho_2) \frac{j_1(qR_1)}{qR_1} + 4\pi R_2^3 (\rho_2 - \rho_s) \frac{j_1(qR_2)}{qR_2} \quad (13)$$

où $j_1(x)$ est la fonction de Bessel

$$j_1(x) = \frac{\sin x - x \cos x}{x^2} \quad (14)$$

L'intensité diffusée par les particules est calculée à partir des densités de longueur de diffusion du cœur (ρ_1), de l'écorce (ρ_2) et du milieu de dispersion (ρ_S), ainsi que des rayons du coeur (R_1) et externe (R_2). Les densités de longueur de diffusion des matériaux sont calculées à partir des tables de longueur de diffusion des atomes et des volumes des molécules. La densité de longueur de diffusion du cœur est égale à celle du polyester $\rho_1 = 1.734 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ pour le PLA et, $\rho_1 = 0.760 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$ pour le PCL. Celle du milieu de dispersion est celle de l'eau deutérée D_2O , $\rho_S = 6.33 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$. L'écorce est composée de PEG et d'eau. La densité de longueur de diffusion du PEG est $\rho_{PEG} = 0.673 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$; celle de l'écorce est calculée à partir des fractions volumiques de PEG (ϕ_{PEG}) et d'eau (ϕ_S):

$$\rho_2 = \phi_{PEG} \rho_{PEG} + \phi_S \rho_S \quad (15)$$

Les rayons du cœur et de l'écorce sont calculés à partir du nombre de molécules de copolymères à blocs par nanoparticule appelé nombre d'agrégation, N (pour PCL-b-PEG):

$$\frac{4\pi}{3} R_1^3 = N d p_{PCL} V_{CL} \quad (16)$$

$$\frac{4\pi}{3} R_2^3 = N [d p_{PCL} V_{CL} + d p_{PEG} V_{EG} + N_{hydr} V_{eau}] \quad (17)$$

où V_{CL} , V_{LA} et V_{EG} sont les volumes d'une unité de répétition de PCL (185.6 \AA^3), PLA (95.7 \AA^3) ou de PEG (61.6 \AA^3) et V_{eau} est le volume d'une molécule d'eau (30 \AA^3).

Le calcul a été fait pour des particules sphériques de structure cœur -écorce avec une distribution de taille de particules de Schulz (Aragón et Pecora 1976).

Un potentiel d'interaction pour sphères dures a été utilisé pour les calculs de $S(q)$; la fraction de volume des sphères rigides pris en compte était celle de particules gonflées d'eau incluant les copolymères à blocs et l'eau liées aux chaînes PEG.

Il n'y a que 3 paramètres dans le modèle qui ont été ajustés aux valeurs expérimentales : le nombre de molécules de copolymères à bloc par nanoparticule (nombre d'agrégation N), le nombre

d'hydratation N_{hydr} (nombre de molécules d'eau par bloc de PEG), et la largeur de la distribution de taille (variance σ^2).

Les autres paramètres tels le rayon moyen du cœur et de la couronne R_1 and R_2 peuvent être calculés sur la base de ces trois paramètres basiques selon de simples considérations géométriques. Le meilleur ajustement aux données expérimentales (figure 8) a été obtenu avec les paramètres présentés dans le tableau 3. La légère discordance du modèle observé à $\sim 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ correspondait au premier minimum de la fonction de Bessel donnant l'équation de l'amplitude de diffusion. Ce minimum à $qR_1 = 4.5$ n'était pas visible dans les données expérimentales dû à l'erreur expérimentale.

Le modèle appliqué a montré que la structure des particules était bien du type écorce-couronne. Le rayon du cœur hydrophobe R_1 était de l'ordre de 9 nm alors que le diamètre externe était deux fois supérieur. Le gonflement extrême des chaînes de PEG dans l'eau a permis la formation d'une couronne hydrophile très dense.

En effet, la couronne renfermait 25% de PEG et 75% d'eau. Le gonflement du PEG par l'eau a entraîné l'augmentation de la fraction de volume des nanoparticules de $\sim 30\%$ alors que la concentration en polymères était seulement de 7%.

Les interactions répulsives de type stérique entre les nanoparticules étaient fortes de par l'extrême gonflement de des couronnes de PEG. Les distributions de taille des particules de PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG étaient resserrées puisque les variances des distributions de Schulz pour les rayons étaient de $\sigma^2 = 3.2 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 20\%$) and $\sigma^2 = 7.3 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 30\%$) respectivement.

Ces paramètres structuraux sont en accord avec des mesures similaires décrites dans la littérature (Riley et al. 2003; Akiba et al. 2010).

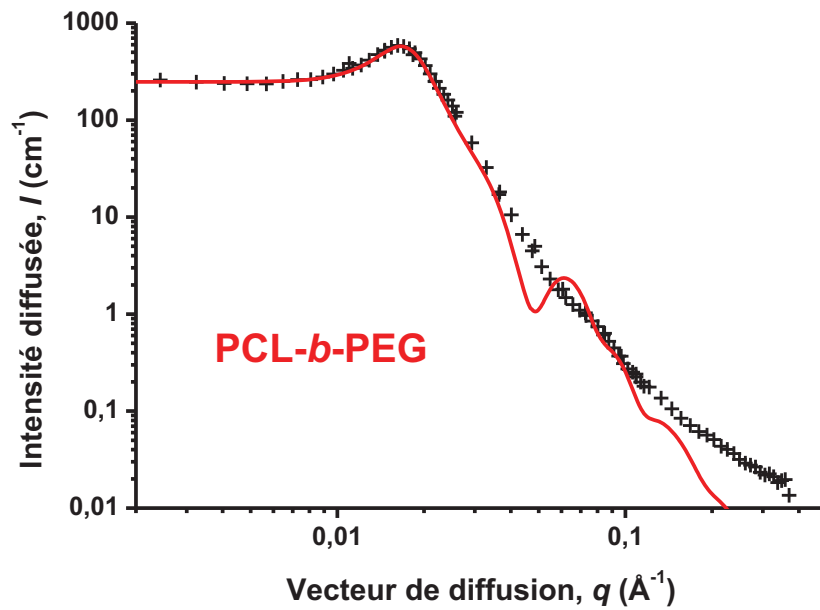


Figure 8. Spectre de diffusion de neutrons de nanoparticules de PCL-*b*-PEG 7 % dans l'eau deutérée. Les points en croix correspondent aux valeurs expérimentales et ceux en trait plein au meilleur ajustement du modèle.

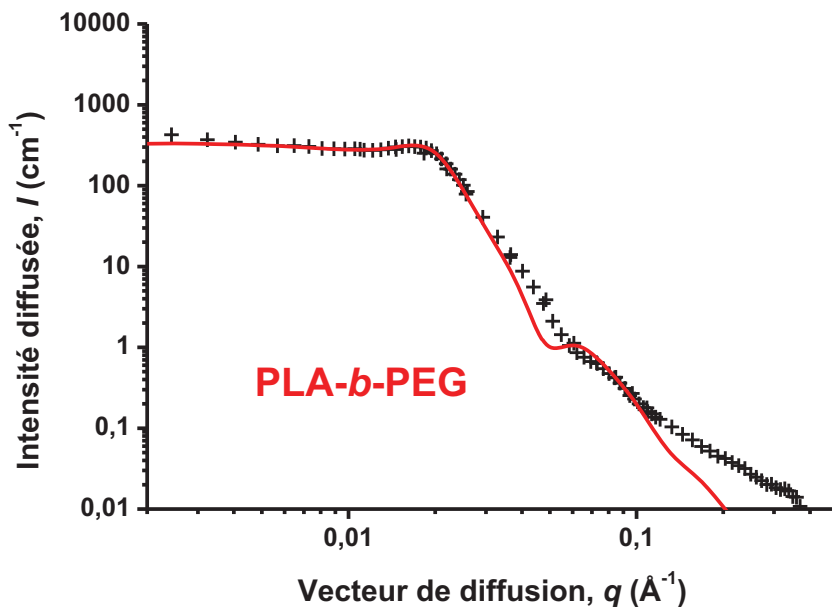


Figure 9. Spectre de diffusion de neutrons de nanoparticules de PLA-*b*-PEG 7 % dans l'eau deutérée. Les points en croix correspondent aux valeurs expérimentales et ceux en trait plein au meilleur ajustement du modèle.

Tableau 3. Paramètres de structure calculés à partir des études de diffusion de neutrons.

| Nanoparticules de copolymère à blocs | PCL- <i>b</i> -PEG | PLA- <i>b</i> -PEG |
|--|--------------------|--------------------|
| Nombre d'agrégation, N | 280 | 200 |
| Nombre d'hydratation, N_{hydr} (molécules d'eau par chaîne de PEG) | 2000 | 1900 |
| Variance de la distribution de taille (standard deviation) (nm ²) | 3.2 | 7.3 |
| Rayon du Coeur hydrophobe (nm) | 9.3 | 8.6 |
| Rayon de la couronne gonflée d'eau (nm) | 18.2 | 16.3 |

Le modèle ne rend pas compte de la diffusion aux grands angles. En effet, le comportement asymptotique de Porod en q^{-4} n'est plus suivi au-delà de $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$. Une décroissance de l'intensité diffusée en q^{-2} est suivie aux grands angles. On observe le PEG gonflé par l'eau aux grands angles ; le comportement en q^{-2} est caractéristique d'une solution semi-diluée de polymère. Ce détail de haute résolution n'est pas pris en compte par le modèle.

5.2.6. Mise en évidence de l'inversion de structure des micelles pendant le procédé de nanoprécipitation par diffusion de neutrons

L'investigation du processus de nanoprécipitation des copolymères à bloc a été menée en ajoutant des quantités croissantes d'eau à une solution de copolymères à blocs dans l'acétone. Une étude précédente se basant sur une étude par diffusion de la lumière de la taille des structures produites pendant la nanoprécipitation avait montré l'existence de structures pseudo micellaires lorsque le copolymère PCL-*b*-PEG était introduit dans l'acétone (Laredj-Bourezg et al. 2012) due à solubilité très réduite de la partie PEG constitutive de ce dernier dans l'acétone (Bordes et al. 2010).

L'ajout progressif d'eau amènerait un réarrangement de ces structures jusqu'à la formation d'une micelle directe avec un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile interagissant avec l'eau. Des spectres comparatifs du copolymère complètement dissous dans le chloroforme et des suspensions aqueuses de micelles de copolymères obtenus après évaporation de l'acétone ont également été effectués.

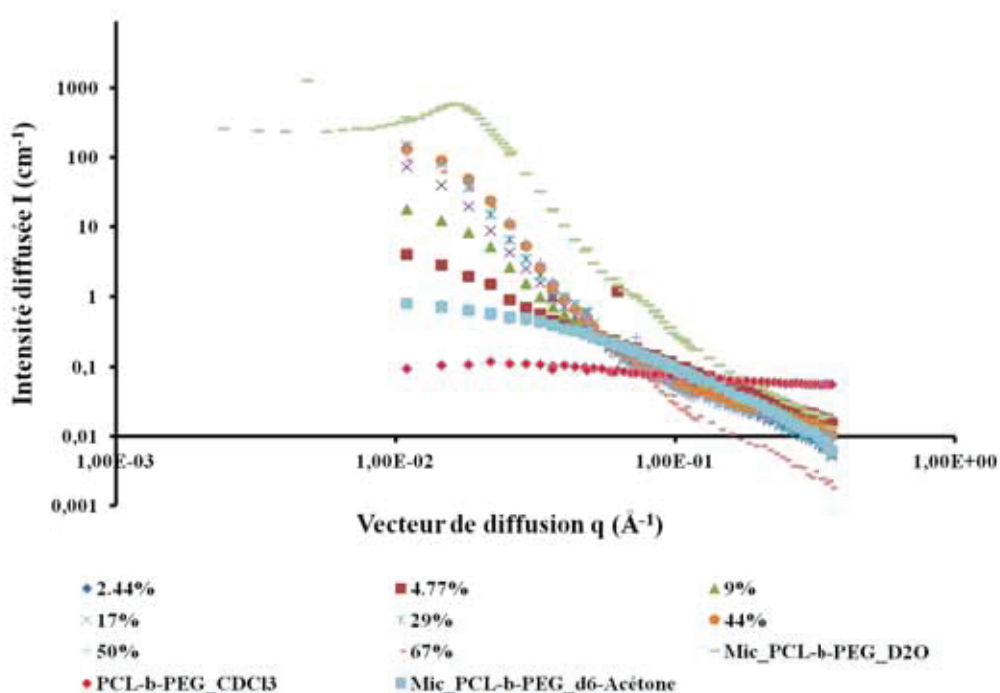


Figure 10. Spectres de diffusion de neutrons obtenus en fonction de la quantité d'eau introduite pendant la nanoprécipitation du copolymère PCL-*b*-PEG.

Les résultats montrent une différence de structures observées entre la solution de copolymère dans le chloroforme et celle obtenue en introduisant le copolymère dans l'acétone pour les deux copolymères étudiés. Ceci prouve que le chloroforme est un solvant préférentiel pour la solubilisation complète des deux copolymères et qu'il ne s'y forme pas de micelles. Au contraire, une diffusion des neutrons qui dépend de l'angle est mesurée pour les solutions dans l'acétone, ce qui montre une organisation en des copolymères à blocs sous la forme d'agrégats. Comme l'acétone est un bon solvant du PCL ou du PLA et un mauvais solvant du PEG, nous pensons que ces structures sont des micelles de type inverse où le cœur est composé de PEG et l'écorce est composée de polyester (PCL ou PLA) solvato par l'acétone. L'ajout de quantités croissantes d'eau se traduit par un changement progressif de l'allure des spectres. Ceci montre un changement progressif de structure jusqu'à se rapprocher de la structure finale des micelles obtenues après évaporation de l'acétone.

Cependant, ce changement de structure semble intervenir beaucoup plus rapidement pour le PCL-*b*-PEG (Figure 10) entre 9 et 17% (v/v) comparé au PLA-*b*-PEG (Figure 11) où le changement de structure semble survenir entre 17 et 29% (v/v) d'eau. Ceci peut être dû à la différence des longueurs de chaîne du PCL et PLA. En effet, une chaîne hydrophobe plus longue que celle du PEG peut s'accompagner de mouvements moléculaires plus ralentis faisant d'une éventuelle inversion de phase

un phénomène plus lent. L'inversion de structure peut être due aussi à une solubilité limitée du copolymère dans le mélange acétone-eau.

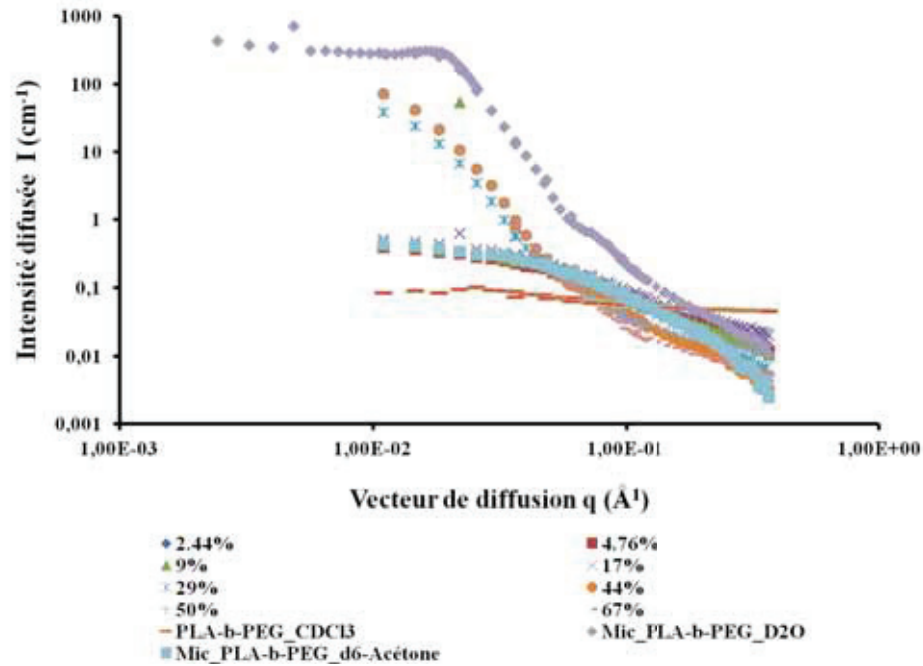


Figure 9. Spectres de diffusion de neutrons obtenus en fonction de la quantité d'eau introduite pendant la nanoprécipitation du copolymère PLA-*b*-PEG.

Le tableau 4 regroupe les paramètres de solubilité du PLA, et du PCL calculés selon la méthode de Hansen (Hansen 2007) en considérant les contributions à la solubilité des interactions dues à la dispersion (δ_d), de type polaire (δ_p), et à de liaisons hydrogènes (δ_{hb}). Le paramètre de solubilité total est ainsi calculé par la formule suivante en prenant en compte les différentes contributions calculées selon les tables d'incrémentes de Hoftyzer and van Krevelen (Krevelen et Nijenhuis 2009) :

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (18)$$

| Compound | Solubility parameters ($\text{MPa}^{1/2}$) | |
|----------|--|-------|
| PLA | δ_d | 17.62 |
| | δ_p | 9.70 |
| | δ_{hb} | 11.77 |
| | Total δ | 23.31 |
| PCL | δ_d | 17.66 |
| | δ_p | 4.97 |
| | δ_{hb} | 8.43 |
| | Total δ | 20.20 |

Les résultats montrent une contribution du type polaire plus élevée pour le PLA comparé à celle du PCL. Cette polarité élevée pourrait expliquer une quantité plus élevée d'eau pour induire une inversion de structure.

5.3. Conclusion

Deux copolymères à blocs différant par la nature et longueur de la partie hydrophobe ont été utilisés pour fabriquer des particules. Le procédé de nanoprecipitation a été modifié par inversion des volumes des solvants organique et aqueux habituellement utilisés afin d'obtenir des suspensions aqueuses concentrées. Le but de cette partie était d'étudier l'impact de ce changement de procédé sur les propriétés des particules obtenues. Les résultats montrent que les pseudo-micelles obtenues ont une forme sphérique dont le cœur hydrophobe résulte de l'arrangement des parties hydrophobes, avec une couronne hydrophile gonflée d'eau majoritairement constituée des chaînes PEG. Les spectres RMN du proton et du ^{13}C ont montré des mouvements moléculaires très ralentis mais présents pour les pseudo-micelles de PCL-*b*-PEG. Le confinement des chaînes de polycaprolactone dans des particules aussi petites (taille déterminée par DLS de l'ordre de 30 nm) inhibe sa cristallisation. Celui se conduit comme un polymère fondu à température ambiante. Les pseudo-micelles à base de PLA-*b*-PEG quant à elles ont montré une structure interne solide avec des mouvements moléculaires imperceptibles avec l'appareillage utilisé. Ceci a été montré pour des polymères ayant une température de transition vitreuse élevée. Les particules formées qualifiées de « Frozen micelles » présentaient un cœur solide, vitreux complètement figé (Riess 2003; Allen, Maysinger, et Eisenberg 1999).

La diffusion de neutrons des nanoparticules dans l'eau montre une organisation écorce-couronne. Avec un cœur formé par le PLA ou PCL entouré d'une couche de chaînes PEG gonflées d'eau.

Les tailles des nanoparticules mesurées concordent également avec les tailles mesurées en DLS. Les nombres d'agrégation calculés étaient de 200 et 280 pour le PLA-*b*-PEG et le PCL-*b*-PEG respectivement. Une chaîne plus longue du PLA s'accompagnerait donc d'un empilement maximal comparée à celle du PCL.

Des études de diffusion de neutrons faites sur des pseudo-micelles formées par des copolymères PLA-*b*-PEG (3 :5, 15 : 5, et 45 :5) ont montré une plus forte densité de greffage des chaînes PEG dans le cas du PLA-*b*-PEG 3 : 5 comparé aux deux autres (Riley et al. 2003). Ainsi, la surface occupée par un PEG était de 1.9, 4.8, et 7.8 nm² pour les compositions 3 :5, 15 :5 et 45 :5 respectivement. Les chaînes de PEG montraient un état de solvation élevé ainsi qu'une courbure de

surface beaucoup plus accentués. Les auteurs avaient postulé une structure conique du copolymère au sein de la micelle tout en observant des différences dans les fractions volumiques du PEG en fonction de la longueur de la chaîne PLA. Une chaîne PLA plus longue s'accompagnait d'une densité plus faible en chaînes PEG mais plus homogène. L'expansion radiale rapide des chaînes de polyéthylène glycol loin des chaînes hydrophobes permet de réduire la courbure au sein de la structure en brosse.

L'étude du diagramme ternaire eau-acétone-copolymère par diffusion de neutrons a montré une inversion de structure au fur et à mesure que l'eau était ajoutée dans le système. Cependant l'inversion de structure aboutissant à la forme particulière finale semble intervenir à des pourcentages différents d'eau pour les deux copolymères. Ceci a été attribué à la polarité élevée du PLA comparé au PCL, qui permettrait une solubilisation plus élevée dans les mélanges acétone-eau. L'ajout progressif d'eau dans le système provoquerait une inversion de structure suite à l'abaissement brutal de la solubilité du polymère dans le milieu.

Chapitre 6

Formulation d'émulsions stabilisées par des particules de PCL-*b*-PEG

6.1. Introduction

Ce chapitre décrit la préparation d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par des structures pseudo-micellaires formées par l'auto-association d'un copolymère di blocs du type poly (caprolactone)-block-poly (oxyde d'éthylène) (PCL-*b*-PEG).

Ces structures diffèrent des micelles formées de petits tensioactifs par le caractère « figé » de leur structure, d'où leur désignation par nanoparticules.

Le procédé d'émulsification décrit repose sur la dispersion d'huile de triglycérides à chaînes moyennes dans une suspension aqueuse de nanoparticules de copolymère à blocs PCL-*b*-PEG, à l'aide d'un homogénéisateur du type rotor-stator.

Afin d'atteindre une concentration élevée en phase interne, des dispersions concentrées de nanoparticules ont été utilisées. Ces dernières ont été obtenues par un procédé d'émulsification spontanée modifié permettant l'obtention de concentrations élevées en particules.

Ces travaux décrivent donc :

- la synthèse et caractérisation du copolymère di blocs PCL-*b*-PEG ;
- le procédé de nanoprecipitation optimisé afin d'obtenir des suspensions aqueuses concentrées en nanoparticules ;
- le procédé d'obtention des émulsions stabilisées par les nanoparticules de PCL-*b*-PEG ;
- la caractérisation de la structure interne des nanoparticules par RMN du proton ainsi que leur organisation à l'interface huile-eau par diffusion des neutrons.

6.2. Partie expérimentale

La partie expérimentale est présentée sous la forme d'un article publié dans *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

Emulsions stabilized with organic solid particles

Faiza Laredj-Bourezg^a, Yves Chevalier^{a,*}, Olivier Boyron^b, Marie-Alexandrine Bolzinger^a^a University of Lyon, Laboratoire d'Automatique et de Génie de Procédés (LAGEP), CNRS UMR 5007, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bd 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France^b University of Lyon, Laboratoire de Chimie, Catalyse, Polymères et Procédés (C2P2), CNRS UMR 5265, Équipe Chimie et Procédés de Polymérisation (LCPP), Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bd 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2011

Received in revised form

21 December 2011

Accepted 22 December 2011

Available online 30 December 2011

Keywords:

Pickering emulsions

Block copolymer

Micelles

ABSTRACT

Biodegradable and biocompatible o/w emulsions were prepared using triglyceride oil and solid organic particles made of block copolymer nanoparticles as stabilizers (Pickering emulsions). In order to reach high concentration of internal phase, rather concentrated dispersions of nanoparticles were required. Nanoparticles of poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene oxide) (PCL-*b*-PEO) diblock copolymer were obtained using the “nanoprecipitation” process relying on the spontaneous emulsification upon solvent shifting. The classical “nanoprecipitation” process was improved so as to afford more concentrated suspensions of nanoparticles, and the nanoparticles were characterized by means of dynamic light scattering and ¹H NMR spectroscopy. The process allowed the preparation of aqueous dispersions of PCL-*b*-PEO nanoparticles with 35–50 nm diameter at concentrations over 5 wt.%. In D₂O, the PCL blocks formed a central hydrophobic core of reduced mobility, while the PEO blocks formed a hydrophilic corona layer swollen by water. O/w emulsions of medium chain triglycerides were successfully prepared using the suspensions of PCL-*b*-PEO nanoparticles as stabilizers. Typical droplet sizes were between 2 μm and 15 μm. The emulsions showed great stability upon storage and their particle size distributions did not show excess nanoparticles present in the aqueous phase as submicron nanoparticles, even when large amounts of nanoparticles with respect to oil were used. The mean droplet diameter of emulsions was controlled by the mass ratio $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$. SANS and TEM experiments performed on PCL-*b*-PEO nanoparticles and micelle-stabilized emulsions disclosed a rearrangement of the nanoparticles at the oil/water interface due to the liquid state of the micelle core of PCL.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pickering emulsions are stabilized by solid particles in place of surfactants [1]. Their “surfactant-free” character makes them attractive for cosmetic and pharmaceutical application where surfactants often show adverse effects (irritancy, hemolytic behavior, etc.) [2]. Towards such domains, biocompatible and biodegradable Pickering emulsions would be an obvious benefit. They can be made up from the oils used in pharmaceutical applications, and organic solid particles made from biodegradable materials. Since solid stabilizing particles are necessarily smaller than emulsion droplets, solid particles of nanometric size were selected so as to allow the fabrication of Pickering emulsions over a wide droplet size range. There are two issues to be overcome in order to reach such goal: (i) the choice of organic nanoparticles that are partially wet by water and oil in order to ensure their anchoring to the oil/water interface; and (ii) the preparation of suspensions of solid particles of high enough concentration in order to allow full coverage of the droplet

surface, even for concentrated emulsions of small droplets that have a large interfacial area. The purpose of the present research is the preparation of such emulsions stabilized by block copolymer nanoparticles. This can be achieved if the two issues quoted above receive satisfactory answer.

Solid particles can spontaneously adsorb at fluid interfaces forming either a dense monolayer of particles, or a thick layer of aggregated solid particles that behaves as a rigid stabilizing layer acting against coalescence [3,4]. Many types of solid particles (hydrophilic silica, hydrophobic silica, clay, barium sulfate, calcium carbonate, polystyrene, spores, etc.) [1,5–12] were used to stabilize emulsions.

Biodegradable nanoparticles would decrease the risk of toxicity already observed with a lot of common chemical surfactants and inorganic nanoparticles, and they are expected to create a barrier to diffusion that allows a controlled release of drug substances incorporated either in the oily layer or inside the polymeric nanoparticles. Poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene oxide) (PCL-*b*-PEO) copolymers have raised much interest because they are biocompatible and partly biodegradable [13–16]. The PCL block is made of biodegradable polyester, and the PEO block is a water-soluble polymer of low molar mass that is bioresorbable.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 43 18 77; fax: +33 4 72 43 16 82.
E-mail address: chevalier@lagep.univ-lyon1.fr (Y. Chevalier).

Such block copolymers are ideal candidates for application of emulsions to pharmaceutical or cosmetic domains.

This work firstly deals with the preparation of particles of non-ionic amphiphilic diblock copolymers that contain a hydrophilic poly(ethylene oxide) (PEO) block and a hydrophobic poly(ϵ -caprolactone) (PCL) using a modified nanoprecipitation process. In a second time, those nanoparticles are used to stabilize o/w emulsions made with medium chain triglyceride (MCT) as oil. Such particles are often called “block copolymer micelles” although they are better particles than classical micelles. Indeed classical micelles formed with water-soluble surfactants form spontaneously, and are at equilibrium with a residual soluble fraction in water. Block copolymer micelles do not form spontaneously and the residual concentration of block copolymer in solution is vanishing low. In the literature, the preparation processes of block copolymer micelles consist in either dialysis of organic solution of block copolymer or the present nanoprecipitation method. The term “Block copolymer nanoparticles” will be used throughout the whole paper. Block copolymer nanoparticles were characterized for their size and internal structure using dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and ^1H NMR measurements. Oil-in-water emulsions were prepared using a conventional mechanical shearing process. Lastly, small-angle neutron scattering (SANS) experiments were used for investigating the structure of the interfacial layer at the oil/water interface where the presence of micelles was expected.

2. Experimental

2.1. Materials

Epsilon-caprolactone (ϵ -CL) (Sigma–Aldrich) was purified by vacuum distillation over calcium hydride (CaH_2 , Acros Organics). Poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) with of molar mass 5000 g mol^{-1} (Sigma–Aldrich) was dried by azeotropic distillation of toluene (anhydrous toluene, Sigma–Aldrich). Acetone (Laurylab), dichloromethane (Acros Organics), stannous 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, Sigma–Aldrich), deuterated water (D_2O) and dodecane-*d*26 (Eur isotop, Saclay, France) were used as received. Deionized water of $18\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ resistivity was used throughout the work.

2.2. Methods

2.2.1. Synthesis of the PCL-*b*-PEO diblock copolymer

mPEG was dried by azeotropic distillation of its solution in anhydrous toluene under dry nitrogen atmosphere. The PCL-*b*-PEO diblock copolymer was synthesized by ring-opening polymerization of ϵ -CL with mPEG as a macroinitiator and stannous 2-ethylhexanoate as a catalyst [14,16–19]. A determined amount of ϵ -CL, mPEG, and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (0.1 mol% of ϵ -CL) were weighted into a rounded three-necked glass flask equipped with a magnetic stirring bar. The reactor was closed under dry nitrogen and heated in an oil bath at 130°C for 12 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature, and the block copolymer was precipitated in an excess of cold diethyl ether. The copolymer recovered by filtration was purified by precipitation of its solution in dichloromethane into an excess of cold diethyl ether. Finally the mixture was filtered and dried at room temperature under vacuum for 24 h. The mean degree of polymerization of the PCL block was determined by ^1H NMR spectra (Fig. 1) and size exclusion chromatography (SEC) as shown in Table 1. At the end, the block copolymer chemical formula is $\text{PCL}_{65}\text{-}b\text{-PEO}_{113}$. This block copolymer was not soluble in water [14].

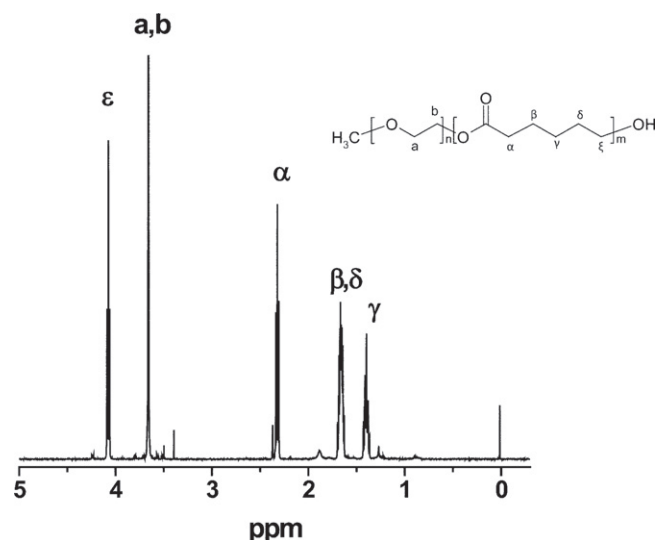


Fig. 1. ^1H NMR spectrum of PCL-*b*-PEO in CDCl_3 and the assignment of the lines.

2.2.2. Preparation of aqueous dispersions of block copolymer nanoparticles

Nanoparticles were prepared using the spontaneous emulsification process [20]. This method was modified in order to increase the concentration of solid particles beyond the usual limits of the nanoprecipitation process. As a typical recipe, 0.75 mg of PCL-*b*-PEO was first dissolved in 50 mL of acetone and then introduced drop wise in 15 mL of water under gentle stirring. The acetone was evaporated under reduced pressure in a second stage.

2.2.3. Preparation of emulsions

The MCT oil and aqueous suspension of PCL-*b*-PEO micelles were mixed together with an UltraTurrax® T25 device equipped with a S25N-18G shaft (IKA, Germany) rotating at 22,000 rpm during 5 min (cold process) and an o/w emulsion was obtained.

2.2.4. NMR analyses

^1H NMR spectra of PCL-*b*-PEO diblock copolymer were recorded by using a Bruker DRX 300 spectrometer operating at 300 MHz. Either deuterated chloroform (CDCl_3) or deuterated water (D_2O) were used as solvents. Chemical shifts were measured in ppm from tetramethylsilane.

2.2.5. Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography (SEC) measurements were performed with a Viscotek TDAmix system from Malvern Instruments that consists of an integrated solvent and sample delivery module (GPCmax) and a Tetra Detector Array including a right (90°) and low (7°) angle light scattering detector (RALS/LALS), a 4-capillary differential viscometer, a differential refractive index detector, and a Diode Array UV Detector. THF was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL min^{-1} ; toluene has served as a flow rate marker. All polymers were injected after filtration through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ pore-size membrane. The separation was carried out on three Polymer Laboratories columns [$3 \times \text{PLgel } 5\text{ }\mu\text{m Mixed C (}300 \times 7.5\text{ mm)}$] and a guard column (PL gel $5\text{ }\mu\text{m}$). Columns and detectors were maintained at 40°C . The OmniSEC 4.6 software was used for data acquisition and data analysis. The absolute molar mass was calculated using triple detection from combined LS and RI signals. The average refractive index increment (dn/dc) was measured with the online refractometer injecting polymer solutions at different concentrations. Then, the dn/dc can be calculated by plotting the RI area (integrated from the RI signal) versus injected concentration

Table 1
PCL-*b*-PEO diblock copolymer characteristics as determined by ¹H NMR and SEC measurements.

| M_w^a (g mol ⁻¹) | M_{NMR}^b (g mol ⁻¹) | M_{SEC}^c (g mol ⁻¹) | PI ^d | m^e | dn/dC^f (cm ³ g ⁻¹) |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-------|--|
| 12,410 | 12,992 | 11,180 | 1.12 | 65 | 0.068 |

^a Theoretical molar mass as calculated according to the ϵ -CL/MPEG feed ratio of the reactor.

^b The molar mass as calculated from the ratio of integrals of the ¹H NMR resonance peaks of the PCL block at 4.07 ppm and of the PEO block at 3.65 ppm.

^c Number average molar mass as measured by SEC analysis with combined LS and RI detection.

^d Polydispersity index (PI) as measured by the SEC analysis.

^e Polymerization degree of the PCL block (m) as calculated from the ¹H NMR spectrum.

^f As calculated by SEC analysis.

directly in the OmniSEC software. Because RI area is assumed to be proportional to the refractive index, the slope gives dn/dC .

2.2.6. Particle size

Size measurements of nanoparticles were performed by dynamic light scattering at 25 °C using a Malvern® NanoZS instrument operating at 633 nm wavelength and 173° scattering angle. The refractive indices of water and block copolymer were taken as 1.33 and 1.45 respectively, and the viscosity of water was 0.8872 mPas. The size distributions obtained by the CONTIN method displayed a single population, which made sense to the mean diameter and width of the size distribution. Particle sizes were expressed as the *z*-average diameter and the polydispersity index (Pdl) given by the cumulant method. For measurements in water/acetone mixtures, the refractive indices and the viscosities of the mixed solvents were measured using an Atago PAL-1 refractometer and a Ubbelohde capillary viscometer respectively.

Emulsions droplet sizes were measured by small angle light scattering using a MasterSizer® 2000 granulometer (Malvern, UK). The refractive indices of water, MCT and dodecane were 1.33, 1.45 and 1.42 respectively.

2.2.7. Transmission electron microscopy (TEM)

Nanoparticles suspensions and MCT in water emulsions stabilized using micelles were imaged at the Centre Technologique des Microstructures (CTμ) technical platform of the University of Lyon [21] using a transmission electron microscope Philips CM120 working at 80 kV acceleration. The particles suspensions and emulsions were placed on formvar/carbon-coated copper TEM grids and dried under atmospheric conditions before their observation.

2.2.8. Small-angle neutron scattering experiments (SANS)

SANS measurements were performed at 25 °C on the D22 spectrometer [22] at the Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France). The samples were contained in quartz cuvettes of 1 mm optical path, giving ~80% transmission that ensures favorable scattering conditions (negligible multiple scattering). Scattered intensity was collected on a 2D-detector at two configurations with sample-to-detector distances of 2 m and 14 m respectively; it was radially averaged, giving the standard scattering pattern of isotropic samples as a function of the modulus of the scattering vector $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$ (momentum transfer) in the range $4 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$. Data was processed according to standard procedures available at the ILL as software packages [23].

Three samples were measured: A suspension of micelles of PCL-*b*-PEO block copolymer at 3% (w/v) in D₂O, a classical and a Pickering o/w emulsion of dodecane in D₂O stabilized using the PCL-*b*-PEO block copolymer. The oil phase was a mixture of 95 vol% of dodecane-*d*26 and 5 vol% of dodecane of natural isotopic abundance; the scattering length density the mixture was matching that of D₂O. The “reference” emulsion was prepared by a conventional emulsification of 33% oil phase made of a 50/50 (v/v) mixture of dodecane and dichloromethane containing 1.5% (w/v) of dissolved PCL-*b*-PEO into 67% of water as aqueous phase. Evaporation

of dichloromethane was performed after the emulsification step. The final emulsion had an oil content of 20 vol%. The dodecane-in-water emulsion stabilized using PCL-*b*-PEO nanoparticles was prepared with equal volumes of dodecane and aqueous suspension of PCL-*b*-PEO nanoparticles (5%, w/v).

3. Results and discussion

3.1. Modification of the “spontaneous emulsification” method

The “nanoprecipitation” or “spontaneous emulsification” process was used for the dispersion of PCL-*b*-PEO in water. The original method called “nanoprecipitation” is widely used for the preparation of aqueous suspensions of polymer nanoparticles [20,24,25]. In the classical version of this process, a solution of polymer in acetone is poured into an aqueous solution of surfactant; a supersaturated solution of polymer results from the dissolution of acetone in water, and the polymer precipitates as a stable suspension of particles of diameter in the range 100–200 nm [24–27]. Water is evaporated under reduced pressure in a second stage in order to recover an aqueous suspension. Such a process usually consists in mixing a fairly dilute solution of organic materials into a larger amount of water. As a consequence this process yields dilute suspensions of such nanoparticles [24,25]. In the case of preparation of polymer nanoparticles, attempts to increase the polymer concentration were unsuccessful; large lumps of solid materials formed when the amount of polymer in acetone was increased. The present case is different since the material to be emulsified is an amphiphilic block copolymer that forms self-stabilized particles. Aggregation, of primary elementary particles is prevented, allowing the formation of much smaller particles in the range 30–40 nm. It is presumed that the formed particles are corresponding to those generated by a nucleation and growth process [26,27]. A limited coagulation and coalescence process usually follows the formation of primary particles [28]; it is prevented by the steric stabilization of the non-ionic PEO blocks. The nanoprecipitation method was modified by inverting the relative amounts of acetone and water, allowing higher concentrations of the final suspensions. As a typical recipe, 0.75 g of the block copolymer was dissolved in 50 mL of acetone. The nanoprecipitation was performed into 15 mL of water under gentle magnetic stirring. The organic solvent was then evaporated under reduced pressure at 40 °C. The path followed within the two steps in a ternary phase diagram (water/acetone/PCL-*b*-PEO) is presented in Fig. 2. As the first step, the starting solution of PCL-*b*-PEO at 1.5% concentration in acetone was mixed with water so as to reach a 1.15% suspension of PCL-*b*-PEO in a acetone/water 77/23 mixed liquid phase. The second step was the evaporation of acetone which yielded a clear aqueous suspension of PCL-*b*-PEO nanoparticles reaching 5% concentration.

Size measurement revealed the formation of nanoparticles of 30 nm diameter as shown in Fig. 2. In order to investigate the formation of nanoparticles, solutions of block copolymer in acetone were combined with water and size measurements were performed by dynamic light scattering (DLS) before and after evaporation of

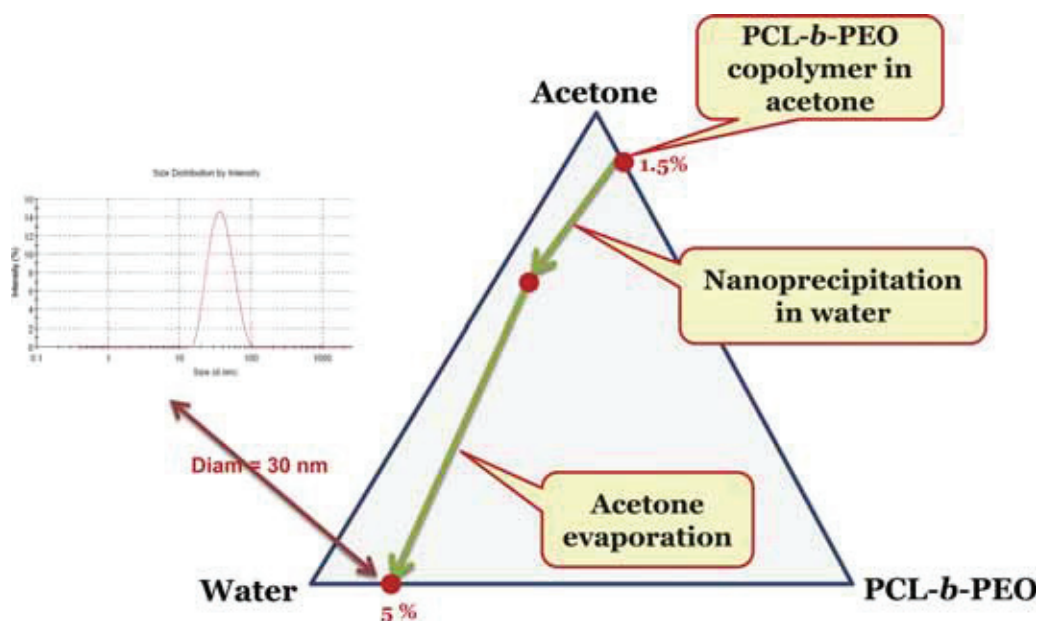


Fig. 2. Paths followed by the chemical composition of the samples during the two stages of the preparation of micelles using the “modified” nanoprecipitation process. The inset at the left shows the particle size distribution measured by DLS.

acetone. Whatever the water content between 30% and 100%, the micelle diameters measured in the acetone/water mixed solvent were the same; the hydrodynamic diameters were in the range 26–35 nm (Table 2). The nanoparticles formed during the first step when the PCL-*b*-PEO solution in acetone was mixed with water.

Since acetone is a good solvent for the PCL block and a precipitant for the PEO block, it is presumed that reverse micelles were formed in the starting solution in acetone. The self-assembled structures of block and graft copolymers strongly depend on the solvent type and concentration: direct micelles, reverse micelles, or more or less rigid organized structures (cylinders, lamellae) [29]. Formation of reverse micelles was more likely because the solution in acetone was fluid and isotropic. Formation of direct micelles by mixing water and the solution in acetone involved a structural inversion from reverse to direct micelles.

3.2. Emulsions stabilized by block copolymer nanoparticles

O/w emulsions were prepared using medium chain triglycerides (MCT) as oil. The preparation of emulsions was investigated using increasing amounts of oil using particles suspensions of concentrations 1.5, 3 or 6% (w/v). Emulsification was carried out by mechanical stirring with a conventional rotor-stator shearing device (Ultra-Turrax). Emulsification was successful up to 50% oil content: the full oil was dispersed as droplets at the end of the emulsification process. Partial failure was observed for 60% oil content:

an o/w emulsion was indeed formed, but free oil was still present as a macroscopic layer of pure oil above the o/w emulsion. Creaming was observed because the continuous phase was fluid; its rate was depending on the droplet diameter. The mean droplet diameter depended on the concentrations of nanoparticles and oil as shown in Fig. 3a. Systematic experiments where either the oil content was varied at constant concentration of PCL-*b*-PEO nanoparticles or the nanoparticles concentration was varied at constant oil content, merged into a single master curve when the mean droplet diameter was plotted as a function of the mass ratio $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$ (Fig. 3b). This behavior showed that the droplet size was controlled by the mass ratio $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$. Such phenomenon has previously been observed with Pickering emulsions stabilized with inorganic solid particles such as silica [8]. The linear dependence of droplet diameter with respect to $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$ is in full agreement with the limited coalescence phenomenon introduced by Arditty et al. [30]. The linear relationship reads [8]

$$D = \frac{6}{\rho_{\text{oil}} a_{\text{nanoparticles}}} \frac{M(\text{oil})}{M(\text{nanoparticles})} \quad (1)$$

where ρ_{oil} is the density of oil and $a_{\text{nanoparticles}}$ is the interfacial area covered by one block copolymer nanoparticle at dense coverage of the oil droplets. The diameter of droplets did not decrease but remained constant for mass ratios below 5 where the expected droplet size was the smallest. The present mechanical stirring device was not powerful enough to break up small oil droplets. It was difficult to obtain droplet emulsions smaller than 2 μm despite using high nanoparticle concentration and/or low amounts of internal phase. The emulsions obtained underwent reversible creaming and showed excellent stability upon storage at 25 °C over several months even for high internal phase ratio emulsions (>50%, v/v). The droplet size measured during 3 months storage at 4, 20 and 40 °C remained constant.

3.3. Investigation of the physical state of nanoparticles: ¹H NMR studies

Direct micelles of PCL-*b*-PEO formed in D₂O. The PCL blocks formed a central hydrophobic core, while the PEO blocks formed

Table 2
Nanoparticle mean diameters measured by dynamic light scattering as a function of the composition of the acetone/water mixed solvent.

| Acetone (%) | Water (%) | PCL- <i>b</i> -PEO (%) | z-Average diameter before solvent evaporation (nm), and Pdl in brackets |
|-------------|-----------|------------------------|---|
| 76 | 23 | 1 | 26(0.2) |
| 69 | 30 | 1 | 26(0.2) |
| 49 | 50 | 1 | 35(0.12) |
| 29 | 70 | 1 | 35(0.13) |
| 0 | 95 | 5 | 30(0.12) ^a |

^a After evaporation of acetone.

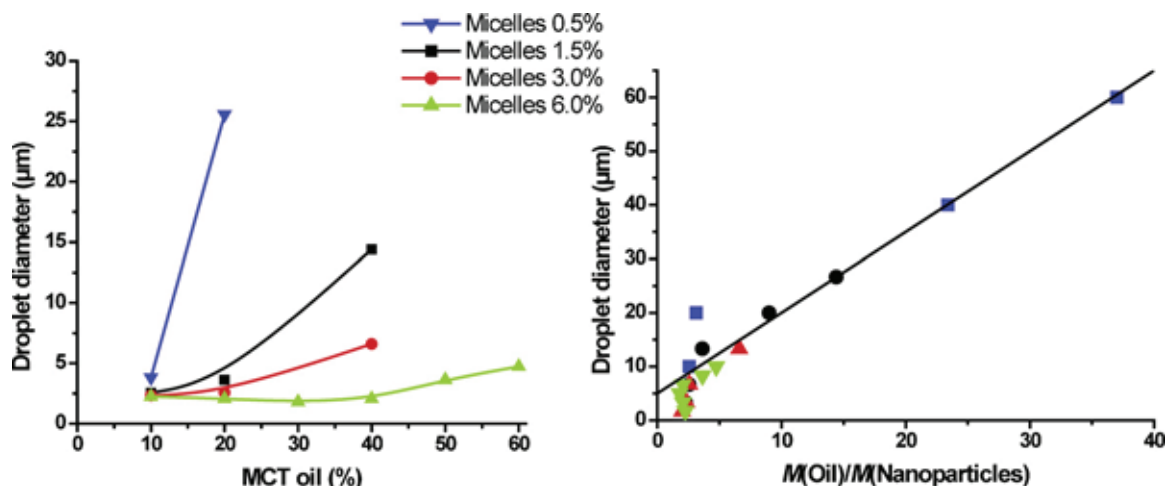


Fig. 3. (a) Emulsions mean diameter as a function of MCT oil and nanoparticles contents. (b) Emulsions mean diameter as a function of the $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$ mass ratio.

a hydrophilic corona layer swollen by water. ^1H NMR spectra of nanoparticles were run in order to assess the physical state of the PCL core. Indeed, bulk polycaprolactone is a semi-crystalline polymer that is a solid below the melting temperature of its crystalline parts (60°C). The amorphous parts of the PCL are in the molten state at room temperature since the glass transition temperature is -60°C . Whether PCL crystallized inside the micellar core or remained fully liquid is revealed by the line width of the NMR spectrum.

The ^1H NMR spectrum of PCL-*b*-PEO micelles in D_2O showed rather sharp peaks for the PEO line at 3.6 ppm and the terminal methyl located at its chain end at 3.0 ppm. Broad lines were observed for the protons of the PCL block at 1.39, 1.65, 2.31, and 4.07 ppm (Fig. 4).

Conversely, the ^1H NMR spectrum of PCL-*b*-PEO in deuterated chloroform (Fig. 1) is typical of the high resolution spectrum of a solution of short polymer chains with narrow lines that indicate high molecular mobility. Indeed, the PCL-*b*-PEO diblock copolymer, as well as every single block, was soluble in chloroform. In D_2O , the

lines of PEO in water were narrow because the molecular motions of the PEO chains, swollen by water, were quite fast. Although the lines of polycaprolactone were broad, they were detected with a NMR spectrometer designed for liquids, which indicates that the PCL blocks have a liquid-like mobility. The areas under the NMR lines of the PCL blocks were those expected on the basis of the length of the PCL block; they were the same as in the spectrum of the solution in CDCl_3 . The full PCL blocks were visible with a liquid-state NMR instrument. Any crystalline part would not be visible with such a NMR technique because the corresponding lines would be much broader than the spectral width. As a reference example, Heald et al. [31] and Drumond et al. [32] observed block copolymer nanoparticles of PLA-*b*-PEO having a glassy core made of poly(lactic acid). The NMR spectrum in D_2O only showed lines of the PEO block. The PLA block was not visible because of its too slow mobility; only a small peak corresponding to the first PLA segment directly attached to the PEO could be detected. Therefore, the present PCL core is fully liquid, which means that rearrangement of the micelles is possible.

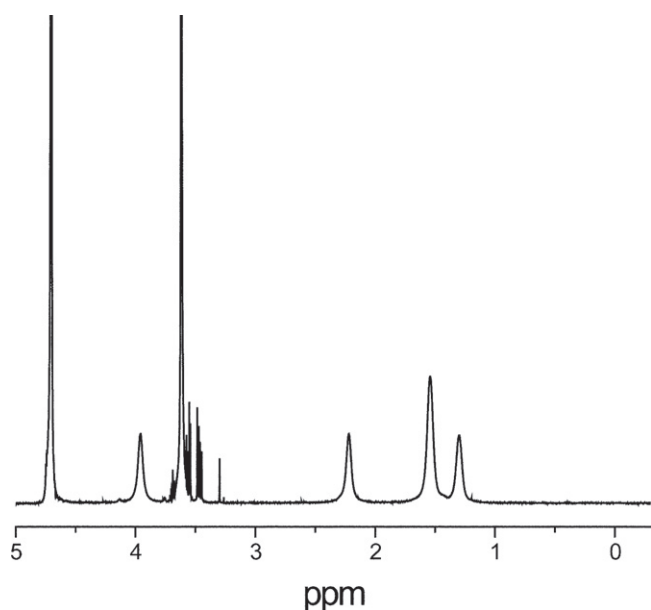


Fig. 4. ^1H NMR spectra of PCL-*b*-PEO in D_2O at room temperature indicating the different mobility's of the PCL and PEO blocks.

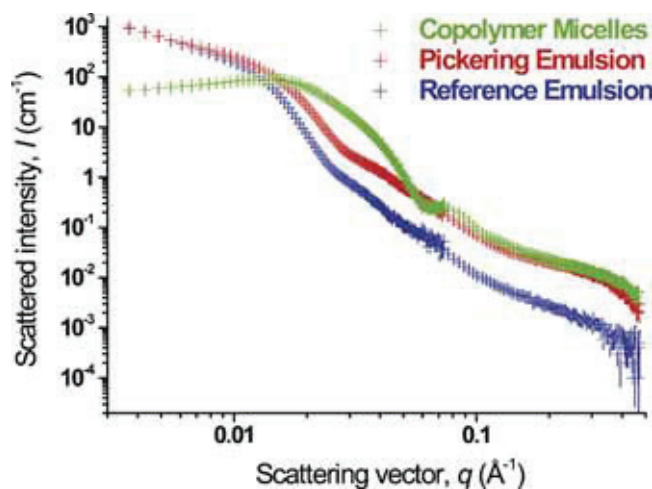


Fig. 5. SANS patterns of: green: copolymer nanoparticles suspension; red: dodecane-in-water emulsion stabilized using nanoparticles; blue: dodecane-in-water emulsion stabilized using block copolymer dissolved in oil. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

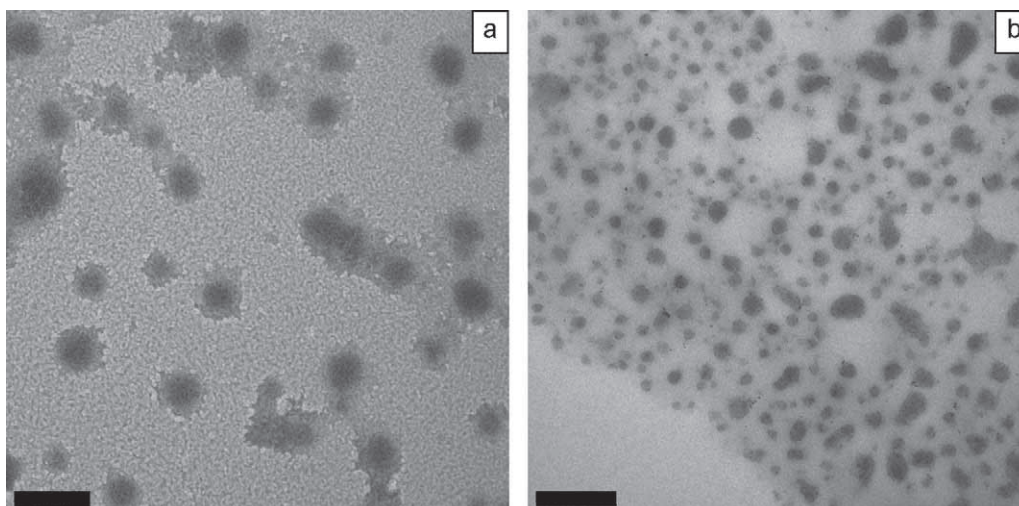


Fig. 6. Morphological characteristics of block copolymer nanoparticles as seen by TEM imaging. (a) Block copolymer nanoparticles in water, scale bar = 100 nm. (b) O/w "Pickering" emulsion, scale bar = 500 nm.

3.4. SANS experiments

SANS measurements of emulsions were performed under contrast match conditions between water and oil. Dodecane was used as oil because it is available as deuterated form for contrast match experiments. The substitution of MCT for dodecane did not change significantly the emulsion properties since stable emulsions having droplet sizes in the same range have been obtained. PCL is neither soluble in dodecane nor in MCT, both oil are poorly soluble in water, so that dodecane and MCT behave in a similar way with that respect. In order to meet contrast match conditions, the scattering length density of deuterated water ($\rho = 6.33 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) was reached with dodecane oil by mixing 95% of dodecane-*d*26 ($\rho = 6.67 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) and 5% of dodecane of natural isotopic abundance ($\rho = -0.46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). Therefore, the scattering came from the adsorbed polymer at the droplet surface. A "Pickering" o/w emulsion expected to have PCL-*b*-PEO nanoparticles adsorbed at its surface was prepared by shear-mixing the oil with an aqueous suspension of nanoparticles. A "reference" o/w emulsion expected to have an adsorbed monolayer of PCL-*b*-PEO surfactant was prepared by emulsification of the oil containing the block copolymer. An indirect method involving a mixture of dodecane oil and dichloromethane followed by evaporation of dichloromethane was used in order to circumvent the insolubility of PCL-*b*-PEO in dodecane. Finally, a suspension of PCL-*b*-PEO nanoparticles in D₂O was also measured (Fig. 5).

The scattering patterns for nanoparticles and both emulsions were very different (Fig. 5). In particular, block copolymer nanoparticles have their first minimum located at a scattering vector of 0.06 \AA^{-1} , while the minimum of "Pickering" and "reference" emulsions appeared at 0.03 \AA^{-1} . This shows that there were no nanoparticles in the emulsion samples, neither at the interface, nor remaining in the aqueous phase.

The scattering patterns of the two emulsions were quite similar; the difference of overall scattering intensity came from the different concentrations of block copolymer in both samples. Hence the structures were similar although the block copolymer has not been incorporated as nanoparticles for the preparation of the reference emulsion. This suggests that the surface of oil droplets was covered by a thin layer of polymer adsorbed at the dodecane/water interface better than by adsorbed nanoparticles. The scattering pattern does not match with the presence of adsorbed nanoparticles. The expected scattering of adsorbed nanoparticles is that of nanoparticles brought close together by their adsorption at the surface, that

is, that of a concentrated suspension of nanoparticles. It should have resembled that of the aqueous suspension of nanoparticles together with a strong correlation peak from a structure factor coming from intermicellar interferences [33–35]. Such peak should appear at a scattering vector of the order $2\pi/\text{Diam} \approx 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ in case of a dense (close-packed) coating of the droplets surface by adsorbed nanoparticles.

Indeed, ¹H NMR measurements have shown that although bulk polycaprolactone is a semi-crystalline polymer at room temperature, the full material is amorphous in its molten state owing to the glass transition temperature of $-60 \text{ }^\circ\text{C}$. It is presumed that the confinement of polycaprolactone chains in small nanoparticles of about 30 nm diameter prevented its crystallization. Therefore, a structural reorganization of adsorbed nanoparticles is possible because the central core of the nanoparticles is fully liquid.

It was expected that the surface of "reference" emulsion droplet was covered by a monolayer of adsorbed amphiphilic block copolymer as it is usual with classical surfactants. In such a case, the scattered intensity should decay as q^{-2} at low angles [36]. This was obviously neither the case for the "Pickering" emulsion, nor for the "reference" emulsion. The structure of the adsorbed layer appeared more complex than classical adsorption schemes.

3.5. Transmission electron microscopy

TEM observations of "Pickering" emulsions and aqueous suspensions of nanoparticles were performed by simple deposition and drying of the dilute samples (0.1%) on TEM grids (Fig. 6). The picture of PCL-*b*-PEO nanoparticles (Fig. 6a) showed fuzzy particles having a mean diameter in the same range as that measured by DLS. The *z*-average diameter calculated from a collection of 200 particle diameters measured on the TEM pictures was $D[5,6] = 50.25 \text{ nm}$ [37]. The mean diameter is slightly larger than that measured by DLS. This could be explained by the liquid-like core of the PCL-*b*-PEO nanoparticles that allowed the particles to spread on the surface of the TEM grid when the suspension has been dried. TEM images of the "Pickering" emulsion showed MCT oil droplets that spilled as large pools inside which pieces of PCL-*b*-PEO material looking like nanoparticles of different sizes were visible. The "Pickering" emulsion was broken upon drying. The mean size of the pieces of material was much larger than that of original PCL-*b*-PEO nanoparticles observed by DLS or in TEM pictures of their aqueous suspension. Such observation agreed with the reorganization of nanoparticles into patches of block copolymer disclosed by means

of SANS. The kind of large nanoparticles observed by TEM may correspond to the pieces of material adsorbed at the surface of oil droplets. However, their rearrangement as round-shaped droplets because of drying is likely; merging of adsorbed fragments during drying is also possible. New nanoparticles reform on the TEM grid after the emulsion has been broken, producing the nanoparticles of different sizes shown in Fig. 6b.

4. Conclusion

O/w emulsions could be prepared using block copolymer nanoparticles as stabilizing nanoparticles. Such emulsions containing 50% of oil were successfully prepared using a conventional mechanical shearing process (Ultra-Turrax rotor-stator device). Such emulsions were stable for long periods (3 months) and their overall characteristics are strongly reminiscent of that of Pickering emulsions. Indeed the preparation process is the same as that of well-known Pickering emulsions stabilized by inorganic solid particles: emulsification of oil into an aqueous suspension of solid particles. The droplet size dependence on oil and block copolymer contents is also identical to that observed for emulsions stabilized by silica particles.

However, the solid stabilizing particles appeared to be liquid. Indeed ^1H NMR measurements disclosed the liquid nature of the hydrophobic core of the block copolymer nanoparticles. SANS experiments also revealed a structural rearrangement of the block copolymer nanoparticles when they were adsorbed at the oil/water interface. It is worth noticing that the structure of the adsorbed layer of block copolymers was the same whatever the preparation process of the emulsions (Pickering-like process with nanoparticles in the aqueous phase or classical process with the block copolymer dissolved in the oil phase). This behavior suggests that the adsorbed layer reached an equilibrium state after the emulsion has been prepared. SANS of the adsorbed block copolymer was not consistent with an adsorbed monolayer as it would be the case with classical surfactants.

Although the stabilizing entities were not the original nanoparticles present in the aqueous phase, the block copolymer PCL-*b*-PEO appears an efficient stabilizer of the o/w emulsions. Indeed stable o/w emulsions containing up to 50% oil were obtained with low concentrations of block copolymer. Since the PCL-*b*-PEO block copolymer was neither soluble in water, nor in MCT and dodecane oils, the preparation of emulsions by means of conventional methods may be difficult. The Pickering approach (emulsification of oil into an aqueous dispersion of PCL-*b*-PEO nanoparticles) for the preparation of such emulsions was advantageous because it allowed the preparation in an easy way using the same instruments as for classical emulsions. The alternative preparation method by emulsification/evaporation used for the “reference” emulsion (using block copolymer dissolved in dichloromethane/dodecane with subsequent evaporation of dichloromethane) did not allow the preparation of concentrated emulsions (the maximum oil content was 20–30%) and the resulting emulsions were less stable than the “Pickering-like” emulsion.

In order to stabilize concentrated emulsions (50% of oil), this process required the preliminary preparation of rather concentrated (3–5%) dispersions of PCL-*b*-PEO nanoparticles in water. Such an issue was solved by a modification of the “nanoprecipitation” process based on the “spontaneous emulsification” phenomenon. This process is a definite improvement over preparation methods of block copolymer nanoparticles used so far which rely on dialysis through semi-permeable membranes.

In order to prepare real Pickering emulsions, solid organic nanoparticles could be prepared using a glassy polymer instead of polycaprolactone. For example poly(lactic acid) is a biocompatible

and biodegradable polymer that is glassy at room temperature. This is the direction of our future work.

References

- [1] R. Aveyard, B.P. Binks, J.H. Clint, Emulsions stabilized solely by solid colloidal particles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102 (2003) 503–546.
- [2] S. Simovic, C.A. Prestidge, Nanoparticle layers controlling drug release from emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 39–47.
- [3] B.P. Binks, C.P. Whitby, Silica particle-stabilized emulsions of silicone oil and water: aspects of emulsification, *Langmuir* 20 (2004) 1130–1137.
- [4] N. Yan, J.H. Masliyah, Adsorption and desorption of clay particles at the oil–water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 168 (1994) 386–392.
- [5] B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions, *Langmuir* 16 (2000) 8622–8631.
- [6] S. Simovic, C.A. Prestidge, Adsorption of hydrophobic silica nanoparticles at the PDMS droplet–water interface, *Langmuir* 19 (2003) 8364–8370.
- [7] S. Simovic, C.A. Prestidge, Hydrophilic silica nanoparticles at the PDMS droplet–water interface, *Langmuir* 19 (2003) 3785–3792.
- [8] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, Y. Chevalier, Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 351 (2010) 348–356.
- [9] S. Abend, G. Lagaly, Bentonite and double hydroxides as emulsifying agents, *Clay Miner.* 36 (2001) 557–570.
- [10] G. Lagaly, M. Reese, S. Abend, Smectites as colloidal stabilizers of emulsions. I. Preparation and properties of emulsions with smectites and nonionic surfactants, *Appl. Clay Sci.* 14 (1993) 83–103.
- [11] J.L. Amalvy, G.-F. Unali, Y. Li, S. Granger-Bevan, S.P. Armes, B.P. Binks, J.A. Rodrigues, C.P. Whitby, Synthesis of sterically stabilized polystyrene latex particles using cationic block copolymers and macromonomers and their application as stimulus-responsive particulate emulsifiers for oil-in-water emulsions, *Langmuir* 20 (2004) 4345–4354.
- [12] B.P. Binks, J.H. Clint, G. Mackenzie, C. Simcock, C.P. Whitby, Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions, *Langmuir* 21 (2005) 8161–8167.
- [13] N. Kumara, M.N.V. Ravikumarb, A.J. Domba, Biodegradable block copolymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 23–44.
- [14] M. Chausson, A.-S. Fluchère, E. Landreau, Y. Aguni, Y. Chevalier, T. Hamaide, N. Abdul-Malak, I. Bonnet, Block copolymers of the type poly(caprolactone)-*b*-poly(ethylene oxide) for the preparation and stabilization of nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* 362 (2008) 153–162.
- [15] A.S. Mikhail, C. Allen, Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(epsilon-caprolactone) micelles containing chemically conjugated and physically entrapped docetaxel: synthesis, characterization, and the influence of the drug on micelle morphology, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1273–1280.
- [16] G.S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 107–116;
- [17] C. Iojoiu, Th. Hamaide, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, Modified poly((-caprolactone)s and their use for drug-encapsulating nanoparticles, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 42 (2004) 689–700.
- [18] M.A.R. Meier, S.N.H. Aerts, B.B.P. Staal, M. Rasa, U.S. Schubert, PEO-*b*-PCL block copolymers: synthesis, detailed characterization, and selected micellar drug encapsulation behavior, *Macromol. Rapid Commun.* 26 (2005) 1918–1924.
- [19] R. Li, X. Li, L. Xie, D. Ding, Y. Hu, X. Qian, L. Yu, Y. Ding, X. Jiang, B. Liu, Preparation and evaluation of PEG–PCL nanoparticles for local tetradine delivery, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 158–166.
- [20] R. Diab, M. Hamoudeh, O. Boyron, A. Elaissari, H. Fessi, Microencapsulation of cytarabine using poly(ethylene glycol)–poly(caprolactone) diblock copolymers as surfactant agents, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 456–469.
- [21] H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies, Procédé de dispersion de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules, Patents FR 2608988 (1986); EP 0275796 (1987); US 5118528 (1992).
- [22] <http://microscopies.univ-lyon1.fr>.
- [23] <http://www.ill.fr/YellowBook/D22>.
- [24] J.-P. Cotton, in: P. Lindner, Th. Zemb (Eds.), *Neutron, X-ray and Light Scattering. Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems*, North-Holland, Amsterdam, 1991, pp. 19–31.
- [25] H. Fessi, F. Puisieux, J.-Ph. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.* 55 (1989) R1–R4.
- [26] S. Stainmesse, A.-M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, H. Fessi, Formation and stabilization of a biodegradable polymeric suspension of nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.* 273 (1995) 505–511.
- [27] S.A. Vitale, J.L. Katz, Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid–liquid nucleation: the Ouzo effect, *Langmuir* 19 (2003) 4105–4110.
- [28] F. Ganachaud, J.L. Katz, Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices, *Chem. Phys. Chem.* 6 (2005) 209–216.
- [29] J. Aubry, F. Ganachaud, J.-P. Cohen Addad, B. Cabane, Nanoprecipitation of poly(methylmethacrylate) by solvent shifting. 1. Boundaries, *Langmuir* 25 (2009) 1970–1979.
- [30] Z. Tuzar, P. Kratochvil, Block and graft copolymer micelles in solution, *Adv. Colloid Interface Sci.* 6 (1976) 201–232.
- [31] S. Arditty, C.P. Whitby, B.P. Binks, V. Schmitt, F. Leal-Calderon, *Eur. Phys. J. E* 11 (2003) 273–281.

- [31] C.R. Heald, S. Stolnik, K.S. Kujawinski, C. De Matteis, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.C. Purkiss, R.J. Barlow, P.R. Gellert, Poly(lactic acid)–poly(ethylene oxide) (PLA–PEG) nanoparticles: NMR studies of the central solidlike PLA core and the liquid PEG corona, *Langmuir* 18 (2002) 3669–3675.
- [32] W.S. Drummond, C.G. Mothé, S.H. Wang, Biodegradable nanosize particles of poly(L,L-lactide)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L,L-lactide), *Polym. Eng. Sci.* 48 (2008) 1939–1946.
- [33] J. Oberdisse, Adsorption and grafting on colloidal interfaces studied by scattering techniques, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 3–8.
- [34] G. Despert, J. Oberdisse, Formation of micelle-decorated colloidal silica by adsorption of nonionic surfactant, *Langmuir* 19 (2003) 7604–7610.
- [35] J. Oberdisse, Small angle neutron scattering and model predictions for micelle-decorated colloidal silica beads, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 1557–1561.
- [36] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982.
- [37] L.H. Hanus, H.J. Ploehn, Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. Theoretical development, *Langmuir* 15 (1999) 3091–3100.

Chapitre 7

Formulation d'émulsions stabilisées par des particules de copolymères à blocs

7.1. Introduction

Ce chapitre vient compléter le chapitre précédent en décrivant la formulation d'émulsions huile-dans-eau en utilisant en plus du copolymère PCL-*b*-PEG précédemment étudié, un copolymère PLA-*b*-PEG. La synthèse organique de ce dernier ainsi que l'obtention de nanoparticules en suspensions aqueuses concentrées et stables sont également décrites.

En plus de la méthode d'émulsification conventionnelle précédemment décrite dans le chapitre 6, une méthode par émulsification spontanée est également investiguée.

Les propriétés des émulsions stabilisées par ces deux types particulaires, et préparées selon les deux procédés d'émulsification sont détaillées.

Nous avons également essayé de démontrer la pertinence du rapport massique huile/nanoparticules pour nos émulsions, fabriquées avec les deux procédés. Pour des émulsions de Pickering, il a été démontré qu'une quantité plus importante de particules dans la formulation permettait d'obtenir des gouttelettes de taille plus petite (Tambe et Sharma 1994; Aveyard, Binks, et Clint 2003; Arditty et al. 2003).

Pour des quantités faibles en particules, dans des conditions d'émulsification données, il est possible que la totalité d'interface créée ne soit pas recouverte de particules. Arditty et coll. (2003, 2004, 2005) ont démontré que dans ce cas, les émulsions avec des gouttelettes de taille micrométrique, subissaient le phénomène de coalescence limitée, jusqu'à atteindre la taille millimétrique. Autrement dit, la coalescence des gouttelettes entraîne la diminution de l'aire

interfaciale et la coalescence continue jusqu'à ce que la surface des gouttelettes soit complètement recouverte de particules.

Dans d'autres études, le phénomène de coalescence limitée n'a pas été observé. En particulier, les données de Binks et Whitby (2004) sur des émulsions fines ne montrent pas la variation linéaire espérée de $1/D$ (inverse du diamètre des gouttes) en fonction de la concentration de silice. Les émulsions sont stables même pour des taux de recouvrement faibles en silice.

L'adsorption des nanoparticules de copolymères à blocs aux interfaces est également investiguée par microscopie électronique en cryofracture et en diffusion de neutrons.

Dans cette dernière technique, l'expérience consiste à envoyer un faisceau de neutrons de faible divergence angulaire, de longueur d'onde λ , sur l'échantillon à étudier et à mesurer la variation de l'intensité diffusée $I(\theta)$ en fonction de l'angle de diffusion θ (Fig. 1). Le paramètre physique du processus est en fait le vecteur de diffusion q dont le module est :

$$q = \sin(\theta/2) 4\pi/\lambda \quad (1)$$

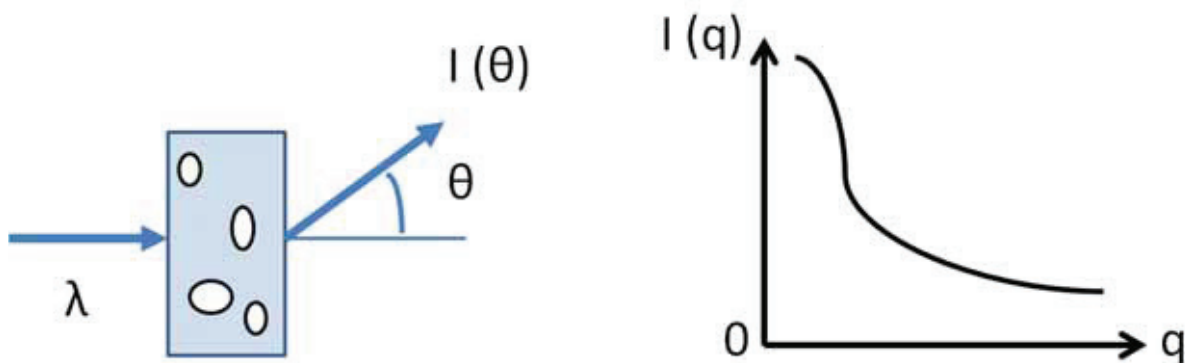


Figure 1. Schéma de l'expérience de diffusion de neutrons et courbe type obtenue.

L'annulation de contraste a été obtenue en utilisant du dodécane et de l'eau deutérés, afin de pouvoir étudier uniquement les objets adsorbés à l'interface.

7.2. Partie expérimentale

La partie expérimentale est présentée sous la forme d'un article soumis bientôt pour publication à *Soft matter*.

Influence of the emulsification process on Pickering emulsions stabilized using biodegradable nanoparticles

Faiza Laredj-Bourezg, Marie-Alexandrine Bolzinger, Yves Chevalier

Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, CNRS UMR 5007, 43 bd 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France.

Abstract

Oil in water emulsions stabilized using biodegradable particles made of PCL-*b*-PEG or PLA-*b*-PEG block copolymers were prepared using two different processes. A conventional one where medium chain triglycerides oil droplets were emulsified in presence of nanoparticles suspensions with a rotor-stator homogenizer (Ultra-Turrax). The second emulsification method was based on the spontaneous emulsification described recently as “Ouzo effect”. The block copolymer and the oil were dissolved in acetone and the emulsion spontaneously formed when the organic mix was introduced in water. The evaporation of acetone led to an oil in water emulsion with excellent stability. The emulsions obtained displayed different creaming properties and droplet size distributions. The control of droplet size and stability of oil-in-water Pickering emulsions stabilized by those biodegradable particles was investigated. Results showed that independently of the block copolymer used, stable emulsions could be obtained even at low nanoparticles content. Surprisingly, the emulsification process appeared as a crucial factor governing emulsions properties. Droplet size was controlled by oil-to-nanoparticles ratio in the conventional emulsification method, while it underwent few fluctuations when using the nanoprecipitation process. Those results underline that the first process was not powerful enough to break up the oil droplets while interface was created at low energy regime in the second one, even using high amounts of internal phase and at low particles concentrations. Freeze-fracture TEM images performed on emulsions (50 wt% oil, 3 wt% nanoparticles) obtained by the two methods showed their organization as strings of particles at the interface. Small angle neutron scattering patterns of the 4 emulsions showed the presence of well separated nanoparticles at the oil/water interface. This proved that during the low energy process, the generation and adsorption of the block copolymer nanoparticles occurred at the same time at oil-water interface, leading to emulsion stabilization. Moreover, stability of emulsions was ensured by the polymeric beads, even at low coverage of the interface.

Keywords: Biodegradable emulsions, Pickering emulsions, biocompatible block copolymer nanoparticles, freeze-fracture TEM, small-angle neutron scattering, spontaneous emulsification.

1. Introduction

Pickering emulsions are water/oil or oil/water mixtures that are solely stabilized by small solid particles and usually inorganic particles (1,2). They are found in many applications and industrial processes, such as crude-oil processing (3), food (4,5), and cosmetics (6,7).

The assembly of colloidal particles at soft interfaces is governed by the respective surface free energies γ of the particle and the two soft phases. Young's equation relates these surface free energies with the equilibrium position of the particle at the interface through the 3-phase

contact angle (θ). Solid particles adsorb at an interface when they are partially wetted, or in other words when $0^\circ < \theta < 180^\circ$. The driving force for adsorption of particles at an o/w interface is the reduction of the interfacial area of the w/o interface (8). The free energy of adsorption to the interface is $\Delta F = \pi R^2 \gamma_{ow} (1 - \cos\theta)$ (9), which means that colloids with radius of 0.01-10 μm and intermediate values of θ are strongly bound ($\Delta F \approx 10^2$ - $10^6 kT$) and are practically irreversibly attached to the interface. Pickering emulsions are therefore extremely stable structures. The major drawback of such emulsions for topical delivery is the use of inorganic particles as stabilizing particles. Related to their small size these nano-sized particles could cross the skin and be retained in the viable skin layers where their clearance is difficult (10–12). Recently organic particles have been successfully used to stabilize Pickering emulsion such as cellulose nanocrystals originating from bacteria, proteins or modified starch granules (13–16). Biocompatible and biodegradable particles such as polyesters are preferred for their utilization in skin delivery. Because of their biocompatible and biodegradable properties, poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) (PLA-*b*-PEG) and polycaprolactone-*block*-poly(ethylene glycol) block copolymers (PCL-*b*-PEG) have been studied for a long time and used as solubilizing agents of poorly soluble drugs, and drug carrier systems for topical applications (10–12) and parenteral delivery (10–17). The presence of a nonionic water-soluble PEG shell as well as the size range (10–100 nm) of polymeric micelles are expected to prevent their uptake by the mononuclear phagocyte system and allow for passive targeting of cancerous or inflamed tissues through the enhanced permeation and retention effect (25). PCL is a hydrophobic, semi-crystalline polymer, having a glass transition temperature (T_g) of -60°C . PLA is a glassy material at room temperature; its glass transition temperature is $+58^\circ\text{C}$. When introduced in water, depending on the hydrophilic and hydrophobic respective chain length, those block copolymers form usually hairy micelles with a hydrophobic core surrounded with the pegylated hydrophilic corona (26–30). Previous studies have shown that PCL did not crystallize inside the core of the PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles leading to particles with a molten core (31,32). Conversely the ^1H NMR of the PLA-*b*-PEG nanoparticles showed that the PLA chains are considered as immobilized in the core of such micelles (33). Those block copolymers micelles were never investigated to stabilize Pickering emulsions. Pickering emulsions stabilized by such micelles are an appealing new delivery system because it could produce a double drug entrapment system: in the micelle core and the emulsion droplets. The stabilization mechanisms of Pickering emulsions depend on the stability of the block copolymer micelles forming the interface, and from the physicochemical parameters driving the emulsion stability and especially the interfacial coverage (34). The preparation of such “frozen micelles” that will be called “nanoparticles” through the paper can be prepared by different process including the spontaneous emulsification process modified in such a way to produce concentrated particles suspensions (31,32,35–37). The aim of the paper was to investigate two processes to formulate Pickering emulsion made up with medium chain triglycerides (MCT) and water: the first one is a classical one where the nanoparticles are produced in first and then used at different ratio to formulate the final Pickering emulsion. The second one takes advantage on the spontaneous emulsification process and provide a one-step method where the stabilizing block copolymer micelles and the final emulsion containing MCT and water are prepared in the same step. The effectiveness of solid nanoparticles to stabilize Pickering emulsion depends on particle size, particle shape particle concentration and particle wettability. Therefore, the oil/water ratios were varied in order to consider the zone of stability of the emulsions and the relevant parameter of the size control. The condition to obtain such system is that the self-assembled structure of the block copolymers micelles might remain stable. Moreover, these chains are expected to maintain steric repulsion between nanoparticles

present at the same interface but also between particles stabilizing other droplets preventing them from coalescence.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG diblock copolymers (the Number average molar masses as measured by SEC analysis are 18234 and 11180 g/mole) were synthesized in LAGEP by ring opening polymerization of ϵ -caprolactone (Sigma-Aldrich) or 3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (Sigma-Aldrich) with mPEG as a macroinitiator and stannous 2-ethylhexanoate as a catalyst (31). Acetone (Laurylab) was used as received. MCT (Sasol, Miglyol 812N) was a kind gift from the supplier. Deionized water of $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ resistivity was used throughout the work.

2-2 Methods

2.2.1. Preparation of emulsions

Emulsions were formulated, using two different processes.

The first method (method 1) consisted in preparing firstly concentrated suspensions of block copolymer particles (PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG nanoparticles) by spontaneous emulsification. The latter was modified by inverting the amounts of acetone and water in order to obtain unusual high concentrations of particles (31). Briefly, 1.4 g of block copolymer was dissolved in acetone (50 mL) and nanoprecipitation took place in water (20 mL) under moderate agitation. Acetone evaporation under reduced pressure led to concentrated aqueous suspensions of particles (up to 7% w/v) with a narrow size distribution. Those aqueous suspensions were then admixed to different amounts of MCT and the emulsification was achieved by mechanical stirring (Ultra-Turrax, IKA, Germany) at a speed of 22,500 rpm for 2 min.

The second method (method 2) consisted in dissolving block copolymer and the MCT in acetone (50 mL). The organic solution was then slowly injected into the aqueous phase (15 mL) under moderate magnetic stirring. The aqueous phase turned milky immediately as a result of the formation of an emulsion. The acetone was then removed under reduced pressure at 45°C.

As demonstrated for silica stabilized emulsions, the relevance of the oil-to-nanoparticles ratio for both emulsification methods was checked by comparing experiments performed by varying either the particles content or the oil, while keeping the other parameter constant. Thus, the bloc copolymers nanoparticles concentration in the aqueous phase was varied from 1 to 9 wt% at constant weight fraction of oil. Alternatively, the oil content was varied from 10 to 60 wt% at constant at nanoparticles concentration. The droplet diameters measured in both series of experiments were plotted as a function of $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$.

2.2.2. Characterization methods

- Particle Size Measurements

Size measurements of nanoparticles were performed by dynamic light scattering at 25°C using a Malvern[®] NanoZS instrument operating at 633 nm wavelength and 173° scattering angle. The refractive indices of water and block copolymer were taken as 1.33 and 1.45

respectively, and the viscosity of water was 0.8872 mPa.s. Emulsions droplet sizes were measured by small angle light scattering using a MasterSizer[®] 2000 granulometer (Malvern, UK). The refractive indices of water, and MCT were 1.33 and 1.45 respectively.

- Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)

Freeze-fracture for transmission electronic microscopy was performed at the Service de Microscopie Electronique (Cryomicroscopie Electronique), University Pierre et Marie Curie-CNRS, on Pickering emulsions containing 50% (w/v) of MCT oil and 3% (w/v) of particles. A very small size specimen (1 mm³) underwent ultra fast freezing (EMCPC Leica, Germany) and was immediately transferred in the vacuum chamber (BAF 400T Bal-Tec) for the rest of the preparation. The specimen surface uncovered by fracture was covered by platinum shadowing at 45° angle. A molding was obtained by carbon evaporation at normal incidence. Both depositions took place at 10⁻⁵ Pa and 123 K. The replicas were recovered independently at room temperature by specimen dissolution in solvent or acid mixture. It was then collected onto a support microscope grid. The images were recorded at the Centre Technologique des Microstructures (CTμ) technical platform of the University of Lyon using a transmission electron microscope Philips CM120 working at 120 kV acceleration.

- Small-Angle Neutron Scattering (SANS)

SANS measurements were performed on the PACE spectrometer at the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEN Saclay, France) (38). 4 different Pickering emulsions of dodecane in water using 3.5 wt% PCL-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG nanoparticles were prepared using two different emulsification processes. The SANS patterns were recorded under contrast match conditions between water and oil. Dodecane was used as oil because it is available as deuterated form for contrast match experiments. The samples were contained in quartz cuvettes of 2 mm optical path, giving transmissions in the 80% range that ensure negligible multiple scattering. Scattered intensity was collected on a detector consisting of 30 concentric ring detection cells, giving the standard radially averaged scattering pattern of isotropic samples as a function of the momentum transfer (modulus of the scattering vector) $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ (momentum transfer) in the range $2.4 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < q < 0.37 \text{ \AA}^{-1}$. Data processing was made according to standard procedures available at the LLB as software packages (39). Aqueous suspensions of block copolymer nanoparticles (7 wt%) were also prepared, but normal water was substituted by deuterated water.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of nanoparticles

The structure of the block copolymer micelles is of the core-shell type (27,31,40). The hydrophobic part consisting of either PCL or PLA forms the micellar core. The latter is surrounded by a hydrophilic shell made of the PEG chains.

The size of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering. A monomodal narrow distribution was obtained: 30 nm for PCL-*b*-PEG and 50 nm for PLA-*b*-PEG. It corresponds to the diameter of the nanoparticle with its PEG external shell swollen by water. The narrow particle size distribution resulted in small values of the polydispersity index given by the cumulants analysis ($PdI = 0.10$ to 0.2).

Repeated particle size measurements did not vary over long storage durations, showing the very good stability of such suspensions of nanoparticles.

3.2. Preparation of emulsions

Emulsions obtained using both techniques were oil in water emulsions, for both types of investigated block copolymers. Phase inversion did not appear even when the oil volume fraction was increased (60 wt%). This result is in accordance with recent studies on emulsion stabilization using PLGA nanoparticles. Concentrated emulsions (oil fraction > 0.7) are unstable to coalescence but do not undergo catastrophic phase inversion. Rather the emulsions release bulk oil which forms a layer on top of the cream (concentrated drops) layer. This indicates that block copolymer nanoparticles preferentially stabilize oil-in-water emulsions.

Creaming rate decreased by increasing oil content regardless of the polymer or the process used. All the obtained emulsions displayed high stability over 2 years at 25°C. The block copolymer constituting the nanoparticles seemed to have no impact on the emulsions properties. Emulsions with the same oil and particles contents manufactured with both processes, showed disparities in size distribution and creaming behavior (Figure 1).

Contrary to emulsions resulting from method 1, emulsions prepared with the spontaneous emulsification process showed much narrower size distributions (Figure 1). Total creaming of these emulsions highlighted a clear lower phase (Figure 2) for low oil amounts (< 50 wt%). Independently of the manufacturing process, creaming observed on both emulsions was totally reversible by simple agitation.

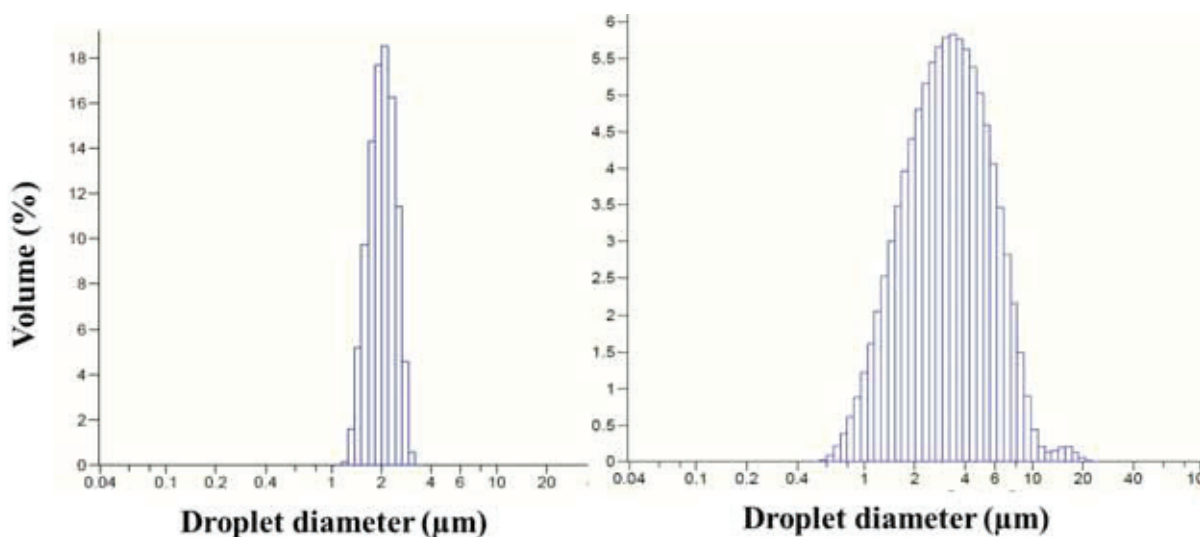


Figure 1. Droplet size distribution of 50 wt% MCT oil in water emulsion stabilized using PLA-*b*-PEG nanoparticles: Right: made using process 1; Left: made using process 2.

Preliminary studies showed that emulsions were unstable to coalescence when using low MCT content (~1% w/v) and high block copolymer micelles content (~9 % w/v). Emulsions containing > 70% w/v of MCT or 8% of nanoparticles (> 8% w/v) exhibited a too high viscosity. This high viscosity impeded correct mixing of oil and aqueous phases into a coarse emulsion and then the entire emulsification process become no longer facilitated. Oil leakage and destabilization of the emulsions resulted whatever the method used (Figure 3).



Figure 2. Emulsions stabilized using PLA-*b*-PEG block copolymer particles with 20% w/v of oil and 3% w/v of nanoparticles. Left: emulsion obtained using the conventional emulsification process, Right: emulsion obtained using the spontaneous emulsification process.

Nevertheless, stable emulsions with high viscosity were obtained with up to 75% w/v of oil and 3% w/v of particles.



Figure 3. Emulsion (80% Miglyol 812N, 9% block copolymer): high viscosity of the organic solution (block copolymer +oil) caused clogging of the needle and leakage of the oil in the spontaneous emulsification process.

3.3. Emulsification process and relevance of the oil-to-block copolymer nanoparticles ratio

As for surfactant-stabilized emulsions, it is expected that the amount of stabilizing material would control the droplet size. This is due to the fact that stabilized interfacial area extent is proportional to the amount of stabilizer. In Pickering emulsion stabilized with silica, three crucial factors were identified to influence the droplet size: *i*) the concentration of particles initially dispersed in the aqueous phase; *ii*) the amount of oil phase and *iii*) the emulsification process (1,41). Droplet sizes obtained with the two processes were plotted as function of oil/nanoparticles ratio [$M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$] for MCT oil.

The experimental data plotted in Figure 3 (A, C) showed that the two types of experiments merged into a single master curve when using method 1. Therefore the two ways of varying the oil-to-particles ratio were equivalent. The oil-to-particles ratio is the relevant formulation parameter that controls the size of the emulsion droplets. Such behavior has already been evidenced with silica stabilized emulsions (42).

The linear dependency of droplet diameter with respect to $M(\text{oil})/M(\text{nanoparticles})$ is in full agreement with the limited coalescence phenomenon introduced by Arditty et al. (43). The linear relationship reads:

$$D = \frac{6}{\rho_{\text{oil}} a_{\text{nanoparticles}}} \frac{M(\text{oil})}{M(\text{nanoparticles})} \quad \text{Eq. 1}$$

where ρ_{oil} is the density of oil and $a_{\text{nanoparticles}}$ is the interfacial area covered by one block copolymer nanoparticle at dense coverage of the oil droplets.

According to Eq. 1, the slope gives the interfacial area per mass unit of block copolymer nanoparticles. The initial slope corresponding to the master curve obtained gave $a_{\text{nanoparticles}} = 10.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and $26 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ for PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG nanoparticles respectively. Lower value of $a_{\text{nanoparticles}}$ for PCL-*b*-PEG nanoparticles indicated tighter coverage of the oil droplet surface (42). This could be explained by the re-arrangement of those nanoparticles at the oil-water interface as described in a previous work (31) or a higher number of nanoparticles (because smaller) than that obtained with PLA-*b*-PEG bloc copolymer during the nanoprecipitation process. Freeze-fracture images reported on Figure 5 showed the arrangement of particles at the interface for PCL-*b*-PEG nanoparticles stabilized emulsions.

Evidence of a dense coverage of the interface was given in accordance with the predicted results obtained from Eq. 1.

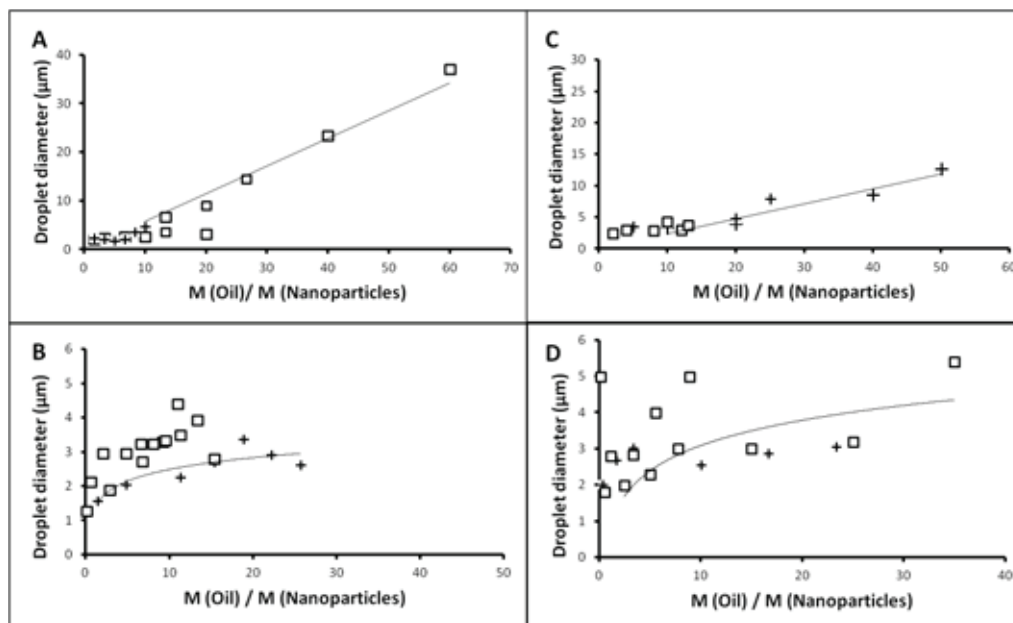


Figure 4. Emulsions mean diameter as a function of the oil-to-particles ratio. Pickering emulsions stabilized using PCL-*b*-PEG particles: A)using Method1; B)using Method2; Pickering emulsions stabilized using PLA-*b*-PEG particles: C)using Method1, D)using Method2.

Squares are for varying oil content with constant nanoparticles contents.

Cross marks are for varying nanoparticles content with constant oil content.

However, Figure 4 (B, D) showed that independently of the particles or the oil contents, the spontaneous emulsification (method 2) led to small variations of droplet sizes. Varying nanoparticles content from 3 to 9 wt%, led to droplets sizes in the range of 2 to 4 μm, when

varying the oil from 10 to 60 wt%. The oil-to-nanoparticles ratio was irrelevant to account for these emulsions. The method 2 using the shifting method led to small emulsion droplet size and therefore generated a high interfacial area. It was expected that the large excess of oil–water interface compared to the amount of nanoparticles that could cover the interface could generate a partial coalescence of uncovered particles reducing the oil/water interface as described by Arditty et al. (2004).

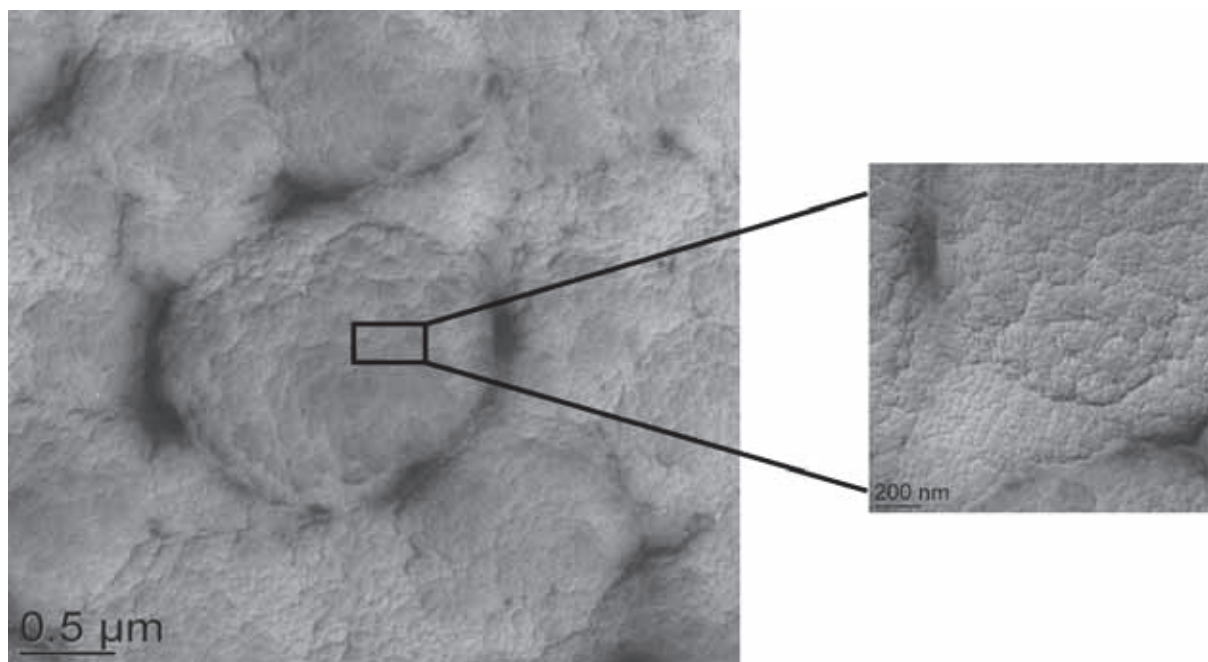


Figure 5. Freeze fracture electron microscopy of PCL-*b*-PEG particles based emulsion (internal phase 50 wt%, particles: 3.5 wt%) made using a conventional emulsification process (method 1).

The limited coalescence mechanism by which a too fine emulsion ripens into a stable coarse emulsion did not operate in the present case. It could be attributed to the small nanoparticles sizes that were unable to completely cover the interface. Freeze-fracture images showed a partial coverage of the interface (Figure 6) for method 2. The fact that such emulsions remain very stable to coalescence suggests that it is not essential to coat droplet interfaces with particles up to complete coverage to provide stability, as also shown by Binks and Kirkland with cyclohexane-in-water emulsions stabilized by SLM 079 silica particles and latex nanoparticles (44).

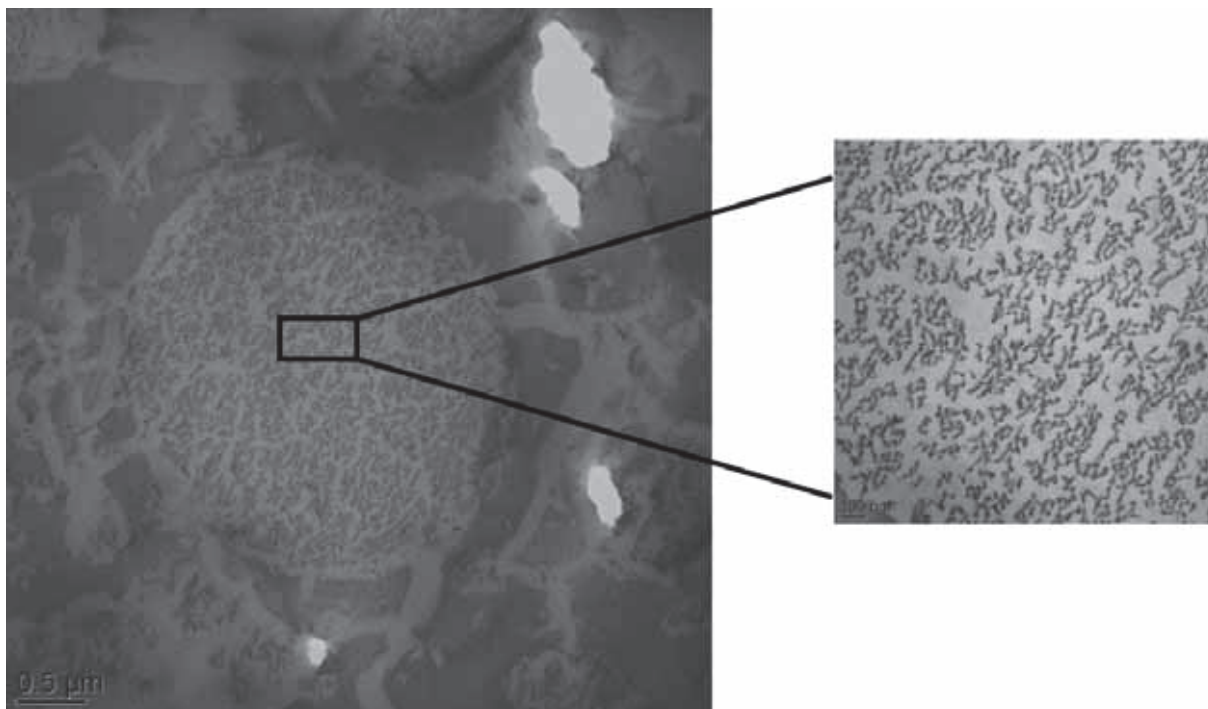


Figure 6. Freeze fracture electron microscopy of PCL-*b*-PEG nanoparticles stabilized emulsions (internal phase 50 wt%, particles: 5 wt%) made using the spontaneous emulsification process.

3.4. Oil/water emulsion formation within the solvent shifting method

During the first seconds of emulsification, block copolymers and oil are facing a high proportion of water, a poor solvent. They supersaturate rapidly giving rise to small oil droplets. These droplets are then rapidly stabilized by block copolymers nanoparticles adsorption at the interface. Davies and Rideal (45) used a mechanism called “diffusion and stranding”, which involves a chemical instability. This is totally different from the interfacial turbulence mechanism which involves a mechanical instability. According to these authors, when an oil-solvent solution, is placed gently in contact with water, the solvent diffuses from the solution into the water phase carrying small amounts of oil (forming a three-component phase in the immediate vicinity of the interface). As the solvent diffuses further into water, the associated oil is thrown out of solution, and is “stranded” in the water in the form of fine emulsion drops. Ruschak and Miller (46) have established that this type of spontaneous emulsification originates in the formation of regions of local supersaturation in one or both phases during the diffusion process, even though, both initial mixtures are unsaturated. Supersaturation near an interface may also promote its breakup by a distinct but closely related chemical instability mechanism (47). Vitale and Katz (48) were the first authors to describe the so-called “Ouzo effect”. The spontaneous emulsification was attributed to a “nucleation-growth mechanism”. When the solubility of some of the solutes decreases rapidly with increasing water concentration, the solution can become supersaturated in these components. If the supersaturation is large, nuclei form spontaneously from small local fluctuations in concentration of solute molecules. The end result of this process (which occurs on the millisecond or faster time scale) is a spatially, fairly uniform dispersion of very small liquid droplets suspended in the continuous liquid phase. Further growth of the droplets occurs almost entirely by Ostwald ripening.

In our case, the solvent shifting method was implemented under unusual conditions. The acetone-to-water-to-MCT ratio was 10:3:3 and a polymer concentration was 1.6 wt% in the

mix before solvent evaporation for the spontaneous emulsification of block copolymers and MCT oil. This led to 50 wt% oil content and 3.5 wt% of block copolymer nanoparticles in the final emulsion. These conditions are far from the boundary limits described by Aubry et al. for successful “ouzo effect” (spontaneous emulsification as a suspension of submicron-sized emulsion) (49). Those authors used the ouzo effect to produce polymethylmethacrylate nanoparticles. They reported a “nucleation-aggregation mechanism” involved in particles formation. However, in our case, at high polymer/oil concentrations, the generation of nanodroplets was not possible and we observed the coexistence of nanoparticles and micronized droplets instead. The high nucleation barrier when small volumes of water are added gave rise to larger and less numerous nuclei and they grew through the capture of non-aggregated solute molecules (nucleation and growth mechanism). This could explain the generation of micron-sized emulsions whatever the oil or the nanoparticles content. Ostwald ripening depletes the small aggregates in favor of the larger droplets. Ultimately, this leads to continuous growth of the larger droplets, which quickly reach several micrometers in size. The solvent evaporation under reduced pressure at 45°C caused a progressive increase of the supersaturation and solvent diffusion from the dispersed phases to the continuous aqueous phase. The size distribution was thereby refined thanks to the “diffusion-stranding” mechanism described earlier.

3.5. Adsorption of block copolymers nanoparticles at the oil/water interface: small angle neutron scattering experiments (SANS)

SANS experiments were aimed at investigating the structure and organization of block copolymer nanoparticles at adsorbed at the surface of oil droplets. A contrast-matched experiment was designed to do so using isotopic substitutions that suppress the scattering of the oil droplets. In order to meet contrast match conditions, the scattering length density of deuterated water ($\rho = 6.33 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) was reached with dodecane oil by mixing 95% of dodecane-*d*26 ($\rho = 6.67 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) and 5% of dodecane of natural isotopic abundance ($\rho = -0.46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). Therefore, the scattering came from the adsorbed polymer at the droplet surface.

The scattered intensity of particles in aqueous suspensions was first investigated in order to get the structure of such nanoparticles. The scattering patterns of 7 wt% block copolymer nanoparticles suspensions in D₂O were recorded and a model of spherical particles having a core-shell morphology was fitted to the experimental data. The scattered intensity was calculated from the scattering length densities of PLA ($1.734 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$), PCL ($0.760 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$), PEG ($0.673 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$) and D₂O ($6.33 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$) for core-shell particles with a Schulz size distribution (50). A hard sphere interaction potential was taken for the calculation of $S(q)$; the volume fraction of hard spheres was that of the water-swollen nanoparticles including the block copolymers and the water molecules that swelled the PEG blocks.

The scattered intensity was given by the scattered amplitude of isolated particles $F(q)$ averaged over the size distribution and the structure factor $S(q)$ that expresses the ordering of the particles as (51).

$$I(q) = [\langle F(q)^2 \rangle + \langle F(q) \rangle^2 (S(q) - 1)] \quad (\text{Eq. 2})$$

The results of the SANS experiments on block copolymer nanoparticles and their interpretation are given in Chapter 5.

In a second stage, the scattering patterns of the Pickering emulsions recorded under contrast match conditions were compared to the scattered intensity by block copolymer nanoparticles.

The concentration of block copolymer nanoparticles was 7 wt% for the aqueous suspensions, whereas it was 3.5 wt% in the Pickering emulsions. Moreover the ordering of the nanoparticles in aqueous suspensions and adsorbed at the oil-water interface is different. The scattering pattern of uncorrelated nanoparticles was taken for the comparison. The later was obtained by taking the form factor of the nanoparticles $\langle F(q)^2 \rangle$ calculated from the model. The experimental scattering patterns of emulsions and those obtained from the model (with PCL-*b*-PEG or PLA-*b*-PEG nanoparticles) were superimposed (Figure 7). The experimental and calculated scattering patterns correspond quite well at large q ($q > 0.02 \text{ \AA}^{-1}$). The good agreement suggests that the nanoparticles were intact since the scattered intensities of unperturbed nanoparticles at their actual concentration matched quite well the scattering of the same nanoparticles in the Pickering emulsion.

For small values of q , the experimental spectrum gave a scattered intensity below the form factor of the nanoparticles. This meant that the micelles were not randomly distributed at the interface, but there was an order of their position that gave rise to a correlation peak and depression of scattered intensity at low angles. The correlation peak was not well-pronounced however. One origin of such weak correlation peak might be the small number of nearest neighbors. Indeed the interface in a two-dimensional space and there are fewer neighbors than in a 3-dimensional space. Another origin might be a disordered arrangement of the micelles at the interface.

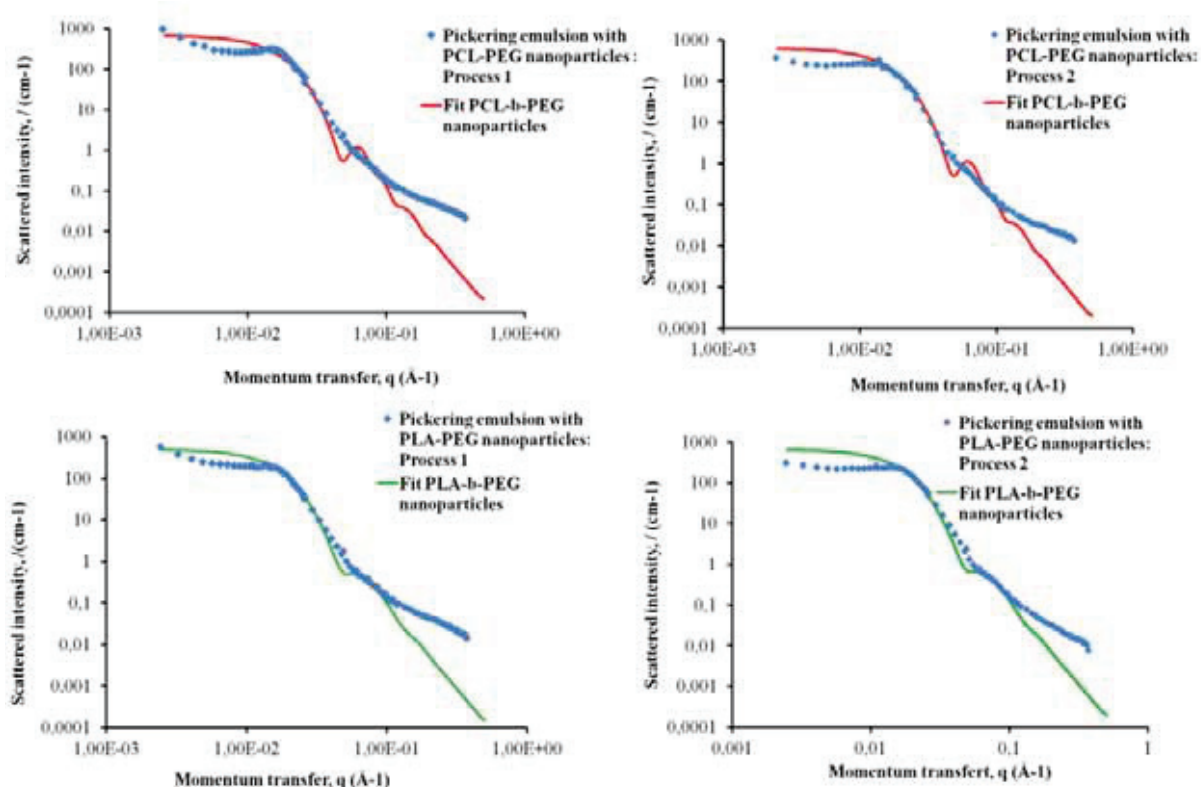


Figure 7. SANS patterns of Pickering emulsions stabilized with either PCL-*b*-PEG or PLA-*b*-PEG nanoparticles. Emulsification was achieved either using process 1 or 2. The red and green overlaid patterns correspond to the model fitting PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG nanoparticles respectively, in aqueous suspensions.

The SANS scattering patterns for nanoparticles and emulsions were not very different. The block copolymers nanoparticles investigated display poly(ethylene glycol) coils at their surfaces. These stabilizing groups may have a significant effect on the interfacial assembly and, therefore, also on the formation and properties of Pickering emulsions. The wetting behavior of the particle is altered by the presence of the stabilizing groups, which affects the equilibrium position of the particles at the interface. Such arguments are reminiscent of the conclusions reached in a theoretical study of adsorption of hydrophobic hairy particles at the oil-water interface. Polymethylmethacrylate (pMMA) particles with polyisobutylene (pIB) grafted to their surface have been reported to stabilize water/oil emulsions because of the repulsive interactions between the poly(isobutylene) group and water (52). The kinetic barrier for assembly at an oil/water interface showed to be an order of magnitude higher than the kinetic barrier for aggregation, which could be due to the following reasons:

- The interaction of pIB with water was more unfavorable than the interpenetration of pIB coils.
- The stabilizing groups can also lead to an activation barrier before interfacial adsorption, analogous to the steric repulsion between two particles.

When using method 1, the rotor-stator device cause high shear necessary to break up the disperse phase and form small emulsion droplets. Simultaneously, particles are assembled at the interface. Particles in the nanoscale range experience less repulsion than those in the micro-scale range (28). This, in addition to van der Waals force lowers the kinetic barrier for aggregation and adsorption at the interface. During the spontaneous emulsification process, the presence of acetone promotes reduction of the interfacial energy leading to oil droplets division and particles adsorption. Moreover, particles aggregation is facilitated because of polyethylene glycol coils being in poor solvent conditions. However an incomplete covering of the interface was observed probably due to the smaller nanoparticle size that should cover the larger interfacial area generated in the second process.

4. Conclusion

In this work, biodegradable Pickering emulsions were formulated using hairy block copolymers nanoparticles. The emulsification took place using two different methods: a conventional rotor-stator process and a one step process where the emulsions were generated by a solvent shifting method. The emulsions obtained displayed good stability over time with some disparities in their properties independently of the polymer used. First, droplets size distribution was tighter with the solvent shifting method. As for classical Pickering emulsions (42,43), the oil-to-nanoparticles ratio influence on droplets size was evidenced for the rotor-stator process but not for the solvent shifting method.

Different mechanisms could be involved in emulsion formation during the spontaneous emulsification process:

- Precipitation of the polymers following local supersaturation, when put in contact with water. Indeed, their insolubility in water forces them to reorganize into direct micelles. Their generation and adsorption at oil-water interface could be attributed to the “nucleation-aggregation mechanism” (49). This aggregation is highly promoted by acetone. The latter is a poor solvent for PEG, favoring the collapse of the polymer chain. Thus, steric forces are reduced and particles attract each other.
- Oil droplets formation and stabilization is due to interconnected scenarios. First, supersaturation of capric/caprylic triglyceride oil when introduced in water, then fragmentation into small oil droplets due not only to interfacial turbulence generated during acetone diffusion (35) but also to interfacial tension lowering in the presence of acetone (53).

The block copolymer particles formed at the same time diffuse rapidly to the interface for stabilization. PEG chains collapse when they are surrounded by acetone, favoring particle-particle aggregation and adsorption at the oil-water interface. The final micron sized droplets results from Oswald ripening making the small droplets disappear in favor of large ones during the evaporation of acetone under reduced pressure.

Particles configuration at the droplets surface was confirmed with TEM of freeze-fractured emulsions. The images showed the presence of small, well separated beads of polymers at the droplet interface that assured stability even at low droplets coverage. SANS patterns of emulsions and overlaid particles patterns provided evidence of particle organization at the oil-in-water interface. These new kind of emulsions made with a low energy process represent a complete original approach in drug delivery. Encapsulation of actives could occur either in the nanoparticles or in the emulsion internal phase. Release of the incorporated drugs had been shown to be totally modulated through polymers selection (54,55). Moreover, the constituting core made of poly (lactide) or polycaprolactone may favor prolonged release of encapsulated actives. The biocompatibility of the involved ingredients makes them safer for health application.

5. References

1. Aveyard R, Binks BP, Clint JH. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2003;100 –102:503-46.
2. Binks BP. Particles as surfactants_ similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2002;7:21-41.
3. Lee RF. Agents Which Promote and Stabilize Water-in-Oil Emulsions. *Spill Science & Technology Bulletin*. mai 1999;5(2):117-126.
4. Dickinson E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*. mars 2012;24(1):4-12.
5. Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*. août 2009;23(6):1473-1482.
6. Frelichowsk J, Bolzinger M-A, Pelletier J, Valour J-P, Chevalier Y. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;371:56-63.
7. Frelichowska J, Bolzinger M-A, Valour J-P, Mouaziz H, Pelletier J, Chevalier Y. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;368:7-15.
8. Pieranski P. Two-Dimensional Interfacial Colloidal Crystals. *Phys. Rev. Lett*. 18 août 1980;45(7):569-572.
9. Levine S, Bowen BD, Partridge SJ. Stabilization of Fine Emulsions By Fine Particles I. Partitioning of Particles Between Continous Phase and Oil-Water Interface. *Colloids and Surfaces*. 1989;38:325-343.

10. Zhang LW, Yu WW, Colvin VL, Monteiro-Riviere NA. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 avr 2008;228(2):200-211.
11. Schneider M, Stracke F, Hansen S, Schaefer UF. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-Endocrinology*. 1 juill 2009;1(4):197-206.
12. Bolzinger M-A, Briçon S, Chevalier Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011;3(5):463-78.
13. Yusoff A, Murray BS. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*. janv 2011;25(1):42-55.
14. Kalashnikova I, Bizot H, Cathala B, Capron I. New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Langmuir*. 21 juin 2011;27(12):7471-7479.
15. Binks BP, Boa AN, Kibble MA, Mackenzie G, Rocher A. Sporopollenin capsules at fluid interfaces: particle-stabilised emulsions and liquid marbles. *Soft Matter*. 5 avr 2011;7(8):4017-4024.
16. Dickinson E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*. mars 2012;24(1):4-12.
17. Ahmed F, Discher DE. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*. 2004;96:37-53.
18. Basile D, Prud'homme C, Bassoulet M-T, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me.PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995;84:493-498.
19. Burt HM, Zhang X, Toleikis P, Embree L, Hunter WL. Development of copolymers of poly(D,L-lactide) and methoxypolyethylene glycol as micellar carriers of paclitaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999;16:161-71.
20. Dong Y, Feng S-S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2004;25:2843-9.
21. Dong Y, Feng S-S. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005;12-19.
22. Kim SY, Lee YM, Kang JS. Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/ poly(D,L-lactide) amphiphilic diblock copolymeric nanospheres: Pharmacokinetic and toxicity studies in rodents. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005;74:581-90.
23. Gou M, Zheng L, Peng X, Men K, Zheng X, Shi Zeng GG, et al. Poly(caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) (PCL-PEG-PCL) nanoparticles for honokiol delivery in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;375:170-6.
24. Meier MAR, Aerts SNH, Staal BBP, Rasa M, Schubert US. PEO-b-PCL Block Copolymers: Synthesis, Detailed Characterization, and Selected Micellar Drug Encapsulation Behavior. *Macromolecules Rapid Communications*. 2005;26:1918-24.

25. Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 5 déc 2005;109(1–3):169-188.
26. Heald CR, Stolnik S, Kujawinski KS, Matteis CD, Garnett MC, Illum L, et al. Poly(lactic acid)-Poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) Nanoparticles: NMR Studies of the Central Solidlike PLA Core and the Liquid PEG Corona. *Langmuir* 2002, 18, 3669-3675. 2002;18:3669-3675.
27. Riley T, Heald CR, Stolnik S, Garnett MC, L. Illum, Davis SS. Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery. *Langmuir*. 2003;19:8428-8435.
28. Stolnik S, Felumb NC, Heald CR, Garnett MC, Illum L, Davis SS. Adsorption behaviour and conformation of selected poly(ethylene oxide) copolymers on the surface of a model colloidal drug carrier. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*. 1997;122:151-159.
29. Meier MAR, Aerts SNH, Staal BBP, Rasa M, Schubert US. PEO-b-PCL Block Copolymers: Synthesis, Detailed Characterization, and Selected Micellar Drug Encapsulation Behavior. *Macromolecules Rapid Communications*. 2005;26:1918-24.
30. Li R, Li X, Xie L, Ding D, Hu Y, Qian X, et al. Preparation and evaluation of PEG–PCL nanoparticles for local tetradrine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;379:158-166.
31. Laredj-Bourezg F, Chevalier Y, Boyron O, Bolzinger M-A. Emulsions stabilized with organic solid particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 5 nov 2012;413:252-259.
32. Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. nov 1999;16(1–4):3-27.
33. Riley T, Stolnik S, Heald CR, Xiong CD, Garnett MC, Illum L, et al. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)–Poly(ethylene glycol) (PLA–PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir*. 1 mai 2001;17(11):3168-3174.
34. Salari JWO, Leermakers FAM, Klumperman B. Pickering Emulsions: Wetting and Colloidal Stability of Hairy Particles—A Self-Consistent Field Theory. *Langmuir*. 7 juin 2011;27(11):6574-6583.
35. H. Fessi and F. Puisieux and J.Ph. Devissaguet and N. Ammoury and S. Benita. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;R1-R4.
36. Stainmesse S, Orecchioni A-M, Nakache E, Puisieux F, Fessi H. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid Polym Sci*. 1 mai 1995;273(5):505-511.
37. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. mars 2007;65(3):259-269.
38. Équipements expérimentaux du Laboratoire Léon Brillouin, LLB, CEN Saclay, F91191 Gif-sur-Yvette, France, (LLB is a CEA-CNRS laboratory), available at: <http://www-llb.cea.fr/index.html>.

39. Cotton J-P. Neutron, X-ray and Light Scattering. Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems. Initial data treatment. North-Holland, Amsterdam; 1991. p. 19-31.
40. Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. nov 1999;16(1-4):3-27.
41. Binks BP, Whitby CP. Silica Particle-Stabilized Emulsions of Silicone Oil and Water: Aspects of Emulsification. *Langmuir*. 2004;20:1130-1137.
42. Frelichowski J, Bolzinger M-A, Chevalier Y. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;351:348-356.
43. Arditty S, Whitby P, Binks BP, Schmitt V, Leal-Calderon F. Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *The European Physical Journal E*. 2003;11:273-281.
44. Binks BP, Kirkland M. Interfacial structure of solid-stabilised emulsions studied by scanning electron microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 juill 2002;4(15):3727-3733.
45. Davies JT, Rideal EK. INTERFACIAL PHENOMENA. 1961 [cité 11 mai 2013]; Disponible sur: <http://trid.trb.org/view.aspx?id=521514>
46. Ruschak KJ, Miller CA. Spontaneous Emulsification in Ternary Systems with Mass Transfer. *Ind. Eng. Chem. Fund.* 1 nov 1972;11(4):534-540.
47. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid and Polymer Science*. 1997;275(7):640-7.
48. Vitale SA, Katz JL. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: « The Ouzo Effect ». *Langmuir*. 1 mai 2003;19(10):4105-4110.
49. Aubry J, Ganachaud F, Cohen Addad J-P, Cabane B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting:1. Boundaries. *Langmuir*. 2009;25(4):1970-1979.
50. Aragón SR, Pecora R. Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *The Journal of Chemical Physics*. 15 mars 1976;64(6):2395-2404.
51. Hayter J, Degiorgio V, Corti M. Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions. *Proceedings of the International School of Physics*, edited by Corti and De Giorgio, Elsevier, Amsterdam. 1985;59.
52. Salari JWO, Leermakers FAM, Klumperman B. Pickering Emulsions: Wetting and Colloidal Stability of Hairy Particles—A Self-Consistent Field Theory. *Langmuir*. 7 juin 2011;27(11):6574-6583.
53. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*. août 2004;280(1-2):241-251.

54. Laredj-Bourezg F, Bolzinger M -A, Pelletier J, Rovere M -R, Smatti B, Valour J-P, et al. Skin delivery by block copolymer micelles (block copolymer nanoparticles). *Journal of Controlled Release*. Submitted;
55. Laredj-Bourezg F, Bolzinger M -B, Pelletier J -P, Rovere M -R, Smatti B, Chevalier Y. Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles control topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Submitted.

Chapitre 8

Application topique des nanoparticules de PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG

8.1. Introduction

L'administration de substances actives par voie topique a pour but soit un traitement local des affections de la peau ou un ciblage systémique à une vitesse lente et prolongée dans le temps au moyen d'une administration transdermique. Dans ce dernier cas, l'actif doit atteindre le derme richement vascularisé. Les particules organiques à base de polyesters ont été utilisées depuis longtemps pour la vectorisation de médicaments et sont reconnus pour assurer une libération contrôlée des actifs encapsulés (Bolzinger et al. 2012).

Les particules de copolymères à blocs offrent l'avantage d'être biodégradables et biocompatibles avec la possibilité de solubiliser des actifs très hydrophobes.

Leur application à l'administration d'actifs par voie orale ou parentérale ont été revus récemment (Torchilin 2007; Gaucher et al. 2005).

L'utilisation de nanoparticules de copolymères à blocs comme supports pour l'absorption cutanée est tout à fait nouveau. Le premier rapport portant sur l'administration transdermique par des nanoparticules de copolymères à blocs a été fait en utilisant un copolymère du type polycaprolactone-bloc-poly (éthylène glycol) formant des nanoparticules encapsulant un vasodilatateur : le Minoxidil (Shim et al. 2004). Il a été montré que la libération du Minoxidil était dépendante de la taille des nanoparticules, ce qui suggère une grande contribution de la voie folliculaire à l'absorption par la peau. Bachhav et al. (2011) ont récemment montré l'amélioration de la pénétration de molécules antifongiques par des micelles de poly (dihexyl lactide)-bloc-poly (éthylène glycol) comparé à la forme émulsion commercialisée Pevaryl[®]. Des vésicules de copolymères appelés Polymersomes ont aussi été évaluées pour la l'application cutanée de plusieurs actifs (Rastogi, Anand, et Koul 2009).

L'utilisation de nanoparticules de copolymères à blocs pour la voie cutanée, apparaît très attractive grâce à leur grand pouvoir solubilisant des molécules très hydrophobes. Contrairement aux tensioactifs classiques, connus pour leur pouvoir détergent et promoteur d'absorption (Ashton et al. 1992; Sarpotdar et Zatz 1986), l'absence de molécules de copolymères libres en fait des véhicules moins enclins à causer des irritations cutanées (Cappel et Kreuter 1991; Ridout et al. 1991; Ashton et al. 1992). D'autre part, la petite taille des nanoparticules de copolymère bloc pourrait apporter une meilleure absorption cutanée de médicaments hydrophobes par rapport aux nanoparticules de polymères classiques. En effet, la taille moyenne des nanoparticules de copolymère à blocs est de 30-50 nm, tandis que la gamme des tailles de nanoparticules de polymères est de 100-200 nm (Yang et Alexandridis 2000).

Leur structure cœur hydrophobe- écorce hydrophile (Allen, Maysinger, et Eisenberg 1999; Riley et al. 2003) en fait des vecteurs adaptés pour une large gamme de principes actifs.

Le travail présenté dans ce chapitre aborde l'absorption cutanée de rétinol utilisé comme molécule lipophile modèle et encapsulé au sein de nanoparticules de PCL-*b*-PEG ou de PLA-*b*-PEG. Le but de cette étude était de mettre en évidence l'origine de l'absorption cutanée élevée décrite par quelques travaux dans la littérature (Bachhav et al. 2011; Shim et al. 2004), mais aussi de la relier à la nature et aux propriétés physico-chimiques des segments hydrophobes constituant les copolymères en question.

Les deux copolymères étudiés diffèrent par la longueur et la structure chimique de leurs parties hydrophobes. Le PLA est un polymère vitreux avec une température de transition vitreuse élevée, alors que le PCL est un polymère semi-cristallin avec une température de transition vitreuse de -60°C. ce dernier a été démontré former des pseudo-micelles à cœur fondu à température ambiante (Laredj-Bourezg et al. 2012).

L'influence des caractéristiques des deux polymères sur la libération et l'absorption cutanée du rétinol est investiguée au bout de 24h d'exposition, en utilisant des cellules de diffusion statique (cellules de Franz, Figure 1 ; Franz, 1975, 1978). La peau utilisée est de la peau de porc (OECD, 2004a ; Bronaugh et Maibach, 1999). Les suspensions de copolymères à blocs ont été comparée à une préparation de polysorbate 80 ainsi qu'une solution huileuse de Rétinol, testées dans les mêmes conditions.

8.2. Partie expérimentale

La partie expérimentale est présentée sous la forme d'un article bientôt soumis pour publication à *Journal of Controlled release*.

Skin delivery by block copolymer micelles (block copolymer nanoparticles)

Faiza Laredj-Bourezg¹, Marie-Alexandrine Bolzinger^{1,*}, Jocelyne Pelletier¹, Jean-Pierre Valour¹, Marie-Rose Rovère², Batoule Smatti³, Yves Chevalier¹

¹ Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, CNRS UMR 5007, 43 bd 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France.

² Université Lyon 1, Laboratoire des Substituts Cutanés, CNRS FRE 3310, Hôpital Édouard Herriot, Lyon, France.

³ Université Lyon 1, Centre commun de Quantimétrie, Lyon, France.

*: corresponding author

Abstract

Block copolymer nanoparticles often referred to as “block copolymer micelles” have been assessed as carriers for delivery of hydrophobic drug into skin. Such nanoparticle carriers are based on organic biocompatible and biodegradable materials that can be loaded with hydrophobic drugs. The purpose was to disclose the main physicochemical characteristics of block copolymer nanoparticles that control skin absorption. Two different types of such nanoparticles have been investigated: poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) copolymer (PLA-*b*-PEG) nanoparticles that have a solid hydrophobic core made of glassy poly(D,L-lactide), and poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene glycol) copolymer (PCL-*b*-PEG) nanoparticles having a liquid core of polycaprolactone. Skin absorption of *all-trans* retinol as a model hydrophobic drug has been measured *in vitro* in excised porcine skin in Franz diffusion cells. Retinol penetration in skin layers showed a large accumulation in *stratum corneum* from both the PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG loaded nanoparticles compared to Polysorbate 80 surfactant micelles and oil solution control sample. Additionally, skin absorption from PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles differed by one order of magnitude although their sizes (65 nm) and external surface (water-swollen PEG layer) were identical. Storage of retinol in the *stratum corneum* was 20 and 80 times higher from PLA-*b*-PEG nanoparticles than from Polysorbate 80 surfactant micelles and oil solution respectively. Skin absorption from PCL-*b*-PEG nanoparticles showed a lesser enhancement than PLA-*b*-PEG. Skin penetration of the Nile Red fluorescent probe was also followed by means of fluorescence microscopy experiments on histological skin sections, providing a non-destructive picture of the storage inside *stratum corneum*, *epidermis* and *dermis*. The origin of the huge enhancement of skin absorption from PLA-*b*-PEG nanoparticles is discussed with the help of detailed characterizations of the structure and physicochemical properties of the block copolymer nanoparticles by means of dynamic light scattering, cryo-TEM and small angle neutron scattering experiments. The physical state of their core (solid or liquid) was measured from ¹H NMR experiments and the solubilizing properties of the nanoparticle cores were assessed from their Hildebrand solubility parameters. It appears as an outcome that the ability of the nanoparticle core for solubilization of the drug is the parameter of best relevance regarding the skin absorption.

Key words: Skin delivery; Cutaneous absorption; Block copolymer; Nanoparticles

Introduction

Drug delivery to skin aims at either the treatment of skin diseases or at reaching the systemic circulation at a slow rate and prolonged time by means of transdermal administration. In the later case, the drug should reach the dermis layer that is irrigated by the systemic circulation. In general, the purpose of drug carriers is targeting the drugs to their site of activity. Organic particles made of polyesters have been used since a long time for drug delivery and recognized to modulate skin delivery rates and location, allowing a controlled release of drugs. Either deep skin penetration or accumulation in the *stratum corneum* (SC) and follicular appendages can be favored depending on the type of drug carrier [1,2,3,4,5,6,7]. Biocompatible and biodegradable polymer particles are attractive because they can be loaded with hydrophobic drugs and they are recognized as safe for their use as drug carriers in the body. It has been recognized since a long time that the size of such polymer particles was an essential parameter that controlled skin delivery [6,8,9]. Small size gives penetration because nanoparticle may penetrate as such, but also because the area of contact with external medium causes a faster release from the particle suspension to the skin. Particle size is not the sole relevant parameter regarding skin absorption however [10].

Block copolymer nanoparticles are such polymer nanoparticles that appeared attractive regarding drug delivery because of their very small size. Their application to drug delivery by means of oral or parenteral administration routes have been reviewed recently [11,12,13]. The utilization of block copolymer nanoparticles as carriers for skin absorption is quite new. The first report dealing with transdermal delivery by block copolymer nanoparticles was an investigation of polycaprolactone-*block*-poly(ethylene glycol) copolymer nanoparticles loaded with the antihypertensive vasodilator mixnoxidil by Shim et al. in 2004 [14]. It was shown that skin delivery to hairy guinea pig skin was larger than to hairless skin, and was dependent on nanoparticle size, suggesting a large contribution of the follicular pathway to the skin absorption. The high potentials of block copolymer nanoparticles for the skin delivery of dermatological drugs have been demonstrated in 2011 by Bachhav et al. [15]. They showed the improved skin delivery of antifungal drugs by poly(dihexyl lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) compared to the commercial o/w emulsion Pevaryl[®] formulation. Block copolymer liposomes called Polymerosomes have also been assessed for skin delivery [16].

Block copolymer nanoparticles, often called “block copolymer micelles”, are such polymer particles of high potential because their small size in the range 20-100 nm might allows an improved drug absorption into the skin. They are made of amphiphilic block copolymers that are reminiscent of surfactant molecules because they have hydrophilic and hydrophobic parts well-separated in the chemical structure. Their self-assemblies as nanoparticles have the same core-shell structure as the classical surfactant micelles: an internal core made of the hydrophobic blocks is surrounded by a shell made of the hydrophilic blocks swollen by water [12,17,18]. This is the reason why nanoparticles made of aggregated amphiphilic block copolymers have often been called as “block copolymer micelles”. There are actually definite differences between block copolymer micelles and classical micelles made from conventional surfactants. Firstly, strongly amphiphilic block copolymers are not soluble in water whereas conventional micelle-forming surfactants are soluble in water. One first consequence is that there is no *cmc* (critical micelle concentration); or the *cmc* is so low that it cannot be measured [17]. The solutions do not contain any free block copolymer molecule. As the second important consequence, the formation of block copolymer micelles is not spontaneous. A preparation process is necessary, which most often involve a solvent shifting method from an organic solution to an aqueous medium. On the contrary, it is well-known that water-soluble surfactant spontaneously self-assemble as micelles when their concentration is higher than the *cmc*. On this basis, the behavior of block copolymer micelles is closer to that of

polymer nanoparticles than that of surfactant micelles. In order to discard any confusion, the term “block copolymer micelles” will no longer be used in the paper and the term “block copolymer nanoparticles” will be preferred. Some block copolymers that are less amphiphilic such as the widely used poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) block copolymers show a surfactant-like behavior with non-vanishing *cmc* values and dynamic partition equilibrium of macromolecules between micelles and their free state in water [19]; these block copolymer micelles are out of the topic of the present paper.

Block copolymer nanoparticles appear attractive for drug delivery because such micelle-like nanoparticles are able to solubilize hydrophobic drugs and transfer them into the skin; but there are no free block copolymer molecules that might penetrate the skin as in the case of classical surfactant micelles. Classical surfactants are known to cause disorganization of the *stratum corneum* (SC) because of their detergent action and because of their ability to penetrate the SC [20,21,22,23,24,25]. Both phenomena known as “penetration enhancer effect” [26,27] cause an alteration of the barrier function of the SC. Upon the detergent action of surfactants, the less polar fraction of the lipids in the SC is washed out and the lipidic barrier of SC is weakened. Upon their penetration in skin, some surfactants mix with the SC lipids and disorganize the crystalline structure of the intercorneocyte medium, resulting in increased permeability for drug molecules [23]. Irritancy is a major issue regarding utilization of surfactants in formulations exposed to the skin surface because of the detergent action that causes water-loss [28], and because of the intrinsic irritancy behavior of surfactant that manifests in case of their deep penetration in the skin [24]. On another hand, the small size of block copolymer nanoparticles might bring about improved skin absorption of hydrophobic drugs compared to classical polymer nanoparticles. Indeed the typical size of block copolymer nanoparticles is 30-50 nm [12,17,18] whereas the size-range of polymer nanoparticles is 100-200 nm [29].

Nanoparticles having a size lower than 100 nm are suspected being hazardous regarding toxicity concerns because their small size allows them to cross biological barriers and penetrate vitally important organs [30,31]. There is no such health concern with block copolymer nanoparticles because they are biodegradable [32]. In particular poly(lactic acid) and polycaprolactone are major biodegradable polyesters used as materials in pharmaceutical formulation [33]. Neither the block copolymer nor their degradation products are toxic. Such block copolymer nanoparticles are also biocompatible because of the PEG hydrophilic shell that acts as a protective layer against the immune system [34,35].

The present study deals with the assessment of skin absorption of hydrophobic drugs loaded in block copolymer nanoparticles. Considering the recent disclosure of the enhanced penetration of antifungal drugs loaded in block copolymer nanoparticles [15], together with the present observation of a large dependence of skin delivery rates from different types of block copolymer nanoparticles, this study was aimed at investigating the origin of the enhanced skin absorption of hydrophobic drugs and the dependence of block copolymer type. Block copolymer nanoparticles based on either poly(lactic acid) (PLA) or polycaprolactone (PCL) were investigated. The chemical structures of the block copolymers are poly(D,L-lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) PLA-*b*-PEG and poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene glycol) PCL-*b*-PEG (Figure 1). The main difference between PLA and PCL is their physical state since PLA is a solid glassy material whereas PCL is a soft amorphous material (molten polymer) at room temperature. Retinol (vitamin A) was selected as the model hydrophobic drug for the work because the skin absorption behavior of retinol has been extensively investigated, making of this molecule a kind of a standard hydrophobic drug in skin delivery

studies. Supplementary experiments have been performed with the Nile Red dye which was well-suited for monitoring of skin absorption by means of fluorescence confocal microscopy.

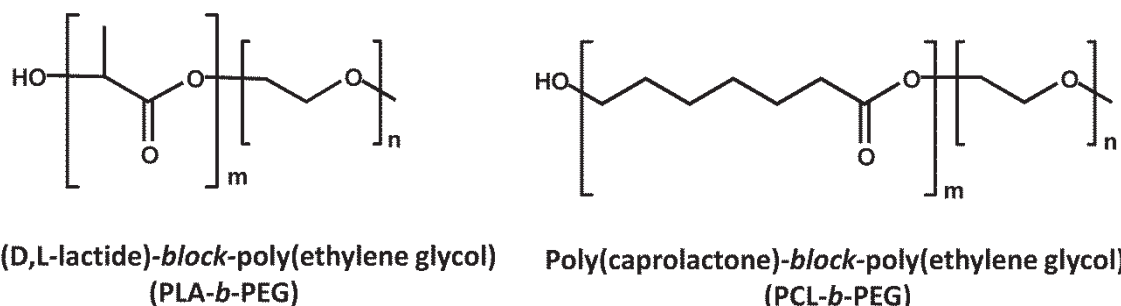


Figure 1. Chemical structure of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymers with polymerization degrees **m** for the hydrophobic (PLA or PCL) block and **n** for the hydrophilic PEG block.

The paper firstly reports the manufacturing and properties of concentrated suspensions of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles. The morphology and properties of such nanoparticles are described in details in order to collect physicochemical data useful in a discussion of the origin of the differences in skin absorption behavior. Dermopharmaceutical studies using the Franz cell diffusion method were conducted for the two model drugs (*all-trans* retinol and Nile Red) over 24 h exposure to evaluate the influence of the type of block copolymer nanoparticles on skin absorption behavior. Finally, a general discussion of the data is focused on the origin of the differences of skin absorption from PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

D,L-Lactide (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione), ϵ -caprolactone, stannous 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) of molar mass $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, *all-trans* retinol, Nile Red and phosphate buffer pH 7.4 were purchased from Sigma-Aldrich. ϵ -Caprolactone was purified by vacuum distillation over calcium hydride (CaH_2 , Acros Organics). D,L-Lactide was recrystallized in ethyl acetate (Sigma-Aldrich). mPEG was dried by azeotropic distillation of toluene (anhydrous toluene, Sigma-Aldrich). Acetone (Laurylab) and dichloromethane (Acros Organics) were used as received. Polysorbate 80 surfactant (Montanox[®] 80) was from Seppic (France), medium-chain triglyceride (caprylic/capric triglyceride Miglyol 812N, MCT) was from Sasol, and butyl hydroxy toluene (BHT) was from Clariant. Analytical grade methanol was purchased from Carlo Erba (Italy). Deionized water of $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity was used throughout the work.

2.2. Synthesis of the PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG Diblock Copolymers

PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG were synthesized by ring-opening polymerization of D,L-lactide or ϵ -caprolactone with mPEG as initiator and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ as catalyst in dry toluene solution [36,37,38,39]. The synthesis process of PCL-*b*-PEG has been previously described [40] and that of PLA-*b*-PEG is very similar. The mean degrees of polymerization of the PLA and PCL blocks were determined by ^1H NMR and Size Exclusion Chromatography (SEC) as shown in Table 1. The polymerization degree of the PEG block was the same as the starting MPEG initiator ($5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), that is, **n** = 113. The polymerization degrees of the PLA and PCL

blocks where $m = 140$ and 65 respectively. Those block copolymers were not soluble in water.

Table 1. Characteristics of the PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG diblock copolymers: number-average molar mass (M_n) and weight-average molar mass (M_w) of the PLA and PCL blocks, polydispersity index.

| Diblock copolymer | Theoretical $M_n^{(a)}$ | M_n from $^1\text{H NMR}^{(b)}$ | M_n from SEC ^(c) | M_w from SEC ^(c) | Polydispersity index, $PdI = M_w/M_n$ |
|--------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| PLA- <i>b</i> -PEG | 15,080 | 21,128 | 18,234 | 19,055 | 1.045 |
| PCL- <i>b</i> -PEG | 12,410 | 12,992 | 11,180 | 12,522 | 1.12 |

^a Theoretical number-average molar mass as calculated according to the monomer/MPEG mole ratio fed in the polymerization vessel.

^b The molar mass as calculated from the ratio of integrals of the $^1\text{H NMR}$ resonance peaks of the PLA block at 5.1 ppm, the PCL block at 4.07 ppm and of the PEG block at 3.65 ppm.

^c Number-average and weight-average molar masses as measured by SEC analysis using combined LS and RI detection.

2.3. Preparation of the Block Copolymer Nanoparticles

The aqueous suspensions of block copolymer nanoparticles were prepared using the spontaneous emulsification process [41,42]. This method was modified by inverting the relative amounts of acetone and water, resulting in concentrated dispersions (7 %) of block copolymer nanoparticles at the end of the preparation process [40]. Retinol and BHT loading inside nanoparticles was simply achieved by dissolving it in acetone before mixing with water. The BHT antioxidant was added as a protection of retinol against oxidation. A typical recipe is as follows: a solution of 1.05 g of PLA-*b*-PEO (or PCL-*b*-PEO) in 50 mL of acetone was added drop wise in 15 mL of water under gentle stirring. A slightly milky suspension formed upon precipitation of the block copolymer as nanoparticles. The acetone was then slowly evaporated under reduced pressure, yielding an aqueous suspension of block copolymer nanoparticles of concentration $0.07 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (7 %).

Preparation of loaded Polysorbate 80 micelles was a simple dissolution of all ingredients in water. The chemical compositions of samples used in skin absorption experiments are given in Table 2.

Table 2. Composition of the investigated formulations (wt%): PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG nanoparticles, Polysorbate 80 micellar solution loaded with retinol, and retinol solution in MCT oil.

| Compositions of formulations (wt%) | PLA- <i>b</i> -PEG or PCL- <i>b</i> -PEG block copolymer nanoparticles | Polysorbate 80 solution | Oil solution |
|--|--|-------------------------|--------------|
| <i>All-trans</i> retinol | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| BHT | 0.5 | 0.5 | - |
| PLA- <i>b</i> -PEG or PCL- <i>b</i> -PEG block copolymer | 7 | - | - |
| Polysorbate 80 | - | 6 | - |
| Water | 92 | 93 | - |
| Medium chain triglyceride oil | - | - | 99.5 |

2.4. Particle Size Measurements

The average size and polydispersity index of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles dispersed in water were measured by means of dynamic light scattering using a NanoZS[®] instrument (Malvern, UK). The suspensions were diluted with water till the count rate of the detector reached 200 kHz. The *z*-average diameter of the nanoparticles was calculated using the methods of the cumulants, taking 0.887 mPa.s for the viscosity of water at 25°C.

2.5. Small-Angle Neutron Scattering (SANS)

SANS measurements were performed on the PACE spectrometer at the Laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEN Saclay, France) [43]. The samples were contained in quartz cuvettes of 1 mm optical path, giving transmissions in the 80% range that ensure negligible multiple scattering. Scattered intensity was collected on a detector consisting of 30 concentric ring detection cells, giving the standard radially averaged scattering pattern of isotropic samples as a function of the momentum transfer (modulus of the scattering vector) $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ (momentum transfer) in the range $2.4 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$. Data processing was made according to standard procedures available at the LLB as software packages [44].

Aqueous suspensions of block copolymer nanoparticles were prepared with the same chemical composition as used for percutaneous penetration experiments, but normal water was substituted by deuterated water.

2.6. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) [45]

Nanoparticles of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymers were imaged at the Centre Technologique des Microstructures (CTμ) technical facility of the University of Lyon [46] using Cryo-TEM. Samples were cryo-fixed utilizing a custom-built chamber referred to as the “controlled environment vitrification system” [47]. The isolated chamber was humidified to near saturation of water before the sample was introduced in order to prevent any water evaporation from the sample. A 5 μL droplet of aqueous suspension was deposited on a Holey Carbon Film 300 mesh (Agar Scientific) microperforated TEM grid at room temperature. It

was then soaked by a filter paper, resulting in the formation of a thin liquid film of 100-300 nm thickness freely spanning across the micropores of the carbon-coated lacelike polymer layer supported by a metal grid. After a minimum 30 s delay, the sample grid assembly was rapidly quenched in liquid ethane at its boiling temperature (90 K), resulting in solidification of water in its glassy state. The glassy specimen was kept under liquid nitrogen until it was loaded into a Gatan CT3500 cryogenic sample holder inserted in the TEM chamber. Images were taken using a transmission electron microscope Philips CM120 operating at 80 kV acceleration.

2.8. ^1H NMR

^1H NMR spectra were recorded at the NMR technical facility “Centre Commun de RMN” of the University of Lyon [48] on the liquid samples in 5 mm diameter NMR tubes with a standard liquid-state high resolution Bruker DRX 300 NMR spectrometer operating at 300 MHz. Either deuterated chloroform (CDCl_3) or deuterated water (D_2O) were used as solvents. Aqueous suspensions of block copolymer nanoparticles in D_2O were prepared according to the same nanoprecipitation process but using D_2O instead of H_2O . Chemical shifts are given in ppm from tetramethylsilane.

2.8. Fluorescence Confocal Microscopy

Fluorescence microscopic images of Nile Red dye distribution were recorded on histological sections of skin using a Leica TCS-SP2 spectral confocal microscope at the “Centre Commun de Quantimétrie” technical facility of the University of Lyon [49]. This technique had become well-established to observe the drug distribution fluorescence in the *stratum corneum*, viable *epidermis*, *dermis*, and hair follicles [50]. All the formulations tested contained 0.05% of Nile Red in place of retinol. After exposure to Nile Red-loaded micelles on the skin surface for 24 h, the applied sample was carefully removed with a cotton pad and the skin was rinsed with PBS buffer. Tissues were embedded in a resin frozen at -20°C . 3 slices of 5 μm thickness were cut at 3 different areas with a cryocut going from *dermis* to *stratum corneum* side (vertical slices). Slices were hydrated in PBS before observation, a drop of fluorescent mounting medium with a cover-glass were applied on top, and both classical reflection and fluorescence microscopy pictures of skin slices were recorded. Upon excitation at 532 nm with laser diode, the emission was recorded between 589-708 nm using a Leica 20X/0.70 HLX PL APO objective. The images from the two techniques were superimposed to obtain the information of the Nile Red distribution in the different skin layers. The relative accumulation of Nile Red could be determined semi-quantitatively on the pictures from the fluorescence intensity in skin layers.

2.9. Skin Absorption Studies

Full-thickness skins of female or male pigs (mean \pm sem = 1.2 ± 0.05 mm) were obtained from young animals sacrificed at the Laboratoire de Physiologie of the University of Lyon. The hairs were cut with an electric cutter. The skin was then cleaned up with tap water and excised, the subcutaneous fatty tissues were carefully removed and the skin pieces were stored flat at -20°C until use. The thickness of each skin piece was measured with a micrometer (Mitutoyo). Transepidermal water loss (TEWL) measurements were performed in triplicate on skin pieces using a Tewameter TM300 (Courage - Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany) just before performing the skin absorption studies. The skin samples with TEWL value higher than $15 \text{ gm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ were discarded following the OECD guidelines [51]. The skin pieces were mounted in two-chamber glassware Franz-type static diffusion cells of effective area 2.54 cm^2 . The 10 mL receiver chamber was filled PBS buffer pH 7.4 containing

1.5% Brij[®]98 and 0.5% BHT. 1 g of freshly prepared formulation (Table 2) was spread uniformly on the skin surface. The study was carried out under occlusive conditions for 24 h. All experiments were undertaken in the dark to avoid degradation of retinol under light exposure. At the end of the study the receptor fluid was removed filtered and analyzed by HPLC. Franz cells were dismantled; the skin surface was washed with 10 mL of a fresh receptor fluid solution; then skin stripping of the *stratum corneum* was performed in one step using acrylic adhesive (Loctite[®] super glue 3, Henkel, Germany). The viable epidermis and dermis were separated by heat treatment in water at 60 °C for 45 s. The epidermis and dermis were cut into pieces with a scalpel, retinol was extracted once with methanol containing 0.5 wt% BHT under ultrasounds in ice bath for 20 min, and samples were filtered and analyzed by HPLC.

The mean and standard error of the mean (sem) of $n = 6$ determinations were calculated. Statistical comparisons were made using the Student's *t*-test (two-sample assuming equal variances) and analysis of variance (ANOVA, single factor) with the level of significance at $p \leq 0.05$.

2.10. HPLC Titration of Retinol

The collected samples were analyzed for retinol using liquid chromatography with a reverse phase column. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 injector, a Waters 600 pump, a reverse phase column XTerra[®]MS C18 (3.9 mm×150 mm, 5 μm) and a Waters 2996 photodiode array UV detector working at 325 nm wavelength. The elution with methanol/water (85:15) solvent at 1.4 mL.min⁻¹ flow rate and 30 °C gave a retention time of 6 min for retinol. Injection volume was 20 μL. The calibration curve for quantitative analysis was linear up to 40 μg.mL⁻¹ and the detection limit for retinol was 20 pg.

3. Results and discussion

3.1. Properties of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles

3.1.1. Preparation of stabilizing nanoparticles made of block copolymer nanoparticles

The nanoparticles of either PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG block copolymers were prepared using the spontaneous emulsification process modified in such a way to produce concentrated particles suspensions [40]. In the classical nanoprecipitation process used for the preparation of polymer nanoparticles [41,42], a fairly dilute solution of polymer in acetone is slowly mixed with a large amount of water containing surfactant (the amount of aqueous phase is at least twice that of acetone). Such a method allows the preparation of dilute suspensions of nanoparticles only; a typical concentration of nanoparticles is 0.2 wt%. The concentration can hardly be increased to ~1 wt% upon increasing the concentration of polymer in the acetone solution; to large concentration of polymer results in the formation of large lumps of polymer of size larger of 1 μm. In the present case where the nanoparticles are self-stabilized by the PEG blocks of the copolymers, the amount of water in which the acetone solution was mixed could be reduced; so that a larger final concentration of nanoparticles was reached after acetone has been evaporated. In a typical recipe, 50 mL of block copolymer solution in acetone was mixed with 15 mL of water. Slightly turbid homogeneous suspensions were obtained upon mixing and at the end of the preparation after evaporation of acetone. Neither creaming nor sedimentation was observed because of the very small size of the nanoparticles.

The so-called block copolymer micelles formed with water insoluble block copolymers are better nanoparticles than micelles. Unlike soluble surfactants that spontaneously self-assemble as micelles in water, block copolymer micelles do not self-assemble spontaneously; they require implementation of a preparation process by mean of dialysis method or nanoprecipitation process. There is no residual block copolymer molecule in water because the solubility is vanishingly small. The structure is of the core-shell type [12,17,18]. The block copolymer molecules are fully embedded in the nanoparticles where the hydrophobic part consisting of either PCL or PLA forms the micellar core. The latter is surrounded by a hydrophilic shell made of the PEG chains. Loading with the hydrophobic drug (*all-trans* retinol in the present case) was easily ensured by addition of the drug in the starting acetone solution. The loaded block copolymer nanoparticles contained the full retinol content that has been added. Owing to the very low solubility of retinol in water, the loading efficiency was close to 100%. For micelles at 7 wt% concentration loaded with retinol at 0.5 wt%, the loading rate defined as the retinol/copolymer mass ratio was 7 %. Therefore, the loading efficiency defined as the maximum loading rate was higher than 7%. Such high loading rates could not be reached in every instance. As example, loading efficiency of indomethacin ($\text{Log}P = 4.27$) in PCL-*b*-PEG nanoparticles was quite high (~40%) [52,53], whereas low loading only could be achieved with the polar drug doxorubicin ($\text{Log}P = 0.5$) in PLGA-*b*-PEG nanoparticles (0.51%) [54]; higher loading of doxorubicin could be achieved with a conjugate prepared by grafting doxorubicin to the block copolymer [54].

3.1.2. Structural characterization of the nanoparticles

The size of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering. The particle size distribution normalized in scattered intensity units was calculated by inverse Laplace transform of the auto-correlation function of the scattered light by the CONTIN algorithm [55]. A monomodal narrow distribution was measured in every instance, so that the z-average diameter coming from the cumulants analysis method was retained as a final parameter. Such mean size is the hydrodynamic diameter which corresponds to the diameter of the nanoparticle with its PEG external shell swollen by water. The hydrodynamic diameters of the PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles 50 nm and 32 nm were respectively. The narrow particle size distribution resulted in small values of the polydispersity index given by the cumulants analysis ($PdI = 0.10$ to 0.15). Repeated particle size measurements did not vary over long storage durations, showing the very good stability of such suspensions of nanoparticles. The sizes of the block copolymer nanoparticles loaded with retinol were larger than the blank nanoparticles. For micelles at 7 wt% concentration loaded with retinol at 0.5 wt% (loading rate = retinol/copolymer = 7 %), the hydrodynamic diameters were 66 nm and 65 nm for PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles respectively. The size distribution was broader than for the blank nanoparticles since the PdI reached 0.15 to 0.3.

Cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) images of 1% suspensions of nanoparticles showed a collection of well-separated particles, with no aggregates (Figure 2). The spatial arrangement of the nanoparticles looked well-ordered, close to periodic. It is presumed that strong repulsions maintained them at a large separation distance from each other in the aqueous suspension at room temperature. The well-separated nanoparticles observed by cryo-TEM in glassy water probably were in the same dispersed state in the liquid medium at room temperature since the sample preparation for TEM observation was just a vitrification by a fast quench to low temperature. It is unlikely that the sample preparation modified the structure since vitrification of water immobilized the water molecules in the same disordered state as in the liquid. Failure of the quench might cause either aggregation or

phase separation phenomena; it could not cause the peptization of nanoparticles into a well-ordered arrangement. The mean particle sizes measured on the pictures were in the ranges of 30 nm and 50 nm for PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG nanoparticles respectively, in agreement with the hydrodynamic diameters measured by dynamic light scattering. Indeed, cryo-TEM does not collapse the nanoparticles since it keeps the full water content of the samples.

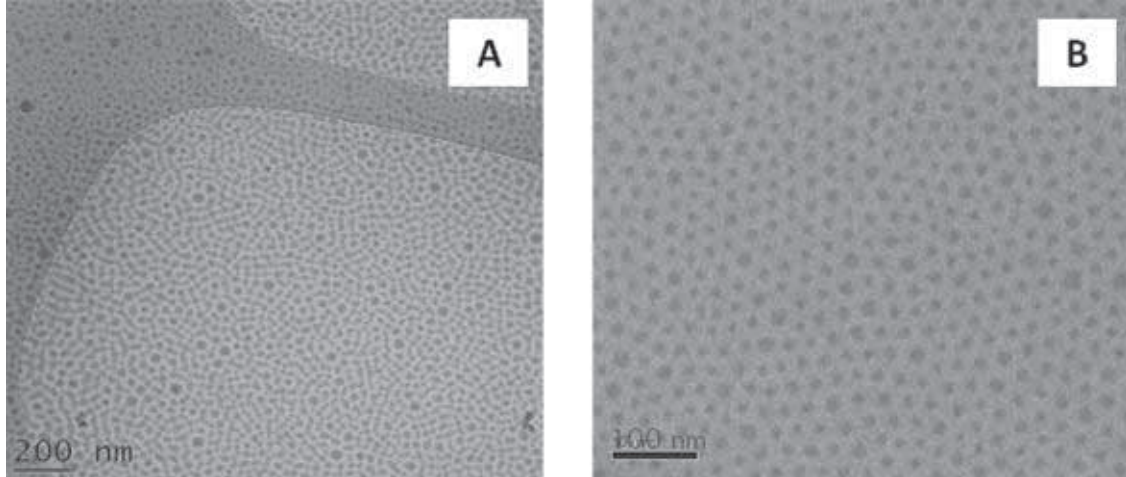


Figure 2. Cryo-TEM images of the PLA-*b*-PEG (A) and PCL-*b*-PEG (B) nanoparticles.

The structure of block copolymer nanoparticles has been investigated by means of small-angle neutron scattering (SANS) experiments [56]. Aqueous suspensions of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles were prepared in deuterated water in order to obtain a favorable contrast between the protonated nanoparticles and the deuterated solvent. The concentration was 6.4 wt% in D₂O so that the volume fraction of nanoparticles was corresponding to a concentration of 7 wt% in H₂O as in other experiments of the present work. The scattering pattern was characteristic of a concentrated suspension of particles [56,57]. The scattered intensity decayed as a q^{-4} power law at large angles ($q > 0.03 \text{ \AA}^{-1}$) corresponding to Porod's law, which indicated a sharp interface between the nanoparticles core and the aqueous medium. The peak of scattered intensity observed at $q \approx 0.016 \text{ \AA}^{-1}$ came from a spatial ordering of nanoparticles because the suspensions were fairly concentrated. Such peak indicated that the block copolymer nanoparticles were well-separated because of strong repulsions between particles were operating. The origin of the repulsions between nanoparticles is the hydrophilic PEG layer surrounding the polyester core that caused steric stabilization of the nanoparticles. The scattering pattern was modeled with spherical particles having a core-shell internal structure. The core was made of the polyester (PLA or PCL) and the shell contained the PEG blocks swollen by water.

The scattered intensity is given by the scattered amplitude of isolated particles $F(q)$ averaged over the size distribution and the structure factor $S(q)$ that expresses the ordering of the particles as [58].

$$I(q) = [\langle F(q)^2 \rangle + \langle F(q) \rangle^2 (S(q) - 1)] \quad (1)$$

Thus the scattered intensity of particles was calculated from the scattering length densities of PLA ($1.734 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$), PCL ($0.760 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$), PEG ($0.673 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$) and D₂O ($6.33 \times 10^{-10} \text{ cm}^{-2}$) for core-shell particles with a Schulz size distribution [58,59]. A hard sphere interaction potential was taken for the calculation of $S(q)$; the volume fraction of hard spheres

was that of the swollen nanoparticles including the block copolymers and the water molecules that swelled the PEG blocks.

There were only three parameters in the model that was fitted to the experimental data: the number of block copolymer molecules per nanoparticle, the hydration number (number of water molecules per PEG block), and the width of the size distribution. All other structural parameters (mean radii of the core and shell R_1 and R_2) can be calculated from these three basic parameters according to simple geometrical considerations. The best fit to the experimental data (Figure 3) was achieved with the parameters given in Table 3. The slight departure of the model from the experimental data observed at $\sim 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ corresponded to the first minimum of the Bessel function entering the equation of the scattering amplitude. This minimum at $qR_1 = 4.5$ was not visible in the experimental data because of experimental smearing effects.

The good fit to the data showed that the structure of the block copolymer nanoparticles was of the core-shell type. The radii of the polyester cores R_1 were of the order of 9 nm and the external radii were twice higher. The extreme swelling of the PEG chains by water made the hydrophilic shell quite thick. Indeed the shell volume contained 25 % of PEG and 75 % of water. Swelling of PEG by water increases the volume fraction of nanoparticles to $\sim 30 \%$ although the concentration was 7 % only. Such large volume fraction was the excluded volume of the hard spheres interaction model. Repulsive steric interactions between nanoparticles were strong because of the extreme swelling of the PEG shell. The size distributions of PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG nanoparticles were narrow since the variances of the Schulz distribution of radii were $\sigma^2 = 3.2 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 20 \%$) and $\sigma^2 = 7.3 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 30 \%$) respectively. Such structural parameters were in agreement with previous similar measurements of the literature [60,61].

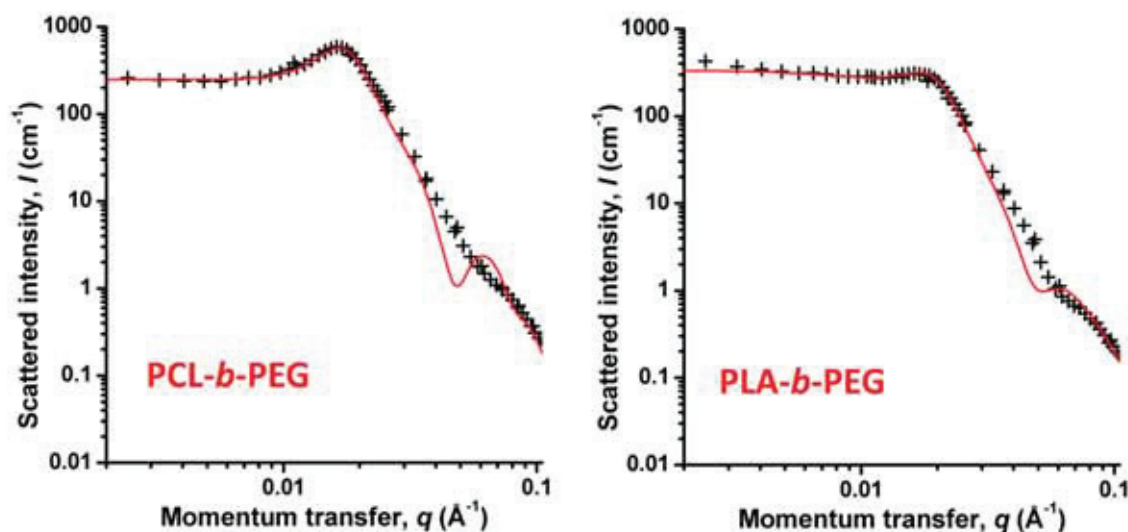


Figure 3. SANS patterns of the PCL-*b*-PEG (left) and PLA-*b*-PEG (right) nanoparticles 7 % in D₂O. Crosses are experimental data points and the solid red lines are the best fit of the model.

Table 3. Structural parameters of SANS experiments

| Block copolymer nanoparticles | PCL- <i>b</i> -PEG | PLA- <i>b</i> -PEG |
|---|--------------------|--------------------|
| Aggregation number | 280 | 200 |
| Hydration number (water molecules per PEG chain) | 2000 | 1900 |
| Variance of the particle size distribution (standard deviation) (nm ²) | 3.2 | 7.3 |
| Radius of the hydrophobic core (nm) | 9.3 | 8.6 |
| Radius of the water-swollen shell (nm) | 18.2 | 16.3 |

3.1.3. State of nanoparticles by ¹H NMR

Nanoparticles of PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG were prepared in D₂O using the same “spontaneous emulsification” process as in H₂O. The PLA/PCL blocks formed a central hydrophobic core, while the PEG blocks swollen by water formed a hydrophilic corona. ¹H NMR spectra of nanoparticles were run with a classical spectrometer designed to record spectra of liquid sample and solutions in order to assess the physical state of the hydrophobic core. Indeed the line width is related to the mobility of the part of molecule: sharp lines reveal a high mobility, broad lines reveal a reduced mobility of a hindered motion or a viscous medium, and the line vanish for the solid state because the molecular motions are too slow with respect to the time scale of liquid state high resolution NMR. The ¹H NMR spectrum of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG copolymers in solution in deuterated chloroform (CDCl₃) showed the whole polymer lines pertaining to the PLA, PCL and PEG blocks because all the blocks are soluble in chloroform (Figure 4). The spectra in CDCl₃ were in agreement with the chemical structure of the PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymers. The ¹H NMR spectrum of PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG nanoparticles dispersed in D₂O showed rather sharp peaks for the PEG line at 3.6 ppm and the terminal methyl located at its chain end at 3.0 ppm (Figure 4). The lines corresponding to the PCL block of PCL-*b*-PEG (at 1.39, 1.65, 2.31 and 4.07 ppm) were broad but definitely visible in the spectrum. The relative areas under all the lines correspond to the chemical structure of the block copolymer as analyzed in CDCl₃ solution, showing that all parts of the PCL-*b*-PEG block copolymer undergo motions typical of a liquid state. The lines of the PLA block of PLA-*b*-PEG could not be observed in the spectrum of the nanoparticles dispersed in D₂O. The PLA lines were so broad that they were almost absent. Such large line width indicated restricted mobility typical of the solid state of the corresponding PLA core of the micelles. The ¹H NMR spectra showed that the PLA-*b*-PEG micelles are solid particles, as previously inferred by Heald et al. [62].

The lines of PEG of both types of block copolymer nanoparticles were quite sharp because PEG is swollen by water, so that it has the typical mobility of a concentrated polymer solution.

Although bulk PCL is a semi-crystalline polymer below the melting temperature of its crystalline parts (+60°C), the amorphous parts of PCL are in the molten state at room temperature because the glass transition temperature of PCL is -60°C. PCL did not crystallize inside the core of the PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles since the full NMR lines of the PCL block could be observed on the ¹H NMR spectrum in D₂O. Crystallization was

probably prevented by the confinement of the macromolecules inside the nanoparticles. The PCL lines appeared as quite broad line however, revealing the high viscosity of the micellar core. Indeed the core of PCL-*b*-PEG micelles is made of pure molten PCL.

Bulk poly(D,L-lactide) is a glassy polymer at room temperature since its glass transition temperature is +60°C. Poly(D,L-lactide) is a fully glassy polymer that does not crystallize, whereas poly(L-lactide) is a semi-crystalline polymer material. The ^1H NMR of the PLA-*b*-PEG nanoparticles showed weak lines corresponding to the PLA block that could be seen at high magnification [62]. It is presumed that such lines corresponded to PLA segments adjacent to the PEG block which showed enough mobility because they were located close to the external surface of the PLA core.

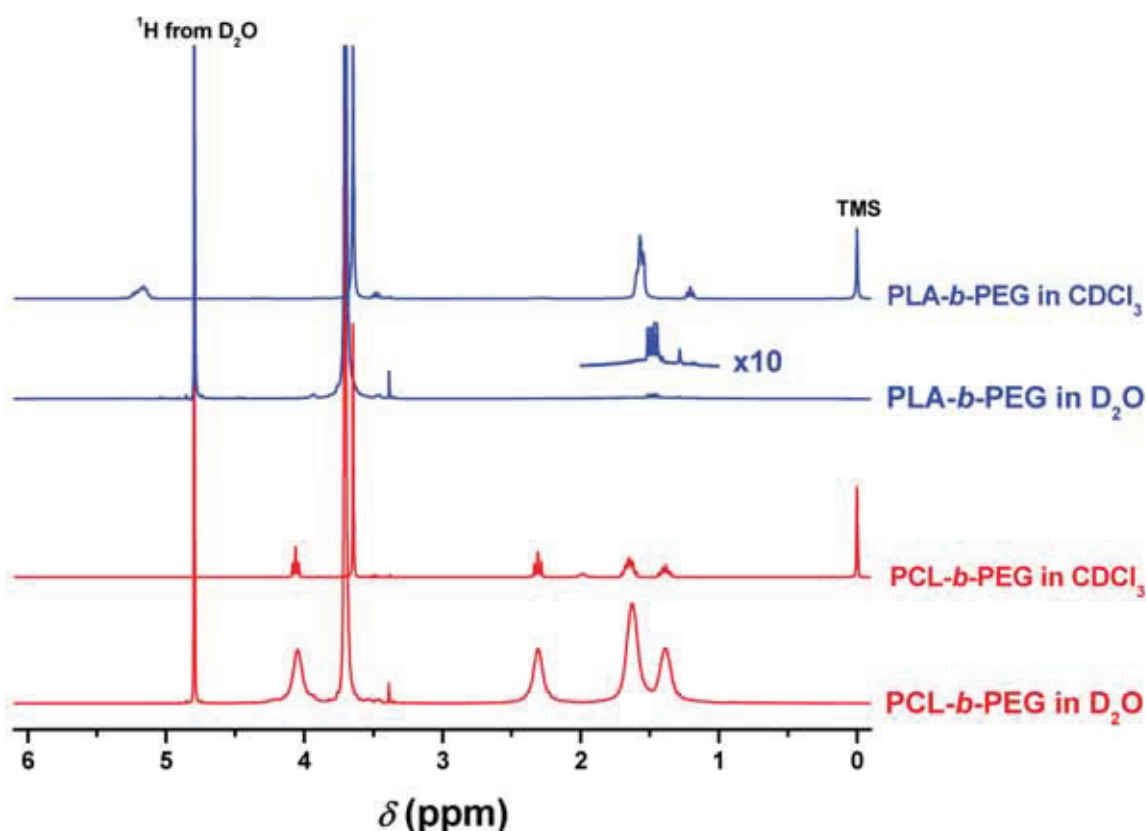


Figure 4. ^1H NMR spectra of PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG copolymers as nanoparticles in D_2O and as solutions in CDCl_3 .

Admixture of retinol in the nanoparticles was achieved using the spontaneous nanoprecipitation process already described, but also by simply dissolving retinol in the aqueous suspensions of blank nanoparticles under gentle magnetic stirring. The ^1H NMR spectra of PLA-*b*-PEG nanoparticles in D_2O displayed the lines of the whole content of the samples (Figure 5 left). The PCL blocks in PCL-*b*-PEG nanoparticles had the mobility of a PCL melt, so that the NMR lines of the full PCL and that of added retinol were clearly visible in the spectra of loaded nanoparticles. In particular, the strongest line of retinol at 1.0 ppm appeared well-resolved in the spectra of the loaded nanoparticles. NMR data showed that retinol retained a high mobility when it was solubilized inside the PCL core of the nanoparticles. NMR spectra were identical whatever the loading process of retinol. The lines of the PCL block of loaded nanoparticles appeared slightly sharper than those of the blank

nanoparticles, revealing the fluidizing effect of the presence of retinol in the core made of PCL melt. On the contrary, the ^1H NMR spectra of the loaded PLA-*b*-PEG nanoparticles in D_2O were identical to the blank nanoparticles, whatever the loading process (Figure 5 right). In particular, the weak PLA lines corresponding to the PLA segments close to the core surface were not modified upon addition of retinol. The NMR lines of retinol could not be observed in the spectra although it has been checked by HPLC that retinol was actually present in the samples, suggesting that retinol was immobilized inside glassy PLA.

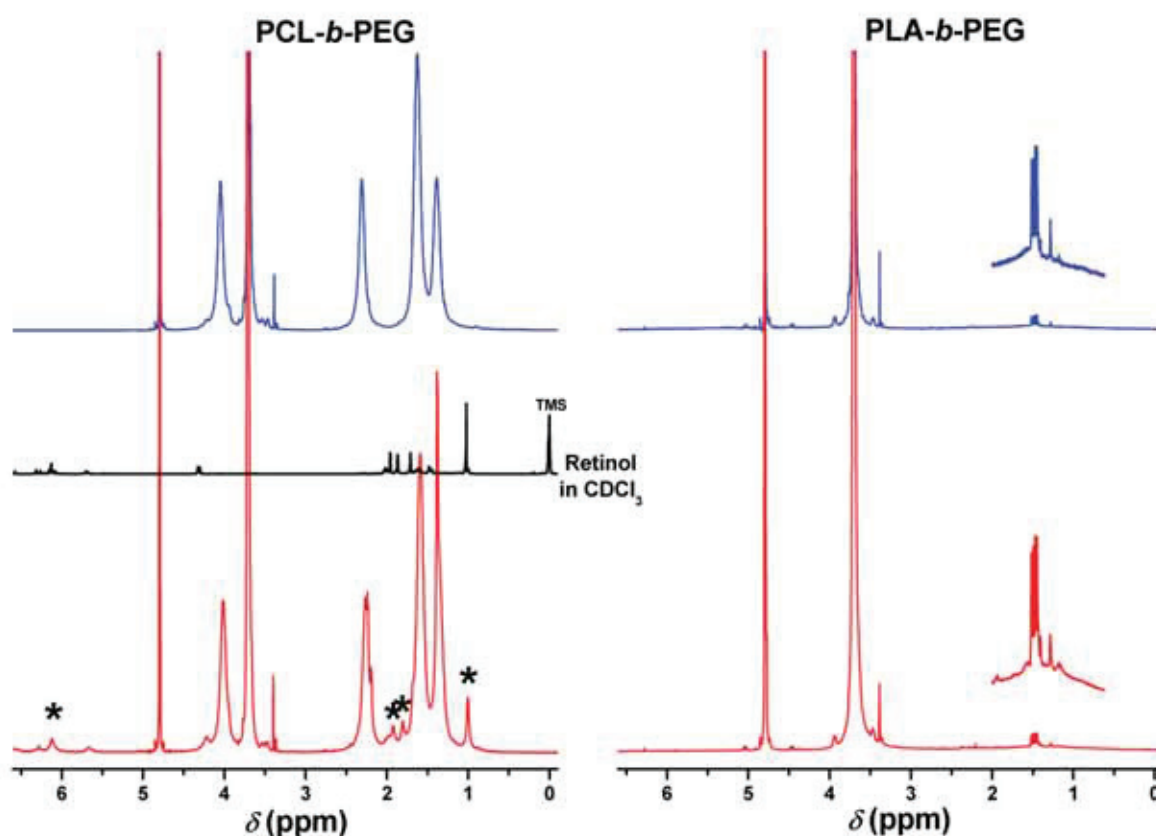


Figure 5. ^1H NMR spectra of PCL-*b*-PEG (left) and PLA-*b*-PEG (right) nanoparticles in D_2O . Red spectra: nanoparticles loaded with retinol; blue spectra: blank nanoparticles. The lines of retinol are marked with stars and the spectrum of retinol in CDCl_3 is given in black.

As summary, PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles have a PLA core in the solid state, whereas the PCL core of PCL-*b*-PEG nanoparticles is liquid. The PEG blocks undergo fast molecular motions because of their swelling by water. Retinol loaded in PLA-*b*-PEG nanoparticles is immobilized by the glassy PLA, while retinol loaded in PCL-*b*-PEG nanoparticles retains a high enough mobility for being visible by liquid state high resolution NMR.

3.1.4. Solubilizing properties of the block copolymer nanoparticles

The solubilization behavior is related to interactions of polymers and drug molecules. Intermolecular interactions are described in the framework of the regular solution theory in terms of the Hildebrand solubility parameter δ . Accordingly, maximum solubility corresponding to optimum compatibility between the polymer and the drug is reached if

$\delta_{\text{polymer}} = \delta_{\text{drug}}$ where mixing is athermal. A large difference of solubility parameters reveals poor solvent properties of the polymer. Such have most often been applied to prediction of solubility of polymers in solvents through the Flory-Huggins interaction parameter [63]. The present concern is the estimation of the solubility of a small molecule (the drug) in a polymer matrix acting as a solvent. The solubility parameters of PLA, PCL and retinol can be either evaluated from experiments, or calculated according to several classical calculation schemes that make use of tables of group increments (Fedors, Small, Hoy, van Krevelen, van Krevelen and Hoftyzer, Hoftyzer and van Krevelen) [64]. The most accurate calculation method makes use of the Hansen's scheme [65] that considers the contributions to the solubility parameter due to the dispersion (δ_d), polar (δ_p), and hydrogen-bonded (δ_{hb}) interactions. The full solubility parameter is given by

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (1)$$

The different contributions are calculated from tables of increments according to Hoftyzer and van Krevelen [64] (Table 3). The calculated values are in agreement with previous determinations, in particular with the solubility parameter of PCL ($\delta = 19.7 \text{ MPa}^{1/2}$) and its contributions reported by Bordes et al. [66] from an extensive comparative study of experimental and group increments methods. The solubility parameter of retinol is also close to $\delta = 16.1 \text{ MPa}^{1/2}$ calculated from the enthalpy of vaporization ($77.99 \text{ kJ.mol}^{-1}$) and its molar volume ($300 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$). The solubilizing properties of the polymers for retinol is calculated from the distance $\overline{\Delta\delta}$ between polymer and retinol in the (δ_d , δ_p , δ_{hb}) space as [64]

$$\overline{\Delta\delta} = \left[(\delta_{d,\text{pol}} - \delta_{d,\text{ret}})^2 + (\delta_{p,\text{pol}} - \delta_{p,\text{ret}})^2 + (\delta_{hb,\text{pol}} - \delta_{hb,\text{ret}})^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

where the suffixes “pol” and “ret” stand for polymer and retinol. Good solubility requires $\overline{\Delta\delta} < 5 \text{ MPa}^{1/2}$ [64]. The value of $\overline{\Delta\delta}$ for the PLA-retinol pair is quite high, showing that PLA is a poor solubilizing medium for retinol. Conversely, PCL is a better “solvent” of retinol since $\overline{\Delta\delta}$ is closer to $5 \text{ MPa}^{1/2}$.

Table 3. Solubility parameter δ ($\text{MPa}^{1/2}$) and its contributions δ_d , δ_p , and δ_{hb} for PLA, PCL and retinol. The difference $\overline{\Delta\delta}$ calculated from Eq. 2 for polymer-retinol pairs is given in the last column.

| Compound | Solubility parameters ($\text{MPa}^{1/2}$) | $\overline{\Delta\delta}$ ($\text{MPa}^{1/2}$) |
|----------|--|--|
| PLA | δ_d | 17.62 |
| | δ_p | 9.70 |
| | δ_{hb} | 11.77 |
| | Total δ | 23.31 |
| PCL | δ_d | 17.66 |
| | δ_p | 4.97 |
| | δ_{hb} | 8.43 |
| | Total δ | 20.20 |
| Retinol | δ_d | 11.89 |
| | δ_p | 1.68 |
| | δ_{hb} | 8.19 |
| | Total δ | 14.54 |

 Total δ

3.2. Drug delivery to skin using PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles

3.2.1. Skin absorption of retinol in passive diffusion experiments in Franz cells

Retinol absorption was measured *in vitro* on porcine skin using the Franz cell method upon 24 h exposure to the different formulations under occlusive conditions. Pig skin has been shown to be the most relevant animal model for human skin [51,67]. Retinol was not detected in the receptor fluid as observed in many previous studies [68,69]. Indeed retinol is a highly lipophilic molecule ($\log P = 5.65$) which preferentially accumulates in the lipidic parts of the *stratum corneum*. Therefore, only the retinol distribution within skin layers after 24 h skin exposure to the samples was investigated. The distribution of retinol in skin layers after 24 h exposure to the different formulations was determined after separation of the *stratum corneum*, viable *epidermis* and *dermis*. The full results are collected in Table 4.

| | PLA- <i>b</i> -PEG nanoparticles ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (% of total) | PCL- <i>b</i> -PEG nanoparticles ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (% of total) | Polysorbate 80 solution ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (% of total) | Oil solution ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (% of total) |
|-------------------------|---|---|--|--|
| Stratum corneum | 32±5 87 | 4.9±0.9 75 | 1.7±0.1 46 | 0.40±0.03 66 |
| Viable epidermis | 2.8±0.4 7.6 | 0.87±0.14 13 | 0.76±0.03 21 | 0.088±0.017 15 |
| Dermis | 2.1±0.2 5.4 | 0.74±0.16 12 | 1.2±0.4 33 | 0.11±0.03 19 |
| Total | 37 | 6.5 | 3.7 | 0.60 |

Table 4. Distribution of retinol in skin layers after 24 h exposure to the formulations. Applied dose was $2 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$. For each skin layer, the absorbed amounts are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (top row) and as % of the total absorbed amount (bottom row).

The total retinol absorption in skin showed a drastic influence of the type of formulation (Figure 6). The differences between all samples were statistically significant according to the Student's *t*-test ($p < 0.05$). Retinol loaded in nanoparticles used as a vehicle in an aqueous suspension displayed a significantly higher absorption in skin compared to the surfactant micelles and the oil solution. PLA-*b*-PEG nanoparticles achieved a high retinol absorption in skin up to 1.9 % of the applied dose. This was much higher by a factor of 6 than the PCL-*b*-PEG nanoparticles although the two types of retinol-loaded nanoparticles looked quite similar (same size, same hydrophilic coating of PEG). Retinol absorption in skin from Polysorbate 80 micelles was much lower and the oil solution was again even lower. PLA-*b*-PEG nanoparticles enhanced the retinol uptake by two orders of magnitude with respect to the oil solution of the same concentration. Such huge effect of the PLA-*b*-PEG nanoparticles was less for PCL-*b*-PEG nanoparticles. The influence of the type of block copolymer is the central topic of the present paper.

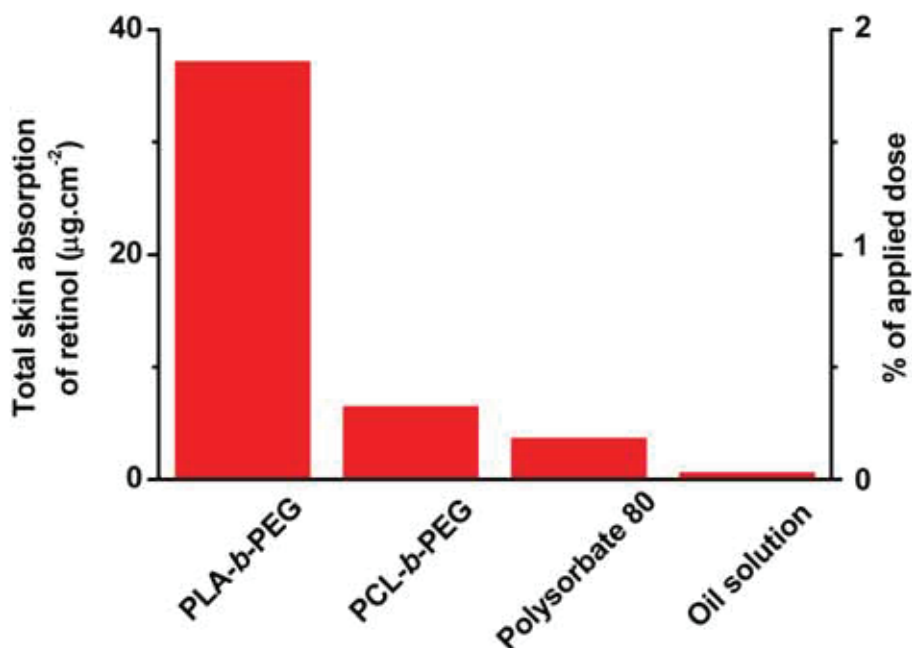


Figure 6. Total retinol retained in skin for each formulation. All differences are statistically significant with $p < 0.05$ ($n = 6$ independent experiments).

The distribution in the skin layers follow the same trends as the total amount, expected for the penetration from the Polysorbate 80 micelles. The accumulation in the *stratum corneum* was stronger with respect to the total for all samples; the fraction of retinol stored in the *stratum corneum* was larger than 46% in all instances. This was expected owing to the strong hydrophobic character of retinol. The amounts in the *stratum corneum* ranged in the same order as the total absorbed amounts and the difference between formulations were even larger. The large skin penetration enhancement of PLA-*b*-PEG nanoparticles caused the storage of retinol in the *stratum corneum* 20 and 80 times higher from PLA-*b*-PEG nanoparticles than from Polysorbate 80 surfactant micelles and MCT oil solution respectively. The amounts of retinol in the viable epidermis and dermis were in the same order. This enhanced penetration depth to the dermis from block copolymer nanoparticles was probably the consequence of the large absorption in the *stratum corneum*. The *stratum corneum* acted as a reservoir for diffusion to the deeper hydrophilic layers of skin. At the end, block copolymer nanoparticles appeared efficient vehicles for the absorption of hydrophobic drugs into the *stratum corneum*, but also for the deep penetration of the drugs compared to the reference solution in MCT oil. The Polysorbate 80 micelles showed a specific behavior since a large amount of retinol was found in the viable epidermis and dermis compared to the *stratum corneum*. Such observation suggests that the Polysorbate 80 surfactant has weakened the diffusion barrier of the *stratum corneum*. Indeed most surfactants show a penetration enhancer activity [20,21,22,23,25]. The origins of such an effect are the detergent action consisting in extraction of part of the lipids of the *stratum corneum* and the disorganization of the crystalline parts of the *stratum corneum* lipids by the surfactants molecules that penetrated the *stratum corneum*. Although the block copolymers have an amphiphilic structure similar to that of a surfactant, they did not show a penetration enhancer activity in the *stratum corneum* as a classical surfactant does. This is a definite difference between classical surfactants and block copolymers. The block copolymers drastically enhance the skin absorption however. The mechanism of such enhancement is

probably different. Since the block copolymers were aggregated as nanoparticles, it is presumed that the follicular penetration pathway was favored, providing a supplementary route for skin absorption.

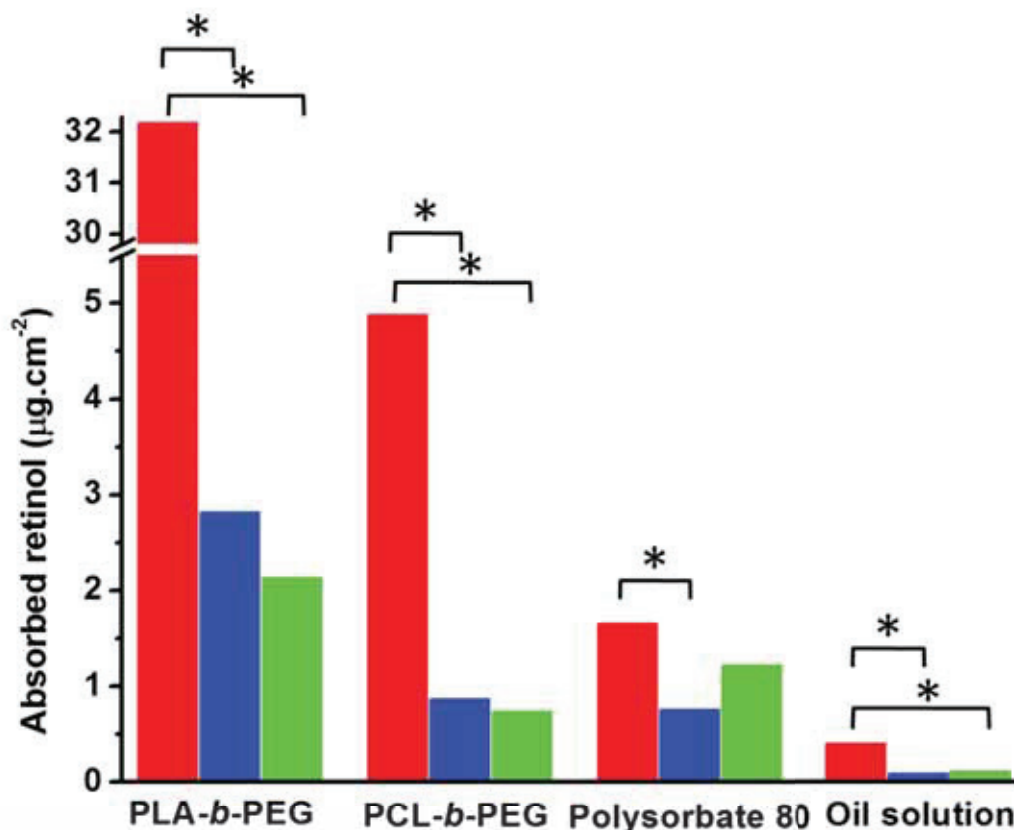


Figure 7. Effects of formulation type on skin distribution of retinol in the excised pig skin after 24 h exposure. Red: *stratum corneum*; blue: viable epidermis; green: dermis. From left to right: PLA-*b*-PEG nanoparticles, PCL-*b*-PEG nanoparticles, Polysorbate 80 micelles and MCT oil solution. Stars show the statistically significant differences according to the Student *t*-test ($p < 0.5$) for $n = 6$ independent experiments.

3.2.2. Skin absorption of Nile Red dye by fluorescence microscopy

In order to observe the distribution in depth of a hydrophobic molecule transported by block copolymer nanoparticles, PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles were loaded with the fluorescent dye Nile Red in place of retinol, skin samples were exposed to the suspensions of loaded nanoparticles, the skin pieces were recovered, washed, and histological sections were prepared for their observation by fluorescence microscopy (Figure 8). A strong fluorescence was observed for skin samples that have been exposed to loaded nanoparticles. The strongest fluorescence came from the *stratum corneum*. The *stratum corneum* appeared as a thin strongly fluorescent layer on the low magnification pictures that allow the observation of the whole skin thickness. Corneocytes were also observed torn away from the skin section by the knife in some places. A less intense but still strong fluorescence was emitted from the viable epidermis. Fluorescence from the dermis was definitely weaker. The fluorescence from the control sample was very weak at the excitation and emission wavelength range used and under the conditions where the fluorescence of Nile Red has been observed (Figure 8A).

Fluorescence of the control corresponds to the self-fluorescence of skin coming from endogenous flavoproteins and melanin [70].

Although Nile Red ($\text{Log}P = 3.44$) is less hydrophobic than retinol ($\text{Log}P = 5.68$), the fluorescence microscopy experiments of skin absorption of Nile Red confirmed the results of skin absorption of retinol. Indeed, the concentration of penetrant decreased in the order *stratum corneum* > viable epidermis > dermis. In agreement with the absorption of retinol again, the skin absorption of Nile Red was much stronger from PLA-*b*-PEG than from PCL-*b*-PEG nanoparticles.

Cross-sectional images revealed that Nile Red accumulated in hair follicles (Figure 8). The relative contributions of penetration through the stratum corneum and hair follicles cannot be drawn from the picture because of the occurrence of hair follicles in the histological section is too low for a statistically significant analysis could be done. The absorptions in hair follicles from PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles could not be compared for the same reason.

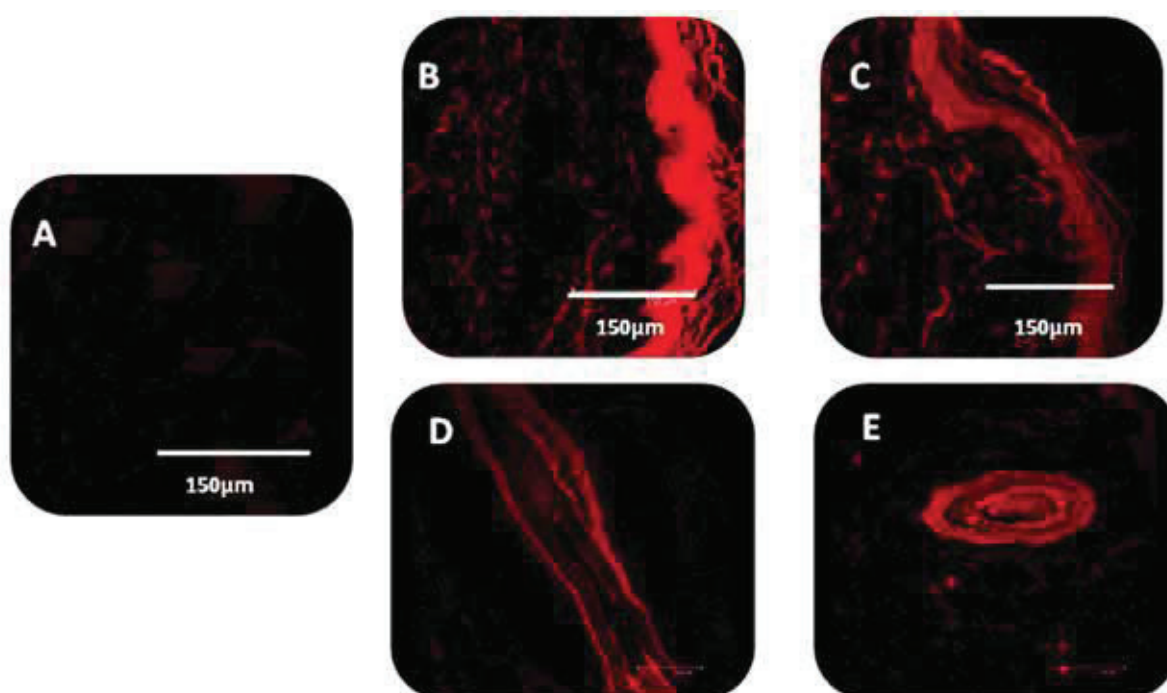


Figure 8. Confocal fluorescence images revealing the penetration and distribution of Nile Red upon 24 h exposure to a PLA-*b*-PEG nanoparticles (B,D), PCL-*b*-PEG nanoparticles (C,E). Pictures show the penetration within hairless parts of pig skin (B,C), and in hair follicles (D,E). Picture A is the control (after 24 h exposure to pure water) that shows the very weak self-fluorescence of skin caused by endogenous fluorescent compounds.

4. Discussion

Large skin absorption of retinol from PLA-*b*-PEG nanoparticles has been disclosed compared to PCL-*b*-PEG nanoparticles. This effect has been observed for the whole skin and in all the skin layers; it manifested both in absorption studies in Franz cells monitored by HPLC and by fluorescence microscopy. Such differences deserve discussion regarding their physicochemical origin.

PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG nanoparticles looked quite similar. The polyester cores of the nanoparticles did not show drastic differences owing to the easy exchange of the major biodegradable polyesters PCL, PLA and PLGA in pharmaceutical formulations. The sizes of the retinol-loaded nanoparticles were also identical (65 nm), although sizes of the blank

nanoparticles were slightly different (50 nm for PLA-*b*-PEG and 32 nm for PCL-*b*-PEG). One is the physical state of PLA and PCL since ^1H NMR experiments have shown that PLA was solid while PCL was liquid. Calculations of the Hildebrand solubility parameters of PLA, PCL and retinol showed that PCL was a better dissolution medium of retinol than PLA. As summary, everything was identical, excepted the physical state and solubilization behavior of polyester cores.

The solid core of PLA-*b*-PEG nanoparticles should have caused a slow release of retinol compared to the liquid core of PCL-*b*-PEG nanoparticles. As a consequence loading of retinol inside PLA-*b*-PEG nanoparticles should have delayed its delivery to the skin. The opposite behavior has been observed, showing that the physical state of the nanoparticles core was not the most relevant parameter controlling the release into skin. Finally it is concluded that the sole remaining parameter that makes a difference between PLA and PCL is of high relevance, that is, the solubilizing power of the polyester matrix for retinol. Thus, PLA being a poor solvent medium for retinol, it does retain retinol inside the nanoparticles and the net result is a better transfer to the other available lipidic medium, the *stratum corneum*. In other words, the large difference between the solubility parameters of PLA and retinol means a high enthalpy of mixing making higher the free energy of mixing for the retinol-PLA pair than for the retinol-PCL. The chemical potential of retinol in the PLA-*b*-PEG nanoparticles is high, so that the partition coefficient of retinol between the *stratum corneum* and PLA-*b*-PEG nanoparticles is large. This argument refers to thermodynamic equilibrium considerations better than kinetic phenomena. Indeed, partition between nanoparticles and *stratum corneum* is operative because the diffusion is slow and the exposure time is long, ensuring local equilibrium conditions along the whole exposure duration.

Poor solubilizing properties appeared a benefit regarding skin absorption because drug transfer to the skin is favored. The best solubilizing properties are often searched for in studies aiming at the selection of the optimum matrix of polymer nanoparticles [71,72,73]. Indeed, high loading capacity requires that the polymer is a good solvent for the drug; and a too bad solubilizing efficiency is detrimental to drug loading. But the transfer of the drug from the nanoparticles to the skin is better when the partition between polymer nanoparticles and skin is towards the skin, that is, when the solubilizing power of the polymer is not too high. Skin delivery of drugs encapsulated inside polymer particles is a matter of a compromise between these two demands: high loading capacity and high drug transfer to skin. It has been suggested that the follicular pathway was predominant for skin absorption from nanoparticles. Indeed there have been several observations of accumulation of nanoparticles in hair follicles based on either fluorescence microscopy or electron microscopy. Owing to the high lipophilic characters of retinol and Nile Red, the penetration pathways are expected through the *stratum corneum* by the intercellular pathway and by the follicular appendages. The intracellular pathway in the *stratum corneum* is discarded because corneocytes are polar media that do not allow the diffusion of hydrophobic molecules. Fluorescence microscopy pictures clearly showed that Nile Red was present at high concentrations in the *stratum corneum*, showing that the intercellular pathway significantly contributed to the overall diffusion of drugs. The fluorescence levels observed in the *stratum corneum* and the hair follicles were similar, showing that the concentration of Nile Red was of the same order of magnitude in both penetration pathways. Therefore, the relative contributions of diffusion through *stratum corneum* and hair follicles are matters of how dense are the hair follicles.

5. Conclusion

The high skin absorption of model hydrophobic molecules *all-trans* retinol and Nile Red loaded in PLA-*b*-PEG nanoparticles has been shown. The skin absorption enhancement was

by a factor 60-80 times with respect to MCT oil solution, depending on the way the improvement is estimated. PLA-*b*-PEG nanoparticles were also more efficient than Polysorbate 80 surfactant micelles by a factor of 10 to 20 for the absorption in the full thickness skin or in the *stratum corneum* respectively. The skin absorption enhancement by PCL-*b*-PEG nanoparticles is less, which questions on the origin of the dependence of skin absorption with respect to the nature of the hydrophobic core of the nanoparticles. Based on detailed physicochemical characterization of the block copolymer nanoparticles, it has been proposed that the most relevant parameter was the solubilizing power of the polymers better than the mobility of the polymer matrix. Low solubilizing properties cause a higher transfer of the drug to the stratum corneum, therefore faster skin absorption of the drug. In other words, the drug transfer from the polymer nanoparticles was better controlled by equilibrium thermodynamic phenomena than by diffusion phenomena related to the kinetics of molecular motions. Although it is acknowledged that skin penetration by the follicular pathway is high for nanoparticles, such a high enhancement cannot be fully ascribed to the contribution of the follicular pathway. Block copolymer nanoparticles, especially PLA-*b*-PEG nanoparticles in case of retinol, appear quite promising for skin delivery of hydrophobic drugs because of the high penetration enhancement reported in the present paper and the biocompatible and biodegradable characters of the materials.

References

- [1] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, Y. Chevalier, Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 156–165.
- [2] W.C. Maka, H. Richter, A. Patzelt, W. Sterry, K.K. Lai, R. Renneberg, J. Lademann, Drug delivery into the skin by degradable particles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 23–27.
- [3] B. Illel, Formulation for transfollicular drug administration: Some recent advances, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 14 (1997) 207–219.
- [4] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Enhancement of topical delivery from biodegradable particles, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1818–1825.
- [5] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *J. Control. Release* 99 (2004) 53–62.
- [6] H. Schaefer, F. Watts, J. Brod, B. Illel, Follicular penetration, in: R.C. Scott, R.H. Guy (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling*, IBC Technical Services, London, 1990, pp. 163–173.
- [7] R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 168–176.
- [8] A. Rolland, N. Wagner, A. Chatelus, B. Shroot, H. Schaefer, Site-specific drug delivery to piloosebaceous structures using polymeric microspheres, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1738–1744.
- [9] A. Vogt, B. Combadiere, S. Hadam, K.-M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer, B. Autran, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, 40 nm, but not 750 or 1500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin, *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 1316–1322.
- [10] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, Y. Chevalier, Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 3 (2011) 463–478.
- [11] G.S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 107–116.

- [12] G. Gaucher, M.H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J.C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *J. Control. Release* 109 (2005) 169–188.
- [13] V.P. Torchilin, Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1–16.
- [14] J. Shim, H.S. Kang, W.-S. Park., S.-H. Han, J. Kim, I.-S. Chang, Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles, *J. Control. Release* 97 (2004) 477–484.
- [15] Y.G. Bachhav, K. Mondon, Y.N.Kalia, R. Gurny, M. Möller, Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals, *J. Control. Release* 153 (2011) 126–132.
- [16] R. Rastogi, S. Anand, V. Koul, Flexible polymerosomes—An alternative vehicle for topical delivery, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 72 (2009) 161–166.
- [17] G. Riess, Micellization of block copolymers, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1107–1170.
- [18] J.-F. Gohy, Block copolymer micelles, *Adv. Polym. Sci.* 190 (2005) 65–136.
- [19] R. Zana, C. Marques, A. Johner, Dynamics of micelles of the triblock copolymers poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) in aqueous solution, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 345–351.
- [20] P.P. Sarpotdar, J.L. Zatz, Percutaneous absorption enhancement by nonionic surfactants, *Drug Develop. Ind. Pharm.* 13 (1987) 15–37.
- [21] M.J. Cappel, J. Kreuter, Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I. Polysorbates, *Int. J. Pharm.* 69 (1991) 143–153.
- [22] P. Ashton, K.A. Walters, K.R. Brain, J. Hadgraft, Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 261–264.
- [23] P. Ashton, K.A. Walters, K.R. Brain, J. Hadgraft, Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on protein and lipid structure of the stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 87 (1992) 265–269.
- [24] I. Effendi, H.I. Maibach, Surfactants and experimental irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis* 33 (1995) 217–225.
- [25] A. López, F. Llinares, C. Cortell, M. Herráez, Comparative enhancer effects of Span[®] 20 with Tween[®] 20 and Azone[®] on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities, *Int. J. Pharm.* 202 (2000) 133–140.
- [26] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603–618.
- [27] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 128–137.
- [28] P.G.M. van der Valk, J.P.Nater, E. Bleumink, Skin irritancy of surfactants as assessed by water vapor loss measurements, *J. Invest. Dermatol.* 82 (1984) 291–293.
- [29] P. Couvreur, G. Couarraze, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, Nanoparticles: Preparation and characterization, in: *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*, S. Benita (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1996.
- [30] N.A. Monteiro-Riviere, J.E. Riviere, Interaction of nanomaterials with skin: aspects of absorption and biodistribution, *Nanotoxicology* 3 (2009) 188–193.
- [31] N.A. Monteiro-Riviere, B. Baroli, Nanomaterial penetration. in: N.A. Monteiro-Riviere (Ed.), *Toxicology of the Skin, Target Organ Toxicology Series*, Informa Healthcare, New York, 2010, Chap. 22, pp. 333–346.
- [32] N. Kumar, M.N.V. Ravikumar, A.J. Domb, Biodegradable block copolymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 23–44.

- [33] U. Edlund, A.-C. Albertsson, Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, *Adv. Polym. Sci.* 15 (2002) 67–112.
- [34] D. Bazile, C. Prud'homme, M.-T. Bassoulet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 493–498.
- [35] C.A. Nguyen, E. Allémann, G. Schwach, E. Doelker, R. Gurny, Cell interaction studies of PLA-MePEG nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 254 (2003) 69–72.
- [36] M.A.R. Meier, S.N.H. Aerts, B.B.P. Staal, M. Rasa, U.S. Schubert, PEO-*b*-PCL block copolymers: Synthesis, detailed characterization, and selected micellar drug encapsulation behavior, *Macromol. Rapid Commun.* 26 (2005) 1918–1924.
- [37] M. Chausson, A.-S. Fluchère, E. Landreau, Y. Aguni, Y. Chevalier, T. Hamaide, N. Abdul-Malak, I. Bonnet, Block copolymers of the type poly(caprolactone)-*b*-poly(ethylene oxide) for the preparation and stabilization of nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* 362 (2008) 153–162.
- [38] R. Li, X. Li, L. Xie, D. Ding, Y. Hu, X. Qian, L. Yu, Y. Ding, X. Jiang, B. Liu, Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetradrine delivery, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 158–166.
- [39] R. Diab, M. Hamoudeh, O. Boyron, A. Elaissari, H. Fessi, Microencapsulation of cytarabine using poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) diblock copolymers as surfactant agents, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 456–469.
- [40] F. Laredj-Bourezg, Y. Chevalier, O. Boyron, M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with organic solid particles, *Colloids Surfaces A* 413 (2012) 252–259.
- [41] H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies, Procédé de dispersion de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules, Patents FR 2608988 (1986); EP 0275796 (1987); US 5118528 (1992).
- [42] S. Staimesse, A.-M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, H. Fessi, Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.* 273 (1995) 505–511.
- [43] Équipements expérimentaux du Laboratoire Léon Brillouin, LLB, CEN Saclay, F91191 Gif-sur-Yvette, France, (LLB is a CEA-CNRS laboratory), available at: <http://www-llb.cea.fr/index.html>.
- [44] J.-P. Cotton, Initial data treatment, in: P. Lindner, Th. Zemb (Eds.), *Neutron, X-ray and Light Scattering. Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems*, North-Holland, Amsterdam 1991, pp. 19–31.
- [45] J. Dubochet, J.-J. Chang, R. Freeman, J. Lepault, A.W. McDowell, Frozen aqueous suspensions, *Ultramicroscopy* 10 (1982) 55–62.
- [46] <http://microscopies.univ-lyon1.fr>
- [47] J.R. Bellare, H.T. Davis, L.E. Scriven, Y. Talmon, Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique, *J. Electron Microsc. Tech.* 10 (1988) 87–111.
- [48] <http://ccrmn.univ-lyon1.fr/>
- [49] <http://quantimetrie.univ-lyon1.fr>
- [50] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, H. Fessi, R.H. Guy, Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 301–316.
- [51] OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment: number 28, 2004.

- [52] I.G. Shin, S.Y. Kim, Y.M. Lee, S.C. Cho, Y.K. Sung, Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. I. Preparation and characterization, *J. Control. Release* 51 (1998) 1–11.
- [53] S.Y. Kim, I.G. Shin, Y.M. Lee, S.C. Cho, Y.K. Sung, Methoxy poly(ethylene glycol)/ ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours, *J. Control. Release* 51 (1998) 13–22.
- [54] H.S. Yoo, T.G. Park, Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA–PEG block copolymer, *J. Control. Release* 70 (2001) 63–70.
- [55] R. Finsy, Particle sizing by quasi-elastic light scattering, *Adv. Colloid Interface Sci.* 52 (1994) 79–143.
- [56] Y. Chevalier, T. Zemb, Structure of micelles and microemulsions, *Rep. Prog. Phys.* 53 (1990) 279–371.
- [57] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982.
- [58] J.B. Hayter, in V. Degiorgio, M. Corti (Eds); *Physics of amphiphiles: micelles, vesicles and microemulsions*, North-Holland, Amsterdam, 1985, p. 59.
- [59] S.R. Aragón, R. Pecora, Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2395–2404.
- [60] T. Riley, C.R. Heald, S. Stolnik, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.M. King, R.K. Heenan, S.C. Purkiss, R.J. Barlow, P.R. Gellert, C. Washington, Core-shell structure of PLA-PEG nanoparticles used for drug delivery, *Langmuir* 19 (2003) 8428–8435.
- [61] I. Akiba, N. Terada, S. Hashida, K. Sakurai, T. Sato, K. Shiraishi, M. Yokoyama, H. Masunaga, H. Ogawa, K. Ito, N. Yagi, Encapsulation of a hydrophobic drug into a polymer-micelle core explored with synchrotron SAXS, *Langmuir* 26 (2010) 7544–7551.
- [62] C.R. Heald, S. Stolnik, K.S. Kujawinski, C. De Matteis, M.C. Garnett, L. Illum, S.S. Davis, S.C. Purkiss, R.J. Barlow, P.R. Gellert, Poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) nanoparticles: NMR studies of the central solidlike PLA core and the liquid PEG corona, *Langmuir* 18 (2002) 3669–3675.
- [63] E.A. Grulke, Solubility parameters values, in: J. Brandrup, E.H. Immergut, E.A. Grulke (Eds.), *Polymer Handbook*, 4th ed., 1999, Chap. 7, pp. 675–714.
- [64] D.W. van Krevelen, *Properties of Polymers*, Elsevier, Amsterdam, 1990, Chap. 7.
- [65] C.M. Hansen, *Hansen Solubility Parameters. A User's Handbook*, CRC Press, Boca Raton FLA, 2000.
- [66] C. Bordes, V. Fréville, E. Ruffin, P. Marote, J.Y. Gauvrit, S. Briançon, P. Lantéri, Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process, *Int. J. Pharm.* 383 (2010) 236–243.
- [67] J.M. Bartek, J.A. LaBudde, H.I. Maibach, Skin permeability *in vivo*: Comparison in rat, rabbit, pig and man, *J. Invest. Dermatol.* 58 (1972) 114–123.
- [68] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, J.-P. Valour, Y. Chevalier, Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions, *Int. J. Pharm.* 371 (2009) 56–63.
- [69] M. Förster, M.-A. Bolzinger, D. Ach, G. Montagnac, S. Briançon, Ingredients tracking of cosmetic formulations in the skin: A confocal Raman microscopy investigation, *Pharm. Res.* 28 (2011) 858–872.
- [70] M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R.H. Webb, R.R. Anderson, *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 946–952.
- [71] J. Liu, Y. Xiao, C. Allen, Polymer–drug compatibility: A guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 132–143.

[72] S.K. Patel, A. Lavasanifar, P. Choi, Roles of nonpolar and polar intermolecular interactions in the improvement of the drug loading capacity of PEO-b-PCL with increasing PCL content for two hydrophobic cucurbitacin drugs, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2584–2591.

[73] S.K. Patel, A. Lavasanifar, P. Choi, Molecular dynamics study of the encapsulation capability of a PCL–PEO based block copolymer for hydrophobic drugs with different spatial distributions of hydrogen bond donors and acceptors, *Biomaterials* 31 (2010) 1780–1786.

Chapitre 9

Application topique des émulsions biodégradables

9.1. Introduction

Les émulsions de Pickering sont des émulsions stabilisées par des particules solides (Aveyard, Binks, et Clint 2003; Chevalier et Bolzinger 2013). Ces systèmes sont caractérisés par une grande stabilité à long terme conférée par la forte adsorption des particules aux interfaces. Celles-ci, fortement ancrées à forment une barrière physique s'opposant à la coalescence des gouttelettes formées (Binks 2002). Cette barrière peut également servir pour la libération contrôlée d'actifs solubilisés dans la phase interne des émulsions (Eskandar, Simovic, et Prestidge 2009). En effet, il a été démontré que des émulsions eau-dans-huile stabilisées par des particules de silice amélioraient la pénétration d'un médicament hydrophile (la caféine) à travers la peau par rapport à une émulsion à base de tensioactifs classiques (Frelichowska et al. 2009). Ce résultat a été attribué à la meilleure adhérence des gouttelettes d'eau Pickering à la surface de la peau. La même conclusion a été tirée pour la perméabilité des médicaments de polarité moyenne à partir d'un d'émulsion de Pickering huile-dans-eau. Enfin, des émulsions de Pickering stabilisées par des particules de silice ont provoqué une large accumulation du rétinol dans la couche cornée par rapport à des émulsions à base de surfactifs (Frelichowsk et al. 2009). Ces enquêtes ont montré que les émulsions de Pickering se comportent d'une manière spécifique, ce qui soulève un intérêt supplémentaire en dehors de leur stabilité améliorée par rapport aux émulsions classiques. En résumé, les émulsions de Pickering sont des alternatives utiles aux émulsions classiques pour l'administration de substances thérapeutiques par voie topique, car ils permettent la modulation de la pénétration des actifs ainsi qu'un ciblage des couches de la peau.

Les applications pharmaceutiques exigent souvent des émulsions biocompatibles et biodégradables. Les particules de silice sont biocompatibles et non toxiques, mais ne sont pas biodégradables.

Le développement des émulsions de Pickering biodégradables nécessite que les particules solides inorganiques soient remplacées par des particules organiques biodégradables.

Des travaux récents ont mis en évidence l'application cutanée d'actifs incorporés dans des émulsions stabilisées par des particules d'amidons (Marku et al. 2012). Ces émulsions ont montré une augmentation du flux du méthyl salicylate à travers la peau comparé une solution appliquée dans les mêmes conditions.

Le but de ce travail est d'évaluer les propriétés de délivrance d'actifs par voie topique, à partir d'émulsions de Pickering, huile-dans-eau, biocompatibles et biodégradables.

En dehors de leur caractère biodégradable, ces particules stabilisatrices sont notamment étudiées en vue de mettre en évidence d'autres propriétés influençant la libération des actifs incorporés.

Dans cette étude, des émulsions de Pickering stabilisées par deux types particulières : les nanoparticules de PCL-b-PEG et PLA-b-PEG, et préparées selon deux procédés différents sont testées pour l'application topique du rétinol durant 24h :

- en utilisant des peaux de porc ;
- en utilisant des cellules de diffusion statique de Franz ;
- comparées à une émulsion classique et une solution huileuse testées dans les mêmes conditions.

La mise en évidence d'un partage du rétinol entre la phase interne et le *stratum corneum*, mais également entre les nanoparticules stabilisatrices ou en excès et le *stratum corneum* est visée.

L'influence du procédé d'émulsification est également étudiée en vue de montrer des différences au niveau de l'absorption cutanée du rétinol comparé à une émulsion classique stabilisée par un tensioactif du type polysorbate 80.

Afin de visualiser la distribution des actifs dans les différentes couches de la peau, des observations en microscopie confocale ont été réalisées en incorporant un actif fluorescent : le rouge Nile.

9.2. Partie expérimentale

La partie expérimentale est présentée sous la forme d'un article soumis bientôt pour publication à *Journal of Controlled release*.

Pickering emulsions stabilized by biodegradable block copolymer micelles control topical drug delivery

Faiza Laredj-Bourezg¹, Marie-Alexandrine Bolzinger^{1,*}, Jocelyne Pelletier¹, Jean-Pierre Valour¹, Marie-Rose Rovère², Batoule Smatti³, Yves Chevalier¹

¹ Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, CNRS UMR 5007, 43 bd 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France.

² Université Lyon 1, Laboratoire des Substituts Cutanés, CNRS FRE 3310, Hôpital Édouard Herriot, Lyon, France.

³ Université Lyon 1, Centre commun de Quantimétrie, Lyon, France.

*: corresponding author

Abstract

Surfactant-free biocompatible and biodegradable oil-in-water emulsions were investigated as vehicles for skin delivery of hydrophobic drugs. Such Pickering emulsions were made of medium-chain triglyceride (MCT) oil droplets stabilized by solid organic nanoparticles made of block copolymers; they were loaded with *all-trans* retinol as a model hydrophobic drug. Two kinds of block copolymer nanoparticles were used as emulsion stabilizers: either poly(lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) (PLA-*b*-PEG) or poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene glycol) (PCL-*b*-PEG). The specificity of such emulsion is the possible drug loading inside the oil droplets and/or inside the block copolymer nanoparticles. Those innovative emulsions were prepared using two different protocols allowing drug loading either inside oil droplets or inside both oil droplets and block copolymer nanoparticles. The skin absorption of retinol loaded in various emulsion carriers differing by their stabilizing nanoparticles and their drug loading type was investigated *in vitro* on pig skin biopsies using Franz cells and compared with several control samples: solution in MCT oil, aqueous suspensions of block copolymer nanoparticles, and a classical o/w MCT emulsion stabilized by a surfactant. The penetration of retinol in skin layers, *dermis*, viable *epidermis* and *stratum corneum*, was evaluated by HPLC after 24 hours exposure to the formulations. Supplementary experiments by confocal fluorescence microscopy allowed the visualization of skin absorption the Nile Red dye on histological sections of skin. Retinol and Nile Red penetrations in skin showed their large accumulation in *stratum corneum* for the Pickering emulsions and the block copolymer nanoparticles compared to the surfactant based emulsion and oil solution. The enhanced skin absorption from Pickering emulsions loaded in oil with respect to surfactant-based emulsion was ascribed to a higher adhesion of the Pickering oil droplets to the skin surface, allowing an easier drug transfer from the oil droplets to the *stratum corneum* lipids. Loading the drug both inside oil droplets and block copolymer nanoparticles of the Pickering emulsions enhanced again the skin absorption of drugs, which was ascribed to the supplementary contribution of the drug-loaded free block copolymer nanoparticles. Such effect allowed tuning the drug delivery to skin in a wide range by means of a suitable selection of either the formulation or the loading process. Indeed, retinol absorption could be varied from 1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in case of drug loading in oil droplets, to 37 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for drug-loaded block copolymer nanoparticles.

Key words: Skin delivery; Cutaneous absorption; Pickering emulsions; Block copolymer nanoparticles

1. Introduction

Pickering emulsions are surfactant-free emulsions stabilized with solid particles. They are known to display improved long-term stability even without the addition of surfactant [1,2,3]. The solid particles act as surfactants by strongly anchoring at the interfaces, thus providing a physical barrier to coalescence. Such properties make Pickering emulsions promising candidates as carriers for drug delivery. In particular, controlled drug delivery to skin from Pickering emulsions has recently been shown in several instances by means of in vitro experiments on skin biopsies [4]. It has been shown that w/o Pickering emulsion stabilized by silica particles enhanced the permeation of an hydrophilic drug (caffeine) through skin compared to a classical surfactant-based emulsion; such an effect has been ascribed to the better adhesion of Pickering water droplets to the skin surface [5]. The same conclusion has been reached for the permeation of drugs of medium polarity from an o/w Pickering emulsion [6,7]. Finally, o/w Pickering emulsions stabilized by silica particles cause an enhanced accumulation of hydrophobic drugs in the *stratum corneum* compared to surfactant-based emulsions; this is the case of the model hydrophobic drug *all-trans* retinol [8,9]. Such investigations showed that Pickering emulsions behave in a specific manner, which raises a supplementary interest apart from their improved stability with respect to classical emulsions. More sophisticated types of o/w Pickering emulsions covered by mixed surfactant/silica particles stabilizing layers [6,9,10] have also been evaluated, leading to the same trends. As summary, Pickering emulsions are useful alternatives to classical *emulsions* for topical drug delivery because they allow the modulation of the delivery rates and sites in the skin. Pickering emulsions share many properties with classical emulsions, so that their implementation in place of classical emulsions does not question the foundations of the drug delivery processes [4].

Pickering emulsions have been originally developed with inorganic stabilizing particles. The early o/w emulsions reported by Pickering in 1907 were stabilized by inorganic “basic copper sulfate” nanoparticles [11]. The most popular inorganic particles studies so far are silica and clay [1]. The stabilization of emulsion droplets requires the adsorption of solid particles at their surface. Adsorption is ensured by partial wetting of the particles by oil and water, so that the surface chemistry of the solid particles is of primary importance [1,2,3]. As example, bare silica hardly adsorb at the oil-water interface [12]; a surface modification by means of chemical grafting of organosilanes allows a fine control of the wetting properties by oil and water [13]. There is a large variety of types of stabilizing particles that revealed successful for the stabilization of emulsions, including oddities such as spores, bacteria, viruses [14,15,16,17,18]. This includes many organic particles; some of them being biodegradable [19,20,21].

Pharmaceutical applications often require biocompatible and biodegradable emulsions. Silica particles are biocompatible and non-toxic, but they are not biodegradable. The development of biodegradable Pickering emulsions requires that the inorganic solid particles are replaced by biodegradable organic particles. The purpose of the present work is to assess the topical drug delivery properties of biocompatible and biodegradable Pickering emulsions stabilized with organic particles. Indeed, it is expected that the same type of differences with respect to surfactant-based emulsion will still hold. Apart from the biodegradability, such substitution of the stabilizing particles brings about supplementary properties with respect to inorganic solid particles. Such new issues and new possibilities need an evaluation. In particular, organic solid particles may undergo reorganizations if they are made of soft materials or if either the oil or the drug swells them. Organic solid particles can be loaded with the organic drug molecules, either at will, or as the result of the diffusion of drug molecules from the oil droplets to the organic particles.

The present study was aimed at investigating the delivery of hydrophobic drugs into skin from Pickering emulsions stabilized by organic nanoparticles. One purpose is the comparison of the behavior of such Pickering emulsions with classical surfactant-based emulsions in the same way as it has been previously done for Pickering emulsions stabilized by silica particles. The second purpose is to investigate the consequences of the specificities of organic particles. Indeed the drug molecules can be loaded either solely inside the oil droplets or both inside oil droplets and organic nanoparticles according to the drug loading process. Since it is expected that drug-loaded organic nanoparticles contribute to the skin delivery, two kinds of organic nanoparticles made of different polyesters have been studied.

Block copolymer nanoparticles made of either poly(D,L-lactide)-*block*-poly(ethylene glycol) (PLA-*b*-PEG) or poly(caprolactone)-*block*-poly(ethylene glycol) (PCL-*b*-PEG) will be used in the present study. Stable Pickering o/w emulsions of biocompatible and biodegradable medium-chain triglyceride (MCT) oil could be prepared using such organic nanoparticles [22]. These two block copolymer nanoparticles showed quite different skin delivery behavior. Indeed a previous study [23] has shown that PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles caused a large enhancement of skin delivery of retinol by a factor of 20 in comparison to classical micelles of Polysorbate 80. Conversely, the enhancement by PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles was moderate. *In vitro* experiments of dermal delivery were carried out on excised porcine skin in Franz diffusion cells for two model hydrophobic drugs, *all-trans* retinol (vitamin A) and the Nile Red fluorescent dye.

The paper firstly reports the manufacturing of o/w Pickering emulsions loaded with retinol (or Nile Red) according to two processes that allow different drug loading types. A detailed characterization of the structure of the emulsions, the distribution of block copolymer nanoparticles between oil droplets surface and aqueous phase, and the distribution of retinol between its different solubilization sites is performed in order to collect the physicochemical data that allows a conclusive discussion of the skin delivery behavior. Biopharmaceutical studies using the Franz cell diffusion method were conducted for 24 h with two model drugs (*all-trans* retinol and Nile red) to evaluate the skin delivery characteristics with respect to a surfactant-based emulsion as control, and to assess the influence of the type of coating by organic nanoparticles and the contributions of the different solubilization sites of the loaded drugs.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymers were synthesized according to methods of the literature as previously reported [22,23]. *All-trans* retinol, Nile Red and phosphate buffer pH 7.4 were purchased from Sigma-Aldrich. Polysorbate 80 surfactant (Montanox[®] 80) was from Seppic (France), medium-chain triglyceride (caprylic/capric triglyceride Miglyol 812N, MCT) was from Sasol, and butyl hydroxy toluene (BHT) was from Clariant. Acetone (Laurylab) was used as received and analytical grade methanol was purchased from Carlo Erba (Italy). Deionized water of 18 MΩ.cm resistivity was used throughout the work.

2.1.2. Preparation of the Stabilizing Nanoparticles

PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles were prepared using the spontaneous emulsification process [24,25] that has been modified for allowing the preparation of high enough concentrated suspensions of nanoparticles [22,23]. A concentration of block copolymer nanoparticles of 7 wt% could be reached accordingly; such concentration was necessary for the preparation of concentrated Pickering emulsions

containing an oil fraction as high as 50 %. The suspensions of block copolymer nanoparticles were the same as those of our previous study [23].

2.1.3. Preparation of emulsions

Two methods were used to prepare Pickering emulsions loaded with retinol or Nile Red. Method 1 consisted in mechanical stirring of an aqueous suspension of blank copolymer particles (7 wt%) and a solution of retinol in MCT (PE1). Method 2 was a one-shot method where the Pickering emulsion was prepared by spontaneous emulsification. It consisted in dissolving PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG block copolymer, retinol and MCT in acetone. The organic solution was then poured in water. Acetone was evaporated under reduced pressure (PE2). The nomenclature used throughout the document is based on the stabilizing block copolymer particles. Therefore, PEPLA and PEPCL are Pickering emulsions made using PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG respectively as stabilizing particles. PE1PLA or PE1PCL, and PE2PLA or PE2PCL, refer to the process. Five o/w emulsions were prepared and compared to an MCT oil solution of retinol (SOL) prepared by simply dissolving retinol in MCT (Table 2): A control o/w emulsion stabilized with Polysorbate 80 (HLB = 15.0) was taken as control (classical emulsion, CE). The amount of emulsifier was adjusted in order to obtain the same droplet size distribution as for the Pickering emulsion. The viscosity of the classical emulsion was similar to that of the Pickering emulsion to avoid the influence of viscosity on the skin absorption profile. The ratio of the oil and aqueous phases was 50:50 (wt:wt) for all emulsions.

2.1.4. Chemical composition of emulsions

All emulsions and control samples were prepared so as to allow comparisons with respect to the studied parameters. The samples were mostly identical in their chemical composition (Table 1) and physicochemical characteristics. Thus, the retinol concentration was the same in all formulations (0.5 wt%). Retinol was protected against oxidation by addition of the BHT antioxidant (0.5 wt%). The oil content of all emulsions was 50 wt% and the concentration of block copolymer micelles was 7 wt% in the aqueous phase (3.5 wt% in the full sample). The droplet size and emulsion viscosity were the same for the three emulsions whatever the process used (Table 2).

| Compositions of formulations (wt%) | Pickering emulsions PE1 and PE2 | | Classical emulsion (CE) | SOL |
|--|---------------------------------|-------------------|-------------------------|------|
| | PE1PLA and PE1PCL | PE2PLA and PE2PCL | | |
| <i>All-trans</i> retinol | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Medium Chain Triglyceride (MCT) | 49.0 | 47.825 | 49.0 | 99.5 |
| Butylhydroxytoluene (BHT) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | - |
| Aqueous suspension of block copolymer particles (7 wt%) | 50.0 | - | - | - |
| PLA- <i>b</i> -PEG or PCL- <i>b</i> -PEG block copolymer | - | 3.35 | - | - |
| Polysorbate 80 | - | - | 2.5 | - |
| Water | - | 47.825 | 47.5 | - |

Table 1. Composition of the nine investigated formulations (wt%): Pickering emulsions (PE1 and PE2), classical emulsion (CE), and solution in MCT oil (SOL).

| | PE1PLA | PE1PCL | PE2PLA | PE2PCL | CE |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Mean droplet size (μm) | 2.7 ± 1.5 | 3.0 ± 1.7 | 2.0 ± 0.4 | 3.0 ± 0.7 | 2.7 ± 1.6 |
| Viscosity at 20°C (mPa.s) | 14.5 | 15.2 | 14.7 | 15.3 | 14.5 |

Table 2. Physicochemical characterizations of the Pickering emulsions (PE1 and PE2) and the corresponding classical emulsion (CE). Mean \pm *sem*, $n = 3$.

2.1.5. Droplet Size Measurements and Viscosity

Emulsions droplet size distributions were measured by small angle light scattering using a MasterSizer[®] 2000 (Malvern, UK). The emulsions were diluted inside the instrument in such a way that the obscuration reached 12 % according to the instructions of the supplier. 88 % transmission gave optimum signal while limiting multiple scattering. The size distribution was calculated homogeneous spheres using the Mie theory taking the real parts of the refractive indices of 1.33 for water and 1.46 for the dispersed phase; the imaginary part of the refractive index was zero. The viscosity of emulsions was measured at 20 °C using a Couette rheometer Rheomat R180 (Lamy, France) equipped with a mobile system N° 11 rotating at 200 s⁻¹ shear rate.

2.1.6. Transmission electron microscopy (TEM) of freeze-fractured emulsions

Freeze-fractured replicas of emulsions were observed by means of TEM. The preparation of replicas was performed at the Service de Microscopie Electronique (Cryomicroscopie Electronique), University Pierre et Marie Curie-CNRS. A drop of emulsion was deposited on a formvar/carbon-coated copper TEM grid; the grid was quenched and the sample was fractured, a carbon/platinum was deposited by sputtering on the fractured surface, and the sample was finally removed by washing with water and dichloromethane in order to end with a replica on a TEM grid. They were observed by TEM at the Centre Technologique des Microstructures (CTμ) technical platform of the University of Lyon using a Phillips CM120 microscope operating at 120 kV acceleration.

2.1.7. Distribution of Retinol in Pickering Emulsions

The distribution of retinol between oil droplets and free block copolymer nanoparticles was determined in order to study the influence of the process and block copolymer type on retinol skin absorption. The Pickering emulsions were centrifuged at 14,500 rpm during 20 min; samples were taken at the top in the layer of creamed emulsion and at the bottom in the clear aqueous phase; retinol was finally assayed using HPLC.

2.1.8. Skin Absorption Studies

Full-thickness skins of female or male pigs (mean \pm *sem* = 1.2 \pm 0.05 mm) were obtained from young animals sacrificed at the Laboratoire de Physiologie of the University of Lyon. The hairs were cut with an electric cutter. The skin was then cleaned up with tap water and excised, the subcutaneous fatty tissues were carefully removed and the skin pieces were stored flat at -20 °C until use. The thickness of each skin piece was measured with a micrometer (Mitutoyo). Transepidermal water loss (TEWL) measurements were performed in triplicate on skin pieces using a Tewameter TM300 (Courage - Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany) just before performing the skin absorption studies. The skin samples with TEWL value higher than 15 g.m⁻².h⁻¹ were discarded following the OECD guidelines [26]. The skin pieces were mounted in two-chamber glassware Franz-type static diffusion cells of effective area 2.54 cm². The 10 mL receiver chamber was filled PBS buffer pH 7.4 containing

1.5% Brij[®]98 and 0.5% BHT. 1 g of freshly prepared formulation (Table 2) was spread uniformly on the skin surface. The study was carried out under occlusive conditions for 24 h. All experiments were undertaken in the dark to avoid degradation of retinol under light exposure. At the end of the study the receptor fluid was removed filtered and analyzed by HPLC. Franz cells were dismantled; the skin surface was washed with 10 mL of a fresh receptor fluid solution; then skin stripping of the *stratum corneum* was performed in one step using acrylic adhesive (Loctite[®] super glue 3, Henkel, Germany). The viable epidermis and dermis were separated by heat treatment in water at 60 °C for 45 s. The epidermis and dermis were cut into pieces with a scalpel, retinol was extracted once with methanol containing 0.5 wt% BHT under ultrasounds in ice bath for 20 min, and samples were filtered and analyzed by HPLC. All collected samples were analyzed for retinol using liquid chromatography with a reverse phase column. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 injector, a Waters 600 pump, a reverse phase column XTerra[®]MS C18 (3.9 mm×150 mm, 5 µm) and a Waters 2996 photodiode array UV detector working at 325 nm wavelength. The elution with methanol/water (85:15) solvent at 1.4 mL.min⁻¹ flow rate and 30 °C gave a retention time of 6 min for retinol. Injection volume was 20 µL. The calibration curve for quantitative analysis was linear up to 40 µg.mL⁻¹ and the detection limit for retinol was 20 pg.

The mean and standard error of the mean (sem) of $n = 6$ determinations were calculated. Statistical comparisons were made using the Student's t -test (two-sample assuming equal variances) and analysis of variance (ANOVA, single factor) with the level of significance at $p \leq 0.05$.

2.1.9. Confocal laser scanning microscopy

Fluorescence microscopic images of Nile Red dye distribution were recorded on histological sections of skin using a Leica TCS-SP2 spectral confocal microscope at the "Centre Commun de Quantimétrie" technical facility of the University of Lyon [27]. This technique had become well-established to observe the drug distribution fluorescence in the *stratum corneum*, viable *epidermis*, *dermis*, and hair follicles [28]. All the formulations tested contained 0.05% of Nile Red in place of retinol. After exposure to Nile Red-loaded emulsions on the skin surface for 24 h, the applied sample was carefully removed with a cotton pad and the skin was rinsed with PBS buffer. Tissues were embedded in a resin and frozen at -20°C. 3 slices of 5 µm thickness were cut at 3 different areas with a cryocut going from *dermis* to *stratum corneum* side (vertical slices). Slices were hydrated in PBS before observation, a drop of fluorescent mounting medium with a cover-glass were applied on top, and both classical reflection and fluorescence microscopy pictures of skin slices were recorded. Upon excitation at 532 nm with laser diode, the emission was recorded between 589-708 nm using a Leica 20X/0.70 HLX PL APO objective. The images from the two techniques were superimposed to obtain the information of the Nile Red distribution in the different skin layers. The relative accumulation of Nile Red could be determined semi-quantitatively on the pictures from the fluorescence intensity in skin layers.

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterization of Pickering Emulsions Loaded with Retinol

3.1.1. Preparation Process

Two methods were used to prepare Pickering emulsions loaded with retinol or Nile Red. Method 1 yielding emulsions PE1 was the classical process for the preparation of Pickering

emulsions [4]. The block copolymer nanoparticles are prepared as a first stage according to the method of our previous reports [22,23]. The concentration of block copolymer particles was 7 wt% and the particle hydrodynamic diameters measured by dynamic light scattering were 32 nm for PCL-*b*-PEG nanoparticles and 50 nm for PLA-*b*-PEG nanoparticles. These aqueous suspensions of nanoparticles were used as an aqueous phase for the manufacture of an o/w emulsion in the second stage. Emulsification was made using mechanical stirring of the aqueous suspension of blank copolymer particles and a solution of retinol in MCT. A stable milky emulsion formed with mean droplet diameters of 3.0 μm for both PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG stabilizing nanoparticles. Since retinol was added as a solution in the oil phase and it is not soluble in water, it was solubilized inside the oil droplets at the end of emulsification process. Method 2 was a one-shot method yielding PE2 where the Pickering emulsion was prepared by spontaneous emulsification. An organic solution PLA-*b*-PEG or PCL-*b*-PEG block copolymer, retinol and MCT in acetone was slowly poured in water under gentle stirring. The mixture turned milky as the oil phase was added because an o/w emulsion formed. Acetone was evaporated under reduced pressure. According to the process, both block copolymer nanoparticles and oil droplets formed simultaneously as the acetone solution was mixed with water. The “spontaneous emulsification process”, also called “nanoprecipitation process” in case of polymer emulsions, yields nanoparticles with typical diameters of 100 nm. Emulsion droplets larger than 1 μm were formed in the present case because the oil content was 50 %, which was in very large excess with respect to the concentration range for a successful spontaneous emulsification process [25]. Since retinol and block copolymer were mixed together in acetone for the preparation of the emulsion, this process allows the loading of retinol inside the hydrophobic core of the block copolymer nanoparticles. As summary, the two processes yielded emulsions that were similar in their chemical compositions, droplet sizes and viscosities; an important difference was the possible drug loading of block copolymer nanoparticles in process PE2 whereas such phenomenon was not allowed in process PE1.

3.2.3. Influence of the Nanoparticle Type and Emulsification Process on the Distribution of Retinol

The block copolymer nanoparticles adsorbed at the surface of the oil droplets of Pickering emulsions, but there is a residual amount of block copolymer nanoparticles in the aqueous phase that did not adsorb. Those free nanoparticles are loaded with retinol upon implementation of process PE2 whereas there remain blank nanoparticles upon application of process PE1. The fractions of retinol solubilized inside oil droplets and block copolymer nanoparticles were determined by means of separation of the aqueous phase by ultracentrifugation. Pickering emulsions were centrifuged and possible residual particles issued from the two processes were assayed for their retinol content (Table 3). The concentration of retinol in the aqueous phase was very low in case of process PE1 whereas a significant fraction of retinol was found in the free block copolymer nanoparticles generated by the process PE2. The differences in retinol contained in the free nanoparticles also depended on the hydrophobic core of the nanoparticles, either PCL or PLA. The larger incorporation of retinol in free PCL-*b*-PEG nanoparticles was in agreement with the better solubilizing power of PCL disclosed from the comparison of Hildebrand solubility parameters of PCL, PLA and retinol [23]. This result also confirmed the coexistence of nanoparticles stabilizing oil droplets and free nanoparticles remaining in the aqueous phase.

| Retinol in the residual nanoparticles (%) | |
|---|------|
| PE1PCL | 0.45 |
| PE2PCL | 3.03 |
| PE1PLA | 0.23 |
| PE2PLA | 0.95 |

Table 3. Retinol amounts contained in the aqueous phase containing residual nanoparticles depending on the manufacturing process and the type of block copolymer. The retinol amount is expressed as a percentage of the total retinol.

3.2.4. Surface Coverage of Oil Droplets

The type of coating and surface coverage of the oil droplets was assessed by means of TEM pictures taken on replicas of freeze-fractured emulsions. TEM pictures showed the block copolymer nanoparticles when the fracture occurred at the interface between oil droplets and aqueous continuous medium. Definite differences were observed according to the block copolymer type and emulsification process. PE1PCL emulsion droplets were coated with a dense layer of PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles. The pictures show close-packed nanoparticles that ensure a full coverage of the oil droplets. On the contrary, PE2PCL emulsion droplets were coated with a loose layer of PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles that appear as well-separated strings. Large parts of the droplet surface are not covered with nanoparticles. Such low density of stabilizing nanoparticles was enough for an efficient stabilization of the oil droplet since the emulsions did not show coagulation or coalescence. The type of emulsification process changed drastically the coverage of the oil droplets. The oil droplet sizes were identical, which was a fortunate coincidence since the phenomena that control the droplet sizes were quite different. Process PE1 that was used for the preparation of emulsion PE1PCL was the classical emulsification process of an o/w emulsion: the stabilizing nanoparticles were dispersed in the aqueous phase in a first stage in the same way as the water-soluble emulsifier is dissolved in the aqueous phase for the fabrication of a conventional surfactant-based emulsion. Emulsification was performed in a second stage using a high shear rotor-stator device (UltraTurrax) so that the droplet size was controlled by the shear rate of the device. The droplet size (~3 μm) corresponded to the typical size of an o/w emulsion of a fluid oil using such an homogenizer. For the PE2PCL emulsion prepared according to the process PE2, oil droplets and block copolymer nanoparticles formed by means of phase separation as the solution in acetone was mixed with water. In the framework of the nucleation growth mechanism, very small oil droplets appeared during the nucleation stage, and they grew during the growth stage till the full oil has demixed. Sub-micron particles of ~100-200 nm diameter form under such a process in dilute medium. For the present emulsion containing 50% oil, the small droplets merge together very fast unless they get stabilized by the adsorbed stabilizing nanoparticles. PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles were also formed in situ during the mixing process. The final size of the oil droplets depended on the rates of demixion of oil, the rate of formation of block copolymer nanoparticles, and the rate of their adsorption at the surface of oil droplets. Coalescence of oil droplets stopped when the surface coverage by adsorbed of block copolymer nanoparticles was sufficient for ensuring the stabilization. At the end, oil droplets of ~3 μm formed with the partial coverage of their surface that allowed an efficient stabilization.

The TEM pictures of emulsion droplets stabilized by PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles were less characteristic and there was no obvious difference between emulsions prepared according to the processes PE1 and PE2. Full coverage of oil droplets was not reached for both PE1PLA and PE2PLA emulsions.

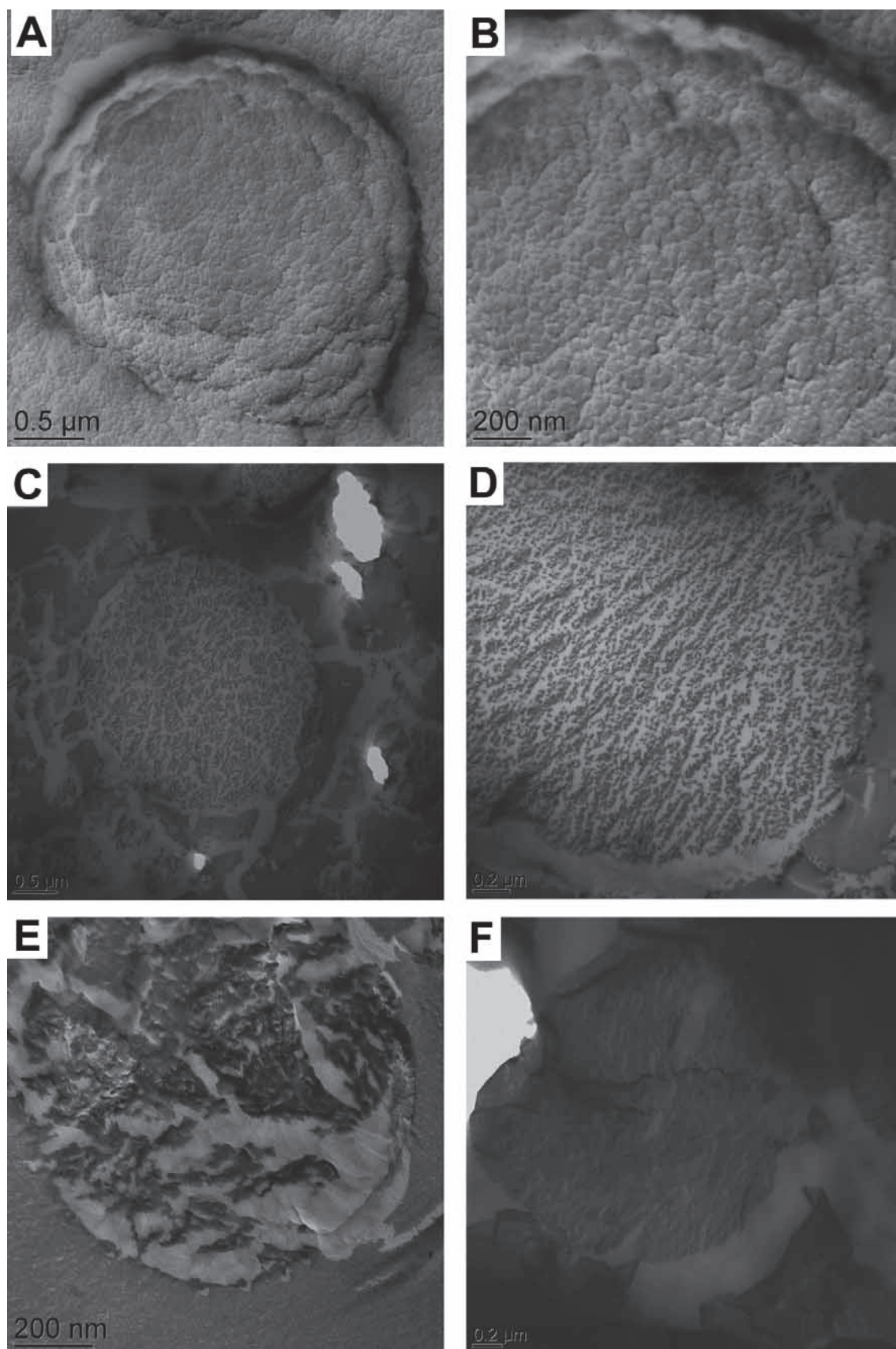


Figure 3. TEM pictures of Pickering emulsions after freeze-fracture. **A, B:** PE1PCL; **C, D** PE2PCL; **E:** PE1PLA; **F:** PE2PLA.

3.2. Retinol Delivery to Skin using Pickering Emulsions

Retinol absorption was measured *in vitro* on porcine skin using the Franz cell method. Pig skin has been shown to be the most relevant animal model for human skin [29]. Retinol was not detected in the receptor fluid because of its high hydrophobic behavior ($\log P = 5.65$). Indeed, it has been observed in many previous studies that retinol uses to accumulate in the *stratum corneum* [8,30]. Therefore, only the retinol distribution within the skin layers, dermis, viable epidermis and *stratum corneum* will be compared.

3.2.1. Total Skin Absorption of Retinol

Figure 4 show total retinol absorption in full thickness skin (dermis + epidermis). Retinol absorption in skin from Pickering emulsions was of the order of $1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; but there were significant differences between the different types of Pickering emulsions. All Pickering emulsions caused significantly larger retinol absorption than the classical emulsion and the solution in MCT oil ($0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Such enhanced retinol absorption from Pickering emulsions is in agreement with previous measurements on Pickering emulsions stabilized by silica particles [8,9,10]. The retinol absorption from Pickering emulsions was definitely lower than from block copolymer micelles however [23]. PLA-*b*-PEG particles achieved skin absorption of 1.9 % of applied dose while absorption from the classical emulsion and the Pickering emulsion were of 0.03 and 0.05 % of applied dose respectively. Such low absorption levels with respect to applied dose show that infinite dose conditions were satisfied in every instance.

The dependence of skin absorption on the type of stabilizing block copolymer nanoparticles and type of emulsification process is intriguing because the differences appeared rather large. Indeed there were statistically significant differences ($p < 0.05$ according to the Student's *t*-test) between PE1PLA and PE2PLA, between PE1PCL and PE2PCL, and between PE2PLA and PE2PCL. PE1PLA and PE1PCL showed similar retinol absorption levels.

A remarkable effect was the enhanced skin absorption from PE2PLA, compared to all other Pickering emulsions. Since this emulsion has been prepared by the process PE2 that causes loading of free block copolymer nanoparticles with retinol, it was suggested that the enhanced retinol absorption from PE2PLA emulsions with respect to PE1PLA came from the contribution of the retinol-loaded free block copolymer nanoparticles. Indeed the retinol absorption from free PLA-*b*-PEG nanoparticles was very high [23]. However, the effect is at the opposite for Pickering emulsions stabilized by PCL-*b*-PEG nanoparticles (PE2PCL is lower than PE1PCL), which suggests that another phenomenon is operating combined with the lower capacity of PCL-*b*-PEG than PLA-*b*-PEG for skin delivery of retinol [23].

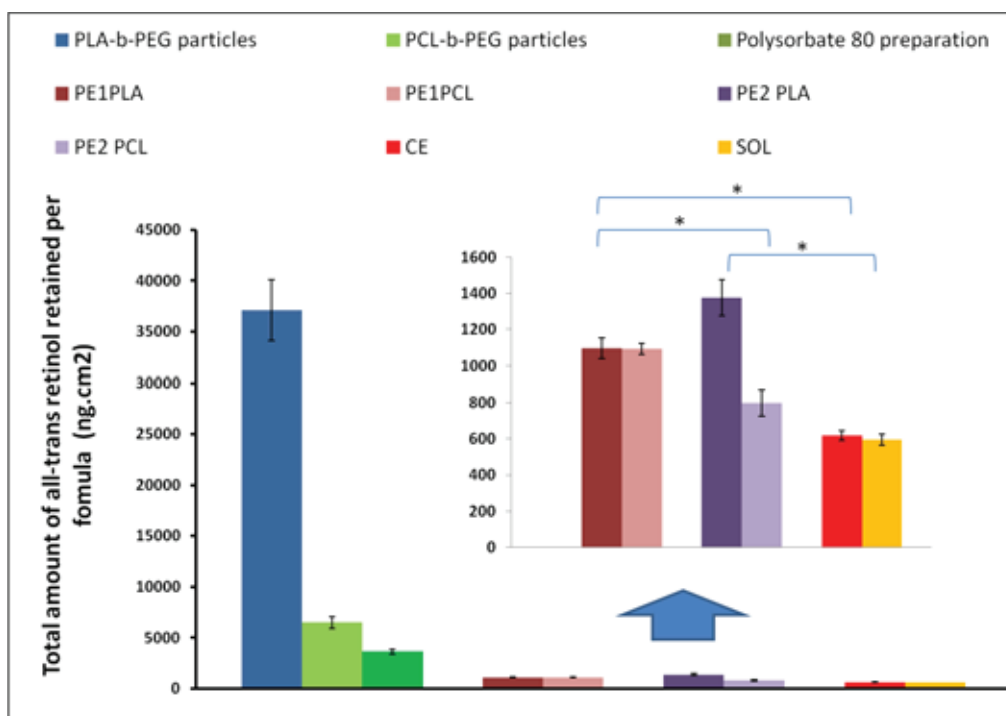


Figure 4. Total retinol retained in skin for each sample.

3.2.2. Retinol Distribution within Skin Layers

The overall results of retinol distribution within the dermis, viable epidermis and *stratum corneum* after 24 h exposure are presented in Figures 5, 6 and in Table 4.

The fraction of the penetrated amount retained in the *stratum corneum* was higher for all formulations compared to CE and SOL. The largest fraction of retinol (more than 50 % of the total absorbed amount) was retained in the *stratum corneum* for all formulations. The distribution profile between the different layers was formulation-dependent: 82% of the penetrated retinol was recovered in the SC for PE2PLA, 75% for PE2PCL. 53% and 60% of the penetrated drug was retained in *stratum corneum* for PE1PLA and PE1PCL while 20% and 16% respectively reached the viable *epidermis*. The distribution in skin layers was quite different for PEPLA and PEPCL depending on the process used. PE2PLA emulsion caused a higher retinol accumulation in the *stratum corneum*, whereas the absorption from all other emulsions (PE1PCL, PE2PCL and PE1PLA) was at the same level. This trend was the same as for the total absorbed amount, which was expected since the accumulation in *stratum corneum* made the major contribution to the total.

Pickering emulsions made using the conventional emulsification process (PE1) displayed similar penetration profiles regardless the stabilizing particles compared to CE and SOL. Conversely for process PE2, retinol absorption profile depended of the type of block copolymer nanoparticles (PE2PLA and PE2PCL). The larger absorption in *stratum corneum* observed for PE2PLA was the consequence of a large contribution of the retinol-loaded free PLA-*b*-PEG nanoparticles because of their very high ability for releasing retinol into the skin. This effect is less for PE2PCL because PCL-*b*-PEG nanoparticles were of lesser efficiency. Surprisingly, the high concentration of retinol stored in the *stratum corneum* did not cause a higher diffusion to the deeper layers of skin, viable epidermis and dermis. This result suggests that retinol-loaded block copolymer nanoparticles prevented retinol diffusion. Retinol appeared stored either in the *stratum corneum*, or in the hair follicles. The same hindered release of retinol to the dermis has also been observed for block copolymer nanoparticles [23]. Consequently, because of retinol retention in the uppermost skin layer, the amounts reaching

the *dermis* were significantly 4-fold higher for PE1PLA and PE1PCL (27% and 24%) with respect to PE2PLA and PE2PCL (5 and 7%).

| | PE1PLA | PE2PLA | PE1PCL | PE2PCL | CE | SOL |
|------------------------|--|--|--|--|--|--|
| | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total | ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) % of total |
| Stratum corneum | 0.60±0.08 53 | 1.13±0.17 82 | 0.65±0.05 60 | 0.60±0.01 75 | 0.37±0.03 59 | 0.40±0.03 66 |
| Epidermis | 0.20±0.03 20 | 0.18±0.02 13 | 0.18±0.01 16 | 0.14±0.02 18 | 0.11±0.01 18 | 0.088±0.02 15 |
| Dermis | 0.30±0.05 27 | 0.07±0.04 5 | 0.026±0.01 24 | 0.06±0.02 7 | 0.14±0.03 22 | 0.11±0.03 19 |
| Total | 1.10 | 1.40 | 1.10 | 0.80 | 0.62 | 0.60 |

Table 4. Distribution of retinol in skin layers after 24 h exposure to the different emulsions and control samples. Applied dose was $2.0 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$.

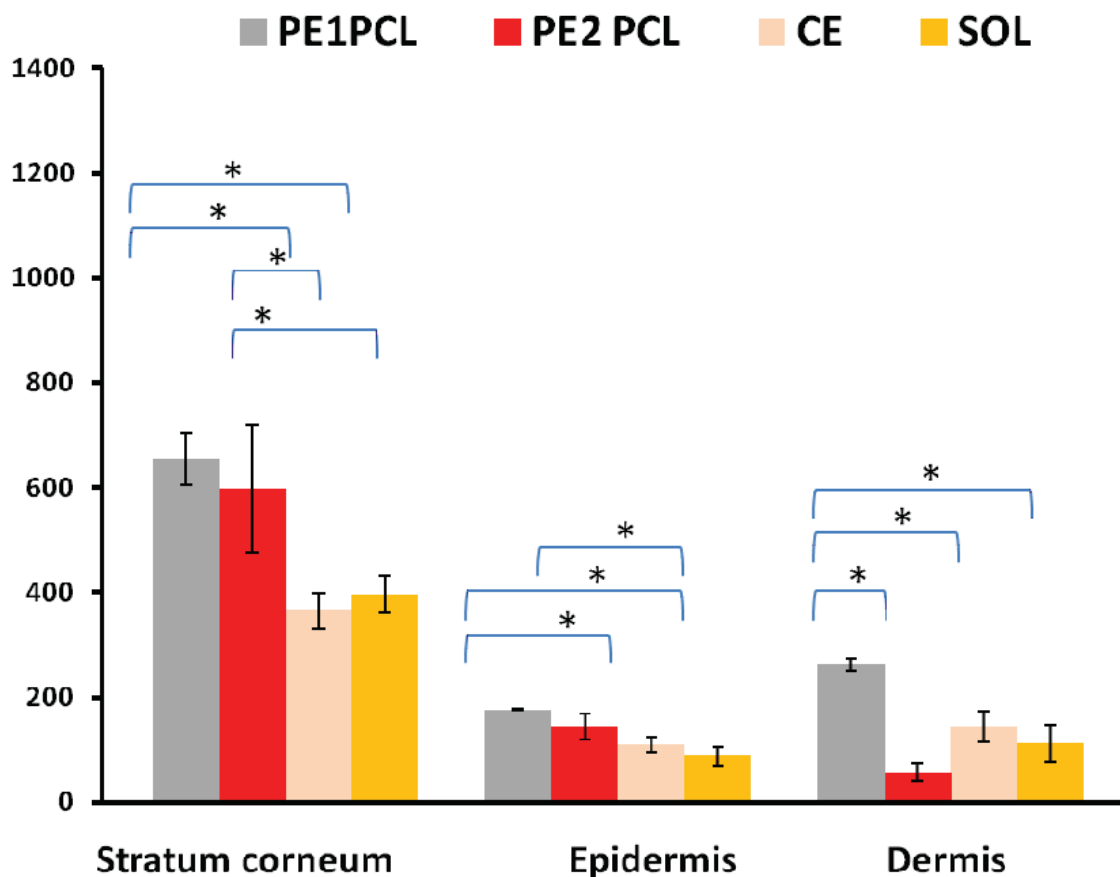


Figure 5. Effects of formulation type on skin distribution of retinol in the excised pig skin after 24 h exposure to retinol. PE1PCL, PE2PCL, CE and SOL. Mean \pm sem, $n = 6$.

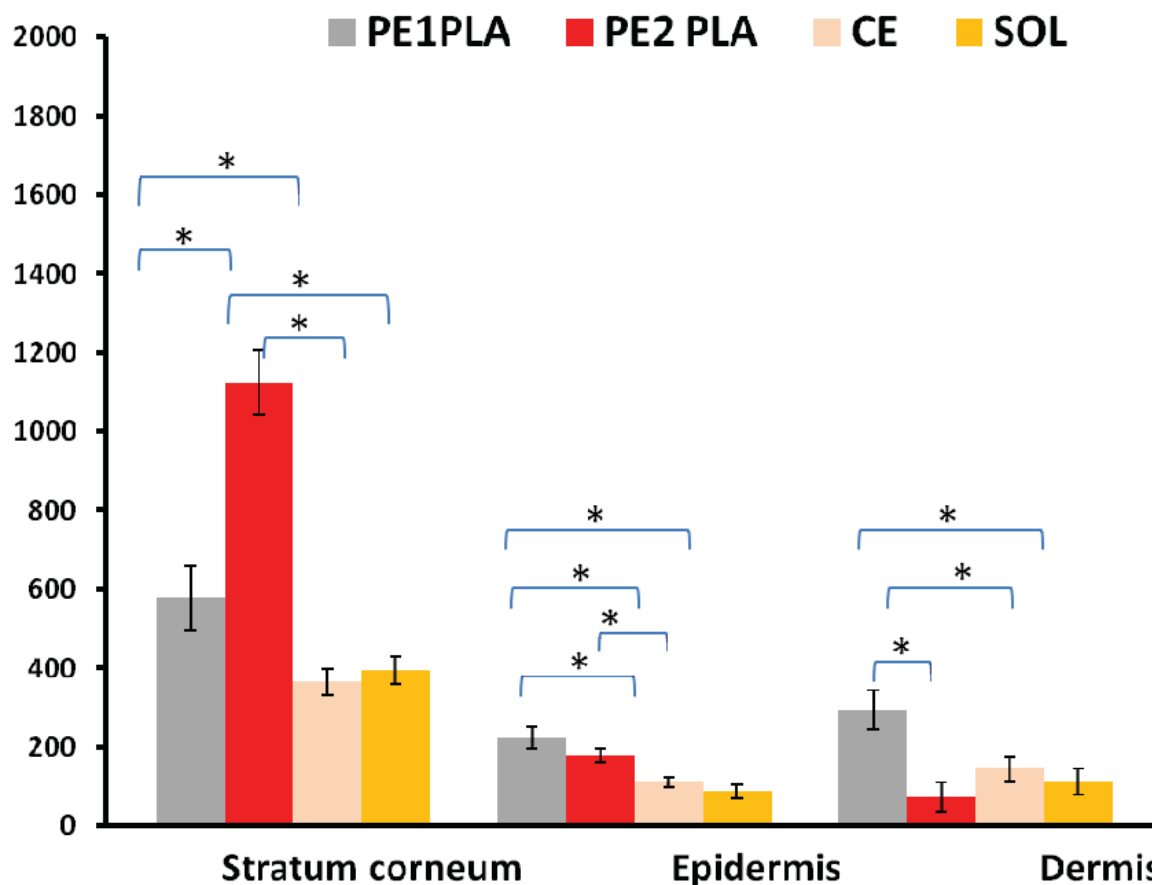


Figure 6. Effects of formulation type on skin distribution of retinol in the excised pig skin after 24 h exposure to retinol. PE1PLA, PE2PLA, CE and SOL. Mean \pm sem, $n = 6$.

3.3. Distribution of Nile Red within Skin Layers

Fluorescence images of vertical sections of pig skin were taken after 24 h exposure to Nile Red-loaded emulsions and block copolymer nanoparticles (Figure 7). Measurements of the natural fluorescence background of pig skin coming from endogenous fluorescent species performed on pig skin sample that have been exposed to pure water in the same conditions as for the emulsion samples gave negligibly small values in the conditions where the fluorescence of Nile Red was measured (data not shown).

The intensity of the dye fluorescence was quite different from one preparation to another. A high fluorescence emission of the dye was mostly observed for particles suspension made with PLA-*b*-PEG block copolymer. Indeed, skin absorption of Nile Red occurred in a very intense manner including *stratum corneum*, *epidermis* and a large part of the *dermis*. On the other hand, the Pickering emulsion PE2PLA had also shown a noticeably greater intensity of the penetrated dye through *stratum corneum*, *epidermis* and *dermis* compared to PE1PLA. In the case of PE1PCL and PE2PCL and PCL-*b*-PEG particles, a higher intensity of fluorescence was observed in *stratum corneum* compared to *epidermis* and *dermis* showing a larger accumulation of the dye at the skin surface. This came as complete variance with the classical emulsion where delivery of the probe achieved a very poor penetration.

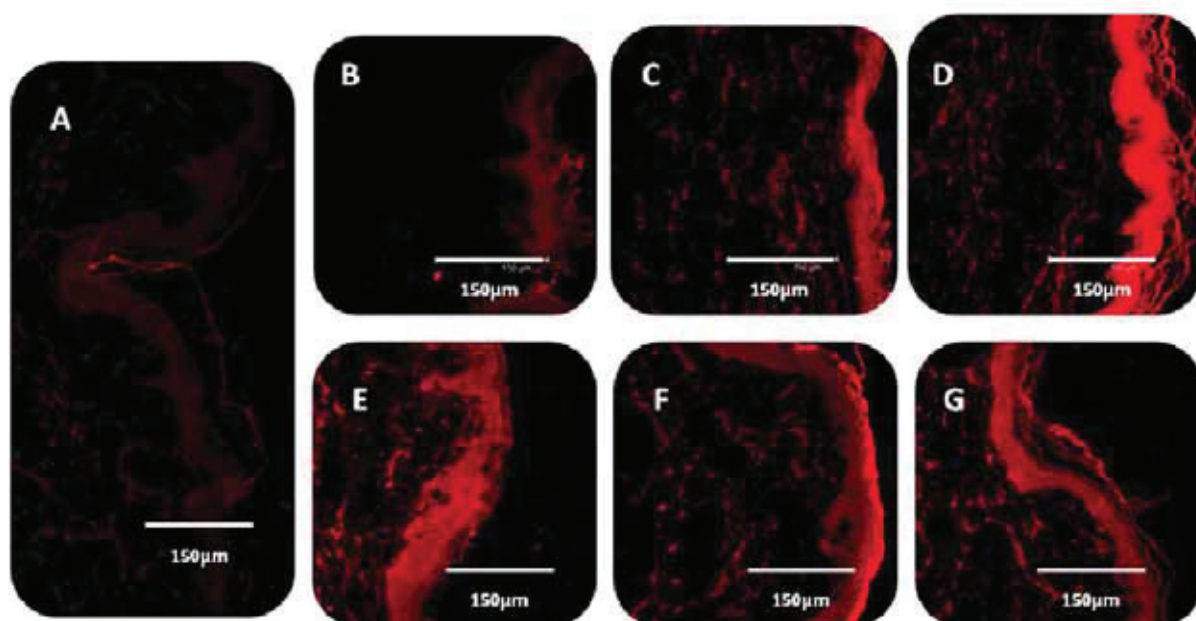


Figure 7. Confocal fluorescence images revealing the penetration and distribution of Nile Red within pig skin after being exposed for 24 h to (top. from left to right): (A) CE, (B) PE1PLA, (C) PE2PLA, (D) PLA-*b*-PEG particles, (down. From left to right): (E) PE1PCL, (F) PE2PCL, (G) PCL-*b*-PEG particles.

Evidence of accumulation in hair follicles has also been given after exposure to block copolymer nanoparticles loaded with Nile Red [23]. This showed that Nile Red accumulated inside the hair follicle openings in accordance with the well-documented accumulation of nanoparticles in skin appendages. However, this previous study also showed that the accumulation in the *stratum corneum* was large, and that the contributions of storage in the *stratum corneum* and hair follicles were of the same magnitude.

4. Discussion

The differences of retinol (and Nile Red) delivery to skin from Pickering emulsions having the same composition but a different manufacture process strongly suggests that retinol-loaded free block copolymer nanoparticles contribute to the skin delivery. This statement is based on the results of the emulsions stabilized by PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles, PE1PLA and PE2PLA. PCL-*b*-PEG nanoparticles did not show this effect. Or this effect that increased the drug delivery was compensated by a second effect acting at the opposite. All emulsions have been designed such as to be very similar, so that differences between them are few. Electron microscopy revealed differences of coverage of the oil droplets by the PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles according to the preparation process, PE1 or PE2. This effect was less for emulsions stabilized by the PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles. The combined effects of the free nanoparticles and the surface coverage of oil droplets is the basis of the following discussion.

The contribution of retinol-loaded free nanoparticles was calculated from the results of experiments performed with block copolymer nanoparticles loaded with retinol [23]. The concentration of retinol was 0.5 wt% and that of nanoparticle was 7 wt% in these experiments. In the present case, the concentration of retinol present in the aqueous phase of the emulsions has been determined by centrifugation and HPLC analysis of the aqueous layer. Although the concentrations of free nanoparticles in the experiments on pure free

nanoparticles and on Pickering emulsions were obviously different, the retinol delivery in considered as primarily controlled by the concentration of retinol. This hypothesis considers that for a given concentration of retinol, a lesser concentration of block copolymer nanoparticles results in a higher concentration of retinol inside each particle. The two effects compensate; a lower concentration of carriers is compensated by a higher loading of each carrier. Therefore, the contribution of free block copolymer nanoparticles (NP) was

$$\text{Contribution of free NP} = \frac{\text{Skin uptake by NP}}{\text{Total skin uptake}} = \frac{\text{Skin uptake in } ref}{[\text{Retinol}]_{ref}} [\text{Retinol}]_{aq}$$

where *ref* stands for the reference experiments with PLA-*b*-PEG and PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles [23] and $[\text{retinol}]_{aq}$ is the concentration of retinol in the aqueous phase of the Pickering emulsions PE2PLA and PE2PCL reported in Table 3. The same calculation held for the retinol uptake by *stratum corneum*, giving similar results.

| | In full thickness skin | | In <i>stratum corneum</i> | |
|---------------|---|---|---|---|
| | Retinol uptake ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) [23] | Contribution of free nanoparticles (%) | Retinol uptake ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) [23] | Contribution of free nanoparticles (%) |
| PE2PCL | 37 | 24.6 | 32 | 24.7 |
| PE2PLA | 6.5 | 25.1 | 4.9 | 27.6 |

Table 5. Calculation of the contribution of the retinol-loaded free micelles in Pickering emulsions PE2 to the skin absorption.

Although the fraction of retinol in the aqueous phase was low (Table 3), its contribution was high (~25%) because it was loaded in effective carrier. The contribution of PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles was as high as for PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles because their higher loading by retinol compensated their lesser efficiency for releasing retinol into skin. The transport of retinol by free PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles accounted for the full experimental values, so that it was not necessary to search for any supplementary phenomenon. Indeed, the contribution of retinol delivery from free PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles amounting to $0.35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ corresponded quite well to the difference of retinol skin absorption between PE2PLA and PE1PLA. As a corollary, the skin delivery from the emulsion droplets of PE2PLA and PE1PLA were the same, which meant that the surface coating of the Pickering emulsions, either were similar, or did not matter so much. Indeed the TEM picture of cryo-fractured PE2PLA and PE1PLA emulsions did not reveal significant differences.

The present analysis based on the supplementary contribution of free block copolymer nanoparticles was not enough to account for the data of Pickering emulsions stabilized by PCL-*b*-PEG block copolymer nanoparticles. The influence of the surface coating by block copolymer nanoparticles may be considered, in particular the surface coverage of oil droplets by nanoparticles. Indeed, TEM pictures of oil droplets have shown a dense coverage of PE1PLA droplets by nanoparticles, whereas adsorbed nanoparticles were sparsely distributed at the surface of PE2PLA droplets, leaving bare parts of the oil-water interface.

Whatever the mechanisms, it is worth noticing that the choice of the type of block copolymer and the process give a ready way to control the delivery of hydrophobic drugs inside the skin. The control over the amount of retinol entering the skin covers a wide range since the lowest value of retinol absorption was $\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 24 h exposure of an emulsion containing 0.5 %

of retinol, and the largest value of $37 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ was reached for PLA-*b*-PEG block copolymer nanoparticles loaded with 0.5 % retinol under the same conditions. All such formulations allow a high drug delivery than the classical surfactant-based emulsion and the oil solution. A supplementary advantage of the Pickering emulsion drug delivery platform is the control over the delivery site. Indeed the delivery to the dermis was very low for the Pickering emulsion fabricated under the process PE2, slightly larger when the process PE1 is implemented, and definitely high for block copolymer nanoparticles compared to the controls (classical emulsion and MCT oil solution).

5. Conclusion

Pickering emulsions enhance the delivery of hydrophobic drugs into skin in accordance with previous observation reported in the literature. This is an interesting alternative to the utilization of chemical penetration enhancers. The present Pickering emulsions were made of biocompatible and biodegradable materials, which improve the safety of the topical dosage forms.

A detailed knowledge of the properties of block copolymer is useful for the selection of a suitable formulation because several physicochemical phenomena influence the drug diffusion into skin. The type of block copolymer and the emulsification process control the coverage of the oil droplets, the interactions between the drug molecule and the hydrophobic block of the copolymer controls the drug loading under process PE2 and the drug transfer from the free polymer nanoparticles to the skin.

These results open opportunities to control drug delivery through skin by simply choosing either the emulsification process or the type of stabilizing nanoparticles. In particular, the dual solubilization of the drug in the emulsion droplets and in the organic stabilizing nanoparticles provides an easy way to modulate the skin delivery. The amount of free block copolymer nanoparticles can be varied by changing the concentration of block copolymer in the recipe. Besides the biocompatibility and biodegradability, organic nanoparticles can be loaded at will with drugs, which is a supplementary benefit over inorganic particles.

References

-
- [1] R. Aveyard, B.P. Binks, J.H. Clint, Emulsions stabilized solely by solid colloidal particles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 100-102 (2003) 503–546.
 - [2] B.P. Binks, Particles as surfactants – similarities and differences, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7 (2002) 21–41.
 - [3] B.P. Binks, T.S. Horozov, *Colloidal particles at liquid interfaces*. Cambridge University Press (2006).
 - [4] Y. Chevalier, M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, *Colloids Surfaces A* (2013) in press.
 - [5] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, J.-P. Valour, H. Mouaziz, J. Pelletier, Y. Chevalier, Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery, *Int. J. Pharm.* 368 (2009) 7-15.
 - [6] N. Ghouchi Eskandar, S. Simovic, C.A. Prestidge, Mechanistic insight into the dermal delivery from nanoparticle-coated submicron o/w emulsions, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 890–904.
 - [7] D. Marku, M. Wahlgren, M. Rayner, M. Sjöö, A. Timgren, Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations, *Int. J. Pharm.* 428 (2012) 1–7.
 - [8] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, J.-P. Valour, Y. Chevalier, Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions, *Int. J. Pharm.* 371 (2009) 56–63.

-
- [9] N. Ghouchi Eskandar, S. Simovic, C.A. Prestidge, Nanoparticle coated submicron emulsions: Sustained *in-vitro* release and improved dermal delivery of all-*trans*-retinol, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1764–1775.
- [10] S. Simovic, N. Ghouchi-Eskandar, C.A. Prestidge, Pickering emulsions for dermal delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21 (2011) 123–133.
- [11] S.U. Pickering, Emulsions, *J. Chem. Soc.* 91 (1907) 2001–2021.
- [12] J. Frelichowska, M.-A. Bolzinger, Y. Chevalier, Pickering emulsions with bare silica, *Colloids Surfaces A* 343 (2009) 70–74.
- [13] B.P. Binks, J.H. Clint, Solid wettability from surface energy components: Relevance to Pickering emulsions, *Langmuir* 18 (2002) 1270–1273.
- [14] B.P. Binks, J.H. Clint, G. Mackenzie, C. Simcock, C.P. Whitby, Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions, *Langmuir* 21 (2005) 8161–8167.
- [15] L.S. Dorobantu, A.K.C. Yeung, J.M. Foght, M.R. Gray, Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), 6333–6336.
- [16] P. Wongkongkatep, K. Manopwisedjaroen, P. Tiposoth, S. Archakunakorn, T. Pongtharangkul, M. Suphantharika, K. Honda, I. Hamachi, J. Wongkongkatep, Bacteria interface Pickering emulsions stabilized by self-assembled bacteria-chitosan network, *Langmuir* 28 (2012) 5729–5736.
- [17] J. He, Z. Niu, R. Tangirala, J.-Y. Wang, X. Wei, G. Kaur, Q. Wang, G. Jutz, A. Boker, B. Lee, S.V. Pingali, P. Thiyagarajan, T. Emrick, T.P. Russell, Self-assembly of tobacco mosaic virus at oil/water interfaces, *Langmuir* 25 (2009) 4979–4987.
- [18] G. Kaur, J. He, J. Xu, S.V. Pingali, G. Jutz, A. Boker, Z. Niu, T. Li, D. Rawlinson, T. Emrick, B. Lee, P. Thiyagarajan, T.P. Russell, Q. Wang, Interfacial assembly of turnip yellow mosaic virus nanoparticles, *Langmuir* 25 (2009) 5168–5176.
- [19] I. Kalashnikova, H. Bizot, B. Cathala, I. Capron, New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals, *Langmuir* 27 (2011) 7471–7479.
- [20] I. Kalashnikova, H. Bizot, B. Cathala, I. Capron, Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface, *Biomacromolecules* 13 (2012) 267–275.
- [21] M.V. Tzoumakia, T. Moschakis, V. Kiosseoglou, C.G. Biliaderis, Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles, *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 1521–1529.
- [22] F. Laredj-Bourezg, Y. Chevalier, O. Boyron, M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid organic particles, *Colloids Surfaces A* 413 (2012) 252–259.
- [23] F. Laredj-Bourezg, M.-A. Bolzinger, J. Pelletier, J.-P. Valour, M.-R. Rovère, B. Smatti, Y. Chevalier, Skin delivery by block copolymer nanoparticles, *J. Control. Release*, submitted.
- [24] H. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies, Procédé de dispersion de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules, Patents FR 2608988 (1986); EP 0275796 (1987); US 5118528 (1992).
- [25] S. Staimesse, A.-M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, H. Fessi, Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.* 273 (1995) 505–511.
- [26] OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment: number 28, 2004.
- [27] <http://quantimetrie.univ-lyon1.fr>
- [28] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, H. Fessi, R.H. Guy, Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 301–316.

-
- [29] M.J. Bartek, J.A. LaBudde, H.I. Maibach, Skin permeability *in vivo*: Comparison in rat, rabbit, pig and man, *J. Invest. Dermatol.* 58 (1972) 114–123.
- [30] G. Marti-Mestres, J.P. Mestres, J. Bres, S. Martin, J. Ramos, L. Vian. The “*in vitro*” percutaneous penetration of three antioxidant compounds, *Int. J. Pharm.* 331 (2007) 139–144.

Conclusion générale

L'objectif principal de cette étude est de stabiliser des émulsions huile-dans-eau avec des particules biodégradables et d'évaluer leur intérêt pour l'application cutanée. Des études physico-chimiques ainsi que des observations en microscopie électronique ont été réalisées afin d'étudier les caractéristiques physico-chimiques des particules en suspension aqueuse et leur mécanismes d'adsorption aux interfaces et de les relier aux propriétés des émulsions obtenues. Dans un deuxième temps, des études biopharmaceutiques cutanées ont été entreprises avec un traceur lipophile afin d'étudier l'influence de l'interface « solide » créée sur la libération de l'actif modèle incorporé dans la phase interne des émulsions mais aussi encapsulé dans les nanoparticules. Ces dernières ont été ainsi testées comme vecteurs de cet actif lipophile pour l'application cutanée. Trois types particulières ont été étudiés dans cette étude : 1) des particules de polycaprolactone stabilisées par un copolymère à blocs du type polycaprolactone-bloc-polyéthylène glycol (PCL-*b*-PEG), 2) des nanoparticules de PCL-*b*-PEG, et 3) des nanoparticules de PLA-*b*-PEG.

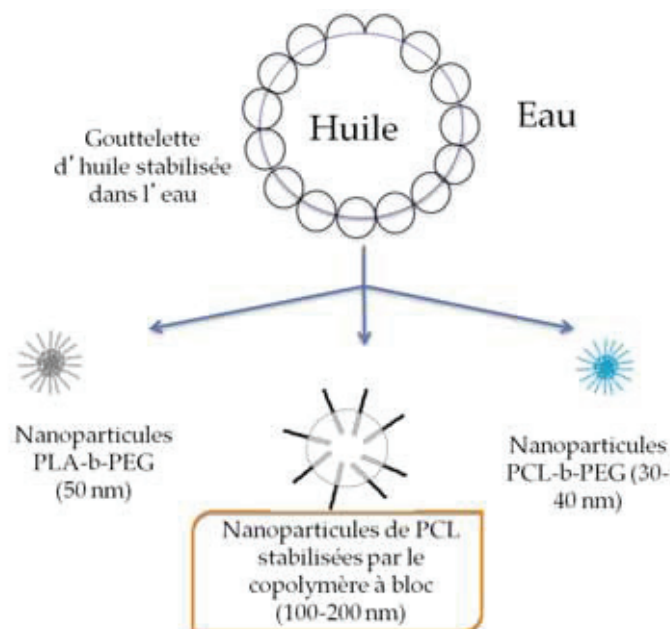


Figure 1. Représentation graphique des trois types particulières utilisés comme stabilisants des émulsions huile-eau.

Deux copolymères biocompatibles, possédant une partie polyéthylène glycol hydrophile et une partie hydrophobe constituée de Polycaprolactone ou d'acide polylactique ont été synthétisés et caractérisés. La formation de ces copolymères à blocs a été vérifiée par RMN du proton et DSC.

Les copolymères di-blocs obtenus possèdent un caractère amphiphile. En effet, ils sont composés d'une partie hydrophile : Polyéthylène glycol et d'une partie hydrophobe : la polycaprolactone ou l'acide polylactique avec un rapport massique PEG-PCL de (5 : 6) et PEG-PLA de (5 : 13).

Le degré de polymérisation de la partie polycaprolactone/acide polylactique détermine la solubilité du copolymère dans l'eau et son HLB. En effet, il a été démontré que seuls les copolymères PCL₁₁₄₀-*b*-PEG₅₀₀₀ (Chausson et al. 2008) et le PLA₂₀₀₀-*b*-PEG₅₀₀₀ (Heald et al. 2002) étaient solubles dans l'eau. Pour des degrés de polymérisation supérieurs, les copolymères obtenus étaient insolubles dans l'eau. Les copolymères synthétisés dans le cadre de notre étude possèdent une longueur de chaîne du PEG constante (5000 g/mole) mais différent par la longueur des chaînes hydrophobes (6000 et 13000 g/mole pour le PCL et PLA respectivement). Ils sont insolubles dans l'eau.

Le premier type particulière investigué était constitué de polycaprolactone stabilisée par un copolymère à blocs du type PCL-*b*-PEG. Ces particules ont déjà été utilisées comme vecteurs de principes actifs (Basile et al. 1995; Dong et Feng 2004; Yoo et Park 2001; X. Zhang, Jackson, et Burt 1996; Chawla et Amiji 2002; Coombes et al. 1997; Diab et al. 2010). Le procédé de nanopréciipitation classiquement utilisé (H. Fessi and F. Puisieux and J.Ph. Devissaguet and N. Ammoury and S. Benita 1989) a été modifié de manière à s'affranchir de l'utilisation des tensioactifs habituellement utilisés pour stabiliser ce type de particules. Le but visé était d'accroître la concentration en particules des suspensions aqueuses obtenues et ceci en s'affranchissant des paramètres liés au procédé tels que l'évaporation ou la lyophilisation dont les résultats se sont avérés peu reproductibles. Ainsi, la concentration en particules obtenues a été multipliée par 8.

Afin d'utiliser une quantité minimale de copolymère à blocs, différents rapports massiques (*RM*) **copolymère/polymère** ont été testés. Les résultats montrent que les $RM < 0.1$ ne permettent pas d'obtenir des suspensions stables en particules. Une valeur de *RM* de 0.1 a été identifiée comme un seuil à partir duquel l'obtention de particules stables était possible. De

plus l'augmentation du RM de 0.1 à 2 a été accompagnée d'une réduction de la taille des particules alors que le phénomène contraire a été observé en stabilisant des particules de polystyrène à l'aide d'un copolymère polystyrène-PEG (Budijono et al. 2010).

Les nanoparticules de polycaprolactone stabilisées par le copolymère PCL6000-*b*-PEG5000 ($RM = 1/2$, concentration en particules = 5% m/v) obtenues par le procédé de nanopréciipitation modifié ont été utilisées avec succès pour stabiliser des émulsions de triglycérides à chaînes moyennes dans l'eau. Ainsi des émulsions renfermant de 10 à 50% m/v de phase interne avec de 0.5 à 3% (m/v) de particules ont montré une très bonne stabilité à la coalescence après conservation à 25 et 40°C.

Des nanoparticules avec un rapport massique $< 1/2$ ont également été testées pour leur capacité à stabiliser des émulsions huile/eau. Les résultats ont montré que pour un $RM < 0.25$, il n'était pas possible d'obtenir des émulsions stables.

Un dosage du PEG (annexe 1) constituant les particules en excès a été effectué sur le surnageant obtenu après centrifugation des suspensions de particules. Les résultats ont montré la coexistence au-delà d'un RM de 0.07, de particules de polycaprolactone (130-160 nm) mais aussi de micelles de copolymère de tailles de l'ordre de 30-40 nm par analyse du surnageant en DLS.

Il est donc évident que

- la proportion de micelles présentes dans la plage de RM allant de 0.07 à 0.1 était insuffisante pour stabiliser la polycaprolactone émulsifiée par nanopréciipitation. L'obtention de nanoparticules de polycaprolactone stables est possible pour des $RM > 0.1$;
- la proportion de micelles coexistant avec les nanoparticules pour des RM de 0.1 à 0.25 ne permettent pas de stabiliser des émulsions huile-dans-eau.
- L'obtention d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par ces deux types particuliers (coexistant) n'est possible qu'à partir d'un $RM > 0.25$.

Ces résultats ont mis en évidence le potentiel de ces micelles en excès à stabiliser des émulsions huile dans l'eau en plus de la possibilité de mettre au point des émulsions

stabilisées par deux types particuliers différents ayant le double potentiel d’agir comme de véritables vecteurs encapsulant des actifs thérapeutiques ou cosmétiques.

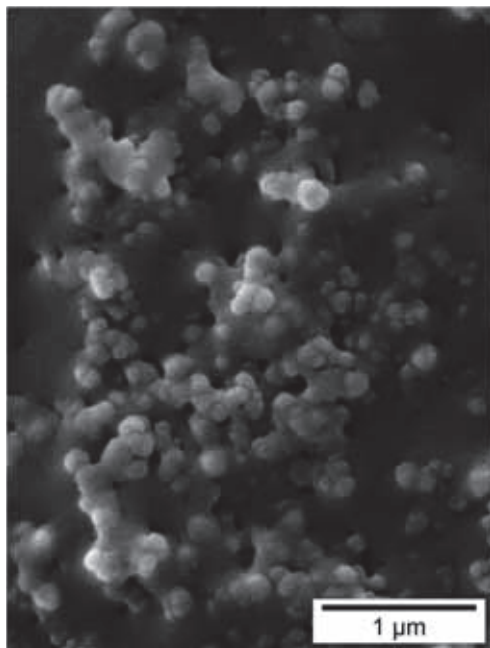


Figure 2. Image en microscopie électronique à balayage (MEB) de nanoparticules de PCL/PCL-*b*-PEG avec un *RM* de 1/2.

Dans la suite de notre travail, nous nous sommes donc intéressés au potentiel des copolymères à blocs du type PCL-*b*-PEG (6 :5) et PLA-*b*-PEG (13 :5) à former des micelles solides qui pourraient éventuellement agir comme des stabilisants de Pickering. Ces pseudo-micelles constitués uniquement à l’issue d’un procédé de nanoprécipitation coexistent dans un état de non équilibre thermodynamique suite à l’élimination du solvant organique et seront donc assimilés à des particules solides (Zhang & Eisenberg 1995). En effet, ils diffèrent des micelles formées par les tensioactifs classiques de faible poids moléculaire dont l’équilibre thermodynamique est assuré par un échange perpétuel des molécules tensioactives entre la micelle formée et l’extérieur. Ces derniers forment spontanément des micelles dès leur introduction dans l’eau, tandis que les copolymères à blocs utilisés, insolubles dans l’eau ne s’organisent en micelles qu’après dissolution dans un solvant organique approprié et introduction dans l’eau (Gohy 2005; Allen, Maysinger, et Eisenberg 1999). Les concentrations micellaires critiques décrites dans la littérature sont de l’ordre de 10^{-6} - 10^{-7} M pour des copolymères de tailles similaires (Fairley, Hoang, et Allen 2008; Choi et al. 2006).

Deux copolymères à blocs différant par la nature et longueur de la partie hydrophobe ont été utilisés pour fabriquer ces particules. Le procédé de nanoprécipitation a été modifié par inversion des volumes des solvants organique et aqueux habituellement utilisés afin d’obtenir des suspensions aqueuses concentrées.

Les suspensions de particules obtenues avaient des concentrations de 5%-10% (m/v) avec des distributions de tailles étroites ($PDI < 0.2$) confirmées par des observations en cryo-MET. Elles ont également montré une très bonne stabilité colloïdale dans le temps.

Les spectres *RMN* du proton et du ^{13}C ont montré des mouvements moléculaires très ralentis mais présents pour les pseudo-micelles de PCL-*b*-PEG.

Le confinement des chaînes de polycaprolactone dans des particules aussi petites (taille déterminée par DLS de l'ordre de 30 nm) inhibe sa cristallisation (Cho et al. 2006). Celui-ci se conduit comme un polymère fondu à température ambiante.

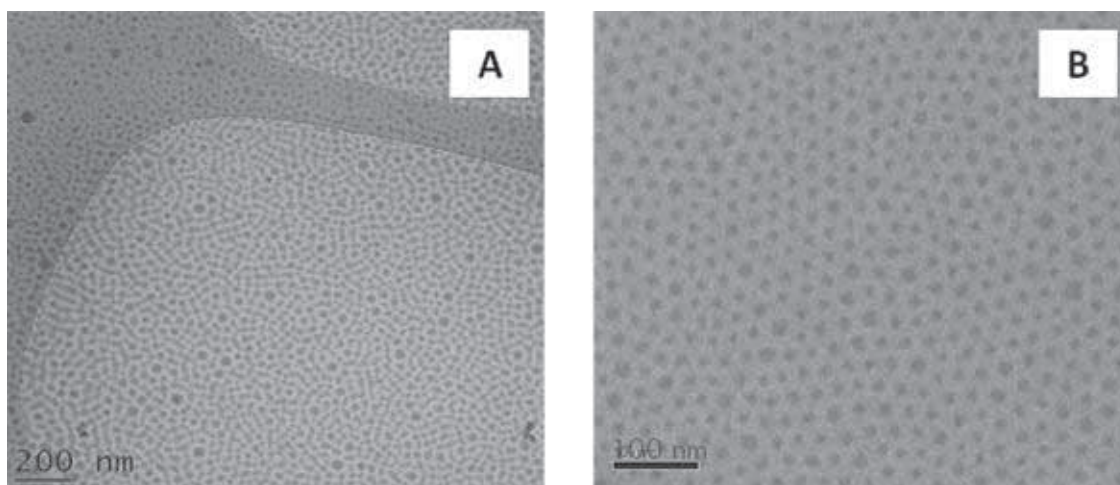


Figure 3. Images de Cryo-TEM des nanoparticules de PLA-*b*-PEG (A) et PCL-*b*-PEG (B) en suspension aqueuse.

Les pseudo-micelles à base de PLA-*b*-PEG quant à elles ont montré une structure interne solide avec des mouvements moléculaires inexistant. Ceci a été montré pour des polymères ayant une température de transition vitreuse élevée. Les particules formées qualifiées de « Frozen micelles » présentaient un cœur solide, vitreux complètement figé (Riess 2003; Riley et al. 2001).

Les spectres réalisés en diffusion de neutrons pour les deux types de particules dans l'eau deutérée ont montré que la structure des particules était bien du type écorce-couronne (Riley et al. 2003; Haag 2004). Le rayon du cœur hydrophobe R_1 était de l'ordre de 9 nm alors que le diamètre externe était deux fois supérieur. Le gonflement extrême des chaînes de PEG dans l'eau a permis la formation d'une couronne hydrophile très dense.

En effet, la couronne renfermait 25% de PEG et 75% d'eau. Le gonflement du PEG par l'eau a entraîné l'augmentation de la fraction de volume des nanoparticules de ~30 % alors que la concentration en polymères était seulement de 7%.

Les interactions répulsives de type stérique entre les nanoparticules étaient fortes de par l'extrême gonflement des couronnes de PEG. Les distributions de taille des particules de PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG étaient resserrées puisque les variances des distributions de Schulz pour les rayons étaient de $\sigma^2 = 3.2 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 20 \%$) and $\sigma^2 = 7.3 \text{ nm}^2$ ($\sigma/R_1 = 30 \%$) respectivement.

Les tailles des nanoparticules mesurées concordent également avec les tailles mesurées en DLS. Les nombres d'agrégation calculés étaient de 200 et 280 pour le PLA-*b*-PEG et le PCL-*b*-PEG respectivement. Une chaîne plus longue du PLA s'accompagnerait donc d'un empilement maximal comparée à celle du PCL.

Tableau 1. Paramètres de structure calculés à partir des études de diffusion de neutrons et en DLS.

| Nanoparticules de copolymère à blocs | PCL- <i>b</i> -PEG | PLA- <i>b</i> -PEG |
|---|--------------------|--------------------|
| N^1 | 280 | 200 |
| N_{hydr}^2 | 2000 | 1900 |
| $\sigma^2 (\text{nm}^2)^3$ | 3.2 | 7.3 |
| $R_1 : (\text{nm})^4$ | 9.3 | 8.6 |
| $R_2 (\text{nm})^5$ | 18.2 | 16.3 |
| Tailles mesurées en DLS (nm) ⁶ | 30 | 50 |

1: Nombre d'agrégation

2 : Nombre d'hydratation = molécules d'eau par chaîne de PEG

3 : Variance de la distribution de taille

4 : Rayon du Cœur hydrophobe

5 : Rayon de la couronne gonflée d'eau

Des études de diffusion de neutrons similaires faites sur des pseudo-micelles formées par des copolymères PLA-*b*-PEG (3 : 5, 15 : 5, et 45 : 5) ont montré une plus forte densité de greffage des chaînes PEG dans le cas du PLA-*b*-PEG (3 : 5) comparé aux deux autres (Riley et al. 2003). Ainsi, la surface occupée par un PEG était de 1.9, 4.8, et 7.8 nm² pour les compositions 3 : 5, 15 : 5 et 45 : 5 respectivement. Les chaînes de PEG montraient un état de solvation élevé ainsi qu'une courbure de surface beaucoup plus accentués. Les auteurs avaient postulé une structure conique du copolymère au sein de la micelle tout en observant des différences dans les fractions volumiques du PEG en fonction de la longueur de la chaîne PLA. Une chaîne PLA plus longue s'accompagnait d'une densité plus faible en chaînes PEG mais plus homogène. L'expansion radiale rapide des chaînes de polyéthylène glycol loin des chaînes hydrophobes permet de réduire la courbure au sein de la structure en brosse.

L'étude du diagramme ternaire eau-acétone-copolymère par diffusion de neutrons a montré une inversion de structure au fur et à mesure que l'eau était ajoutée dans le système. Cependant l'inversion de structure aboutissant à la forme particulière finale semble intervenir à des pourcentages différents d'eau pour les deux copolymères. Ceci a été attribué à la différence de polarité des chaînes hydrophobes des deux copolymères. Le PLA étant plus polaire serait plus soluble dans les mélanges acétone/eau. L'ajout continu d'eau dans le milieu provoquerait une chute de solubilité intervenant plus tôt pour les chaînes de PCL forçant l'inversion de structure.

Ces deux types de nanoparticules ont été utilisés pour stabiliser des émulsions de triglycérides à chaînes moyennes dans l'eau. Deux procédés d'émulsification ont été développés.

Le premier consistait à préparer des suspensions aqueuses de nanoparticules par le procédé de nanoprécipitation optimisé puis à réaliser l'émulsion huile-eau par un homogénéisateur de type rotor-stator.

Le deuxième procédé consistait à formuler des émulsions eau/huile concentrées par émulsification spontanée. Il s'agissait de solubiliser le copolymère et l'huile dans un solvant organique (typiquement de l'acétone) et d'introduire la préparation obtenue dans l'eau sous faible agitation.

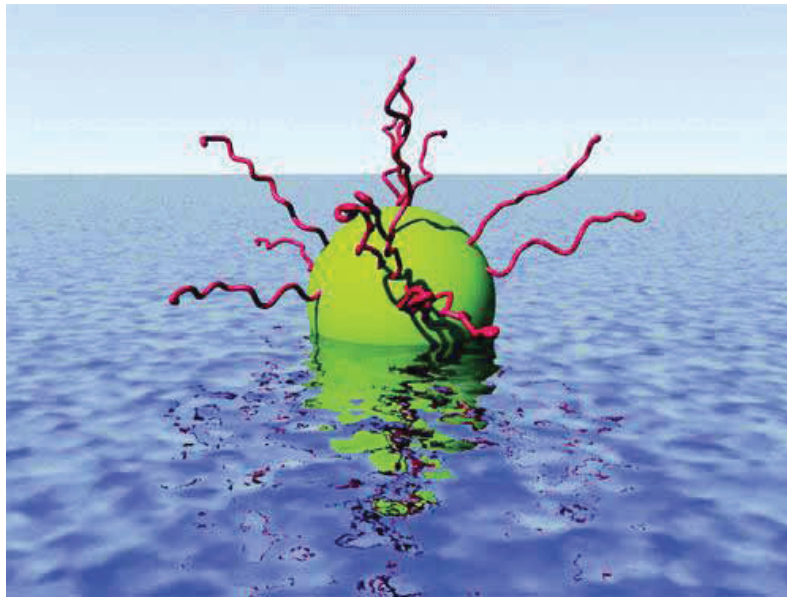


Figure 4. Schématisation d'une particule (stabilisée par des chaînes PEG ancrées à sa surface) adsorbée à l'interface huile-eau. La stabilisation des particules est du type stérique. Adapté de (Salari, Leermakers, et Klumperman 2011).

L'émulsion se formait instantanément et le solvant organique était ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite. Les émulsions obtenues avec les deux procédés ont montré d'excellentes propriétés de stabilité à la coalescence même pour des concentrations élevées en phase interne. Cependant une distribution de tailles beaucoup plus étroite a pu être obtenue avec le procédé 2 comparée au procédé classique.

L'étude de l'évolution du diamètre des gouttelettes en fonction du ratio huile/nanoparticules a montré que de façon similaire aux émulsions de Pickering stabilisées par la silice (J. Frelichowska, Bolzinger, et Chevalier 2010), le diamètre des gouttelettes mesuré était dépendant de ce ratio pour le procédé N°1. Les émulsions obtenues avec le procédé d'émulsification classique subissaient donc le phénomène de la coalescence limitée (Whitesides et Ross 1995; Arditty et al. 2003).

Pour les émulsions obtenues avec le procédé de nanopréciipitation spontanée, il semblait que le diamètre des gouttelettes d'huile était indépendant du ratio précédemment mentionné, faisant apparaître une très faible variation de la granulométrie des émulsions même en introduisant de très fortes proportions d'huile.

Différents mécanismes sont impliqués dans la formation de ces émulsions lors de l'introduction de la préparation organique (contenant le copolymère et l'huile) dans l'eau.

Tout d'abord, la précipitation du copolymère au contact de l'eau est favorisée par leur insolubilité dans l'eau. Ils forment instantanément des pseudo-micelles. La présence d'acétone, un mauvais solvant pour les chaînes de polyéthylène glycol favoriserait le tassement des chaînes de PEG et donc l'abaissement des répulsions stériques entre chaînes de PEG de particules différentes. Cette réorganisation des chaînes de PEG aurait pour principal effet l'abaissement de l'énergie d'activation permettant leur adsorption à l'interface huile-eau (Salari, Leermakers, et Klumperman 2011). Cette interface est créée par sursaturation dès introduction dans l'eau. L'huile est rapidement fragmentée suite aux turbulences créées par la diffusion du solvant dans le milieu (H. Fessi and F. Puisieux and J.Ph. Devissaguet and N. Ammoury and S. Benita 1989). La création d'interface est aussi facilitée par la présence d'acétone dans le milieu responsable de l'abaissement de la tension interfaciale (Bouchemal et al. 2004).

La distribution de taille resserrée des émulsions micrométriques obtenues résulteraient du mûrissement d'Oswald responsable de la disparition des gouttelettes de faible taille au profit des plus grandes pendant l'étape d'évaporation de solvant.

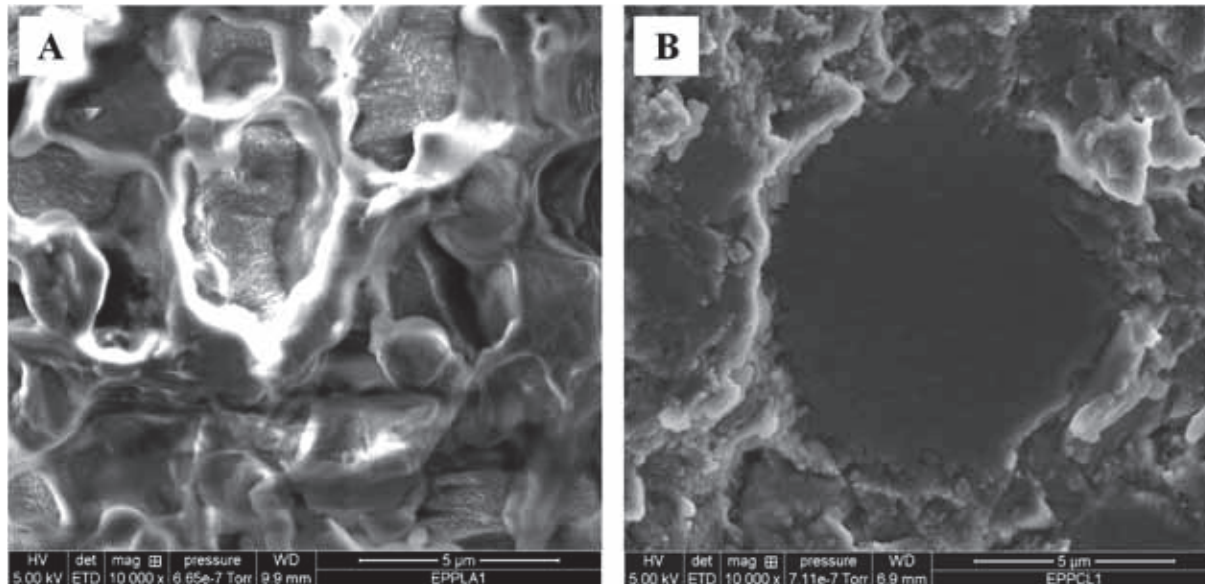


Figure 5. Images de Cryo-MEB d'émulsions huile dans eau stabilisées par des particules de PLA-*b*-PEG (A) et PCL-*b*-PEG (B) et fabriquées selon le procédé 1.

Les observations en cryofracture des émulsions obtenues par les deux procédés, montrent des gouttelettes d'huile avec à leur surface l'adsorption de nanoparticules individualisées mais

orientées. Cette organisation en particules individualisées à l'interface a été également confirmée par l'observation des émulsions contenant 50% (m/v) de dodécane deutéré et 4-5% m/v de particules, en cryo-MEB et par diffusion de neutrons. La superposition des spectres de neutrons correspondant à ceux des micelles en suspension aqueuse et ceux des émulsions montre qu'aux petites valeurs de q , le spectre expérimental donne une intensité diffusée inférieure au facteur de forme des particules. Cela signifie que les particules ne sont pas distribuées aléatoirement à l'interface mais qu'il y a un ordre de position. Le pic est cependant peu prononcé, d'une part parce que le nombre de premiers voisins est faible (on est à l'interface dans un espace de dimension 2 et il y a moins de voisins que dans un espace de dimension 3), et probablement aussi parce que l'arrangement des particules à l'interface n'est pas très ordonné. Cependant, le bon accord suggère que les particules sont intactes puisqu'il est possible de faire coïncider les intensités diffusées en prenant la concentration réelle de particules.

Ces résultats montrent que des émulsions de Pickering peuvent être obtenues avec des particules de PLA-*b*-PEG et PCL-*b*-PEG

- en utilisant deux procédés d'émulsification différents.
- Ces particules agissent comme des stabilisants de Pickering et s'adsorbent à l'interface huile-eau soit lors de leur utilisation en suspension aqueuse (dans le procédé 1) soit par formation et adsorption in situ à l'interface (procédé 2).
- Les émulsions obtenues avec le second procédé ont montré une distribution plus resserrée comparée à celles issues du procédé conventionnel. Ceci est probablement dû à l'abaissement de la tension interfaciale, favorisé par la présence d'acétone. L'adsorption aux interfaces est également favorisée par la réduction des répulsions stériques à la surface des nanoparticules consécutives au repliement des chaînes PEG se trouvant en présence d'un solvant tétra tel que l'acétone.
- L'observation de l'interface par cryofracture montre une densité plus élevée en nanoparticules lorsque le procédé 1 est utilisé alors que les particules sont plus espacées à l'interface lors du procédé 2. Cette différence peut s'expliquer par l'interface plus élevée créée lors du procédé 2 comparé au procédé 1 pour un même nombre de particules au départ.

L'absorption cutanée d'une molécule hydrophobe modèle : le rétinol, a été testé en utilisant des particules de PLA-*b*-PEG et PCL-*b*-PEG en suspensions aqueuses, ce test a été réalisé en utilisant :

- des cellules de diffusion de Franz de type statique ;
- des explants cutanés provenant de la peau de flanc de porc.

Les résultats montrent une accumulation supérieure du rétinol dans la peau à partir des particules de PLA-*b*-PEG comparées aux PCL-*b*-PEG et des préparations de polysorbate 80 testées dans les mêmes conditions.

Cette large accumulation dans la peau, a notamment été observée pour le Minoxidil encapsulé dans des pseudo micelles de copolymères à blocs (PCL-*b*-PEG) (Shim et al. 2004). Le mécanisme de pénétration suspecté était un passage accru par la voie folliculaire.

Bachhav et al. (2011) ont récemment montré l'amélioration de la pénétration de molécules antifongiques par des micelles de poly (dihexyl lactide)-bloc-poly (éthylène glycol) comparé à la forme émulsion commercialisée Pevaryl[®]. Des vésicules de copolymères appelés Polymersomes ont aussi été évaluées pour la l'application cutanée de plusieurs actifs (Rastogi, Anand, et Koul 2009).

Le présent travail mis en évidence une différence de relargage du rétinol en fonction du cœur hydrophobe constituant les particules. Cette différence pouvait être imputée à leur structure cristalline interne. Or, les études de RMN du proton avaient montré un cœur de polymère fondu pour les particules de PCL-*b*-PEG (le PCL étant complètement amorphe lorsque confiné dans des nanoparticules de cette taille) et un autre figé, solide pour les particules de PLA-*b*-PEG (le PLA formé de D, L-Lactide est complètement vitreux). Le relargage du rétinol serait alors beaucoup plus ralenti dans le deuxième type de particules à cause des mouvements moléculaires extrêmement ralentis.

La différence d'absorption a alors été imputée non pas à la structure même du cœur des particules mais à la solubilité du rétinol dans les différents cœurs hydrophobes. En effet, le calcul des paramètres de solubilité selon Hoftyzer and van Krevelen a montré une meilleure solubilisation (compatibilité) du rétinol dans la polycaprolactone comparée à l'acide polylactique. Cette différence de compatibilité rétinol-polymère a entraîné un relargage plus

important des particules PLA-*b*-PEG, alors qu'une diffusion plus lente est suspectée pour les particules PCL-*b*-PEG.

Des résultats similaires ont mis en avant l'influence de la compatibilité polymère-principe actif sur la libération de celui-ci. Ainsi, la libération rapide de l'ellipticine, une substance anticancéreuse, a été montrée dépendre de sa moindre compatibilité avec le PLA, polymère constitutif des particules de PLA-*b*-PEG où elle était encapsulée (Liu, Xiao, et Allen 2004). Une compatibilité ellipticine/acide polylactique plus basse que celle calculée pour le couple ellipticine/polycaprolactone s'est traduite par une libération complète en 36 heures alors qu'avec la polycaprolactone, seulement 30% de la quantité de départ a été libérée en 6 jours. La relation entre la solubilisation des actifs et la longueur des chaînes hydrophobes constituant les pseudo-micelles de copolymères à blocs PCL-*b*-PEG a également été mise en évidence. En effet, une meilleure solubilisation (et donc une meilleure compatibilité) des actifs suivants : l'indométacine, le curcumin, la plombagine, le paclitaxel, et l'étoposide a été obtenue avec l'allongement de la chaîne PCL (Letchford, Liggins, et Burt 2008).

Ces résultats ont également été observés en microscopie confocale, en utilisant du rouge Nile comme traceur fluorescent. Le mécanisme de pénétration visualisé était clairement du type intercellulaire au vu de la forte fluorescence accumulée dans le *stratum corneum*, de l'épiderme viable et d'une large partie du derme.

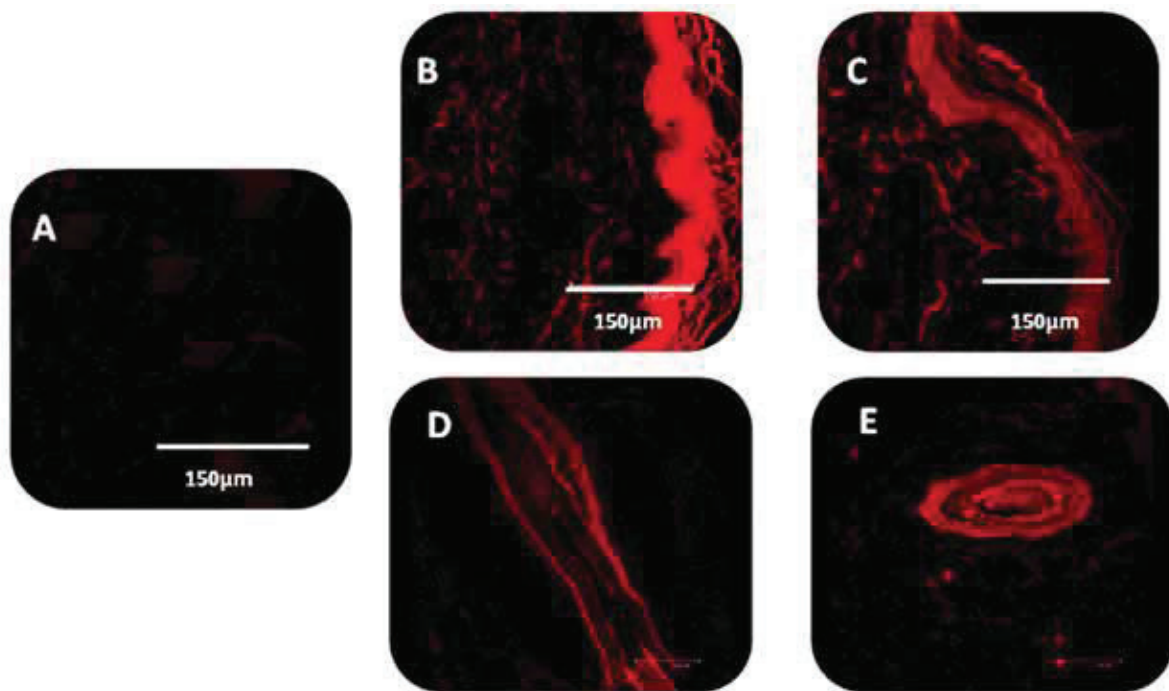


Figure 6. Observations faites en microscopie confocale révélant la distribution du rouge nile, après 24h d'exposition à des particules de PLA-*b*-PEG (B,D), et des particules de PCL-*b*-PEG (C,E). Les images (D) et (E) montrent la localisation du rouge nile dans des des follicules pileux. L'image (A) montre l'auto fluorescence naturelle d'une peau prise comme référence.

Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler la libération d'actifs, lors de leur application cutanée en utilisant des nanoparticules biodégradables, constituées de composés biocompatibles.

Le rétinol a également été encapsulé dans la phase interne d'émulsions stabilisées par les deux types particulaires et formulées selon les deux procédés d'émulsification (soit quatre émulsions de Pickering). Des travaux ultérieurs ont montré une accumulation supérieure du rétinol dans les couches supérieures de la peau à partir d'une émulsion de Pickering comparé à une émulsion classique testée dans les mêmes conditions (Frelichowska et al. 2009).

L'application cutanée des émulsions biodégradables montre une accumulation supérieure de rétinol dans le *stratum corneum* comparée à une émulsion classique à base de polysorbate 80.

Cependant, l'émulsion formulée par le procédé 2 (émulsification spontanée) en utilisant les particules de PLA-*b*-PEG comme stabilisant de Pickering a montré une accumulation supérieure du rétinol, comparée aux 3 autres émulsions de Pickering.

Cette différence notable peut être le résultat de deux facteurs :

1) le procédé d'émulsification spontanée lui-même. En effet, le rétinol a pu se retrouver encapsulé non seulement dans la phase interne de l'émulsion, mais aussi au sein des nanoparticules formées simultanément. D'où une double libération du rétinol à partir des gouttelettes d'huile et des particules.

2) comme dans le cas des nanoparticules en suspensions aqueuses, la libération du rétinol lors de l'application de ces émulsions sur la peau pendant 24h, a pu être le résultat non seulement de la diffusion-partage huile/*stratum corneum*, mais aussi du partage supplémentaire à partir des particules modulé par la compatibilité rétinol/PLA ou rétinol/PCL. D'où une quantité nettement supérieure pour des émulsions stabilisées par les deux types particulaires et formulées selon le même procédé.

Les résultats de ce travail ont montré la possibilité d'obtenir des émulsions de Pickering biocompatibles et biodégradables, stabilisées par des particules de copolymères à blocs, selon deux procédés différents. L'un des procédés développés durant cette thèse, a montré une facilité de mise en œuvre et l'implication de très faibles énergies lors de l'émulsification, avec la formation/adsorption de nanoparticules simultanément à la création de l'interface huile-eau. Les émulsions obtenues ont montré d'excellentes propriétés de stabilisation même en présence de fortes teneurs en phase interne (>60% m/v).

Les nanoparticules de copolymères à blocs et les émulsions de Pickering obtenues ont montré une accumulation supérieure du rétinol dans la peau.

La différence de solubilité rétinol/polymère ainsi que le procédé d'obtention des émulsions se sont montrés d'excellents outils pour la modulation de la libération des actifs dans la peau.

Ceci montre notamment la possibilité d'assurer une double libération des actifs lorsqu'ils sont incorporés simultanément dans ce type novateur d'émulsions.

Le caractère biodégradable de ces formulations permettrait de s'affranchir également de l'utilisation des tensioactifs chimiques reconnus pour leur effet irritant et perturbateur du *stratum corneum*.

Pour conclure, les travaux présentés dans cette thèse permettent d'émettre de nombreuses perspectives, tant au niveau du procédé d'émulsification, que pour les autres voies d'administration. En effet, l'amélioration des paramètres de formulation permettrait d'obtenir des granulométries resserrées plus compatible avec une administration systémique.

La perspective d'une double encapsulation permettant une libération en deux temps, à partir des nanoparticules et des gouttelettes ouvre des perspectives de modulation thérapeutique non négligeables. Le choix du polymère hydrophobe ainsi que la longueur des chaînes de polymère permettrait un contrôle des temps de libération des actifs encapsulés.

Il serait aussi intéressant d'étudier l'incorporation de molécules hydrophiles dans ce type de formulations afin de déterminer leur mode d'encapsulation dans ces particules et leurs mécanismes de libération.

Annexe 1

Dosage du copolymère résiduel par dosage de la partie de chaîne polyéthylène glycol

1. Principe

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe iodé (Sims et Snape 1980) entre le PEG et l'iode. Ce complexe présente un maximum d'absorption en UV à 535 nm. Dosier l'extrémité PEG nous permet en réalité de doser le copolymère PCL-*b*-PEG.

2. Produits

- Polyéthylène glycol 5000 g/mole ;
- Acide chlorhydrique 1N ;
- Chlorure de Baryum ;
- Iodine,
- Iodure de Potassium ;
- Eau désionisée.

3. Méthode

Cette méthode de titration donne une réponse linéaire sur une gamme de concentrations de 1.25 à 7.5 µg de PEG/ml. L'établissement de la courbe d'étalonnage, consiste à préparer des solutions références en PEG contenant 7.5, 5, 3.75, 2.5 et 1.25 µg de PEG/ml à partir d'une solution stock contenant 10 µg de PEG/ml. Les dilutions ont été effectuées avec de l'eau désionisée.

Le mode opératoire consiste à ajouter à 4 ml de chaque solution 1 ml d'une solution de chlorure de baryum (dans l'HCl 1N) à 5% (poids/volume). Puis, 1 ml d'une solution préparée en dissolvant 1.27 g d'iode dans 100 ml d'une solution à 2% (poids/volume) d'iodure de potassium.

Le développement de la couleur doit se faire pendant 15 min à température ambiante, et les absorbances des échantillons ont été mesurées à une longueur d'onde de 535 nm en utilisant un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'eau par la solution de PEG.

La Figure 1 montre la courbe d'étalonnage obtenue avec le polyéthylène glycol 5000. Une bonne linéarité a été obtenue dans la gamme de concentrations testées (1.25-7 µg/ml). Au-delà, un précipité rouge brique apparaissait signe d'une sursaturation en complexe iodé.

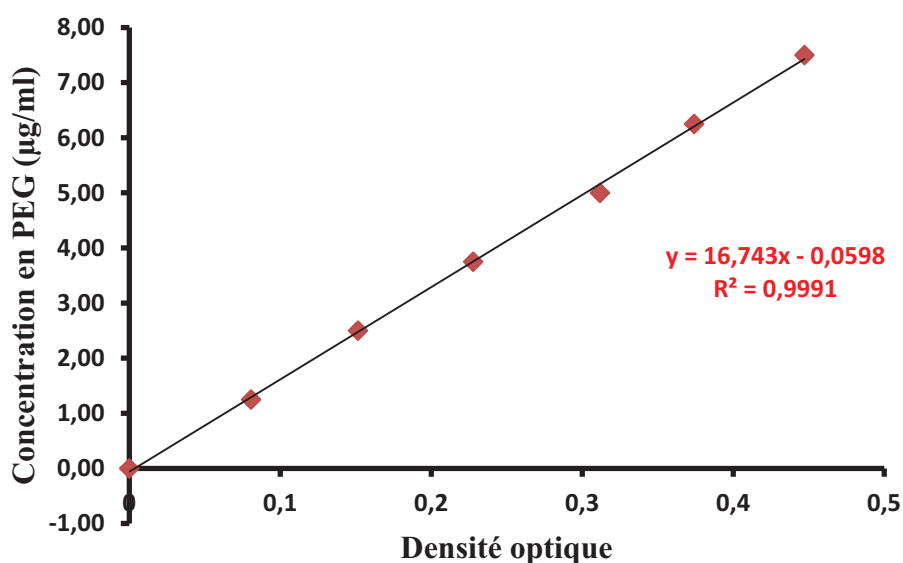


Figure 1. Courbe d'étalonnage établie à partir de solutions étalons de poly (éthylène glycol) (5000 g/mole) dans l'eau.

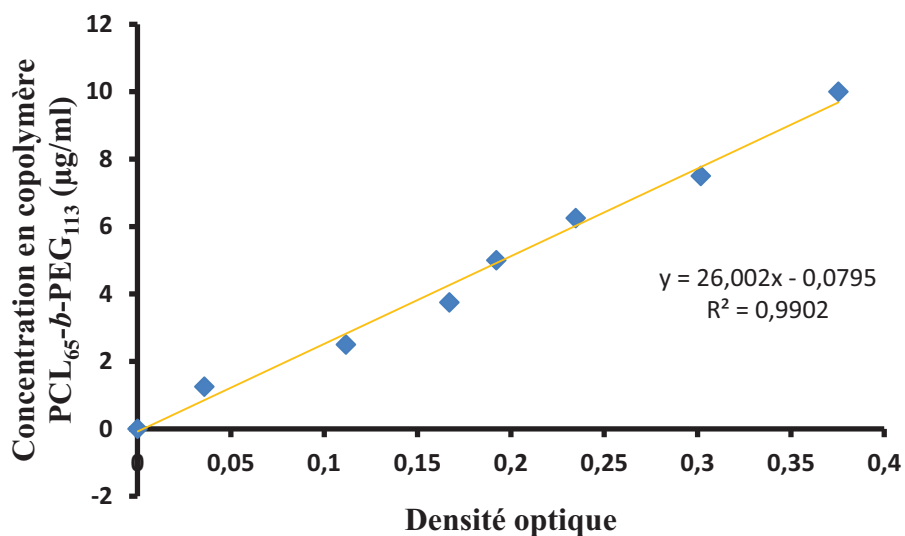


Figure 2. Courbe d'étalonnage établies à partir de suspensions étalons de micelles de copolymère à blocs PCL₆₅-b-PEG₁₁₃ dans l'eau.

4. Conclusion

En utilisant cette méthode, nous avons établi une droite d'étalonnage basée sur le dosage de la partie PEG du copolymère (Figure 2). Ainsi, de façon indirecte nous avons pu établir une droite d'étalonnage à l'aide de suspensions étalons de particules de copolymère à blocs PCL₆₅-b-PEG₁₁₃. Ces suspensions ont été préparées à partir d'une suspension mère à 2% (m/v) formulée par le procédé de nanopréciipitation précédemment décrit.

Références

- Abdel-Mottaleb, M.M.A. et al., 2012. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1), p.151-157.
- Abend, S. et al., 1998. Stabilization of emulsions by heterocoagulation of clay minerals and layered double hydroxides. *Colloid and Polymer Science*, 276(8), p.730-737.
- Abraham, M.H. & Martins, F., 2004. Human skin permeation and partition: General linear free-energy relationship analyses. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6), p.1508–1523.
- Abramovits, W., Granowski, P. & Arrazola, P., 2010. Applications of nanomedicine in dermatology: use of nanoparticles in various therapies and imaging. *Journal of cosmetic dermatology*, 9(2), p.154–159.
- Ackerman, A. & Jacubov, H., 1992. Structure and function of skin: development, morphology, and physiology. In Philadelphia: S.L. Moschella, H.J. Hurley, p. 3-87.
- Agarwal, R., Katare, O.P. & Vyas, S.P., 2000. The pilosebaceous unit: A pivotal route for topical drug delivery. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22(2), p.129.
- Akiba, I. et al., 2010. Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS. *Langmuir*, 26(10), p.7544-7551.
- Allen, C., Maysinger, D. & Eisenberg, A., 1999a. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1–4), p.3-27.
- Allen, C., Maysinger, D. & Eisenberg, A., 1999b. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16(1–4), p.3-27.
- Alvarez-Roman, R. et al., 2004a. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 21, p.1818-1825.
- Alvarez-Roman, R. et al., 2004b. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 21, p.1818-1825.
- Alvarez-Román, R. et al., 2004a. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1), p.53-62.
- Alvarez-Román, R. et al., 2004b. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 99(1), p.53-62.
- Aragón, S.R. & Pecora, R., 1976. Theory of dynamic light scattering from polydisperse systems. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6), p.2395-2404.
- Arditty, S. et al., 2003. Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *The European Physical Journal E*, 11, p.273-281.
- Arditty, Stéphane et al., 2004. Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, p.659–664.
- Arias, J.L. et al., 2009. Formulation and physicochemical characterization of poly(caprolactone) nanoparticles loaded with flufenamic acid and diclofenac sodium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, p.1-5.
- Ashton, P. et al., 1992. Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 87(1–3), p.261-264.
- Aveyard, R., Binks, B. P. & Clint, John H., 2003. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100–102, p.503–546.
- Azarbayjani, A.F. et al., 2011. Development and characterization of skin permeation retardants and enhancers: A comparative study of levothyroxine-loaded PNIPAM,

- PLA, PLGA and EC microparticles. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 32(7), p.380–388.
- Bachhav, Y.G. et al., 2011a. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *Journal of Controlled Release*, 153(2), p.126-132.
- Bachhav, Y.G. et al., 2011b. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *Journal of Controlled Release*, 153(2), p.126-132.
- Baroli, B. et al., 2007. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(7), p.1701-1712.
- Basile, D. et al., 1995. Stealth Me.PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84, p.493-498.
- Benson, H.A.E., 2010. Elastic Liposomes for Topical and Transdermal Drug Delivery. In V. Weissig, éd. *Liposomes*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, p. 77-86.
- Van den Bergh, B.A. et al., 1999. Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. *Journal of controlled release*, 62(3), p.367–379.
- Bernard, E., Dubois, J.-L. & Wepierre, Jacques, 1997. Importance of sebaceous glands in cutaneous penetration of an antiandrogen: Target effect of liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(5), p.573–578.
- Berner, B. et al., 1989. Ethanol: Water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: Skin permeation of ethanol and nitroglycerin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(5), p.402–407.
- Bettinger, J., Gloor, Max & Gehring, Wolfgang, 1994. Influence of a pretreatment with emulsions on the dehydration of the skin by surfactants. *International Journal of Cosmetic Science*, 16(2), p.53–60.
- Binks, B. P. et al., 2003. Ellipsometric Study of Monodisperse Silica Particles at an Oil-Water Interface. *Langmuir* 2003, 19, 8888-8893, 19, p.8888-8893.
- Binks, B. P. et al., 2005. Naturally Occurring Spore Particles at Planar Fluid Interfaces and in Emulsions. *Langmuir*, 21, p.8161-8167.
- Binks, B. P., 2002. Particles as surfactants_ similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, p.21-41.
- Binks, B. P. & Lumsdon, S.O., 2000. Catastrophic Phase Inversion of Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Hydrophobic Silica. *Langmuir*, 16, p.2539-2547.
- Binks, B. P. & Lumsdon, S.O., 2001. Pickering Emulsions Stabilized by Monodisperse Latex Particles: Effects of Particle Size. *Langmuir*, 17, p.4540-4547.
- Binks, B. P. & Whitby, C.P., 2004. Silica Particle-Stabilized Emulsions of Silicone Oil and Water: Aspects of Emulsification. *Langmuir*, 20, p.1130-1137.
- Binks, Bernard P & Horozov, Tommy S, 2006. Colloidal Particles at Liquid Interfaces: An Introduction. *Colloidal Particles at Liquid Interfaces*, Chapt, 1, p.1–74.
- Binks, Bernard P., 2002. Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1–2), p.21-41.
- Binks, Bernard P. et al., 2011. Sporopollenin capsules at fluid interfaces: particle-stabilised emulsions and liquid marbles. *Soft Matter*, 7(8), p.4017-4024.
- Bolzinger, Marie-Alexandrine et al., 2012. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(3), p.156-165.
- Bolzinger, Marie-Alexandrine, Briançon, Stéphanie & Chevalier, Yves, 2011. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(5), p.463–478.

- Bordes, C. et al., 2010. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. *International Journal of Pharmaceutics*, 383(1–2), p.236-243.
- Bouchemal, K. et al., 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), p.241-251.
- Bouwstra, J. & Ponec, M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), p.2080-2095.
- Bouwstra, J.A et al., 1999. The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1419(2), p.127-136.
- Bouwstra, Joke A. et al., 2003. Water Distribution and Related Morphology in Human Stratum Corneum at Different Hydration Levels. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), p.750-758.
- Brandner, J.M., Haftek, M. & Niessen, C.M., 2010. Adherens junctions, desmosomes and tight junctions in epidermal barrier function. *Open Dermatol J*, 4, p.14–20.
- Brown, M.B. et al., 2008. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10717540500455975> [Consulté le avril 28, 2013].
- Cappel, M.J. & Kreuter, J., 1991. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I. Polysorbates. *International Journal of Pharmaceutics*, 69(2), p.143-153.
- Casagrande, C. et al., 1989. « Janus Beads »: Realization and Behaviour at Water/Oil Interfaces - Abstract - EPL (Europhysics Letters) - IOPscience. *EPL (Europhysics Letters)*, 9(3), p.251.
- Cevc, G. & Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1104(1), p.226-232.
- Cevc, Gregor & Blume, Gabriele, 2004. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1663(1–2), p.61-73.
- Cevc, Gregor & Blume, Gabriele, 2001. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1514(2), p.191-205.
- Cevc, Gregor & Gebauer, D., 2003. Hydration-Driven Transport of Deformable Lipid Vesicles through Fine Pores and the Skin Barrier. *Biophysical Journal*, 84(2), p.1010-1024.
- Cevc, Gregor, Schätzlein, A. & Richardsen, H., 2002. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1564(1), p.21-30.
- Chan, D.Y., Henry jr., J. & White, L., 1981. The interaction of colloidal particles collected at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 79(2), p.410-418.
- Chausson, M. et al., 2008. Block copolymers of the type poly(caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) for the preparation and stabilization of nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 362, p.153-162.

- Chawla, J.S. & Amiji, M.M., 2002. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*, 249, p.127-138.
- Chen, L., 2009. Protein micro/nanoparticles for controlled nutraceutical delivery in functional foods. , p.572-600.
- Chevalier, Yves & Bolzinger, Marie-Alexandrine, 2013. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777571300157X>
- Chevalier, Yves & Zemb, T., 1990. The structure of micelles and microemulsions. *Rep. Prog. Phys*, 53, p.279-371.
- Chin, J.H. & Goldstein, D.B., 1981. Membrane-Disordering Action of Ethanol Variation with Membrane Cholesterol Content and Depth of the Spin Label Probe. *Molecular Pharmacology*, 19(3), p.425-431.
- Cho, E.C. et al., 2006. Effect of particle size, composition, and thermal treatment on the crystalline structure of polycaprolactone nanoparticles. *Biomacromolecules*, 7(5), p.1679.
- Choi, C. et al., 2006. Synthesis and physicochemical characterization of amphiphilic block copolymer self-aggregates formed by poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science*, 99(6), p.3520–3527.
- Coderch, D.L. et al., 2003. Ceramides and Skin Function. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4(2), p.107-129.
- Coombes, A.G.A. et al., 1997. Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surface attachment of hydrophilic species using the concept of poly(ethylene glycol) anchoring segments. *Biomaterials*, 18, p.1153-1161.
- Cotton, J.P. & Benoit, H., 1975. Étude du contraste et de son influence sur les déterminations de l'intensité diffusée et du rayon de giration dans les systèmes de macromolécules hétérogènes. *Journal de Physique*, 36(9), p.905-910.
- Crank, J., 1979. *The Mathematics Diffusion*, Oxford University Press.
- Cross, Sheree E & Roberts, Michael S, 2005. Dermal blood flow, lymphatics, and binding as determinants of topical absorption, clearance, and distribution. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*, p.251.
- Cross, Sheree E. et al., 2007. Human Skin Penetration of Sunscreen Nanoparticles: In-vitro Assessment of a Novel Micronized Zinc Oxide Formulation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(3), p.148-154.
- Cui, Z. & Mumper, R.J., 2001. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release*, 75(3), p.409-419.
- Cui, Z. & Mumper, R.J., 2002. Topical immunization using nanoengineered genetic vaccines. *Journal of Controlled Release*, 81(1–2), p.173-184.
- Cussler, E.L., 1997. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press.
- Dalvi, U. & Zatz, J.L., 1981. Effect of nonionic surfactants on penetration of dissolved benzocaine through hairless mouse skin. *Journal of the society of cosmetic chemists*, p.87-94.
- Danov, K.D. & Kralchevsky, P.A., 2010. Capillary forces between particles at a liquid interface: General theoretical approach and interactions between capillary multipoles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 154(1-2), p.91-103.
- Davis, A.F. & Hadgraft, J., 1991. Effect of supersaturation on membrane transport: 1. Hydrocortisone acetate. *International Journal of Pharmaceutics*, 76(1–2), p.1-8.
- Degiorgio, V. & Corti, M., 1985. Physics Of Amphiphiles: Micelles, Vesicles And Microemulsions: Proceedings Of The International School Of Physics, Enric.

- DeLouise, L.A., 2012. Applications of Nanotechnology in Dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), p.964-975.
- Diab, R. et al., 2010a. Microencapsulation of cytarabine using poly(ethylene glycol)–poly(?-caprolactone) diblock copolymers as surfactant agents. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(4), p.456–469.
- Diab, R. et al., 2010b. Microencapsulation of cytarabine using poly(ethylene glycol)–poly(?-caprolactone) diblock copolymers as surfactant agents. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(4), p.456–469.
- Dickinson, E., 2010. Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), p.40-49.
- Dong, Y. & Feng, S.-S., 2004. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 25, p.2843–2849.
- Dong, Yuancai & Feng, S.-S., 2004. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 25, p.2843–2849.
- Dorobantu, L.S. et al., 2004. Stabilization of Oil-Water Emulsions by Hydrophobic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, p.6333-6336.
- Downing, D.T., Strauss, J.S. & Pochi, P.E., 1969. Variability in the Chemical Composition of Human Skin Surface Lipids I. *Journal of Investigative Dermatology*, 53(5), p.322-327.
- Du, K. et al., 2010. Adsorption Energy of Nano- and Microparticles at Liquid–Liquid Interfaces. *Langmuir*, 26(15), p.12518-12522.
- Dufresne, M.H. et al., 2003. *Block copolymer micelles—engineering versatile carriers for drugs and biomacromolecules* R. Gurny., Gattefossé, Saint Priest.
- El Maghraby, G. & Williams, A., 2009. Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(2), p.149-163.
- El Maghraby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4–5), p.203-222.
- Elias, P.M. et al., 2002. The Potential of Metabolic Interventions to Enhance Transdermal Drug Delivery. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 7(1), p.79-85.
- Eskandar, N. Ghouchi, Simovic, S. & Prestidge, C. A., 2009. Nanoparticle Coated Submicron Emulsions: Sustained In-vitro Release and Improved Dermal Delivery of All-trans-retinol. *Pharmaceutical Research*, 26, p.1764-1775.
- Eskandar, Nasrin Ghouchi, Simovic, Spomenka & Prestidge, Clive A., 2009. Chemical stability and phase distribution of all-trans-retinol in nanoparticle-coated emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 376(1–2), p.186-194.
- Eskandar, Nasrin Ghouchi, Simovic, Spomenka & Prestidge, Clive A., 2010. Mechanistic insight into the dermal delivery from nanoparticle-coated submicron O/W emulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), p.890–904.
- Fairley, N., Hoang, B. & Allen, C., 2008. Morphological control of poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) copolymer aggregates in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 9(9), p.2283–2291.
- Faunce, T. et al., 2008. Sunscreen Safety: The Precautionary Principle, The Australian Therapeutic Goods Administration and Nanoparticles in Sunscreens. *NanoEthics*, 2(3), p.231-240.
- Ferreira, L.A. et al., 1995. Vehicle influence on in vitro release of glucose: w/o, w/o/w and o/w systems compared. *Journal of Controlled Release*, 33(3), p.349-356.

- Ferreira, L.A.M. et al., 1994. Vehicle influence on in vitro release of metronidazole: role of w/o/w multiple emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 109(3), p.251-259.
- Förster, M. et al., 2011. Ingredients Tracking of Cosmetic Formulations in the Skin: A Confocal Raman Microscopy Investigation. *Pharmaceutical Research*, 28(4), p.858-872.
- Fortes, M.A., 1982. Attraction and repulsion of floating particles. *Canadian Journal of Chemistry*, 60(23), p.2889–2895.
- Frelichowsk, J. et al., 2009. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 371, p.56-63.
- Frelichowska, J., Bolzinger, M-A & Chevalier, Y., 2010. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351, p.348-356.
- Frelichowska, Justyna, Bolzinger, Marie-Alexandrine, Valour, J.-P., et al., 2009. Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 368, p.7-15.
- Frelichowska, Justyna, Bolzinger, Marie-Alexandrine, Pelletier, Jocelyne, et al., 2009. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2), p.56-63.
- Friberg, S. E. & Brin, A.-J., Interfacial transfer of vitamin E acetate during evaporation of its emulsion. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 46(5), p.255-260.
- Friberg, STIG E, 1990. Micelles, microemulsions, liquid crystals, and the structure of stratum corneum lipids. *J Soc Cosmet Chem*, 41, p.155–171.
- Friberg, Stig E. & Langlois, B., 1992. Evaporation from Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 13(2), p.223-243.
- Friend, D. et al., 1988. Transdermal delivery of levonorgestrel I: Alkanols as permeation enhancers in vitro. *Journal of Controlled Release*, 7(3), p.243-250.
- Garbin, V., Crocker, J.C. & Stebe, K.J., 2012. Nanoparticles at fluid interfaces: Exploiting capping ligands to control adsorption, stability and dynamics. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), p.1-11.
- Gaucher, G. et al., 2005. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3), p.169-188.
- Glatter, O. & Kratky, O., 1982. *Small angle X-ray scattering*, Academic press London.
- Gloor, M et al., 2001. [Clinical effect of salicylic acid and high dose urea applied according to the standardized New German Formulary]. *Die Pharmazie*, 56(10), p.810-814.
- Gohy, J.-F., 2005. Block Copolymer Micelles. *Advances in Polymer Science*, 190, p.65-136.
- Gontier, Etienne et al., 2008. Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study. *Nanotoxicology*, 2(4), p.218-231.
- González-Rodríguez, M. & Rabasco, A., 2011. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(7), p.857-871.
- Gosa, K.-L. & Uricanu, V., 2002. Emulsions stabilized with PEO–PPO–PEO block copolymers and silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 197(1), p.257–269.
- H. Fessi and F. Puisieux and J.Ph. Devissaguet and N. Ammoury and S. Benita, 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, p.R1-R4.
- Haag, R., 2004. Supramolecular Drug-Delivery Systems Based on Polymeric Core–Shell Architectures. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(3), p.278–282.
- Hadgraft, J., 2001. Modulation of the Barrier Function of the Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(Suppl. 1), p.72-81.

- Hadgraft, Jonathan, 2002. *Transdermal Drug Delivery Systems: Revised And Expanded*, CRC Press.
- Haftek, M., Teillon, M.-H. & Schmitt, D., 1998. Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration. *Microscopy Research and Technique*, 43(3), p.242–249.
- Hansen, C.M., 2007. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*, CRC Press LLC.
- Hansen, S. & Lehr, Claus-Michael, 2012. Nanoparticles for transcutaneous vaccination. *Microbial Biotechnology*, 5(2), p.156-167.
- Heald, C.R. et al., 2002. Poly(lactic acid)-Poly(ethylene oxide) (PLA-PEG) Nanoparticles: NMR Studies of the Central Solidlike PLA Core and the Liquid PEG Corona. *Langmuir* 2002, 18, 3669-3675, 18, p.3669-3675.
- Heather A.E. Benson, 2005. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, 2(1), p.23-33.
- Hennion, M. & Mirebeau, I., 1999. Article. *Le Journal de Physique IV*, 09(PR1), p.Pr1-51.
- Heuschkel, S., Goebel, A. & Neubert, Reinhard H.H., 2008. Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), p.603–631.
- HIGUCHI, T., 1960. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11, p.85-97.
- Holbrook, K.A. & Odland, G.F., 1975. The Fine Structure of Developing Human Epidermis: Light, Scanning, and Transmission Electron Microscopy of the Periderm. *Journal of Investigative Dermatology*, 65(1), p.16-38.
- Honeywell-Nguyen, P.L. et al., 2003. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *Journal of controlled release*, 90(2), p.243–255.
- Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, Gert S. & Bouwstra, Joke A., 2004. Quantitative Assessment of the Transport of Elastic and Rigid Vesicle Components and a Model Drug from these Vesicle Formulations into Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(5), p.902-910.
- Horozov, T., 2008. Foams and foam films stabilised by solid particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(3), p.134-140.
- Horozov, T. S. et al., 2003. Order-Disorder Transition in Monolayers of Modified Monodisperse Silica Particles at the Octane-Water Interface. *Langmuir*, 19, p.2822-2829.
- Horozov, T. S., Aveyard, R. & Clint, J. H., 2005. Particle Zips: Vertical Emulsion Films with Particle Monolayers at Their Surfaces. *Langmuir*, 21, p.2330-2341.
- Huang, Y. et al., 2010. Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials*, 31(34), p.9086-9091.
- Huang, Y.-Y., Chung, T.-W. & Tzeng, T., 1997. Drug release from PLA/PEG microparticulates. *International Journal of pharmaceuticals*, 156(1), p.9–15.
- Hunter, T.N. et al., 2008. The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 137, p.57-81.
- Hwang, C.-C. & Danti, A.G., 1983. Percutaneous absorption of flufenamic acid in rabbits: Effect of dimethyl sulfoxide and various nonionic surface-active agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(8), p.857–860.
- Iervolino, M., Raghavan, S. & Hadgraft, J., 2000. Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation. *International Journal of Pharmaceutics*, 198(2), p.229-238.

- Inoue, K. et al., 2005. Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug. *Journal of Controlled Release*, 108(2–3), p.306-318.
- Izquierdo, P. et al., 2007. A Study on the Influence of Emulsion Droplet Size on the Skin Penetration of Tetracaine. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(5), p.263-270.
- Jain, A.K., Thomas, N.S. & Panchagnula, R., 2002. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride.: I. Effect of terpenes. *Journal of Controlled Release*, 79(1–3), p.93-101.
- Jain, J. et al., 2009. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), p.1388-1401.
- De Jalón, E.G. et al., 2001. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 226(1–2), p.181-184.
- Jiang, S.J. & Zhou, X.J., 2003. Examination of the Mechanism of Oleic Acid-Induced Percutaneous Penetration Enhancement: an Ultrastructural Study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), p.66-68.
- Jimenez, M.M. et al., Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *International journal of pharmaceutics*, 272(1-2), p.45-55.
- Jung, S. et al., 2006. Innovative Liposomes as a Transfollicular Drug Delivery System: Penetration into Porcine Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(8), p.1728-1732.
- Jungbauer, F.H.W., Coenraads, P.J. & Kardaun, S.H., 2001. Toxic hygroscopic contact reaction to N-methyl-2-pyrrolidone. *Contact Dermatitis*, 45(5), p.303–304.
- Jungersted, J.M. et al., 2010. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*, 65(7), p.911–918.
- Kirjavainen, M. et al., 1996. Interaction of liposomes with human skin in vitro — The influence of lipid composition and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1304(3), p.179-189.
- Kobayashi, M. et al., 1986. Vibrational spectroscopic study on polymorphism and order-disorder phase transition in oleic acid. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(23), p.6371-6378.
- Kohli, A.K. & Alpar, H.O., 2004. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *International Journal of Pharmaceutics*, 275(1-2), p.13-17.
- Kralchevsky, P.A. & Denkov, N.D., 2001. Capillary forces and structuring in layers of colloid particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(4), p.383-401.
- Krevelen, D.W. van & Nijenhuis, K. te, 2009. *Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions*, Elsevier.
- Ktistis, G. & Niopas, I., 1998. A Study on the In-vitro Percutaneous Absorption of Propranolol from Disperse Systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(4), p.413–418.
- Kumara, N., Ravikumarb, M.N.V. & Domba, A.J., 2001. Biodegradable block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, p.23-44.
- Kurihara-Bergstrom, T. et al., 1990. Percutaneous Absorption Enhancement of an Ionic Molecule by Ethanol–Water Systems in Human Skin. *Pharmaceutical Research*, 7(7), p.762-766.
- Kushla, G.P. & Zatz, J.L., 1991. Correlation of water and lidocaine flux enhancement by cationic surfactants in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(11), p.1079–1083.

- Lademann, Juergen et al., 2009. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2), p.021014-021014.
- Lademann, Juergen et al., 2007. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(2), p.159-164.
- Lairez, D., 2003. Introduction à la diffusion de neutrons aux petits angles. *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 103, p.253-290.
- Langlois, B.R. & Friberg, Stig E, 1993. Evaporation from a complex emulsion system. *JOURNAL-SOCIETY OF COSMETIC CHEMISTS*, 44, p.23–23.
- Laredj-Bourezg, F. et al., 2012. Emulsions stabilized with organic solid particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 413, p.252-259.
- Larsen, C.P. et al., 1990. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(5), p.1483-1493.
- Leal-Calderon, F. & Schmitt, V., 2008. Solid-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13, p.217-227.
- Lee, C.K. et al., 1994. Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(4), p.562–565.
- Lekki, J. et al., 2007. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 260(1), p.174-177.
- Letchford, K. & Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, p.259-269.
- Letchford, K., Liggins, R. & Burt, H., 2008. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: theoretical and experimental data and correlations. *Journal of Pharmaceutical Science*, 97(3), p.1179–1190.
- Levine, S., Bowen, B.D. & Partridge, S.J., 1989. Stabilization of Fine Emulsions By Fine Particles I. Partitioning of Particles Between Continuous Phase and Oil-Water Interface. *Colloids and Surfaces*, 38, p.325-343.
- Li, J. et al., 2008. Methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L-lactic acid) copolymer nanoparticles as carriers for transdermal drug delivery. *Polymer International*, 57(2), p.268-274.
- Lilia Romero, E. & Morilla, M.J., 2011. Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(4), p.356–375.
- Liu, J., Xiao, Y. & Allen, C., 2004. Polymer–drug compatibility: A guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(1), p.132–143.
- Loan Honeywell-Nguyen, P. et al., 2002. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1573(2), p.130-140.
- López, A. et al., 2000. Comparative enhancer effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. *International Journal of Pharmaceutics*, 202(1–2), p.133-140.
- Luengo, J. et al., 2006. Influence of Nanoencapsulation on Human Skin Transport of Flufenamic Acid. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(4), p.190-197.

- Luo, M., Song, Y. & Dai, L.L., 2009. Heterogeneous or competitive self-assembly of surfactants and nanoparticles at liquid–liquid interfaces. *Molecular Simulation*, 35(10-11), p.773-784.
- Ma, H. et al., 2011. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: The importance of illumination mode and primary particle size. *Environmental Pollution*, 159(6), p.1473-1480.
- Madison, K.C., 2003. Barrier Function of the Skin: « La Raison d'Être » of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), p.231-241.
- Magdassi, S., 1997. Delivery systems in cosmetics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, p.671-679.
- Maghraby, G.M.M.E., Williams, Adrian C. & Barry, Brian W., 1999. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditional Liposomes: Mechanistic Studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(10), p.1123–1134.
- Magnusson, B.M. et al., 2004. Molecular Size as the Main Determinant of Solute Maximum Flux Across the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(4), p.993-999.
- Mahoney, M. et al., 2010. Desmosomes and Desmosomal Cadherin Function in Skin and Heart Diseases; Advancements in Basic and Clinical Research. *Dermatology Research and Practice*, 2010. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/drp/2010/725647/abs/> [Consulté le mai 20, 2013].
- Mak, W.C. et al., 2011. Drug delivery into the skin by degradable particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), p.23-27.
- Mak, W.C. et al., 2012. Triggering of drug release of particles in hair follicles. *Journal of Controlled Release*, 160(3), p.509-514.
- Marku, D. et al., 2012a. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 428(1–2), p.1-7.
- Marku, D. et al., 2012b. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 428(1–2), p.1-7.
- Marro, D., Guy, Richard H & Begoña Delgado-Charro, M., 2001. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. *Journal of Controlled Release*, 70(1–2), p.213-217.
- Megrab, N.A., Williams, A.C. & Barry, B.W., 1995. Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane: effects of propylene glycol and supersaturation. *Journal of Controlled Release*, 36(3), p.277-294.
- Menon, G. & Ghadially, R., 1997. Morphology of lipid alterations in the epidermis: A review. *Microscopy Research and Technique*, 37(3), p.180–192.
- Merad, M. et al., 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology*, 3(12), p.1135-1141.
- Meyer, K. et al., 2011. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in Vitro*, 25(8), p.1721-1726.
- Moghimi, S.M. & Patel, H.M., 1993. Current progress and future prospects of liposomes in dermal drug delivery. *Journal of Microencapsulation*, 10(2), p.155-162.
- Monteiro-Riviere, N.A., 2010. Structure and function of skin. In *Toxicology of the Skin*. Informa Healthcare USA, Inc., New York, p. 1-18.
- Morimoto, Y. et al., 2002. *In Vitro* Skin Permeation of Morphine Hydrochloride during the Finite Application of Penetration-Enhancing System Containing Water, Ethanol and *l*-Menthol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(1), p.134-136.
- Morris, V.J., 2011. Emerging roles of engineered nanomaterials in the food industry. *Trends in Biotechnology*, 29(10), p.509-516.

- Morrison, I.D. & Ross, S., 2002. *Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams*, Wiley-Interscience New York.
- Moser, K., Kriwet, K., Kalia, Yogeshvar N, et al., 2001a. Enhanced skin permeation of a lipophilic drug using supersaturated formulations. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), p.245-253.
- Moser, K. et al., 2001. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52(2), p.103-112.
- Moser, K., Kriwet, K., Kalia, Yogeshvar N., et al., 2001b. Stabilization of supersaturated solutions of a lipophilic drug for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1–2), p.169-176.
- Moser, K., Kriwet, K., Froehlich, C., et al., 2001. Supersaturation: Enhancement of Skin Penetration and Permeation of a Lipophilic Drug. *Pharmaceutical Research*, 18(7), p.1006-1011.
- Müller, R.H, Radtke, M. & Wissing, S., 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), p.121-128.
- Müller, R.H. et al., 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), p.522-530.
- Murray, B.S. et al., 2011. Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins. *Food Hydrocolloids*, 25(4), p.627-638.
- Naoui, W. et al., 2011. Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug. *Pharmaceutical research*, 28, p.1683-1695.
- Neubert, R. et al., 1998. Recent developments in the area of dermal drug application. *Pharm Ind*, 60(2), p.149.
- Newman, M.D., Stotland, M. & Ellis, J.I., 2009. The safety of nanosized particles in titanium dioxide– and zinc oxide–based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4), p.685-692.
- Niemiec, S.M., Ramachandran, C. & Weiner, N., 1995. Influence of Nonionic Liposomal Composition on Topical Delivery of Peptide Drugs into Pilosebaceous Units: An in Vivo Study Using the Hamster Ear Model. *Pharmaceutical Research*, 12(8), p.1184-1188.
- Nilsson, L. & Bergenståhl, B., 2007. Emulsification and Adsorption Properties of Hydrophobically Modified Potato and Barley Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), p.1469-1474.
- Nohynek, G.J., Dufour, E.K. & Roberts, M.S., 2008. Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk? *Skin Pharmacology and Physiology*, 21(3), p.136-149.
- Nokhodchi, A. et al., 2003. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(2), p.359-369.
- Oborska, A. et al., Influence of polyalcohols and surfactants on skin penetration of flavonoids from the emulsion. *Journal of applied cosmetology*, 22(1), p.35-42.
- Ogiso, T. et al., 2008. Transfollicular Drug Delivery: Penetration of Drugs Through Human Scalp Skin and Comparison of Penetration Between Scalp and Abdominal Skins In Vitro. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/1061186021000001814?journalCode=dr> [Consulté le avril 28, 2013].
- Okuyama, H. et al., 1999. Influence of non-ionic surfactants, pH and propylene glycol on percutaneous absorption of piroxicam from cataplasm. *International Journal of Pharmaceutics*, 186(2), p.141-148.

- Otto, A., Du Plessis, J. & Wiechers, J. W., 2009. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International journal of cosmetic science*, 31(1), p.1–19.
- Paige, D. g., Morse-Fisher, N. & Harper, J. i., 1994. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *British Journal of Dermatology*, 131(1), p.23–27.
- Pannatier, A. et al., 1978. The Skin as a Drug-Metabolizing Organ. *Drug Metabolism Reviews*, 8(2), p.319-343.
- Panyam, J. & Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), p.329-347.
- Park, E.-S. et al., 2000. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 209(1–2), p.109-119.
- Patel, H., Berge, W. ten & Cronin, M.T.D., 2002. Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the prediction of skin permeation of exogenous chemicals. *Chemosphere*, 48(6), p.603-613.
- Patzelt, A. et al., 2011. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Controlled Release*, 150(1), p.45-48.
- Pawar, A.B. et al., 2011. Arrested coalescence in Pickering emulsions. *Soft Matter*, 7(17), p.7710.
- Pellett, M. et al., 1997. The penetration of supersaturated solutions of piroxicam across silicone membranes and human skin in vitro. *Journal of Controlled Release*, 46(3), p.205-214.
- Pershing, L.K., Lambert, L.D. & Knutson, K., 1990. Mechanism of Ethanol-Enhanced Estradiol Permeation Across Human Skin in Vivo. *Pharmaceutical Research*, 7(2), p.170-175.
- Pickering, S.U., 1907. CXCVI.—Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91(0), p.2001-2021.
- Pieranski, P., 1980. Two-Dimensional Interfacial Colloidal Crystals. *Physical Review Letters*, 45(7), p.569-572.
- Pierre, M.B.R. & Costa, I. dos S.M., 2011. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Archives of Dermatological Research*, 303(9), p.607-621.
- Pozzo, A.D. & Pastori, N., 1996. Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 18(2), p.57–66.
- Prabha, S. et al., 2002. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1–2), p.105-115.
- Prausnitz, M.R., Mitragotri, S. & Langer, R., 2004. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(2), p.115-124.
- Prestidge, C. A., Barnes, T. & Simovic, S., 2004. Polymer and particle adsorption at the PDMS droplet-water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, p.105-118.
- Prow, T.W. et al., 2011. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), p.470-491.
- Radomska-Soukharev, A., 2007. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), p.411-418.
- Raghavan, S. et al., 2001. Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 212(2), p.213-221.

- Ramsden, W., 1903. Separation Of Solids in The surface Layers of solutions and Suspensions. *Proceedings of the Royal Society of London*, 72, p.156-164.
- Ranatunga, R.J.K.U. et al., 2011. Molecular dynamics study of nanoparticles and non-ionic surfactant at an oil–water interface. *Soft Matter*, 7(15), p.6942-6952.
- Rancan, F. et al., 2012. Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), p.76-84.
- Rastogi, R., Anand, S. & Koul, V., 2009. Flexible polymerosomes—An alternative vehicle for topical delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), p.161-166.
- Reid, M.L., Jones, S.A. & Brown, M.B., 2009. Transient drug supersaturation kinetics of beclomethasone dipropionate in rapidly drying films. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2), p.114-119.
- Rhein, L., Robbins, C. & Fernee, K., 1986. Surfactant structure effects on swelling of isolated human. *J. Soc. Cosmet. Chem*, 37, p.125–139.
- Ridout, G. et al., 1991. The effects of zwitterionic surfactants on skin barrier function. *Fundamental and applied toxicology*, 16(1), p.41–50.
- Riess, G., 2003. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, 28, p.1107–1170.
- Riley, T. et al., 2003. Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery. *Langmuir*, 19, p.8428-8435.
- Riley, T. et al., 2001. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)–Poly(ethylene glycol) (PLA–PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir*, 17(11), p.3168-3174.
- Roberts, M.S. & Walters, K.A, 2008. Human skin morphology and dermal absorption. In *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Informa Healthcare, p. 1-15.
- Romonchuk, W.J. & Bunge, A.L., 2006. Permeation of 4-cyanophenol and methyl paraben from powder and saturated aqueous solution through silicone rubber membranes and human skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(11), p.2526–2533.
- Russell, J.T. et al., 2005. Self-Assembly and Cross-Linking of Bionanoparticles at Liquid-Liquid Interfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(16), p.2420-2426.
- Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E. & Monteiro-Riviere, Nancy A., 2007. Variables Influencing Interactions of Untargeted Quantum Dot Nanoparticles with Skin Cells and Identification of Biochemical Modulators. *Nano Letters*, 7(5), p.1344-1348.
- Salari, J.W.O., Leermakers, F.A.M. & Klumperman, B., 2011a. Pickering Emulsions: Wetting and Colloidal Stability of Hairy Particles—A Self-Consistent Field Theory. *Langmuir*, 27(11), p.6574-6583.
- Salari, J.W.O., Leermakers, F.A.M. & Klumperman, B., 2011b. Pickering Emulsions: Wetting and Colloidal Stability of Hairy Particles—A Self-Consistent Field Theory. *Langmuir*, 27(11), p.6574-6583.
- Dos Santos, O.D.H. et al., 2006. Study of Liquid Crystalline Phase Changes during Evaporation in Vegetable Oil Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27(7), p.997-1001.
- Santos, P. et al., 2011. Enhanced permeation of fentanyl from supersaturated solutions in a model membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, 407(1–2), p.72-77.
- Sarpotdar, P. p. & Zatz, J.L., 1986. Percutaneous Absorption Enhancement by Nonionic Surfactants. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12(11-13), p.1625-1647.
- Sasatsu, M., Onishi, H. & Machida, Y., 2005. Preparation of a PLA–PEG block copolymer using a PLA derivative with a formyl terminal group and its application to nanoparticulate formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 294, p.233-245.

- Schaefer, H et al., 1990. Follicular penetration. In *Prediction of percutaneous penetration, Methods, Measurements, Modeling*. London: R.C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraft, p. 163–173.
- Schäfer-Korting, M. et al., 2010. Innovative Agents for Actinic Keratosis and Nanocarriers Enhancing Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(1), p.6-14.
- SchÄtzlein & Cevc, 1998. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *British Journal of Dermatology*, 138(4), p.583–592.
- Scheuplein, R.J., 1967. Mechanism of Percutaneous Absorption. *Journal of Investigative Dermatology*, 48(1), p.79-88.
- Scheuplein, R.J. & Blank, I.H., 1971. Permeability of the skin. *Physiological Reviews*, 51(4), p.702–747.
- Schneider, Marc et al., 2009. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-endocrinology*, 1(4), p.197–206.
- Schulman, J.H. & Leja, J., 1954. Control of contact angles at the oil-water-solid interfaces. Emulsions stabilized by solid particles (BaSO₄). *Transactions of the Faraday Society*, 50(0), p.598-605.
- Schwarz, J.S., Weisspapir, M.R. & Friedman, D.I., 1995. Enhanced Transdermal Delivery of Diazepam by Submicron Emulsion (SME) Creams. *Pharmaceutical Research*, 12(5), p.687-692.
- Seto, J.E. et al., 2010. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *Journal of Controlled Release*, 145(1), p.26-32.
- Shahi, V. & Zatz, J.L., 1978. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(6), p.789–792.
- Shen, C., Guo, S. & Lu, C., 2008. Degradation behaviors of monomethoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. *Polymers for Advanced Technologies*, 19, p.66-72.
- Shen, W.-W., Danti, A.G. & Bruscato, F.N., 1976. Effect of nonionic surfactants on percutaneous absorption of salicylic acid and sodium salicylate in the presence of dimethyl sulfoxide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), p.1780–1783.
- Shi, B. et al., 2005. Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and biodistribution in S180 tumor bearing mice. *Colloid and Polymer Science*, 283, p.954–967.
- Shim, J. et al., 2004a. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 97(3), p.477-484.
- Shim, J. et al., 2004b. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 97(3), p.477-484.
- Simovic, S. & Prestidge, C. A., 2007. Nanoparticle layers controlling drug release from emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, p.39-47.
- Simovic, S. & Prestidge, C. A., 2004. Nanoparticles of Varying Hydrophobicity at the Emulsion Droplet-Water Interface: Adsorption and Coalescence Stability. *Langmuir*, 20, p.8357-8365.
- Simovic, Spomenka & Prestidge, Clive A., 2003. Adsorption of Hydrophobic Silica Nanoparticles at the PDMS Droplet–Water Interface. *Langmuir*, 19(20), p.8364-8370.

- Sloan, K.B. & Bodor, N., 1982. Hydroxymethyl and acyloxymethyl prodrugs of theophylline: enhanced delivery of polar drugs through skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 12(4), p.299-313.
- Smith, E.W. & Maibach, H.I., 2006a. *Percutaneous penetration enhancers*, CRC/Taylor & Francis.
- Smith, E.W. & Maibach, H.I., 2006b. *Percutaneous penetration enhancers*, CRC/Taylor & Francis. Available at: <http://drugdelivery.chbe.gatech.edu/Papers/1995/Prausnitz%20Electroporation%20in%20Percutaneous%20Penetration%20Enhancers%201995.pdf> [Consulté le avril 29, 2013].
- Sonavane, G. et al., 2008. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), p.1-10.
- Stancik, E.J. et al., 2003. Structure and dynamics of particle monolayers at a liquid-liquid interface subjected to shear flow. *Faraday Discussions*, 123, p.145-156.
- Stancik, E.J., Kouhkan, M. & Fuller, G.G., 2004. Coalescence of Particle-Laden Fluid Interfaces. *Langmuir*, 20(1), p.90-94.
- Strathclyde, G.G., 1990. Multiple-phase oil-in-water emulsions. *J. Soc. Cosmet. Chem*, 41, p.1-22.
- Sung, K., Fang, J.-Y. & Yoa-Pu Hu, O., 2000. Delivery of nalbuphine and its prodrugs across skin by passive diffusion and iontophoresis. *Journal of Controlled Release*, 67(1), p.1-8.
- Tambe, D. E. & Sharma, M. M., 1994. The Effect of Colloidal Particles On Fluid-Fluid Interfacial Properties And Emulsion Stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 52, p.1-63.
- Tambe, David E. & Sharma, Mukul M., 1993. Factors Controlling the Stability of Colloid-Stabilized Emulsions I. An Experimental Investigation. *Journal of Colloid and Interface science*, 157, p.244-253.
- Tambe, David E. & Sharma, Mukul M., 1994. factors Controlling the Stability of Colloid-Stabilized Emulsions II. A model for the Rheological Properties of Colloid-Laden Interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 162, p.1-10.
- Tan, A. et al., 2009. Silica-lipid hybrid (SLH) microcapsules: A novel oral delivery system for poorly soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 134(1), p.62-70.
- Teeranachaidekul, V. et al., 2008. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*, 128(2), p.134-141.
- Thomas, N.S. & Panchagnula, R., 2003. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(1), p.71-79.
- Tian, J. et al., 2007. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem*, 2(1), p.129-136.
- Torchilin, V.P., 2007. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), p.1-16.
- Touitou, E. et al., 2000. Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, 65(3), p.403-418.
- TREGGAR, R.T., 1961. Relative penetrability of hair follicles and epidermis. *The Journal of physiology*, 156, p.307-313.
- Trommer, H. & Neubert, R.H.H., 2006a. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(2), p.106-121.

- Trommer, H. & Neubert, R.H.H., 2006b. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(2), p.106-121.
- Tuzar, Z. & Kratochvil, P., 1976. Block and Graft Copolymer Micelles In Solution. *Advances in Colloid and Interface Science*, 6, p.201-232.
- Tzoumaki, M.V. et al., 2011. Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids*, 25(6), p.1521-1529.
- Vaddi, H.K. et al., 2003. Oxide Terpenes as Human Skin Penetration Enhancers of Haloperidol from Ethanol and Propylene Glycol and Their Modes of Action on Stratum Corneum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(2), p.220-228.
- Velikov, K.P., Durst, F. & Velev, O. D., 1998. Direct Observation of the Dynamics of Latex Particles Confined inside Thinning Water–Air Films. *Langmuir*, 14(5), p.1148-1155.
- Vettor, M. et al., 2010. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), p.253-262.
- Vignati, E., Piazza, R. & Lockhart, T.P., 2003. Pickering Emulsions: Interfacial Tension, Colloidal Layer Morphology, and Trapped-Particle Motion. *Langmuir*, 19(17), p.6650-6656.
- Vogt, A. et al., 2006. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *Journal of investigative dermatology*, 126(6), p.1316–1322.
- Walker, R.B. & Smith, E.W., 1996. The role of percutaneous penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(3), p.295-301.
- Walters, Kenneth A., Bialik, W. & Brain, K.R., 1993. The effects of surfactants on penetration across the skin*. *International Journal of Cosmetic Science*, 15(6), p.260–271.
- Walters, Kenneth A., Walker, M. & Olejnik, O., 1988. Non-ionic Surfactant Effects on Hairless Mouse Skin Permeability Characteristics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(8), p.525–529.
- Wang, W. et al., 2004. Effect of charged colloidal particles on adsorption of surfactants at oil–water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 274(2), p.625-630.
- Wege, H.A. et al., 2008. Long-Term Stabilization of Foams and Emulsions with In-Situ Formed Microparticles from Hydrophobic Cellulose. *Langmuir*, 24(17), p.9245-9253.
- Welin-Berger, K., Neelissen, J. & Bergenståhl, B., 2001. In vitro permeation profile of a local anaesthetic compound from topical formulations with different rheological behaviour — verified by in vivo efficacy data. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), p.229-236.
- Whitesides, T.H. & Ross, D.S., 1995a. Experimental and Theoretical Analysis of the Limited Coalescence Process: Stepwise Limited Coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, 169(1), p.48-59.
- Whitesides, T.H. & Ross, D.S., 1995b. Experimental and Theoretical Analysis of the Limited Coalescence Process: Stepwise Limited Coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, 169(1), p.48-59.
- Wiechers, J. m. & Barlow, T., 1999. Skin Moisturisation and Elasticity Originate From at Least Two Different Mechanisms. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(6), p.425–435.
- Wiechers, J. W. et al., 2012. Predicting skin penetration of actives from complex cosmetic formulations: an evaluation of inter formulation and inter active effects during formulation optimization for transdermal delivery. *International Journal of Cosmetic Science*, 34(6), p.525-535.

- Wiley, R., 1954. Limited coalescence of oil droplets in coarse oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid Science*, 9(5), p.427-437.
- Williams, A.C. & Barry, B.W., 1989. Essential oils as novel human skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2), p.R7-R9.
- Williams, Adrian C & Barry, Brian W, 2004. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(5), p.603-618.
- Williams, Adrian C. & Barry, Brian W., 2012. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, p.128-137.
- Wissing, S., Lippacher, A. & Müller, R., 2001. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of cosmetic science*, 52(5), p.313-324.
- Wu, X. et al., 2010. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(3), p.117-123.
- Wu, Xiao, Price, G.J. & Guy, Richard H., 2009. Disposition of Nanoparticles and an Associated Lipophilic Permeant following Topical Application to the Skin. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), p.1441-1448.
- Yang, L. & Alexandridis, P., 2000. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(1-2), p.132-143.
- Yoo, H.S. & Park, T.G., 2001. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *Journal of Controlled Release*, 70, p.63-70.
- Yusoff, A. & Murray, B.S., 2011. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(1), p.42-55.
- Zellmer, S., Pfeil, W. & Lasch, J., 1995. Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1237(2), p.176-182.
- Zhang, K. et al., 2012. Human skin permeation of neutral species and ionic species: Extended linear free-energy relationship analyses. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(6), p.2034-2044.
- Zhang, L. & Eisenberg, A., 1995. Aggregates of Polystyrene-b-poly (acrylic acid) Block Copolymers. *Science*, 268, p.23.
- Zhang, L. & Eisenberg, A., 1996. Multiple Morphologies and Characteristics of « Crew-Cut » Micelle-like Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 118(13), p.3168-3181.
- Zhang, X., Jackson, J.K. & Burt, H.M., 1996. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International Journal of Pharmaceutics*, 132, p.195-206.
- Zheng, M. et al., 2013. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 430, p.76-84.
- Zhu, K.J., Xiangzhou, L. & Shilin, Y., 1990. Preparation, characterization, and properties of polylactide (PLA)-poly(ethylene glycol) (PEG) copolymers: A potential drug carrier. *Journal of Applied Polymer Science*, 39(1), p.1-9.

Emulsions de Pickering stabilisées par des particules polymériques biodégradables : étude physico-chimique et évaluation pour l'application cutanée.

RESUME: La stabilisation dite de Pickering repose sur l'utilisation de particules solides au lieu des émulsifiants. Leur forte adsorption aux interfaces confère à celles-ci une rigidité les protégeant de la coalescence. Ce travail se partage en quatre grandes parties. Un premier volet traite de la fabrication de ces particules et de leur caractérisation physico-chimique. Une deuxième partie traite de la formulation d'émulsions H/E selon deux procédés différents et leur caractérisation. La troisième partie avait pour but l'investigation du comportement de ces particules à l'interface H/E par diffusion de neutrons. La dernière partie traite de l'évaluation de ces émulsions pour l'application cutanée.

Ce travail a pour objectif de formuler des émulsions de Pickering en utilisant des particules polymériques biodégradables. Des particules individualisées formées à partir de copolymères di-blocs du type : PCL-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG, ont été fabriquées selon un procédé de nanoprecipitation innovant. Elles ont été caractérisées en termes de taille et de stabilité. Leur structure interne a également été investiguée par RMN et cryo-MET. Leur aptitude à stabiliser des émulsions H/E très concentrées a été démontrée. L'impact du procédé d'émulsification sur les propriétés finales a été souligné et l'adsorption de particules en forme de chapelets serrés à l'interface a été visualisée par diffusion de neutrons et microscopie électronique après cryofracture.

L'absorption du rétinol dans la peau à partir de ces émulsions innovantes, a montré une accumulation accrue de cet actif dans le *stratum corneum* comparée à celle d'une émulsion stabilisée par des tensioactifs classiques. Cette absorption cutanée a été montrée dépendre du procédé de fabrication des émulsions. Les particules en suspension aqueuse ont aussi été testées pour l'encapsulation et la libération cutanée du rétinol. Les résultats ont montré l'influence de la constitution interne des particules (PCL ou PLA) sur l'absorption du rétinol dans la peau. L'utilisation de polymères biodégradables apporte de nouvelles perspectives dans la formulation des émulsions de Pickering à usage cosmétique ou pharmaceutique, en s'affranchissant des effets jugés hasardeux pour la santé humaine des particules inorganiques.

MOTS-CLES: émulsion de Pickering biocompatibles, copolymères di-blocs, absorption cutanée, nanoparticules biodégradables

Pickering emulsions stabilization using biodegradable particles: physical chemistry studies and application to skin drug delivery.

SUMMARY: The so-called Pickering stabilization is based on the use of solid particles instead of emulsifiers. Their strong adsorption at interfaces confers rigidity preventing them from coalescence. This work is divided into four main parts. The first part deals with the manufacture of these particles and their physicochemical characterization. A second part deals with the O/W emulsions formulation according to two different methods and their characterization. The third part is an investigation into the behavior of these particles at the O/W interface by small angle neutron scattering. The last part deals with the evaluation of these emulsions for their application to skin delivery.

This work aims at the preparation of Pickering emulsions using biodegradable polymeric particles. Individual particles formed from diblock copolymers such as: PCL-*b*-PEG and PLA-*b*-PEG, were made by an innovative nanoprecipitation process. They were characterized in terms of their size and stability. Their internal structure was also investigated by NMR and cryo-TEM. Their ability to stabilize highly concentrated O/W emulsions has been demonstrated. The impact of the emulsification process on the final properties was emphasized and the adsorption of particles as tight necklaces at the interface was visualized by neutron scattering and freeze-fracture electron microscopy.

The skin absorption of retinol from these innovative emulsions showed enhanced accumulation of the asset in the *stratum corneum* compared to conventional surfactant-stabilized emulsions. Such skin absorption of retinol was shown to depend on the manufacturing method of the emulsions. Particles in aqueous suspension were also tested for encapsulation and delivery of retinol in skin. The results showed the influence of the internal structure of the particles (PCL or PLA) on the absorption of retinol in the skin. The use of biodegradable polymers brings new perspectives in the formulation of Pickering emulsions for cosmetic or pharmaceutical use, while avoiding the effects of inorganic particles considered hazardous to human health.

KEY WORDS: Biocompatible Pickering emulsion, skin absorption, biodegradable nanoparticles, block copolymers

DISCIPLINE: génie pharmaceutique - dermatopharmacie

Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007,
Université Claude Bernard Lyon 1,
43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France