



HAL
open science

Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques

Laurène Lesoin

► **To cite this version:**

Laurène Lesoin. Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2011. Français. NNT : . tel-00637271

HAL Id: tel-00637271

<https://theses.hal.science/tel-00637271>

Submitted on 31 Oct 2011

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.

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N°attribué par la bibliothèque :

TITRE :

**FORMATION DE LIPOSOMES PAR UN PROCEDE INNOVANT UTILISANT
LES FLUIDES SUPERCRITIQUES**

THESE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE

Faculté des Sciences et Techniques

Discipline : Génie des Procédés

présentée et soutenue publiquement par

LAURÈNE LESOIN

Le 20 mai 2011

Thèse réalisée sous la direction du Professeur **Elisabeth BADENS** et du Docteur **Olivier BOUTIN** et co-encadrée par le Docteur **Christelle CRAMPON**

Ecole doctorale : **Sciences de l'Environnement**

JURY

Rapporteurs :

Mme M.-J. COCERO Professeur – Université de Valladolid

Mme P. SUBRA-PATERNAULT Directeur de Recherche - ENSCBP

Examineurs :

Mme E. BADENS Professeur – Université Paul Cézanne

M. O. BOUTIN Maître de Conférences – Université Paul Cézanne

Mme C. CRAMPON Maître de Conférences – Université Paul Cézanne

M. J.-B. GUILLOT Professeur – Ecole Centrale Paris

**M. P. LACROIX -
DESMAZES** Directeur de Recherche - ENSCM

Remerciements

A M. le Professeur Patrick BONTOUX (Directeur de l'UMR) et M. le Professeur Nicolas ROCHE (Directeur adjoint de l'UMR),

J'ai effectué le présent travail de thèse au laboratoire de Mécanique, Modélisation et Procédés Propres (UMR CNRS 6181). Je vous remercie de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de l'UMR.

A Mme le Professeur Elisabeth BADENS,

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie en thèse dans votre équipe Procédés et Fluides Supercritiques. Pendant trois ans et demi, vous avez dirigé mes travaux de thèse et je vous remercie pour l'intérêt et la confiance que vous avez su m'accorder au quotidien. Cette thèse a été pour moi un accomplissement sur le plan professionnel et personnel. J'ai l'impression d'avoir trouvé ma voie. Sans votre disponibilité et vos conseils, ce travail n'aurait pu être réalisé.

A M. le Docteur Olivier BOUTIN,

Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour votre disponibilité et vos conseils tout au long de ce travail de thèse.

A Mme le Docteur Christelle CRAMPON,

Je tiens à te remercier tout particulièrement pour ton soutien au long de ces années. Tes conseils, ta bonne humeur et ta disponibilité m'ont aidé à prendre confiance en moi et à me dépasser. Je te remercie pour tout.

A Mme le Professeur María José COCERO et Mme le Docteur Pascale SUBRA-PATERNAULT,

Je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

A M. le Professeur Jean-Bernard GUILLOT et M. le Docteur Patrick LACROIX-DESMAZES,

Je vous remercie de participer à ce jury de thèse.

A Mme Laurence ASIA, Mme le Docteur Isabelle BEURROIES, M. le Docteur Jérôme LABILLE, M. le Docteur Yves GALLY et M. le Professeur Jean-Denis TROADEC,

Je tiens à vous faire part de ma gratitude pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces années de thèse.

A Emilie, Yasmine, Mireille, Jérémy, Sébastien, Laurie, Fanny, Thomas, Clémence, Audrey, Jean-Paul et tous les autres,

Merci pour votre présence amicale, votre gentillesse et votre soutien.

A mes parents,

Sans vous, je ne serais pas arrivée jusque là.

A Guillaume,

A Louise,

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Nomenclature	7
Introduction générale.....	8
Chapitre I : Synthèse bibliographique - Les fluides supercritiques et les liposomes.....	12
Introduction	13
I-1. Les fluides supercritiques.....	14
I-1.1. Définition d'un fluide supercritique.....	14
I-1.2. Propriétés physico-chimiques des fluides supercritiques	16
I-1.3. Le CO ₂ supercritique.....	17
I-1.4. Applications des fluides supercritiques – génération de particules	18
I-2. Les liposomes	22
I-2.1. Préambule	22
I-2.2. Les constituants majeurs des liposomes : les phospholipides.....	22
I-2.3. Les différentes classes de liposomes.....	27
I-2.4. Stabilité des liposomes.....	29
I-2.5. Applications des liposomes.....	31
I-2.6. Caractérisation des liposomes.....	33
I-2.7. Formation des liposomes	42
Chapitre II : Comportement du système ternaire CO ₂ /eau/surfactant sous pression- Application à la formation des liposomes	62
Introduction	63
II-1. Des émulsions aux liposomes	65
II-1.1. Etude des systèmes ternaires CO ₂ /eau/surfactant sous pression	65
II-1.2. Déstabilisation des émulsions.....	69
II-1.3. La formation des liposomes.....	73
II-2. Les procédés utilisant du CO ₂ supercritique	76
II-2.1. Les techniques utilisées et les caractéristiques des liposomes formés	76
II-2.2. Les mécanismes de formation des liposomes.....	80
II-3. Conclusion	83

Chapitre III : Etude du procédé Supercritical Anti-Solvent (SAS) - Application à la formation de phospholipides divisés et comparaison avec une méthode conventionnelle	84
Introduction	85
III-1. Matériels et méthodes	87
III-1.1. Les produits	87
III-1.2. La préparation des liposomes	88
III-1.3. La caractérisation	92
III-2. Résultats	94
III-2.1. Préambule	94
III-2.2. Comparaison entre le procédé supercritique SAS et la méthode classique de Bangham	95
III-2.3. Etude de l'influence de la variation des paramètres expérimentaux pour le procédé SAS	105
III-3. Conclusion	116
 Chapitre IV : Mise au point d'un procédé innovant - Le procédé Continu Anti-Solvant (CAS)	 119
Introduction	120
IV-1. Présentation du procédé Continuous Anti-Solvent	121
IV-1.1. Introduction	121
IV-1.2. Montage expérimental du procédé Continuous Anti-Solvent	121
IV-1.3. Protocole expérimental	124
IV-2. Détermination d'un point de fonctionnement en mode semi-batch	126
IV-2.1. Comportement des phases	128
IV-2.2. Etude des paramètres expérimentaux	130
IV-3. Essais préliminaires du procédé Continuous Anti-Solvent (CAS)	139
IV-3.1. Procédé CAS1	140
IV-3.2. Procédé CAS2	142
IV-3.3. Discussion	143
IV-4. Développements autour du procédé CAS	144
IV-4.1. Reproductibilité	144
IV-4.2. Influence des variations de la pression sur le procédé CAS	145
IV-4.3. Etude de la morphologie des liposomes formés par le procédé CAS	146
IV-4.4. Elimination de l'éthanol présent dans la suspension liposomiale	147
IV-5. Conclusion	150
 Conclusion générale et perspectives	 151
Bibliographie	155
Liste des Tableaux	165
Liste des Figures	168

Nomenclature

P	<i>pression</i>	<i>MPa</i>
T	<i>température</i>	<i>K</i>
m_0	<i>masse d'eau initialement placée dans l'autoclave</i>	<i>g</i>
d_1	<i>somme des pourcentages volumiques des liposomes de tailles inférieures à 1 μm</i>	<i>%</i>
d_2	<i>somme des pourcentages volumiques des liposomes de tailles comprises entre 1 et 10 μm</i>	<i>%</i>
d_3	<i>somme des pourcentages volumiques des liposomes de tailles supérieures à 10 μm</i>	<i>%</i>

Acronymes

RESS	<i>Rapid Expansion of a Supercritical Solution</i>
SAS	<i>Supercritical Anti-Solvent</i>
ASES	<i>Aerosol Solvent Extraction System</i>
PGSS	<i>Particles from Gas Saturated Solution</i>
SEDS	<i>Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids</i>
GAS	<i>Gas Anti-Solvent</i>
SDM	<i>Système de Délivrance de Médicaments</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
MLV	<i>Multilamellar Vesicle</i>
ADN	<i>Acide DésoxyriboNucléique</i>

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet porté depuis plusieurs années par l'équipe Procédés et Fluides Supercritiques du laboratoire de Mécanique, Modélisation et Procédés Propres de l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille III (UMR CNRS 6181) et visant à mettre au point un procédé supercritique innovant de génération de liposomes. L'équipe Procédés et Fluides Supercritiques développe des techniques supercritiques de micronisation qui permettent de former des particules solides de taille calibrée à partir de matériaux bruts. De 1994 à 1998, une thèse a été menée au sein du laboratoire sur la micronisation de la lécithine de soja par plusieurs procédés supercritiques [1]. Le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent) s'est finalement révélé être le plus performant pour microniser la lécithine de soja brute. C'est dans ce cadre que cette thèse a démarré en 2007 et avec un double objectif : une étude d'optimisation sur le procédé SAS et la mise au point d'un procédé supercritique innovant continu et en une étape pour former des liposomes.

Les liposomes sont des vésicules sphériques nano- ou micrométriques dont l'enveloppe est constituée d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les liposomes possèdent un cœur aqueux séparé du milieu aqueux environnant par ces bicouches. Les liposomes sont biodégradables, atoxiques et principalement employés comme systèmes de délivrance de principes actifs (médicaments, compléments alimentaires) dans l'organisme humain. Il existe de nombreuses façons de former des liposomes. Les méthodes dites conventionnelles telles que celle de Bangham [2, 3] sont les plus utilisées. Cependant, ces méthodes posent des problèmes car elles nécessitent l'emploi de solvants organiques toxiques [4]. De plus, elles ont souvent été étudiées et appliquées sur des petits volumes de solution et il existe donc peu d'éléments sur leur extrapolation. De nos jours, l'intérêt suscité par les liposomes dans la médecine ou l'agroalimentaire est notable. Mais cet engouement est confronté au durcissement de la réglementation sur l'utilisation des solvants organiques tant au niveau Européen avec la Directive REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances – EC1907/2006), qu'au niveau de l'industrie alimentaire mondiale avec la régulation des substances ou additifs alimentaires avec le concept GRAS (Generally Recognized As Safe), ou encore au niveau de l'industrie pharmaceutique mondiale avec les contraintes imposées par les BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication). Ainsi, le développement

de nouveaux procédés utilisant des solvants propres tels que le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique est devenu une nécessité. C'est l'un des enjeux de ce travail de thèse : la conception d'un procédé innovant utilisant un fluide supercritique propre comme solvant de substitution aux solvants organiques. Le choix s'est alors directement orienté vers le CO₂ supercritique car dans un contexte de conscience environnementale accrue, le CO₂ est un produit abondant et réutilisable. De plus, la température critique du CO₂ (304,1 K) permet de travailler avec des principes actifs thermolabiles comme par exemple lorsque ces principes actifs sont encapsulés dans les liposomes. Enfin, pour des applications médicales, l'emploi du CO₂ supercritique, dans certaines conditions, permet de stériliser le milieu de travail. Ainsi, un gaz à effet de serre (le CO₂) trouve aujourd'hui une utilité dans des procédés alternatifs.

Ce travail de recherche a principalement porté sur la mise au point d'un procédé innovant, continu et compact de formation de liposomes. A ce stade, il est important de souligner que, dans ce travail de recherche, la formation des liposomes a été abordée sous l'angle du Génie des Procédés. Ainsi, les liposomes, objets prisés du monde médical sont ici considérés comme le produit d'un procédé. Et si le monde médical travaille sur l'encapsulation par les liposomes avec des progrès constants sur l'amélioration de la stabilité et de l'efficacité d'encapsulation des liposomes pour une biodisponibilité accrue et un ciblage pointu, dans ce travail de recherche, c'est le liposome brut qui est fabriqué et l'amélioration du procédé qui est en jeu. Cependant, au cours de ce travail de thèse, l'encapsulation d'un marqueur fluorescent dans les liposomes a été réalisée et plusieurs techniques de caractérisation des liposomes (morphologie, taille, efficacité d'encapsulation) ont été développées. Ainsi, l'encapsulation de principes actifs à haute valeur ajoutée dans ces liposomes est tout à fait envisageable.

Ce manuscrit s'organise autour de quatre chapitres. Le premier chapitre est dédié à une synthèse bibliographique des différents thèmes abordés : les fluides supercritiques et les liposomes. Après une présentation générale des fluides supercritiques, de leurs propriétés et de leurs applications, ce chapitre se poursuit par une description générale des liposomes, de leurs applications, des méthodes de caractérisation et de formation des liposomes. Ce premier chapitre se termine sur l'état de l'art des techniques supercritiques de formation des liposomes.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique critique sur le comportement des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression. Lors de la formation

des liposomes par des procédés hautes pressions, des phospholipides sont mis au contact de CO₂ supercritique avec de l'eau et éventuellement un solvant organique (en faible quantité). L'ajout d'eau peut être fait sous pression ou lors de la dépressurisation ou encore sous pression ambiante (après la dépressurisation). Si l'on imagine de mettre au point un procédé compact, la phase d'hydratation sera préférentiellement réalisée sous pression ou lors de la dépressurisation. Alors, le comportement des phases des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant ou quaternaires CO₂/eau/surfactant/éthanol est un point à étudier. En effet, comme il le sera démontré, le comportement de ces systèmes aura des conséquences sur les caractéristiques des liposomes formés. Cette seconde étude bibliographique propose une nouvelle analyse des procédés supercritiques de formation des liposomes extraits de la littérature et présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit. Des conclusions sont tirées et des pistes sont données pour comprendre les mécanismes de formation des liposomes dans les procédés mettant en jeu des fluides supercritiques. Ces éléments bibliographiques seront utiles lors du travail expérimental sur le procédé innovant présenté dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Le troisième chapitre de ce manuscrit est une étude expérimentale visant, tout d'abord, à comparer un procédé supercritique (Supercritical Anti-Solvent) et une méthode conventionnelle (méthode de Bangham) pour diviser des phospholipides (lécithine de soja brute) avant de former des liposomes. Dans un second temps l'influence de la variation de certains paramètres expérimentaux du procédé SAS sur les caractéristiques des particules formées est étudiée. Le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent), bien connu et développé au laboratoire, est utilisé pour microniser la lécithine de soja brute. La méthode de Bangham est l'une des méthodes conventionnelles de traitement de la lécithine la plus utilisée et elle permet de former un film phospholipidique dans un ballon par évaporation d'un solvant. Les phospholipides divisés obtenus par le procédé SAS ou par la méthode de Bangham sont ensuite soumis à une phase commune d'hydratation sous agitation dans les conditions ambiantes de température et de pression. Les deux méthodes ont été testées dans les mêmes conditions afin d'être comparées : même phospholipides (lécithine de soja) et même solvant organique (éthanol). Pour la comparaison des procédés, le taux de solvant résiduel des phospholipides divisés, la morphologie, la taille, l'efficacité d'encapsulation et la stabilité des liposomes formés à partir de ces phospholipides divisés ont été étudiés. Dans la seconde partie de cette étude, l'influence de la variation des paramètres expérimentaux (pression, rapport molaire CO₂/solvant et concentration en soluté) a été étudiée en fonction de la morphologie des phospholipides divisés et de la taille des liposomes formés.

Le quatrième chapitre de ce mémoire présente la mise au point du procédé innovant, continu et en une seule étape. Ce chapitre constitue l'aboutissement de ce travail de thèse. Tout d'abord, le fonctionnement du procédé en mode semi-batch a été testé. Cette étude s'est avérée nécessaire pour le choix des valeurs expérimentales du procédé continu. Cette étape a également permis de visualiser les phases en présence et de comprendre certains phénomènes impliqués dans le procédé au regard de ce qui a été présenté dans le Chapitre II. Deux procédures ont ensuite été testées en mode continu : autoclave à une seule sortie (CAS1) ou à deux sorties (CAS2). Le procédé innovant a ainsi été conçu puis développé autour de l'influence des paramètres opératoires sur la morphologie, la taille et l'efficacité d'encapsulation des liposomes formés.

Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale, suivie d'un développement sur des perspectives envisageables pour la suite de ce travail.

Chapitre I : Synthèse bibliographique - Les fluides supercritiques et les liposomes

Introduction

Ce premier chapitre bibliographique est divisé en deux parties. La première partie est consacrée à la présentation des fluides supercritiques et en particulier au dioxyde de carbone (CO₂) supercritique. Un historique des fluides supercritiques est proposé, suivi de la présentation de leurs propriétés. Ensuite, les propriétés physico-chimiques de ces fluides sont présentées, puis le cas du CO₂ supercritique est introduit avec les applications possibles. Dans ce travail de recherche, le CO₂ supercritique est l'outil fondamental, utilisé comme solvant ou anti-solvant dans des procédés dits supercritiques, et qui nous intéresseront pour former les liposomes.

La seconde partie de cette section bibliographique est consacrée aux liposomes. Tout d'abord, les phospholipides, principaux constituants des liposomes, sont présentés. Dans un second temps, la stabilité des liposomes est discutée et des solutions au problème sont évoquées, comme avec l'ajout d'autres constituants que les phospholipides dans la formulation des liposomes. Les différentes classes de liposomes sont ensuite présentées et les applications des liposomes comme vecteur de principes actifs sont discutées. La caractérisation et la formation des liposomes (techniques conventionnelles et supercritiques) sont abordées en dernier lieu. Dans le cadre de ce travail de recherche, les procédés utilisant du CO₂ supercritique pour former des liposomes font l'objet d'une partie détaillée. Ces éléments constituent la base des travaux expérimentaux développés par la suite et présentés dans ce travail.

Le lien entre ces deux axes bibliographiques se construit ainsi naturellement : le premier nourrissant le second. La compréhension des mécanismes de formation des liposomes dans les procédés supercritiques fera l'objet d'une seconde étude bibliographique proposée dans ce manuscrit (Chapitre II).

I-1. Les fluides supercritiques

I-1.1. Définition d'un fluide supercritique

I-1.1.1. Historique

La notion de point critique est apparue au XIX^{ème} siècle. En 1823, le baron Cagnard de la Tour (1777-1859) [5] observa pour la première fois la disparition de l'interface gaz/liquide en travaillant sur une enceinte chauffée contenant de l'alcool. Par la suite, il remarque qu'en plaçant une bille métallique dans cette enceinte, cette bille pouvait se déplacer presque sans résistance quand l'enceinte était placée à une température suffisante. Mais c'est finalement le physicien Thomas Andrews (1813-1885) [6] qui confirma l'existence de la température critique entre 1861 et 1869. Les expériences menées par Mendeleïev (1834-1907) sur ce qu'il appelait la « température d'ébullition absolue » illustrent bien les propriétés d'un corps pur au-delà du point critique. Mendeleïev plaça des liquides dans des tubes capillaires et les chauffa. Il observa alors qu'en augmentant la température, les liquides montaient dans les tubes et ce jusqu'à une certaine température, au-delà de laquelle les ménisques disparaissaient. Il en conclut qu'à cette température, la phase liquide et la phase gazeuse avaient les mêmes propriétés. Par la suite, une série de travaux furent entrepris sur la solubilité de certains composés dans les fluides supercritiques. Dans les années 1930, les fluides supercritiques furent utilisés pour la première fois dans l'industrie pour des opérations de réaction. A partir des années 1970, l'utilisation industrielle des fluides supercritiques se développa avec, entre autres, des applications dans l'industrie agroalimentaire (décaféination du café).

I-1.1.2. Définition

Les corps purs peuvent se trouver soit à l'état solide, liquide ou gazeux. Le diagramme de phases (Pression – Température) d'un corps pur est présenté sur la Figure I-1. Les domaines d'existence des trois états, solide (S), liquide (L) et gaz (G) sont délimités par les courbes d'équilibres diphasiques solide – gaz, solide – liquide et liquide – gaz. La courbe d'équilibre liquide – gaz s'étend du point triple T, où coexistent les trois phases, jusqu'au point critique C, de coordonnées T_C et P_C , au-delà duquel la distinction liquide/gaz n'existe plus.

Un fluide supercritique peut être défini comme un fluide dense placé dans des conditions de température et de pression supérieures à celles du point critique de ce fluide. Quelques exemples de composés souvent utilisés comme fluide supercritique et leurs coordonnées critiques sont présentés dans le Tableau I-1. On remarque que les valeurs de températures et de pressions critiques s'échelonnent sur un large intervalle, traduisant des conditions de températures et de pressions parfois difficiles à atteindre. Sur ce point, nous retiendrons que le dioxyde de carbone (CO_2) possède un point critique dit « intermédiaire » avec une température critique proche de l'ambiante (304,1 K) et une pression critique « accessible » (entre 8 et 12 MPa).

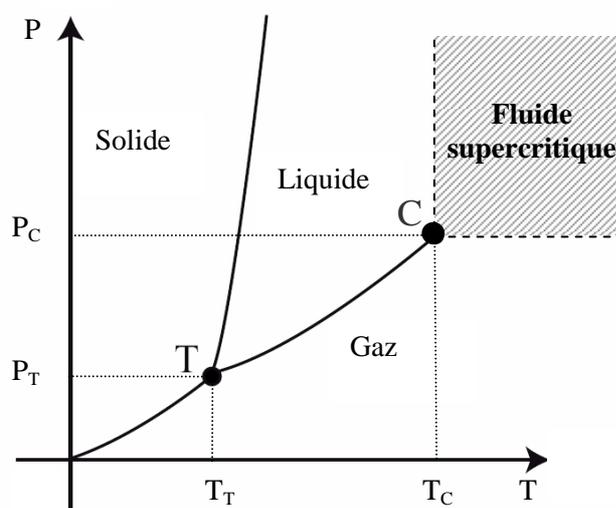


Figure I-1 - Diagramme de phase d'un corps pur

Tableau I-1 - Coordonnées critiques de quelques corps purs

Composé	T_C (K)	P_C (MPa)
Azote	126,6	3,4
Dioxyde de carbone (CO_2)	304,1	7,38
Ethane	305,2	4,9
Propane	369,6	4,2
Pentane	469,6	3,3
Acétone	508,1	4,70
Ethanol	513,9	6,14
Eau	647,3	22,12

I-1.2. Propriétés physico-chimiques des fluides supercritiques

Les fluides supercritiques possèdent des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles des gaz et des liquides. Le Tableau I-2 regroupe les différents ordres de grandeurs des masses volumiques, viscosités dynamiques et diffusivités pour les gaz, les fluides supercritiques et les liquides. Ainsi, il apparaît que les fluides supercritiques ont une masse volumique proche de celles des liquides, leur conférant un certain pouvoir solvant. Ils possèdent une viscosité dynamique proche de celle des gaz, favorisant les transferts de matière. Mais le transfert de matière dépend aussi de la diffusivité et justement, les fluides supercritiques, grâce à leur diffusivité plus élevée que celles des liquides, sont considérés comme de bons solvants d'extraction ou d'imprégnation.

Outre ces propriétés, les fluides supercritiques ont une particularité qui réside dans la variabilité de leurs propriétés en fonction des conditions de température et de pression. Ainsi, de faibles variations de température ou de pression autour du point critique vont entraîner de grandes variations de masse volumique. Cela leur confère la qualification de fluides « à géométrie variable ». Au voisinage du point critique (et pour $P > P_C$), les variations de viscosité dynamique sont importantes. Concernant la diffusivité, elle augmente lorsque la température augmente et diminue lorsque la pression augmente. Enfin, la tension interfaciale des fluides supercritiques tend vers zéro lorsque les conditions de pression et de température sont proches des conditions critiques (P_C, T_C).

Tableau I-2 - Propriétés physicochimiques des fluides supercritiques

	<i>Masse volumique</i> ($kg.m^{-3}$) : ρ	<i>Viscosité dynamique</i> ($Pa.s$) : μ	<i>Diffusivité</i> ($m^2.s^{-1}$) : D
Gaz 293 K et 0,1 MPa	$0,1 < \rho < 2$	$10^{-5} < \mu < 3.10^{-5}$	$10^{-5} < D < 4.10^{-5}$
Fluides supercritiques			
T_C, P_C	$200 < \rho < 500$	$10^{-5} < \mu < 3.10^{-5}$	7.10^{-8}
$T_C, 4 P_C$	$400 < \rho < 900$	$3.10^{-5} < \mu < 9.10^{-5}$	2.10^{-8}
Liquide 293 K et 0,1 MPa	$600 < \rho < 1600$	$2.10^{-4} < \mu < 3.10^{-3}$	$2.10^{-10} < D < 2.10^{-9}$

A ces propriétés (masse volumique, viscosité et diffusivité), il est important d'ajouter que, grâce à leur densité élevée, les fluides supercritiques favorisent la solubilisation d'un soluté de par les interactions solvant-soluté engendrées par la proximité des molécules. Ce pouvoir solvant est ajustable en fonction des conditions de pression et de température. Cette solubilisation dépend bien évidemment de la nature chimique du soluté et en particulier de sa polarité. Dans le cas d'un fluide supercritique apolaire (comme le CO₂ supercritique), en ajoutant un co-solvant polaire, on modifie le pouvoir solvant de la phase supercritique et on rend possible la solubilisation d'un composé polaire en phase supercritique. Par exemple, l'éthanol est employé comme co-solvant polaire lorsque le CO₂ supercritique est utilisé pour solubiliser de la lécithine de soja (polaire).

I-1.3. Le CO₂ supercritique

Le dioxyde de carbone est aujourd'hui le fluide supercritique le plus couramment utilisé. Aussi bien à l'échelle industrielle qu'à l'échelle laboratoire, les raisons de son utilisation préférentielle sont multiples. Tout d'abord, le CO₂ est abondant (c'est un sous produit de l'industrie chimique ; en particulier l'industrie de la synthèse de l'ammoniac), inerte chimiquement, non-inflammable, non toxique, non cancérigène ou mutagène. Ensuite, comme il l'a été souligné dans le paragraphe I-1.2, le CO₂ présente l'avantage de posséder des coordonnées critiques relativement « accessibles » avec en particulier une température critique proche de l'ambiante ($T_C = 304,2$ K). Enfin, le CO₂ est à l'état gazeux dans les conditions ambiantes de température et de pression permettant ainsi une séparation spontanée entre le matériel à traiter et le CO₂ en fin de procédé par simple dépressurisation. Le CO₂ peut être récupéré et recyclé en fin de procédé.

Ainsi, il existe de nombreuses raisons pour lesquelles le CO₂ est largement employé comme fluide supercritique. L'un des seuls freins à son utilisation pourrait être lié à son caractère apolaire. Le CO₂ est une molécule apolaire et présente ainsi un pouvoir solvant limité pour les composés polaires. Mais, l'ajout d'un co-solvant et/ou l'utilisation du CO₂ supercritique dans un procédé anti-solvant (notion développée ultérieurement) permettent de contourner cette difficulté. Pour des conditions expérimentales relativement accessibles, le CO₂ peut ainsi, selon les applications, se substituer aux solvants organiques classiques.

I-1.4. Applications des fluides supercritiques – génération de particules

Un fluide supercritique offre l'avantage de présenter par certains aspects des propriétés proches de celles des liquides et par d'autres, des propriétés proches de celles des gaz. Ces propriétés vont, de plus, être modifiables de façon continue sur de larges gammes de pressions et de températures. Ainsi, les propriétés singulières des fluides supercritiques seront mises à profit dans des procédés mettant en jeu des transferts de matière et/ou des réactions chimiques.

I-1.4.1. Les principales applications

Au départ, en dehors des réactions de synthèse, principalement utilisé dans l'industrie agroalimentaire (extraction de jus de fruit, 1939 ; décaféination du café, 1978 [7]) ou dans la pétrochimie (désasphaltage de résidus pétroliers, 1976), l'utilisation des technologies supercritiques touchent aujourd'hui de nombreux domaines : environnement, agro-alimentaire, santé, cosmétique, matériaux, nucléaire. Le Tableau I-3 présente un aperçu des utilisations des fluides supercritiques en fonction des domaines d'applications.

Tableau I-3 - Applications des technologies supercritiques en fonction du domaine d'application

Domaine	Environnement	Agro-alimentaire	Santé/Cosmétique	Matériaux	Nucléaire
<i>Principales utilisations des technologies supercritiques</i>	- Décontamination - Traitement des déchets	- Extraction - Imprégnation - Fractionnement - Stérilisation - Micro-encapsulation	- Réaction de synthèse - Génération de particules par précipitation - Imprégnation - Micro-encapsulation - Stérilisation	- Réaction de synthèse - Polymérisation - Imprégnation - Nettoyage - Séchage	Réaction chimique
<i>Exemple d'applications</i>	Effluents nucléaires [8], élimination des produits de traitement du bois des poteaux électriques contenant du cuivre, du chrome et de l'arsenic (CCA) [9]	Extraction d'arômes de vanille [10], délipidation du cacao [11]	Formation de microcapsules biodégradables pour la délivrance de médicaments ou de gènes dans l'organisme [12], Stérilisation terminale de niveau stérile SAL10-6 [13]	Mélange de polymères pour la fabrication de matériaux composites [14], Séchage pour la formation d'aérogels [15], teinture des fibres textiles [16]	Dégradation des déchets par oxydation hydrothermale [17]

Les principales applications des fluides supercritiques concernant ce travail de recherche portent sur la génération de particules de très petites tailles (de l'ordre du μm), appelée micronisation.

I-1.4.2. Les procédés supercritiques de génération de particules

La génération de particules solides par précipitation est aujourd'hui une application courante des fluides supercritiques. Cette technique permet par recristallisation de former des poudres de tailles pouvant aller de quelques centaines de nm à quelques mm et de caractéristiques contrôlées (taille, distribution de taille, morphologie et faciès, nature polymorphique).

Le fluide supercritique le plus couramment utilisé pour ce type d'applications est le CO₂ supercritique. Pour des applications pharmaceutiques, les solutés sont principalement des composés polaires. Dans la suite de ce manuscrit, nous considérerons le cas d'un soluté polaire et d'un fluide supercritique apolaire. Selon le rôle joué par le fluide supercritique dans ces procédés, on peut distinguer trois grandes familles de procédés [18] :

- Le fluide supercritique joue le rôle de solvant.
- Le fluide supercritique joue le rôle d'anti-solvant.
- Le fluide supercritique joue le rôle de soluté ou d'agent de dispersion.

I-1.4.2.1. Les procédés solvant

Le principe des procédés solvant est d'utiliser le fluide supercritique pour solubiliser le soluté à précipiter. Ces procédés s'appliquent ainsi à des composés dont la solubilité est supérieure à 10 kg.kg⁻¹ [19]. Dans le cas contraire, un co-solvant est employé. Une fois le soluté solubilisé, le mélange est détendu au travers d'une buse ou d'un capillaire afin de faire chuter brutalement la masse volumique et donc le pouvoir solvant du fluide supercritique ce qui provoque la précipitation du soluté. Les particules sont ainsi générées par la dépressurisation rapide du milieu. Ces procédés mettent en jeu des sursaturations élevées. Le procédé de référence des procédés solvant est le procédé RESS (Rapid Expansion of a Supercritical Solution).

Les procédés solvant donnent de très bons résultats en terme de contrôle de taille des particules. Selon les propriétés du co-solvant employé, il est parfois nécessaire de travailler à des conditions de température et pression élevées pour solubiliser le soluté. Ces procédés nécessitent des rapports CO₂/soluté élevés. Les pompes utilisées dans ces procédés doivent donc posséder de fortes capacités. Enfin, les utilisateurs de ces procédés mentionnent souvent des problèmes de bouchage de buse ou de capillaire et ces procédés sont difficilement extrapolables [19].

I-1.4.2.2. Les procédés anti-solvant

L'effet anti-solvant repose sur la diminution de solubilité d'un soluté pour un solvant organique lors de l'ajout d'un anti-solvant, dans notre cas, un fluide supercritique. Dans les techniques anti-solvant, le soluté à microniser est solubilisé dans un solvant organique. Ce dernier est totalement soluble dans le fluide supercritique à l'inverse du soluté. La solution organique liquide est ensuite mise en contact avec le fluide supercritique qui se solubilise dans la phase liquide tandis que le solvant diffuse vers la phase continue. Il y a ainsi sursaturation du soluté et précipitation.

Les procédés anti-solvant sont utilisés pour cristalliser des molécules d'applications très diverses et en particulier, des composés pharmaceutiques. Contrairement aux cas des procédés solvant, les procédés anti-solvant ne nécessitent pas l'emploi de conditions opératoires élevées (pression et température). Cependant, comme pour les procédés solvant, les procédés anti-solvant nécessitent de grandes quantités de fluide supercritique.

Les procédés anti-solvant diffèrent par le mode de mise en contact de la solution organique et du fluide supercritique. Par exemple, dans le procédé GAS (Gas Anti-Solvent), la solution organique est préalablement introduite dans l'autoclave avant que ce dernier ne soit mis sous pression. Le procédé GAS est un procédé batch. Dans le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent), la solution organique est injectée dans un continuum supercritique grâce à un capillaire. Le procédé SAS est semi-continu pour la phase supercritique. L'introduction du fluide supercritique et l'injection de la solution organique sont réalisés à co-courant. Le procédé ASES (Aerosol Solvent Extraction System) est identique au procédé SAS mais cette fois, l'introduction du fluide supercritique et l'injection de la solution organique sont réalisés à contre-courant. Le procédé SEDS (Solution-Enhanced Dispersion with Supercritical fluids) utilise une buse coaxiale qui sert de chambre de prémélange entre la solution organique et le fluide supercritique. Le procédé SAS est probablement le plus utilisé de nos jours comme technique anti-solvant.

I-1.4.2.3. Les procédés où le fluide supercritique joue le rôle d'agent de dispersion

Les procédés dans lesquels le fluide supercritique joue le rôle d'agent de dispersion reposent sur le fait que les gaz présentent une bonne solubilité dans les liquides (entre 5 à

50% en masse). Dans ces procédés, le fluide supercritique est solubilisé dans une phase liquide contenant le soluté à cristalliser, ou bien dans le soluté à l'état fondu. Une solution saturée en gaz est ainsi obtenue. Elle est ensuite atomisée à travers une buse dans une unité d'expansion sous basse pression et basse température. La séparation spontanée du fluide supercritique entraîne la solidification du composé à précipiter.

Ces procédés permettent de précipiter des molécules partiellement solubles dans le fluide supercritique utilisé ce qui n'est pas possible avec les procédés anti-solvant. Ces procédés présentent de plus l'avantage d'avoir de très bons rendements et de consommer peu de fluide supercritique. Cependant, le principal inconvénient de ces procédés est lié aux conditions de température employées ce qui peut constituer un frein pour le traitement des composés thermolabiles.

Le procédé PGSS (Particles from Gas Saturated Solution) est le procédé le plus généralement employé pour ce type d'utilisation des fluides supercritiques. Dans ce procédé, le soluté à précipiter est fondu puis mis en contact avec le fluide supercritique.

La description de certains de ces procédés sera développée ultérieurement dans le cas spécifique de la formation des liposomes.

I-2. Les liposomes

I-2.1. Préambule

Les liposomes sont des vésicules (structures fermées) sphériques composées de bicouches phospholipidiques qui encapsulent une partie du solvant dans lequel elles se trouvent [20]. Leur taille varie d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres. L'épaisseur d'une bicouche phospholipidique mesure quelques nanomètres (en fonction de la nature des phospholipides). En solution, la membrane des liposomes (la ou les bicouches) a un caractère dynamique, c'est-à-dire qu'elle va interagir avec le milieu et évoluer [21]. Une partie des phospholipides sont solubilisés en solution et une autre partie des phospholipides sont donc organisés en bicouches. Des échanges de molécules de phospholipides se font entre les bicouches d'un même liposome, entre liposomes et entre les bicouches et la solution. Ce point est abordé dans certaines études [20] et constitue la principale difficulté du travail expérimental sur les liposomes, tant il est difficile de les former, de les analyser et de les conserver.

I-2.2. Les constituants majeurs des liposomes : les phospholipides

I-2.2.1. Définition

Les lipides sont des corps gras d'origine naturelle. Les lipides les plus répandus au niveau des membranes biologiques sont les glycérolipides, les sphingolipides et les stérols. Les phospholipides font partie de la famille des glycérolipides. Les glycérolipides sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone hydrophobe (apolaire) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe polaire, qui constitue la tête polaire du lipide. Dans le cas des phospholipides, il s'agit du groupe phosphate, lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés. Les acides gras possèdent généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peuvent comporter une ou plusieurs insaturations, non conjuguées en général. C'est essentiellement la tête polaire (groupe phosphate dans notre cas) qui va dicter le comportement des différents lipides et qui va permettre leur classification ; ainsi, dans le cas des phospholipides, on trouve : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS)... [22] (Tableau I-4). Les phospholipides (Figure I-2) sont

donc constitués de deux parties (polaire et apolaire) qui possèdent des affinités pour deux milieux incompatibles, d'où l'appellation des phospholipides comme molécules amphiphiles ou tensioactifs ou surfactants [23]. Les molécules de phospholipides vont donc avoir tendance à s'organiser en solution de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires et inversement.

Tableau I-4 – Exemples de groupement chimique associé au groupement phosphate des phospholipides

<i>Nom</i>	<i>Formule chimique</i>
Phosphatidylethanolamine (PE)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$
Phosphatidylglycérol	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$
Phosphatidylcholine (PC)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$
Phosphatidylsérine (PS)	$-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2\text{COOH}$

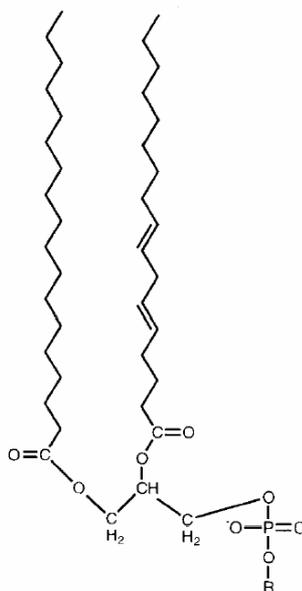


Figure I-2 – Schéma développé d'une molécule de phospholipide

I-2.2.2. Propriétés

I-2.2.2.1. Préambule

Les phospholipides possèdent une température de transition de phase qui correspond au passage réversible d'un état ordonné (L_β ou configuration *trans*) vers un état désordonné (L_α ou configuration *gauche*) via un état intermédiaire P_β [24] (Figure I-3).

La température de transition de phase dépend de la longueur et de la saturation des chaînes des phospholipides. Pour les phospholipides les plus utilisés (phosphatidylcholine), la température de transition de phase est comprise entre 271 et 328 K.

Les deux états, L_{β} et L_{α} , résultent d'une rotation possible autour des liaisons C-C des queues des chaînes hydrocarbonées. A une température inférieure à la température de transition de phase, les chaînes hydrocarbonées sont étirées au maximum (état L_{β}). Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire. La probabilité d'une isomérisation *trans* - *gauche* s'accroît alors. Au-delà de la température de transition de phase, les phospholipides passent d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée (L_{β} à L_{α}). Dans la configuration désordonnée, les chaînes hydrocarbonées ne sont plus étirées [25].

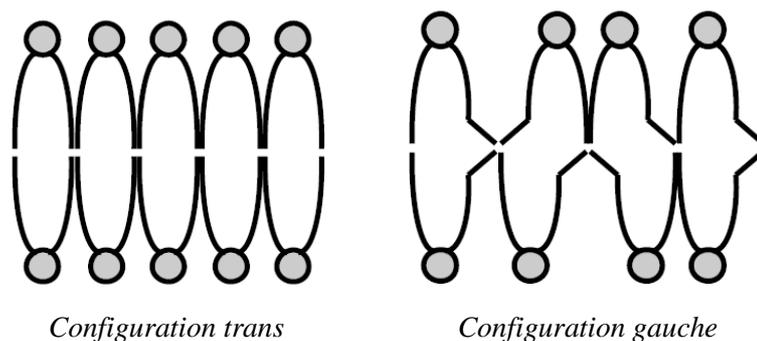


Figure I-3 – Configuration trans et gauche des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique [25]

1-2.2.2.2. De la molécule amphiphile à la vésicule

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ainsi, ces molécules vont s'auto-organiser et former des assemblages pour protéger leurs parties hydrophobes de l'eau et leurs parties hydrophiles des composés apolaires.

Prenons l'exemple d'un système composé d'eau, de CO_2 et de surfactant sous pression. En présence de CO_2 et d'eau, les phospholipides vont ainsi se localiser à l'interface CO_2 /eau, abaissant les tensions interfaciales et stabilisant le mélange apolaire/polaire. Les molécules de phospholipides vont s'organiser de manière à ce que les têtes polaires soient en contact avec les molécules d'eau, tandis que les deux queues apolaires vont s'étendre vers le CO_2 supercritique [26]. En fonction de la concentration en phospholipides, de la quantité

d'eau, de la température et de la pression du mélange, les phospholipides vont s'auto-assembler pour concilier le contact des parties hydrophiles avec l'eau [24].

Trois types particuliers d'arrangement vont nous intéresser au cours de ce travail de recherche : la micelle normale, la micelle inverse et la vésicule. Une micelle est un compartiment sphérique fermé constitué d'une couche de surfactant ; selon l'orientation de la partie polaire du surfactant vers l'extérieur ou vers l'intérieur de la sphère, on définit respectivement les micelles normales et les micelles inverses (Figure I-4).

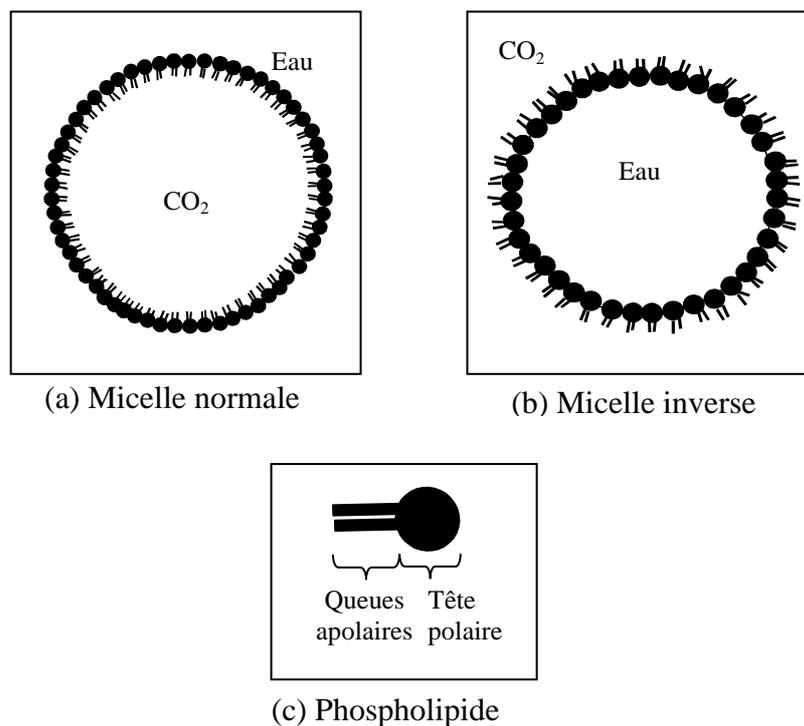


Figure I-4 – Schéma simplifié d'une micelle normale (a), d'une micelle inverse (b) et d'un phospholipide (c)

En considérant le CO₂ dans lequel des phospholipides ont été solubilisés avec un co-solvant, l'ajout d'eau en faible quantité conduit à la formation de micelle normale. Lorsque la quantité d'eau augmente, ce sont cette fois de faibles quantités de CO₂ qui sont dispersées dans l'eau et des micelles inverses sont formées.

Lorsque le CO₂ est libéré (par exemple lors de la détente du système), les phospholipides sont alors directement en contact avec la phase aqueuse. Alors, les queues apolaires des phospholipides vont se regrouper pour éviter les interactions avec l'eau, formant

une ou plusieurs bicouches phospholipidiques avec les têtes polaires des phospholipides en contact avec l'eau et les queues apolaires se faisant face, résultant en la formation d'une vésicule. Une vésicule se définit comme un compartiment sphérique fermé de petite taille (de quelques centaines de nanomètres à quelques millimètres) séparant une phase aqueuse d'une autre par au moins une bicouche de surfactant. Une vésicule phospholipidique est appelée liposome (Figure I-5).

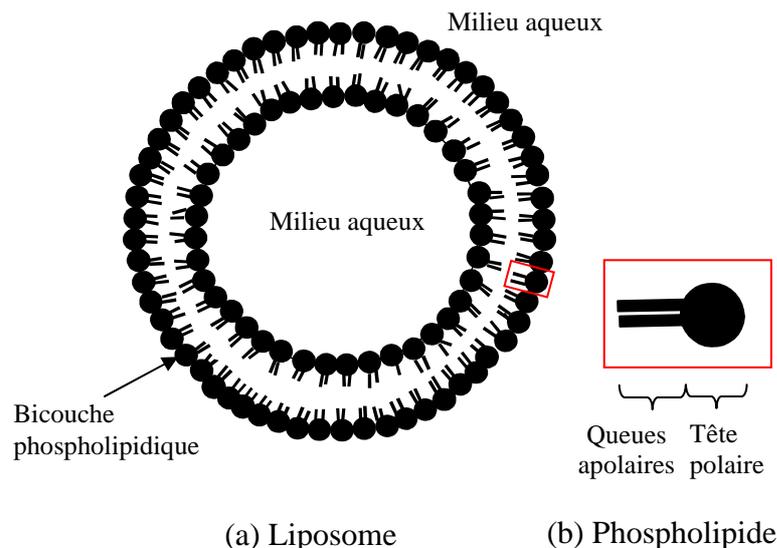


Figure I-5 – Schéma simplifié d'un liposome (a) et d'un phospholipide (b)

D'autres phases peuvent également apparaître après la libération du CO₂ supercritique, telles que la phase lamellaire (empilement de bicouche), la phase hexagonale inverse (arrangement de micelles cylindriques inverses), la phase éponge et la phase cubique inverse discontinue [24] (Figure I-6).

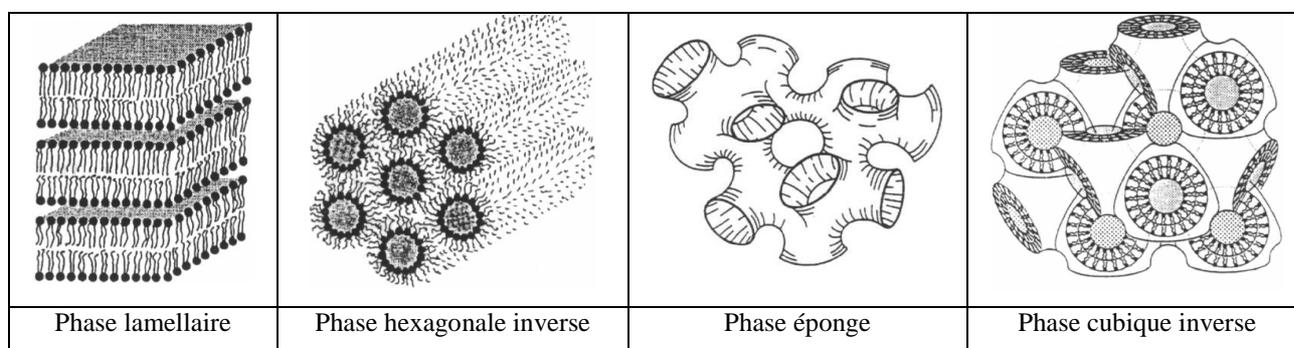


Figure I-6 – Exemples de phases possibles pour des molécules amphiphiles dans l'eau [24]

Cependant, en opérant avec des phospholipides finement divisés et avec une agitation suffisante, les vésicules, c'est-à-dire les liposomes, constituent la phase prédominante. La formation de liposomes requiert ainsi un prétraitement des phospholipides (dispersion, micronisation, ...). Dans la littérature, il est généralement précisé que ce traitement doit être réalisé à une température supérieure à la température de transition de phase des phospholipides [25]. C'est le passage d'une température supérieure à la température de transition de phase vers une température inférieure à la température de transition de phase qui assure la rigidité de la bicouche phospholipidique (passage d'un état désordonné vers un état ordonné).

I-2.3. Les différentes classes de liposomes

Les liposomes sont classés en fonction de leur nombre de bicouches appelé lamellarité et de leur taille. Ces caractéristiques varient en fonction de la méthode de formation employée et des matières premières utilisées pour les former [20].

Les vésicules unilamellaires (*unilamellar vesicles* ou LUV) sont formées d'une seule bicouche concentrique. A l'inverse, les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles* ou MLV) comptent plusieurs bicouches concentriques.

En prenant en compte la taille des liposomes, les vésicules géantes unilamellaires (*large unilamellar vesicles* ou LUV) sont des vésicules unilamellaires de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm et les petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicles* ou SUV) sont des vésicules unilamellaires de tailles comprises entre 0,02 et 0,1 μm . Enfin, les vésicules multilamellaires ont une taille comprise entre 0,2 et 100 μm . Ces gammes de tailles sont données à titre indicatif et ont été déterminées en fonction des données de la littérature recensées dans ce manuscrit.

Enfin, les vésicules multivésiculaires sont des vésicules pour lesquelles plusieurs vésicules sont emprisonnées dans une vésicule plus grosse.

Ces éléments sont regroupés sur la Figure I-7 et dans le Tableau I-5.

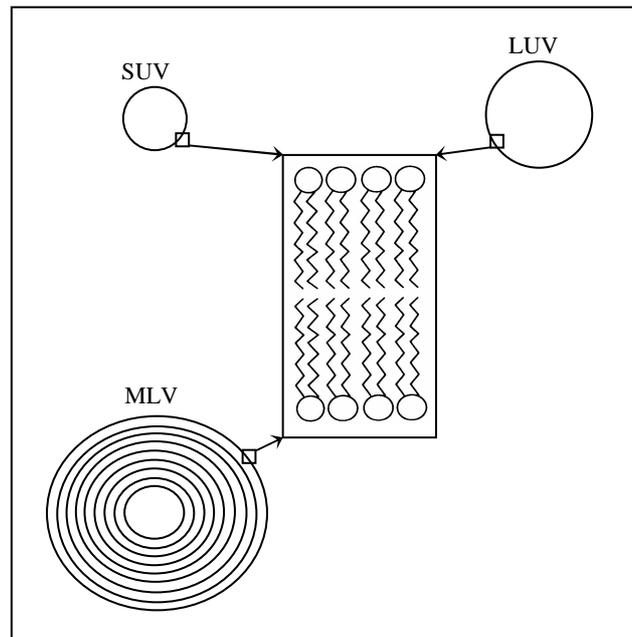
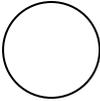
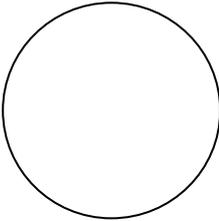
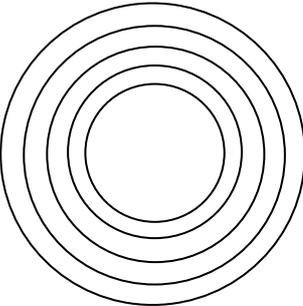


Figure I-7 - Structures des liposomes

Tableau I-5 – Tableau récapitulatif des différentes classes de liposomes [27]

Type de liposomes	Schéma simplifié	Classe	Taille approximative / μm
Petite vésicule unilamellaire		SUV	0,02 – 0,1
Large vésicule unilamellaire		LUV	0,1 – 1
Vésicule multilamellaire		MLV	0,2 – 100

I-2.4. Stabilité des liposomes

I-2.4.1. Fluidité membranaire

Comme présenté dans le paragraphe I-2.2.2, au-delà d'une certaine température appelée température de transition de phase, les phospholipides passent d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée (L_β à L_α) (Figure I-3). Dans la conformation ordonnée, les chaînes des molécules de phospholipides sont étirées au maximum et parallèle entre elles. A l'inverse, dans la conformation désordonnée, les chaînes des molécules de phospholipides oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la bicouche phospholipidique. Les chaînes hydrocarbonées ne sont alors plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche peut diminuer.

Lorsque les phospholipides sont dans la configuration ordonnée L_β , la bicouche phospholipidique des liposomes est dite rigide. A l'inverse, lorsque les phospholipides sont dans la configuration désordonnée L_α , la bicouche des liposomes est dite fluide (état dans lequel les queues des phospholipides ne sont plus étirées rectilignement).

D'autres mouvements sont possibles au sein de la bicouche phospholipidique (diffusion latérale, flexion au niveau des doubles liaisons, rotation) [24] mais ces points ne seront pas développés dans ce travail de recherche.

La fluidité membranaire est finalement définie comme l'aptitude des phospholipides à se mouvoir au sein de la membrane [28]. Une bicouche phospholipidique dans son état ordonné type gel présente donc une fluidité plus faible que dans son état désordonné type fluide. Ainsi, la température influence fortement l'organisation des phospholipides au sein de la bicouche phospholipidique. Le passage d'un état type gel à un état type fluide pour la bicouche ou la présence locale de zones désorganisées au sein d'une structure majoritairement organisée pour la bicouche favorise les phénomènes de fusion entre liposomes. Plus généralement, en cas de changement de température, une suspension liposomiale sera altérée avec relargage des principes actifs encapsulés.

I-2.4.2. Agrégation des liposomes

L'agrégation des liposomes en solution est un phénomène inévitable lorsque les liposomes ne sont constitués que de phospholipides naturels. Cette agrégation est due à

l'existence des forces attractives de van der Waals, c'est-à-dire de forces induites à l'extrémité des phospholipides. Une fois au contact, des phénomènes de fusion (coalescence) entre liposomes peuvent se produire comme vu dans le paragraphe I-2.4.1.

I-2.4.3. Dégradation chimique des liposomes

Les phospholipides sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles [29]. Ces deux dégradations altèrent l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut entraîner la libération des principes actifs encapsulés. Les conditions (température, cinétique) conduisant à ces dégradations ne sont pas détaillées.

I-2.4.4. Les solutions

Dans ce paragraphe, toutes les solutions existantes pour renforcer la stabilité des liposomes en solution ne seront pas abordées. Seuls les cas simples seront traités.

I-2.4.4.1. Ajout de cholestérol aux phospholipides

Le cholestérol ($C_{27}H_{46}O$) est utilisé dans la formulation des liposomes car il permet d'atténuer les effets de la température sur la bicouche phospholipidique. Le cholestérol vient se loger au sein de la bicouche phospholipidique. Dans le cas où la température est inférieure à la température de transition de phase, le cholestérol réduit la rigidité de la membrane. Au contraire, lorsque la température est supérieure à la température de transition de phase, le cholestérol diminue le mouvement des phospholipides au sein de la bicouche. Ainsi, le cholestérol agit pour éviter les situations extrêmes de rigidité ou de fluidité au sein de la bicouche phospholipidique.

I-2.4.4.2. Ajout de phospholipides chargés aux phospholipides neutres

L'emploi de phospholipides chargés permet d'augmenter les forces répulsives entre les liposomes et ainsi compenser les forces attractives de van der Waals. Ainsi, les phénomènes d'agrégation sont réduits.

I-2.4.4.3. La lyophilisation des liposomes

Les liposomes peuvent être lyophilisés [30] après leur formation. De nombreuses formulations à base de liposomes sont ainsi présentées dans le commerce (AmBisome®). Mais la lyophilisation d'une suspension liposomiale peut entraîner une dégradation des liposomes : des phénomènes d'agrégation/fusion des vésicules sont observés et donc une perte

du matériel encapsulé [31, 32]. Pour préserver les caractéristiques des liposomes après la phase de déshydratation/réhydratation, l'utilisation d'un agent cryoprotecteur tel que le saccharose ou le glycérol (des sucres), est nécessaire [33]. Cependant, on peut émettre un doute sur cette technique car rien ne permet d'assurer que les liposomes se reformeront de façon identique après la réhydratation.

I-2.4.4.4. La congélation des liposomes

L'idée de congeler une suspension liposomiale après sa formation afin de la conserver peut sembler avantageuse car la congélation est un processus rapide, semblable à une trempe et ainsi, on peut penser que la suspension liposomiale n'aurait pas le temps de se dégrader. Elle serait figée en l'état. Des exemples de congélation/décongélation sur des suspensions liposomiales sont présentés dans la littérature [34, 35]. Mais à chaque fois, il est souligné que ces cycles de congélation/décongélation fragilisent la membrane des liposomes et provoquent une évolution des liposomes : à partir d'une suspension de SUV, on obtient une suspension de LUV [34] ; et, à partir d'une suspension de MLV, on obtient une suspension de LUV [35]. Ces applications sont parfois utiles, par exemple, pour augmenter l'efficacité d'encapsulation d'une suspension de SUV, cette dernière est transformée en une suspension de LUV par des cycles de congélation/décongélation [34]. Mais la congélation ne permet pas de conserver une suspension liposomiale en l'état.

I-2.5. Applications des liposomes

Les liposomes furent découverts au début des années 60 [2, 3] et au départ, principalement utilisés comme modèle membranaire pour l'étude de la structure et des propriétés des membranes biologiques [2]. De par leur nature non-toxique, biodégradable, les liposomes furent rapidement reconnus pour leur possible utilisation comme systèmes de délivrance de médicaments (SDM) par voie cutanée, parentérale ou orale. L'un des avantages des liposomes est qu'ils peuvent encapsuler des composés hydrophiles ou lipophiles, soit dans l'espace interne aqueux, soit dans la bicouche phospholipidique ; des composés peuvent également être intégrés à la membrane phospholipidique par complexation (Figure I-8). Les premiers essais ne furent malheureusement pas à la hauteur des espérances. Tout d'abord, la durée de vie des liposomes dans le sang est limitée car le système immunitaire détruit les liposomes au niveau du foie et de la rate par phagocytose. Ensuite, lors d'une utilisation par voie entérale, les liposomes sont dégradés en milieu intestinal par les sels biliaires et les lipases pancréatiques [36].

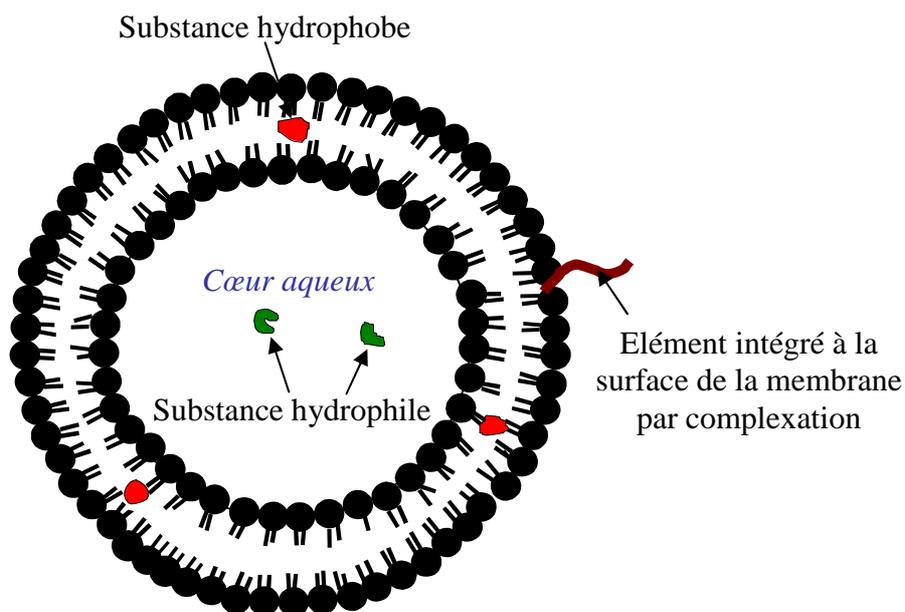


Figure I-8 – Schéma d'un liposome avec des substances encapsulées ou complexées

Depuis 30 ans, les progrès réalisés dans la formulation des liposomes permettent, aujourd'hui, de s'affranchir de ces difficultés. Aux liposomes dit « bruts », se sont substitués des liposomes « furtifs » (entourés de polymères - polyéthylène glycol – pour éviter la phagocytose [37-39]), des immunoliposomes (liposomes furtifs auxquels ont été attachés des ligands spécifiques à la surface externe pour cibler une cellule ou un tissu [40]) et enfin, des liposomes cationiques (liposomes furtifs dont la surface interne et externe est chargée positivement afin d'accroître les interactions avec les membranes cellulaires et l'ADN [41, 42]).

Grâce à leur biodisponibilité accrue et la possibilité de ciblage spécifique, ces nouveaux SDM sont utilisés pour le traitement du sida [43-46], du cancer [43, 47, 48], de la malaria [43, 49], des maladies touchant les poumons, le foie ou la rate [43], et plus généralement le traitement des maladies infectieuses [43]; la vaccination [43, 50, 51]; le diagnostic (rayons X, infrarouge) [43, 52-54]; la thérapie génique [43, 55, 56]; et enfin, l'ophtalmologie [57]. L'application des liposomes directement sur la peau et la libération de principes actifs pénétrant les tissus permettent des applications multiples en dermatologie ou cosmétologie [58]. Enfin, l'utilisation des liposomes touchent d'autres secteurs que le secteur médical avec des débouchés dans l'industrie textile (coloration de textiles ou modification de surface [59-61]), dans l'agroalimentaire (encapsulation d'arôme, de nutriments, d'enzymes [62], encapsulation d'antibiotiques d'origine naturelle pour le bétail [63]), dans

l'environnement (dépollution des sols et réduction des pollutions engendrées par les marées noires [64, 65]).

A titre d'exemple, nous citerons deux médicaments aujourd'hui commercialisés qui utilisent les liposomes comme vecteurs de principes actifs. Tout d'abord, AmBisome® (50 mg) qui est une préparation liposomiale d'amphotéricin B (antifongique). Ce médicament se présente sous la forme d'une poudre. Un solvant est ajouté et la suspension liposomiale est injectée en intraveineuse sous perfusion. D'après les spécifications du médicament, après l'ajout de solvant, AmBisome® est une suspension de liposomes unilamellaires ; le principe actif (l'amphotéricin B) se situant au niveau de la bicouche phospholipidique. Ensuite, nous citerons l'exemple de Caelyx® (2mg.mL⁻¹) qui est une formulation liposomiale PEGylée de chlorhydrate de doxorubicine utilisée dans le traitement des cancers du sein et de l'ovaire. Les liposomes PEGylés contiennent des segments greffés en surface par le polymère hydrophile de méthoxypolyéthylène glycol. Ces groupements linéaires de méthoxypolyéthylène glycol sont étalés à la surface des liposomes créant ainsi une pellicule protectrice qui réduit les interactions entre la bicouche phospholipidique et les composés plasmatiques. Cette formulation permet aux liposomes Caelyx® de rester pendant une longue durée dans la circulation sanguine. Les liposomes pégylés sont suffisamment petits (diamètre moyen approximatif 100 nm) pour passer intacts (extravasation) à travers les vaisseaux tumoraux altérés qui irriguent la tumeur.

I-2.6. Caractérisation des liposomes

Les liposomes sont caractérisés par leur taille, leur morphologie (forme, nombre de couches) leur efficacité d'encapsulation et leur stabilité. Cette section est dédiée à la méthodologie des différentes techniques de caractérisation des liposomes.

I-2.6.1. Etude de la morphologie des liposomes

Les liposomes peuvent être sphériques ou ellipsoïdaux, à une ou plusieurs bicouches. Ces propriétés influencent la stabilité des liposomes, leur capacité à encapsuler des principes actifs. En outre, les liposomes ellipsoïdaux sont moins facilement caractérisables que les liposomes sphériques.

Deux techniques sont utilisées pour étudier la morphologie des liposomes : la microscopie électronique à transmission et la microscopie optique à contraste de phase. Une

image de liposomes obtenue par microscopie électronique à transmission et une image obtenue par microscopie optique à contraste de phase sont présentées dans le Tableau I-6.

I-2.6.1.1. La microscopie électronique à transmission

Cette technique est très performante mais elle nécessite une préparation complexe des échantillons de suspension liposomiale. Deux méthodes de préparation des échantillons sont proposées dans la littérature : la fracture cryogénique ou la coloration négative.

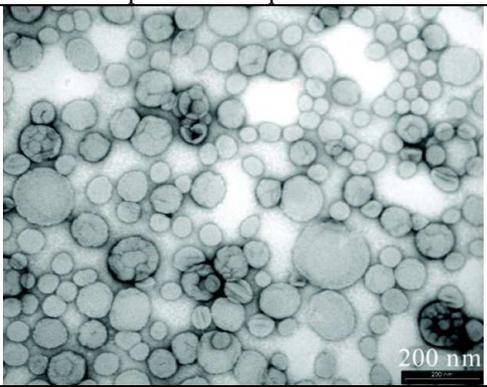
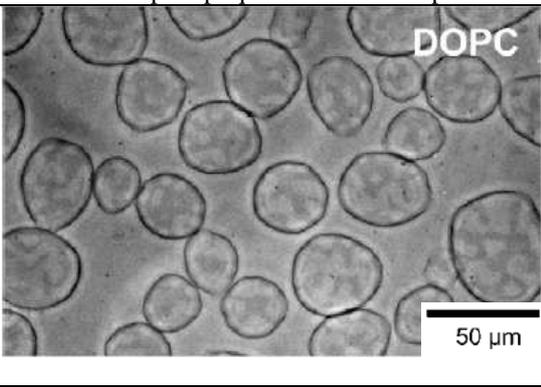
Dans le premier cas [66], les échantillons de suspension liposomiale sont tout d'abord soumis à une cryogénéisation dans du propane liquide (Température < 230 K). Puis l'échantillon solide est fracturé à 123 K et une reproduction de la surface est réalisée par sublimation d'une fine couche de carbone sous vide sur la surface de l'échantillon solide. Une ombre de la réplique est créée avec une vapeur de platine. La réplique est ensuite nettoyée avec de l'eau et de l'acétone et elle est placée sur une grille de cuivre et observée au microscope électronique à transmission.

Dans le second cas [67], les échantillons de suspension liposomiale sont absorbés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin de quelques nanomètres. L'excès d'eau est absorbé à l'aide d'un papier buvard. Une solution contenant un agent contrastant, tel que du tetroxyde d'osmium ou de l'acétate d'uranyl, est ajoutée sur la grille pendant quelques secondes puis absorbée. L'agent contrastant va se fixer préférentiellement au bord des particules absorbées. De par sa forte masse atomique, le contrastant dévie les électrons dans le diaphragme objectif. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre sur les images obtenues au microscope électronique à transmission.

I-2.6.1.2. La microscopie optique à contraste de phase

Un microscope optique à contraste de phase transforme en niveaux de gris les différences d'indices de réfraction entre deux structures. Des structures transparentes sont ainsi visualisables lorsque leur indice de réfraction diffère de l'indice de réfraction des éléments voisins. Cette technique ne nécessite pas de préparation particulière des échantillons de suspension liposomiale. La microscopie optique à contraste de phase a été utilisée par Sankar Kadimi *et al.* [68] et Tsumoto *et al.* [69] pour observer des liposomes en suspension.

Tableau I-6 – Images de liposomes en suspension obtenues par deux méthodes : microscopie électronique à transmission et microscopie optique à contraste de phase

Méthode	Microscopie électronique à transmission	Microscopie optique à contraste de phase
Images		
Références	Meure <i>et al.</i> [70]	Tsumoto <i>et al.</i> [69]

Finalement, si la microscopie optique à contraste de phase est une méthode simple à mettre en œuvre, la microscopie électronique à transmission permet d'obtenir des images en coupe des liposomes et de compter le nombre de bicouches. Le niveau de détails de la microscopie optique à contraste de phase est moindre que celui de la microscopie électronique à transmission. On remarque cependant que l'on peut observer des vésicules à l'intérieur des vésicules plus grosses (liposomes multivésiculaires) avec le microscope optique à contraste de phase dans l'image du Tableau I-6.

I-2.6.2. Détermination de la taille des liposomes

La taille est une des propriétés les plus étudiées des liposomes. En fonction de leur taille, les applications des liposomes ne sont pas les mêmes. Par exemple, pour des applications pharmaceutiques, il est préférable que les liposomes soient de tailles comprises entre 2 et 5 μm .

Deux méthodes sont principalement utilisées pour déterminer la taille des liposomes : la spectroscopie par corrélation de photons [66, 67, 70, 71] et la granulométrie laser [72, 73].

I-2.6.2.1. La spectroscopie par corrélation de photons

Cette méthode repose sur le mouvement brownien des particules de quelques nanomètres à quelques micromètres. Lorsque ces particules sont en suspension dans un gaz ou un liquide, elles sont animées d'un mouvement aléatoire, dit mouvement brownien, résultant des collisions avec les molécules de fluides. Ainsi, réparties uniformément, leur position change mais leur répartition dans l'espace reste identique (Loi de Fick). Lorsqu'un faisceau de lumière traverse une suspension de particules au repos, l'équilibre du système sera rétabli

au bout d'un certain temps grâce au mouvement brownien des particules. Expérimentalement, des fluctuations d'intensité de lumière sont observées. L'échelle de ces fluctuations contient des informations sur la taille et la concentration des particules (Loi de Stokes Einstein). La taille des liposomes est ainsi déterminée.

I-2.6.2.2. La granulométrie laser

Cette technique est basée sur la théorie de la diffraction de la lumière (théorie de Fraunhofer). La diffraction de la lumière est un phénomène qui se produit à chaque fois qu'un faisceau lumineux rencontre un obstacle (un corps d'indice optique différent) qui s'interpose dans la propagation du flux incident. Plus l'obstacle est étroit, plus la déviation angulaire de la lumière sera importante. En assimilant les particules (taille de l'ordre du micromètre) contenues dans une suspension à des obstacles, l'analyse de la figure de diffraction obtenue en faisant circuler un faisceau lumineux dans cette suspension permet de remonter à la taille des particules.

I-2.6.3. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des liposomes

Comme il l'a déjà été présenté, les liposomes servent à encapsuler des composés, à les véhiculer dans l'organisme et à les délivrer.

L'encapsulation puis la détermination de l'efficacité d'encapsulation sont des opérations complexes qui dépendent du type de molécule encapsulée. Le choix de la molécule encapsulée dépend de la finalité de l'étude. Deux cas sont distingués : les études à visée médicale et les études en vue d'amélioration de procédé. Dans le premier cas, les composés encapsulés sont des principes actifs à visées thérapeutiques alors que dans le second cas, les composés « modèles » encapsulés sont des marqueurs fluorescents (fluorescéine) ou d'autres composés (glucose, cholestérol). Ensuite, selon le caractère hydrophile ou hydrophobe du composé encapsulé, ce dernier sera placé différemment au sein du liposome : dans l'espace interne aqueux pour les composés hydrophiles et dans la bicouche phospholipidique pour les composés hydrophobes. Les principaux composés encapsulés dans des liposomes formés par des procédés supercritiques et recensés dans la littérature avec les méthodes de détermination de l'efficacité d'encapsulation sont listés dans le Tableau I-7.

La difficulté principale de la détermination expérimentale de l'efficacité d'encapsulation réside dans la différenciation des composés effectivement encapsulés de ceux

qui ne le sont pas et se trouvent dans l'espace aqueux en dehors des liposomes pour les composés hydrophiles. Cette différenciation est nécessaire pour ne doser que les composés encapsulés dans les liposomes. Parmi les techniques de différenciation, il existe des méthodes physiques de séparation (chromatographie ou dialyse) ou des méthodes chimiques consistant à neutraliser les molécules non encapsulées afin que l'appareil de mesure ne les détecte pas. Parmi les méthodes chimiques, la neutralisation d'un marqueur fluorescent (calcéine) par des ions cobalt est utilisée pour inhiber la fluorescence du marqueur fluorescent non encapsulé [74, 75]. Certaines de ces techniques sont recensées dans le Tableau I-7. Les techniques de séparation physique peuvent entraîner une dégradation des liposomes (rupture ou perte de matériel encapsulé). A l'inverse, les techniques de différenciation chimique sont des techniques plus douces.

Enfin, selon la méthode de différenciation des composés encapsulés des composés non encapsulés, la formule mathématique de calcul de l'efficacité d'encapsulation sera différente, comme présenté dans le Tableau I-8. Ce tableau présente les résultats obtenus en termes d'efficacité d'encapsulation pour des liposomes formés avec un procédé supercritique. Ces résultats ne sont pas comparables, tant le procédé employé pour former les liposomes, le composé encapsulé, la méthode de différenciation et la méthode de mesure diffèrent et influent sur le résultat final. Ce tableau présente également les efficacités d'encapsulation mesurées en utilisant des méthodes conventionnelles pour former des liposomes du type de la méthode de Bangham. Les résultats obtenus pour des liposomes formés par des méthodes classiques sont souvent bien inférieurs à ceux obtenus pour des liposomes formés par des procédés supercritiques.

Tableau I-7 - Données bibliographiques sur les composés encapsulés dans des liposomes formés par des procédés utilisant les fluides supercritiques

Composé encapsulé	Composé hydrophile ou hydrophobe	Application	Méthode de détermination de l'efficacité d'encapsulation			Références
			Séparation des composés encapsulés des composés situés à l'extérieur des liposomes (non encapsulés)	Technique de rupture des liposomes	Technique de dosage	
Isothiocyanate-5 de fluorescéine	Hydrophile	Colorant fluorescent utilisé en photochimiothérapie	Chromatographie d'exclusion stérique	Détergent C ₁₆ H ₂₆ O ₂	Spectrofluorimètre	Frederiksen <i>et al.</i> [67]
Acide tétrasulfonique phthalocyanine de zinc	Hydrophile	Substance photosensible utilisée pour les thérapies photodynamiques (tumeurs de vessie)	Chromatographie d'exclusion stérique	Détergent C ₁₆ H ₂₆ O ₂	Spectrophotomètre UV visible	Frederiksen <i>et al.</i> [67]
Glucose	Hydrophile	Caractérisation de procédé	Dialyse	Ethanol	Méthode GOD (Glucose OxyDase) au spectrophotomètre	Otake <i>et al.</i> [71]
Cholesterol	Hydrophobe	Caractérisation de procédé	Chromatographie de filtration sur gel	Ethanol	Technique de précipitation des lipoprotéines	Otake <i>et al.</i> [71]
Miconazole	Une partie hydrophile et une partie hydrophobe	Traitement de la mycose	Lavage	-	Chromatographie liquide haute performance	Kunastitchai <i>et al.</i> [72]
Alpha-tocophérol acétate	Hydrophobe	Vitamine E synthétique (antioxydant)	Centrifugation	Ethanol absolu	Chromatographie liquide haute performance	Bridson <i>et al.</i> [76]
Amphotéricine B	Une partie hydrophile et une partie hydrophobe	Traitement de la mycose	Dialyse	Méthanol	Chromatographie (méthode de Bartlett)	Sankar Kadimi <i>et al.</i> [68]
Calcéine	Hydrophile	Marqueur cellulaire fluorescent	Ajout de CoCl ₂ pour neutraliser la fluorescence de la calcéine non encapsulée	Détergent C ₁₆ H ₂₆ O ₂	Spectrofluorimètre	Takahashi <i>et al.</i> [77]
Calcéine	Hydrophile	Marqueur cellulaire fluorescent	Ajout de CoCl ₂ pour neutraliser la fluorescence de la calcéine non encapsulée	Détergent C ₁₆ H ₂₆ O ₂	Spectrofluorimètre	Tsumoto <i>et al.</i> [69]
Docetaxel	Hydrophile	Agent anti-cancer utilisé en chimiothérapie	Centrifugation	Méthanol	Chromatographie liquide haute performance	Naik <i>et al.</i> [78]
Huile essentielle de racines d'Atractyle	Hydrophobe	Complément alimentaire	Dialyse	Ethanol et Triton X-100	Chromatographie gazeuse	Wen <i>et al.</i> [79]
Huile essentielle de lavandin	Hydrophobe	Antibiotique pour le bétail	Centrifugation	Acétone	Chromatographie gazeuse	Varona <i>et al.</i> [63, 80]

Tableau I-8 - Données bibliographiques sur l'encapsulation par des liposomes formés avec des procédés utilisant les fluides supercritiques

<i>Composé encapsulé</i>	<i>Formule de calcul de l'efficacité d'encapsulation</i>	<i>Efficacité d'encapsulation / %</i>	<i>Volume encapsulé / L.mol⁻¹</i>	<i>Efficacité d'encapsulation obtenue pour une méthode classique / %</i>	<i>Taille des liposomes / μm</i>	<i>Références</i>
Isothiocyanate-5 de fluorescéine	-	20	-	5	0,2	Frederiksen <i>et al.</i> [67]
Acide tétrasulfonique phtalocyanine de zinc	-	20	-	5	0,2	Frederiksen <i>et al.</i> [67]
Glucose	(quantité de molécules encapsulées / quantité totale de molécule introduite)x100	5 – 35	-	1 – 5	0,1 – 1,2	Otake <i>et al.</i> [71]
Cholesterol	-	63	-	<10	0,1 – 1,2	Otake <i>et al.</i> [71]
Miconazole	(quantité de molécules encapsulées / quantité totale de molécule introduite)x100	4 – 34,7 (pH = 4,0) 58,9 – 100 (pH = 7,2)	-	-	2,7 - 9,4	Kunastitchai <i>et al.</i> [72]
Alpha-tocophérol acétate	(quantité de molécules encapsulées / quantité totale de molécule introduite)x100	-	1,2 – 1,7	-	0,03 – 0,1	Bridson <i>et al.</i> [76]
Amphotéricine B	(quantité de molécules dans les liposomes / (quantité de molécules dans les liposomes + quantité de molécules dans la solution aqueuse))x100	22 - 35	-	15 – 28	0,15 – 1,5	Sankar Kadimi <i>et al.</i> [68]
Huile essentielle	((quantité de molécules dans la solution – quantité de molécules non encapsulées)/quantité de molécules introduites)x100	82,18	-	-	0,173	Wen <i>et al.</i> [79]
Docetaxel	(quantité de molécules encapsulées / quantité totale de molécule introduite)x100	79,2	-	-	0,269	Naik <i>et al.</i> [78]
Calcéine	((Intensité du marqueur fluorescent encapsulé – Intensité du marqueur libre)/(Intensité totale du marqueur fluorescent – Intensité du marqueur libre))x100	2 - 16	-	2 - 16	5 – 30	Takahashi <i>et al.</i> [77]
Calcéine	((Intensité du marqueur fluorescent encapsulé – Intensité du marqueur libre)/(Intensité totale du marqueur fluorescent – Intensité du marqueur libre))x100	-	15 – 30	-	10 – 40	Tsumoto <i>et al.</i> [69]

I-2.6.4. Détermination du taux de solvant résiduel des liposomes ou des phospholipides

La détermination du taux de solvant résiduel est réalisée soit directement sur la suspension liposomiale, soit sur la poudre de phospholipides micronisées (pour les procédés anti-solvant) avant hydratation. Le Tableau I-9 présente les données fournies dans la littérature sur la détermination du taux de solvant résiduel de suspensions liposomiales fabriquées par des procédés supercritiques ou du taux de solvant résiduel des phospholipides divisés obtenus par des procédés supercritiques. De façon plus générale (en dehors des procédés haute pression), le taux de solvant résiduel de suspension liposomiale est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (avec un détecteur à ionisation de flamme ; solvant utilisé : ter-butanol) sur des suspensions liposomiales lyophilisées (Gogineni *et al.* [81]).

Tableau I-9 - Données bibliographiques sur les méthodes de détermination du taux de solvant résiduel dans les suspensions liposomiales ou dans les phospholipides divisés formés par des techniques utilisant les fluides supercritiques

<i>Solvant utilisé dans le procédé</i>	<i>Elément sur lequel le dosage est effectué</i>	<i>Appareil de dosage</i>	<i>Résultat</i>	<i>Références</i>
Ethanol	Suspension liposomiale	Chromatographie en phase gazeuse	14 – 17% (v/v)	Frederiksen <i>et al.</i> [67]
Dichlorométhane et méthanol	Phospholipides divisés	Chromatographie en phase gazeuse	<30 ppm (Dichlorométhane)	Kunastitchai <i>et al.</i> [72]
			15 – 86 ppm (méthanol)	
Ethanol	Phospholipides divisés	Spectroscopie infrarouge	/	Bridson <i>et al.</i> [76]
Ethanol et chloroforme	Suspension liposomiale	Chromatographie en phase gazeuse	1,4 – 3,9 (% v/v) (éthanol)	Meure <i>et al.</i> [70]
			0,4 (% v/v)(chloroforme)	
Chloroforme et méthanol	Suspension liposomiale	Chromatographie en phase gazeuse	Non détecté par l'appareil	Naik <i>et al.</i> [78]

I-2.7. Formation des liposomes

De nombreuses méthodes d'élaboration des liposomes sont recensées dans la littérature. Dans le cadre de ce travail de recherche, nous nous intéresserons à la formation de liposomes « bruts » (sans additifs) et nous analyserons la taille, la lamellarité et l'efficacité d'encapsulation des liposomes formés. Les méthodes de formation des liposomes peuvent être divisées en deux familles : les méthodes conventionnelles et les méthodes alternatives. Pour l'intérêt de ce travail de recherche, seules les techniques utilisant des fluides supercritiques seront développées comme méthodes alternatives aux méthodes conventionnelles. On peut citer à titre informatif le développement des techniques utilisant la microfluidique comme méthode alternative en plus des méthodes supercritiques.

I-2.7.1. Les méthodes conventionnelles

I-2.7.1.1. Présentation

Les principales méthodes conventionnelles sont les suivantes : la méthode de Bangham [2, 3, 27, 82], la méthode d'élimination du solvant [27, 82, 83], les méthodes d'injection [82, 84-86], la méthode d'évaporation du solvant en phase inverse [82, 86], la méthode de la double émulsion [27, 82]. Ces méthodes sont référencées dans le Tableau I-10.

La méthode de Bangham [2, 3, 27, 82] est généralement la plus utilisée. Elle consiste à solubiliser des phospholipides dans un solvant organique. Ensuite, le solvant organique est évaporé jusqu'à formation d'un film phospholipidique. Ce film est hydraté par ajout d'une solution aqueuse sous agitation pour former des liposomes. La méthode de Bangham permet de former des MLV avec un diamètre de l'ordre de 0,05 à 10 μm .

La méthode d'élimination du solvant [27, 82, 83] repose sur le même principe que la méthode de Bangham. Cette méthode permet de produire des LUV avec une taille comprise entre 0,1 et 1 μm .

Les méthodes d'injection [82, 84-86] comprennent la méthode d'injection d'éthanol et la méthode d'injection d'éther. Ces deux méthodes sont basées sur le même principe : la dissolution des phospholipides dans une phase organique, suivie par l'injection de cette

solution dans une solution aqueuse chauffée pour former des liposomes. Ces méthodes produisent des SUV avec un diamètre moyen compris entre 0,03 et 0,11 μm .

D'autres méthodes, comme la méthode d'évaporation du solvant en phase inverse [82, 86], produisent initialement des micelles ou micelles inverses comme précurseur à la formation de liposomes. Dans le cas de la méthode d'évaporation du solvant en phase inverse, les phospholipides s'organisent initialement en micelle inverse dans un milieu solvant organique/eau (faible proportion d'eau). Puis, lors de l'élimination du solvant, les micelles inverses deviennent des micelles normales puis des liposomes.

Enfin, dans la méthode de l'émulsion double [27, 82], une émulsion eau dans huile est formée par ajout d'une faible quantité d'eau dans un solvant organique contenant les phospholipides solubilisés. Cette émulsion est agitée pour disperser les gouttes d'eau dans la phase organique. Ensuite, cette émulsion eau dans huile est placée dans un grand volume de phase aqueuse et agitée, de façon à former une émulsion double eau dans huile dans eau. Du diazote, appliqué sous forme de courant dans l'émulsion double permet d'éliminer le solvant organique et de former des liposomes. Ces liposomes sont des SUV avec un diamètre moyen de 0,05 μm .

Comme présenté dans le Tableau I-10, ces méthodes, dites conventionnelles, nécessitent souvent une étape de formation complémentaire, appelée procédé de post-formation, pour permettre de réduire la taille des liposomes ou de modifier leur lamellarité par sonication [87], extrusion sur membrane [87], utilisation d'un homogénéiseur et/ou d'un microfluidiseur [88] ; ou encore réduire le taux de solvant résiduel des liposomes ou les sécher [89-91]. Le Tableau I-10 – Les méthodes classiques de formation des liposomes (données de la littérature) regroupe les principales caractéristiques des liposomes formés par ces méthodes (taille et efficacité d'encapsulation).

I-2.7.1.2. Avantages et inconvénients

Les méthodes conventionnelles sont des méthodes simples à mettre en œuvre. Ces méthodes comptent plusieurs étapes. Elles s'opèrent sur de petits volumes et sont donc très prisées dans la Recherche médicale pour des essais.

Cependant, ces méthodes ont souvent été étudiées et appliquées sur de petits volumes de solution et il existe donc peu d'éléments pour les extrapoler. Par exemple, pour la méthode de Bangham, un film phospholipidique est déposé sur une paroi et le rapport surface/volume de la cellule n'est pas le même à l'échelle laboratoire et à l'échelle industrielle.

De plus, la plupart de ces méthodes utilisent des solvants organiques toxiques. Par exemple, la méthode de Bangham nécessite un mélange de solvants souvent composés d'isopropanol, de diéthyl éther, de chloroforme et de méthanol [4]. La nocivité de ces solvants est réelle et sans comparaison avec celle de l'éthanol qui est utilisé comme solvant dans la plupart des procédés supercritiques de formation des liposomes comme nous le verrons par la suite. Enfin, l'utilisation de ces solvants requiert une étape supplémentaire pour s'assurer que le produit final (les liposomes) est exempt de traces de solvant résiduelles ; d'où la mise en œuvre d'étape de traitement après formation comme présenté dans le Tableau I-10. Pour toutes ces raisons, ces méthodes ne sont pas envisageables pour des applications pharmaceutiques à grande ou moyenne échelle. Aujourd'hui, avec le durcissement de la réglementation européenne qui interdira peu à peu l'utilisation de produits toxiques¹, le développement de méthodes alternatives est devenu une nécessité.

¹ Directive REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances – EC1907/2006)

Tableau I-10 – Les méthodes classiques de formation des liposomes (données de la littérature)

<i>Méthode</i>	Méthode de Banga [2, 3, 27, 82]	Méthode d'élimination du solvant [27, 82, 83]	Méthode de l'injection [82, 84-86]	Méthode d'évaporation du solvant en phase inverse [82, 86]	Méthode de la double émulsion [27, 82]
<i>Diamètre moyen des liposomes / μm</i>	0,05 – 10 [92]	0,1 – 1 [93]	0,03 – 0,11 [86]	0,45 (avec cholestérol) – 0,18 (sans cholestérol) [86]	0,05 [86]
<i>Classe des liposomes</i>	MLV [92]	LUV [93]	SUV [86]	LUV ou MLV selon la concentration en phospholipides [86]	SUV [86]
<i>Efficacité d'encapsulation</i>	Efficacité d'encapsulation annoncée « élevée » et bonne stabilité	Problème d'encapsulation: lors de l'élimination du solvant, le composé encapsulé peut être entraîné	Efficacité d'encapsulation élevée	Efficacité d'encapsulation: 30-45%	(*)
<i>Procédé de post-formation</i>	Sonication	Elimination des traces de solvant résiduelles	Mélange pour homogénéisation et élimination des traces de solvant résiduelles	Sonication	Elimination des traces de solvant résiduelles

(*) non défini

I-2.7.2. Les techniques supercritiques

Les techniques supercritiques de formation des liposomes ont été développées pour palier aux difficultés inhérentes aux techniques conventionnelles. En particulier, dans les techniques supercritiques, l'utilisation de solvants organiques peut être évitée et si elle est nécessaire, les solvants employés sont moins toxiques (souvent l'éthanol) que dans les méthodes conventionnelles et les quantités utilisées sont réduites. Le CO₂ supercritique est choisi comme fluide supercritique.

Généralement, les procédés utilisant un fluide sous pression sont classés en fonction du rôle joué par le fluide supercritique. Dans le cas du traitement des phospholipides, trois stratégies sont considérées. Le CO₂ supercritique peut être utilisé comme solvant pour solubiliser le soluté ; et dans ce cas, des liposomes sont produits par ces procédés. Ou bien le CO₂ est employé comme anti-solvant pour précipiter le soluté ; et dans ce cas, des phospholipides divisés sont produits par ces procédés. Les phospholipides divisés sont couramment appelés proliposomes [78] mais nous n'utiliserons pas ce terme dans le manuscrit car il prête à confusion. L'hydratation de phospholipides divisés sous agitation conduit à l'organisation des phospholipides en bicouche, c'est-à-dire à la formation de liposomes. Les travaux décrits ci-dessous décrivent la formation de liposomes ou de phospholipides divisés.

I-2.7.2.1. Le CO₂ est utilisé comme solvant pour solubiliser le soluté

Castor *et al.* [94] ont utilisé un montage expérimental (Figure I-9) et deux procédures pour former des liposomes, respectivement appelées la méthode de la décompression et la méthode de l'injection. Ce montage contient deux autoclaves montés en série. Le premier est utilisé pour la solubilisation des composés avec du CO₂ supercritique et le second est dédié à la formation des liposomes dans les conditions ambiantes. Ces procédés sont des procédés batch et diffèrent par l'introduction de la phase aqueuse. Dans la méthode de la décompression, un mélange composé de phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidylethanolamine), de co-solvant organique (éthanol, 2% massique), de principes actifs hydrophobes et de solution aqueuse est solubilisé (13 – 20 MPa ; 333 K) dans le CO₂ supercritique au niveau du premier autoclave. Le mélange supercritique est ensuite détendu (7 MPa.min⁻¹) au travers d'une buse (diamètre 0,06 mm) dans le second autoclave, entraînant la formation d'une suspension liposomiale. Dans la méthode de l'injection, le mélange

composé de phospholipides, de co-solvant organique, de principes actifs hydrophobes et de CO₂ supercritique est détendu au travers d'une buse dans le second autoclave contenant la phase aqueuse. La méthode de la décompression conduit à la formation de liposomes unilamellaires avec un diamètre moyen compris entre 0,01 et 0,3 µm. A l'inverse, les liposomes formés par la méthode de l'injection sont des liposomes multilamellaires avec un diamètre moyen compris entre 0,06 et 2 µm.

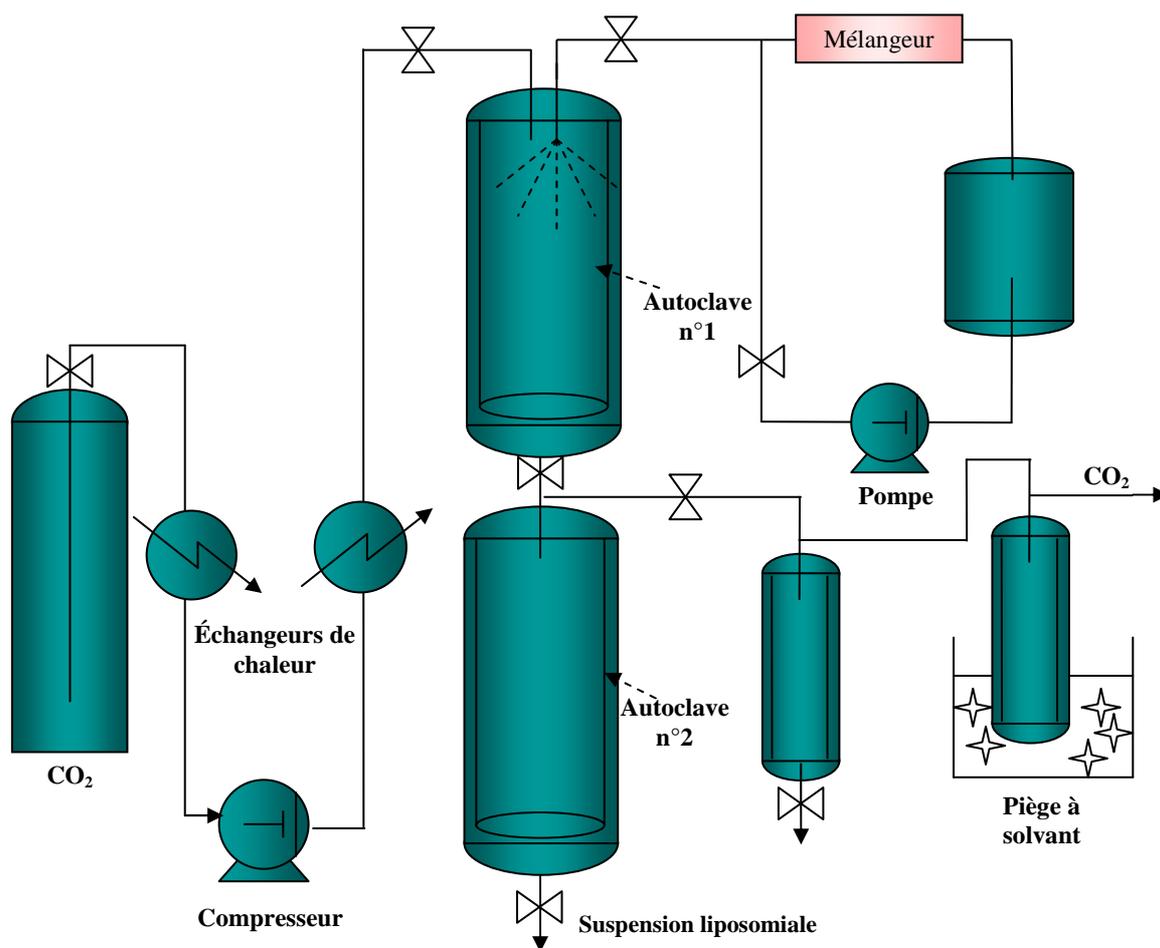


Figure I-9 – Schéma du montage expérimental de Castor *et al.* [94]

Frederiksen *et al.* [67, 95] ont mis au point un procédé batch (Figure I-10) basé sur le procédé de l'injection de Castor *et al.* [94]. Ce procédé est divisé en deux parties : une partie sous pression élevée (25 MPa ; 333 K) et une partie sous pression atmosphérique. Chaque partie comprend une boucle de recirculation. Ces deux parties sont connectées par l'intermédiaire d'une pièce appelée capillaire d'encapsulation (diamètre : 0,5 mm ; longueur : 5,0 cm). La phase aqueuse contenant le principe actif à encapsuler est introduite au niveau de ce capillaire lorsque le mélange supercritique est détendu. Dans la partie haute pression, les phospholipides (palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine) et le cholestérol sont solubilisés dans

la phase supercritique composée de CO₂ et de co-solvant organique (éthanol). Le temps de recirculation dans la boucle de recyclage est de 30 min. Le mélange supercritique est alors détendu et les phospholipides précipités sont mis en contact avec la phase aqueuse au niveau du capillaire d'encapsulation puis mélangés grâce à un mélangeur statique (taux de recirculation : 0,5 mL.min⁻¹ pendant 30 min).

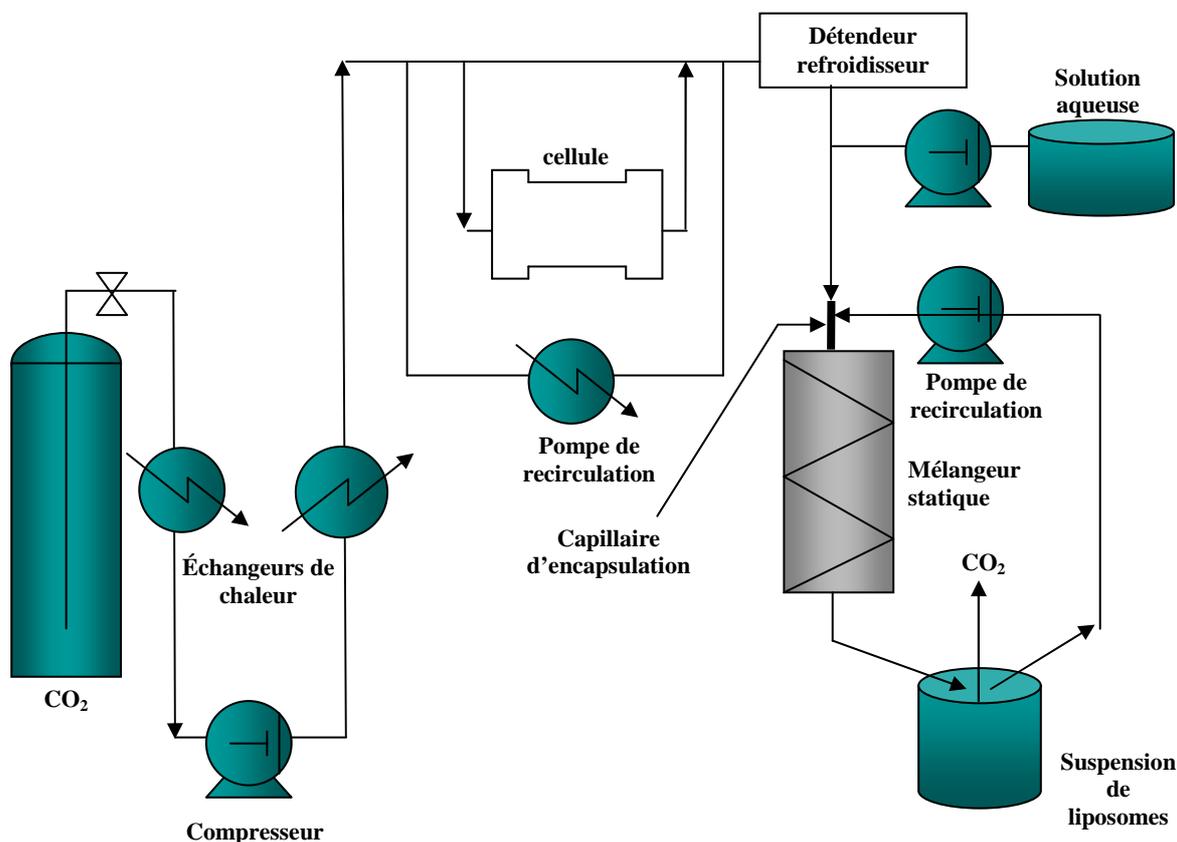


Figure I-10 – Schéma du montage expérimental de Frederiksen *et al.* [67, 95]

A partir de cette méthode, deux populations de liposomes sont formées : environ 90% de SUV (diamètre compris entre 0,02 et 0,05 μm) et environ 10% de MLV (diamètre d'environ 0,25 μm). Les expériences réalisées par Frederiksen *et al.* [67, 95] furent reprises par Bridson *et al.* [76]. En utilisant un montage expérimental similaire à Frederiksen *et al.* [67, 95], et pour des conditions expérimentales données (15 – 25 MPa ; 293 – 328 K ; débit de CO₂ lors de l'expansion : 9 – 43 g.min⁻¹ ; longueur et diamètre du capillaire : 10cmx127 μm ; phospholipides : phosphatidylcholine de soja et cholestérol), Bridson *et al.* [76] ont fabriqué des liposomes multilamellaires de diamètre moyen d'environ 0,2 μm . Ces différences de valeurs de tailles de liposomes entre Frederiksen *et al.* [67, 95] et Bridson *et al.* [76] peuvent s'expliquer par des différences de valeurs de débits de CO₂ lors de la phase d'expansion (2 mL.min⁻¹ à 25 MPa pour Frederiksen *et al.* contre 9 – 43 g.min⁻¹ avec une pression comprise entre 15 et 25 MPa pour Bridson *et al.*).

Otake *et al.* [71, 96-98] ont élaboré un procédé supercritique batch pour former des liposomes appelé évaporation supercritique en phase inverse ou scRPE pour supercritical Reverse Phase Evaporation (Figure I-11). Cette méthode consiste à introduire les phospholipides (L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine) et le co-solvant organique dans une cellule à volume variable (cellule verticale de volume total 50 cm³). Le CO₂ est introduit et la pression expérimentale est fixée (20 MPa). La cellule est chauffée à 314 K et la pression est maintenue constante. Une fois l'équilibre atteint (CO₂/EtOH/phospholipide : 93,20/6,52/0,28 %massique), une solution aqueuse est lentement introduite (0,05 mL.min⁻¹) dans la cellule. Le mélange est continuellement agité avec un agitateur magnétique en forme d'étoile (longueur : 9 mm). Une fois que la quantité d'eau souhaitée a été injectée, le CO₂ est libéré. Les liposomes se forment durant la dépressurisation. Ainsi, à la différence de Castor [94], dans la méthode scRPE, la dissolution et la dépressurisation sont réalisées dans le même autoclave et, de plus, la quantité d'eau dans l'autoclave varie dans le temps. Cependant, le volume de la cellule utilisée est faible. Grâce à la méthode scRPE, Otake *et al.* [71, 96-98] ont fabriqué des LUV de forme ellipsoïdale avec un diamètre moyen compris entre 0,1 et 1,2 μ m. Cette méthode a été utilisée pour encapsuler des composés hydrophobes (cholestérol) et des composés hydrophiles (glucose). Les composés hydrophobes sont ajoutés dans la cellule avant la dissolution initiale. A l'inverse, les composés hydrophiles sont injectés dans la cellule avec la solution aqueuse. Des efficacités d'encapsulation de 63% et 25% ont été obtenues, respectivement, pour l'encapsulation du cholestérol et du glucose.

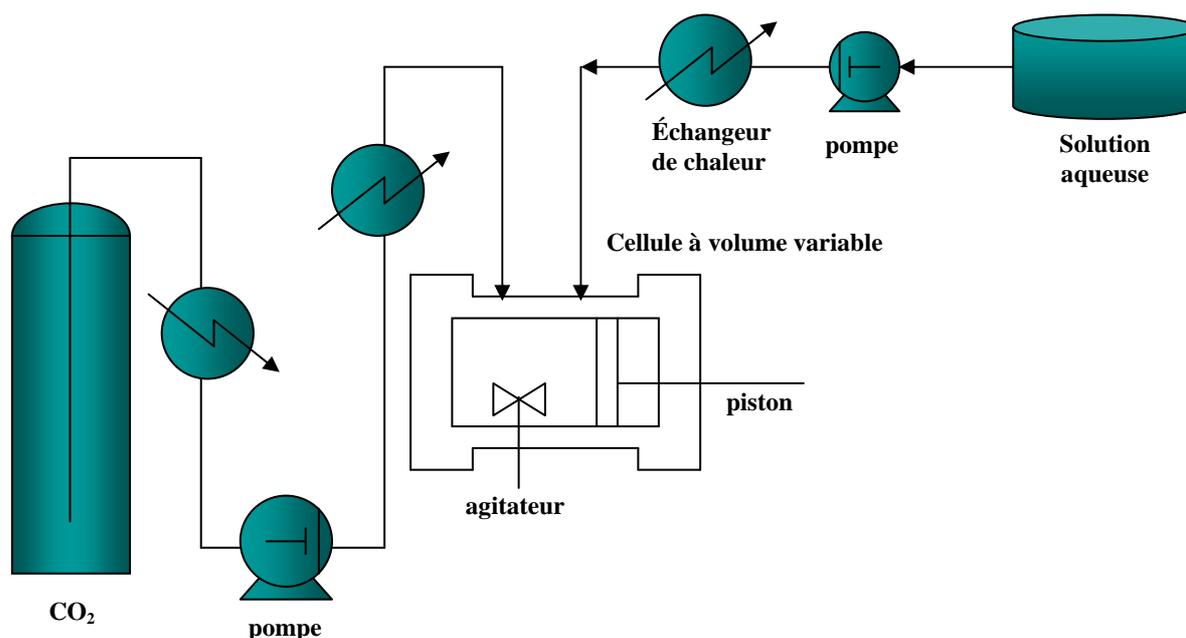


Figure I-11 - Schéma du montage expérimental d'Otaka *et al.* (scRPE) [71, 96-98]

Ensuite, Otake *et al.* [66] ont mis au point un autre procédé batch basé sur le procédé scRPE et appelé procédé amélioré de l'évaporation supercritique en phase inverse ou IscRPE pour Improved supercritical Reverse Phase Evaporation (Figure I-12). Il s'agit d'une méthode sans solvant organique. Cette méthode consiste à introduire un mélange inhomogène de phospholipides (L - α - dimyristoylphosphatidylcholine, 1 - α - dipalmitoylphosphatidylcholine, 1 - α - distearoylphosphatidylcholine et 1 - α - dioleoylphosphatidylcholine) et de solution aqueuse dans l'autoclave (cellule horizontale de volume 200 cm³). La cellule est portée à une température de 333 K et agitée (barreau aimanté de longueur 30 mm). Ensuite, le CO₂ est introduit et la cellule est progressivement amenée à la pression de travail de 20 MPa. La cellule est laissée sous agitation pendant 40 min puis soumise à une série de dépressurisation. Ces dépressurisations conduisent à la formation de liposomes avec un diamètre de 1,5 μ m. Comparativement à la méthode scRPE, les liposomes formés par la méthode IscRPE sont plus stables (1 mois à température ambiante) et leur efficacité d'encapsulation pour le glucose est supérieure (36% contre 25%).

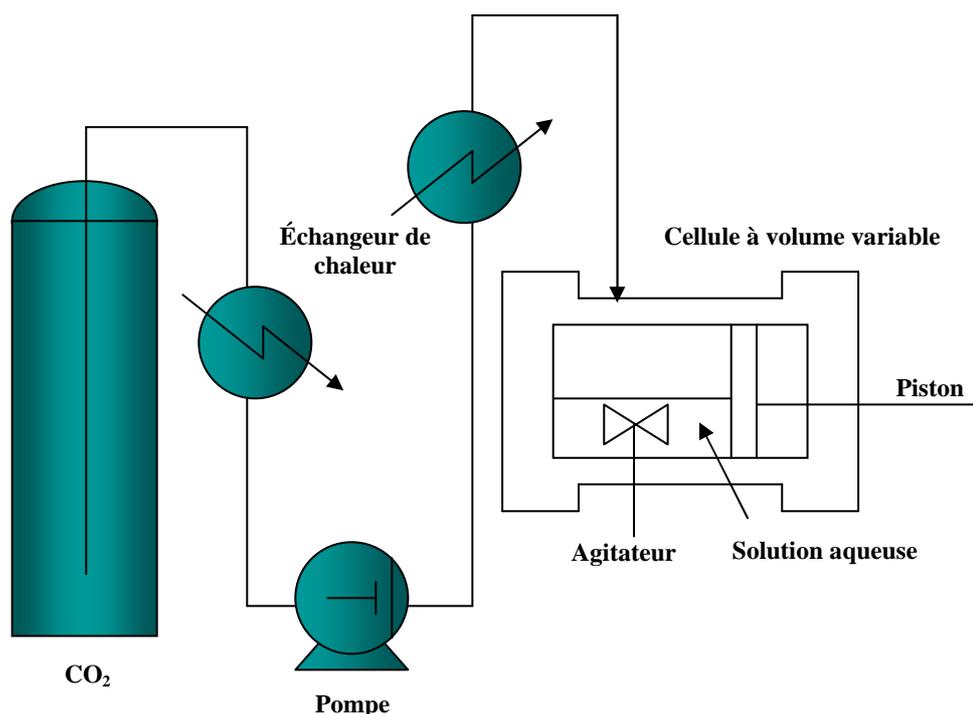


Figure I-12 - Schéma du montage expérimental d'Otake *et al.* (IscRPE) [66]

Wen *et al.* [79] ont développé un procédé batch appelé le procédé RESS (Rapid Expansion of a Supercritical Solution) modifié (Figure I-13). Deux autoclaves montés en série sont utilisés dans ce procédé. Tout d'abord, les phospholipides (phosphatidylcholine), le cholestérol (rapport molaire phospholipide:cholestérol = 3:1) et le composé hydrophobe à encapsuler (rapport molaire composé hydrophobe:phospholipide = 1:20) sont solubilisés dans un solvant organique (éthanol) et la solution est placée dans le premier autoclave (100 cm³). Ensuite, le CO₂ est introduit pour atteindre les conditions expérimentales souhaitées (15 – 30 MPa ; 333 K). Les phospholipides sont solubilisés dans la phase supercritique. Après une heure, le mélange supercritique est introduit dans le second autoclave appelé collecteur par une buse coaxiale. Au même moment, une solution tampon est ajoutée dans le collecteur par la buse coaxiale. La buse assure le mélange entre les composés solubilisés et la solution tampon. La buse coaxiale est fixée en haut du collecteur. Le collecteur est ouvert pour permettre l'évacuation du CO₂ (évacuation contrôlée par un débitmètre). Le bas du collecteur contient un cylindre pour récupérer la suspension liposomiale. L'encapsulation du composé hydrophobe est réalisée au moment de la formation des liposomes lors de la dispersion des phospholipides dans la solution tampon pendant la dépressurisation. Ce procédé a été appliqué à l'encapsulation d'huile essentielle extraite d'*Atractylodes macrocephala*. Dans les conditions optimales (30 MPa, 338 K et fraction molaire éthanol/CO₂ : 15%), les liposomes formés ont une taille de 173 nm et une efficacité d'encapsulation de 82% a été mesurée.

Ces méthodes diffèrent par le mode opératoire de mise en contact des phases et par le fait d'hydrater ou non sous pression. Les conditions expérimentales et les caractéristiques des liposomes obtenus par ces méthodes sont listées dans le Tableau I-11.

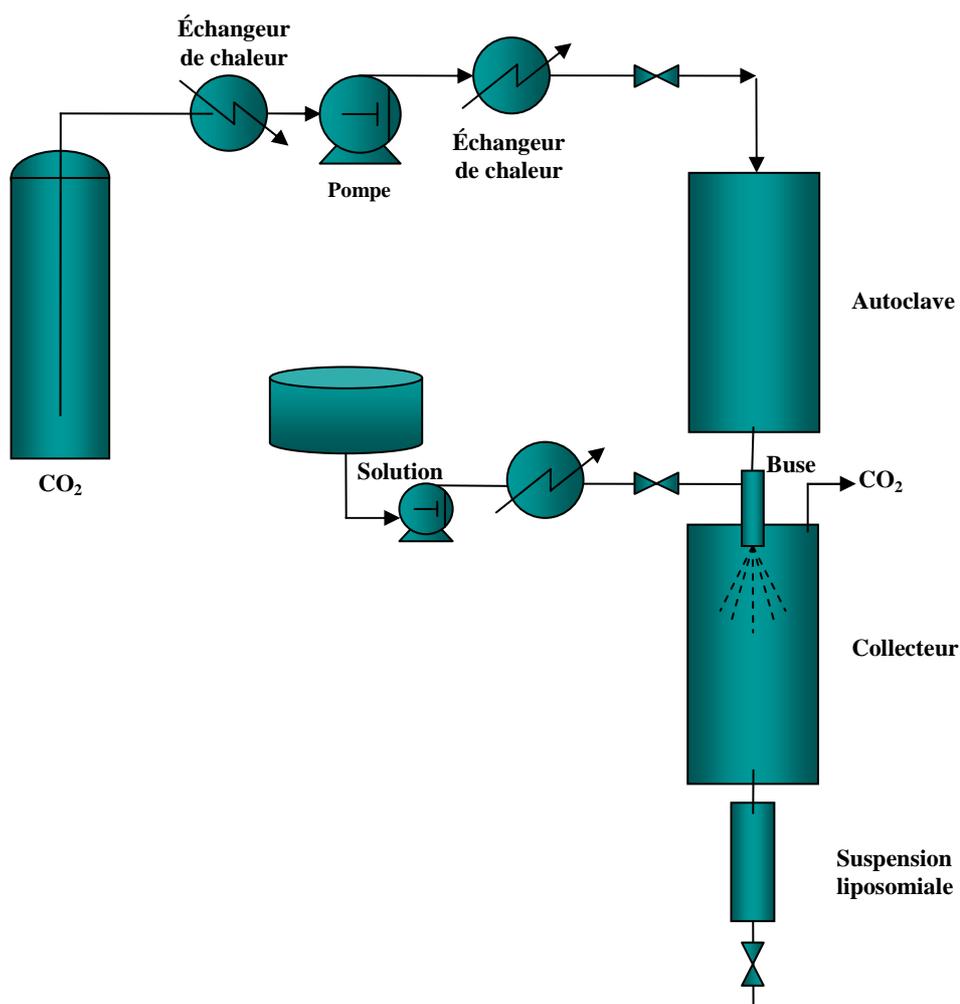


Figure I-13 - Schéma du montage expérimental de Wen *et al.* [79]

Tableau I-11 – Conditions expérimentales et caractéristiques des liposomes formés pour les procédés utilisant le CO₂ supercritique comme solvant

Méthode	Volume de l'autoclave / cm ³	Solvant organique utilisé	Nature des phospholipides	Présence de cholestérol	Pression / MPa	T / K	Taille des liposomes (classe) / μm	Composé(s) encapsulé(s)	Efficacité d'encapsulation (%)	Références
Méthode de la décompression et de l'injection	-	Ethanol	phosphatidylcholine et phosphatidylethanolamine	Non	13 - 20	333	Méthode de la décompression: 0,01 – 0,3 (unilamellaires) Méthode de l'injection : 0,06 – 2 (multilamellaires)	Principe actif hydrophobe	-	Castor <i>et al.</i> [94]
Méthode des liposomes supercritiques	-	Ethanol	palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine	Oui	25	333	0,02 – 0,05 (SUV ; 90% en nombre) 0,25 (MLV ; 10% en nombre)	Fluorescein isothiocyanate-dextran et zinc phthalocyanine tetrasulfonic acid (marqueurs hydrophiles)	20	Frederiksen <i>et al.</i> [67, 95]
			Phosphatidylcholine de soja et phosphatidylcholine de soja hydrogéné	oui	15 - 25	293 - 328	0,2 (MLV)	Ciprofloxacine HCl		Bridson <i>et al.</i> [76]
scRPE method	50	Ethanol	L-α-dipalmitoylphosphatidylcholine	Non	20	314	0,1 – 1,2 (LUV)	Cholesterol et glucose	25 (glucose) 63 (cholestérol)	Otake <i>et al.</i> [71, 96-98]
IscRPE method	200	Ethanol	L-α-dimyristoylphosphatidylcholine, 1-α-dipalmitoylphosphatidylcholine, 1-α-distearoylphosphatidylcholine et 1-α-dioleoylphosphatidylcholine	non	20	333	1,5	Glucose	36	Otake <i>et al.</i> [66]
Modified RESS method	100	Ethanol	phosphatidylcholine	oui	30	338	0,173	Huile essentielle	82	Wen <i>et al.</i> [79]

I-2.7.2.2. Le CO₂ est utilisé comme anti-solvant pour précipiter le soluté

Ces méthodes sont utilisées pour diviser (microniser) des phospholipides. Les phospholipides divisés doivent ensuite être hydratés pour former des liposomes. Les techniques employées pour diviser les phospholipides sont des techniques supercritiques connues pour la comminution. Parmi ces techniques, on recense : le procédé SAS (supercritical anti-solvent) [4, 78, 99, 100], le procédé SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids) [73], le procédé ASES (Aerosol Solvent Extraction System) [72] et le procédé GAS (Gas Anti-Solvent) [68].

Magnan *et al.* [4, 101] et Badens *et al.* [100] ont été les premiers à utiliser le procédé SAS (Figure I-14) pour microniser de la lécithine de soja, c'est-à-dire former des phospholipides divisés. Ce procédé s'opère en mode semi-continu. L'éthanol est utilisé pour solubiliser la lécithine de soja (fraction massique lécithine de soja/éthanol : 2 – 16,5 % massique). La solution organique est ensuite injectée (10 – 28 mL.h⁻¹) dans un autoclave traversé par un courant de CO₂ supercritique (308 K, gamme de pression de 8 à 11 MPa et un débit massique de CO₂ de 400 g.h⁻¹). Ce dernier est un anti-solvant vis à vis du soluté mais il est miscible en toute proportion avec le solvant organique. L'effet anti-solvant du fluide supercritique et la diffusion du solvant organique vers la phase légère conduisent à la sursaturation du soluté et à sa précipitation. Une fois que la solution organique a été injectée, l'autoclave est lavé avec du CO₂ pur de façon à renouveler son contenu. Des images obtenues au microscope optique à balayage ont montré que la lécithine de soja micronisée formait de petites sphères partiellement agglomérées de diamètre allant de 1 à 40 µm. Ces travaux constituent la base de ce travail de recherche.

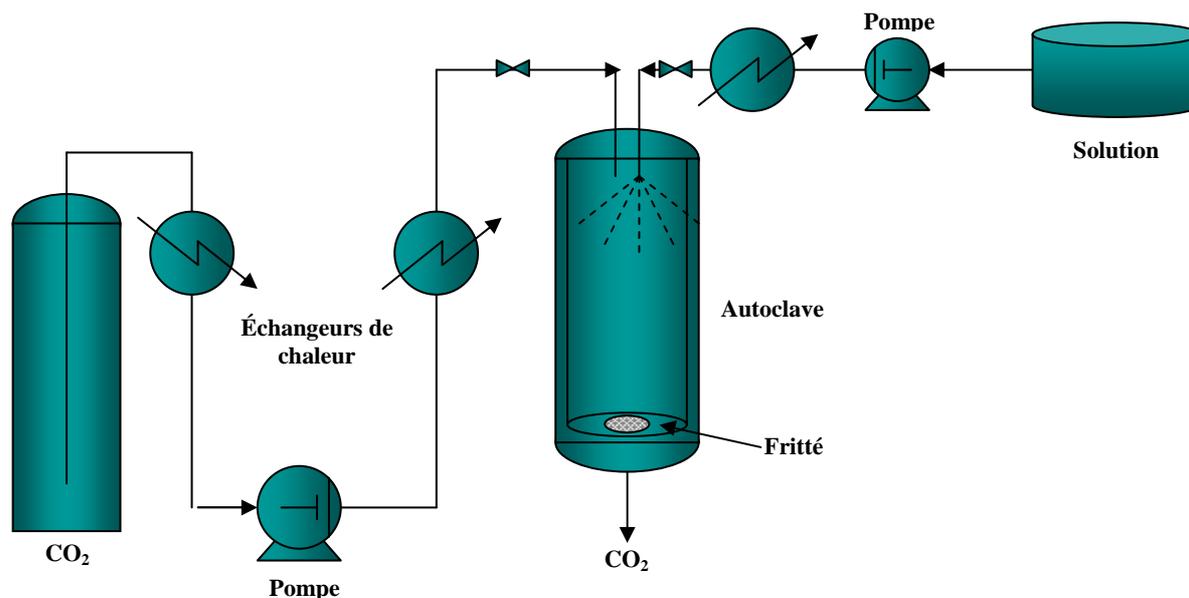


Figure I-14 - Schéma du montage expérimental du procédé SAS [4, 101]

Kunastitchai *et al.* [72] ont micronisé des phospholipides (phosphatidylcholine) grâce au procédé supercritique semi-continu ASES (Figure I-15), puis ils ont procédé à une phase d'hydratation dans les conditions ambiantes pour former des liposomes à partir des phospholipides divisés. La micronisation des phospholipides est réalisée dans un autoclave parcouru par un courant de CO_2 ($6 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ entre 8,5 et 10,5 MPa) et dans lequel une solution organique (méthanol et dichlorométhane), contenant le principe actif à encapsuler, les phospholipides (phosphatidylcholine), le cholestérol et un tensioactif non-ionique (Poloxamer), est injectée ($6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) à l'aide d'une buse (diamètre : 0,4 mm et angle d'injection : 15°). Cette étape est suivie d'une étape de lavage (3 – 4 heures). Les particules micronisées ont un diamètre compris entre 10 et 40 μm . Ensuite, l'hydratation des phospholipides divisés est réalisée par ajout d'une solution aqueuse (10 mg de phospholipides micronisés pour 1 mL de solution aqueuse) à pH contrôlé sous agitation et à une température de 328 K. Les liposomes ainsi formés ont un diamètre compris entre 2,7 et 6,7 μm pour une solution aqueuse de pH égal à 4,0 et un diamètre compris entre 3,6 et 9,4 μm pour une solution aqueuse de pH égal à 7,2. Kunastitchai *et al.* [72] ont encapsulé du Miconazole (médicament utilisé pour traiter les infections fongiques de la peau) dans les liposomes et des efficacités d'encapsulation comprises entre 19 et 38% ont été mesurées.

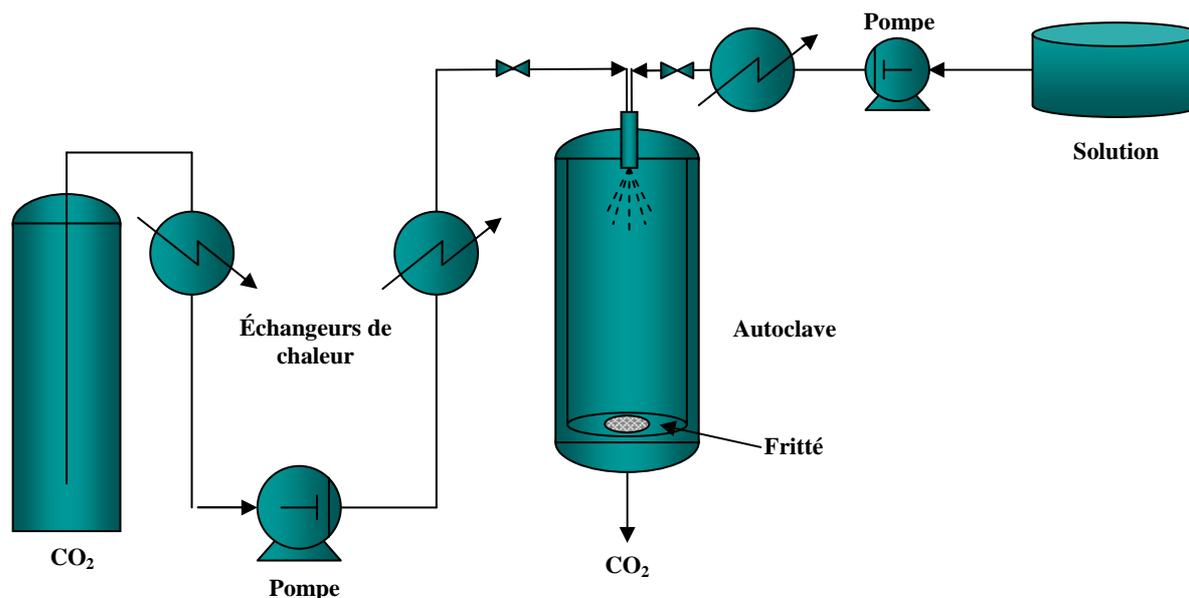


Figure I-15 - Schéma du montage expérimental du procédé ASES [72]

Sankar Kadimi *et al.* [68] ont micronisé des phospholipides grâce au procédé GAS. Dans le procédé GAS, le CO₂ est utilisé comme anti-solvant pour précipiter les phospholipides comme dans le procédé SAS (Figure I-14), mais cette fois le procédé s'opère en mode batch. La division des phospholipides est effectuée dans un autoclave initialement chargé avec une solution organique (chloroforme et méthanol) contenant les phospholipides (phosphatidylcholine), le cholestérol et les principes actifs hydrophiles. L'autoclave est chauffé (333 – 338 K) et porté à la pression de travail (15 MPa) par introduction de CO₂. Sankar Kadimi *et al.* [68] sont les seuls à avoir utilisé un procédé anti-solvant et à avoir introduit la phase aqueuse dans l'autoclave alors que le mélange était encore sous pression. Cette introduction a été réalisée 20 à 30 minutes après l'obtention de la pression de travail dans l'autoclave. Le mélange dans la cellule est agité par intervalle de temps défini avec un agitateur magnétique. Au bout de 20 à 30 minutes, une solution saline (0,9%) est alors lentement introduite dans l'autoclave (0,5 mL.min⁻¹) entre 333 et 338 K pour hydrater les phospholipides divisés. Les liposomes formés après la dépressurisation ont un diamètre compris entre 0,15 et 3 µm. Des efficacités d'encapsulation de 20% ont été obtenues pour l'encapsulation de l'Amphotéricin –B (médicament utilisé pour traiter les infections fongiques de la peau). Sankar Kadimi *et al.* [68] ont également procédé à la phase d'hydratation après la dépressurisation (à une température comprise entre 333 et 338 K).

Li *et al.* [73] ont micronisé des phospholipides à l'aide du procédé SEDS qui est semblable au procédé SAS (Figure I-14), mais qui utilise une buse avec chambre de pré-mélange pour introduire la solution organique et le fluide supercritique. Pour les conditions opératoires testées (températures comprises entre 303 et 313 K, pressions comprises entre 8 et 12 MPa, avec un débit de CO₂ de 45 mL.min⁻¹ et avec des rapports volumiques solvant/CO₂ compris entre 1 et 5%), les particules micronisées obtenues sont sphériques, partiellement agglomérées et de taille d'environ 1 µm.

Naik *et al.* [78] ont également hydraté des phospholipides (phosphatidylcholine de soja hydrogénée entre 4 et 10% molaire et non-hydrogénée entre 2 et 4% molaire) divisés par le procédé SAS (307 – 319 K, 10 – 22 MPa, avec un débit massique de CO₂ compris entre 30 et 120 g.min⁻¹, solvants organiques : chloroforme:méthanol (2:1), avec ajout de cholestérol et avec un débit de solution organique de 0,15 mL.min⁻¹) pour former des liposomes furtifs (polymères ajoutés initialement avec les phospholipides) encapsulant du Docetaxel (substance active anticancéreuse). L'hydratation a été réalisée à 323 K. Les efficacités d'encapsulation obtenues varient entre 50,1 et 71,1% et les tailles des liposomes formés sont comprises entre 0,25 et 2,0 µm. Une étude de stabilité a montré que ces liposomes sont stables pendant une durée de 3 mois à une température de 303 K.

Les conditions expérimentales et les caractéristiques des liposomes obtenus par ces méthodes sont listées dans le Tableau I-12.

Il est important de souligner que dans les procédés anti-solvant où la formation des liposomes est réalisée en deux étapes, la température du procédé supercritique de micronisation et la température de la phase d'hydratation à pression ambiante diffèrent. Dans les exemples reportés, la phase d'hydratation est conduite à une température supérieure ou égale à 323 K (température de transition de phase de la phosphatidylcholine, composant majoritaire des phospholipides utilisés dans ces procédés).

Tableau I-12 - Conditions expérimentales et caractéristiques des phospholipides divisés pour les procédés utilisant le CO₂ supercritique comme anti-solvant

Méthode	Méthode batch ou semi-continue	Solvant organique utilisé	Pression / MPa	T / K	Hydratation réalisée	Taille des liposomes / μm	Composé(s) encapsulé(s)	Efficacité d'encapsulation (%)	Références
SAS	Semi-continue	Ethanol	8 - 11	308	Non	Pas de phase d'hydratation	-	-	Magnan <i>et al.</i> [4, 101] Badens <i>et al.</i> [100]
		Ethanol	10	308	Non	Pas de phase d'hydratation	Puerarin	-	Li <i>et al.</i> [73]
		Chloroforme et méthanol	10 - 22	307 - 319	après la dépressurisation (323 K)	0,269	Docetaxel	79	Naik <i>et al.</i> [78]
ASES	Semi-continue	Méthanol et Dichlorométhane	8,5 – 10,5	304 - 333	après la dépressurisation (328 K)	2,7 – 6,7 (pH=4,0) 3,6 – 9,4 (pH=7,2)	Miconazole	4 – 30 (pH=4,0) 60 – 100 (pH=7,2)	Kunastitchai <i>et al.</i> [72]
GAS	Batch	Chloroforme et méthanol	15	333 - 338	sous pression (338 K)	0,15 – 3	Amphotericin B	22 - 35	Sankar Kadimi <i>et al.</i> [68]
					après la dépressurisation (338 K)	10			

I-2.7.2.3. Le CO₂ est utilisé comme simple agent dispersant dans des conditions subcritiques ou critiques

Meure *et al.* [70] ont développé un procédé appelé DESAM (Depressurization of Expanded Solution into Aqueous Media) dans lequel le CO₂ est utilisé comme agent dispersant dans des conditions subcritiques. Pour ce procédé, deux autoclaves, respectivement appelés chambre d'expansion et chambre de formation des vésicules, sont montés en série. La première étape de ce procédé consiste à solubiliser les phospholipides (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) et le cholestérol dans un solvant organique (éthanol et chloroforme). Ensuite, la solution organique est introduite dans la chambre d'expansion (150 cm³) préalablement chauffé à une température comprise entre 293 et 296 K. Ensuite, la chambre est mise sous pression avec du CO₂ (6 MPa). Le CO₂ se solubilise dans la phase liquide jusqu'à saturation puis le mélange est détendu vers la chambre de formation des vésicules (connexion grâce à un tube de longueur 0,9 cm et de diamètre interne 177,8 µm ou un tube de longueur 1,5 cm et de diamètre interne 254 µm) qui contient une solution aqueuse chauffée entre 348 et 363 K. Au final, une suspension liposomiale est collectée dans la chambre de formation des vésicules. Les liposomes formés sont des SUV de diamètres compris entre 0,05 et 0,2 µm.

Varona *et al.* [63, 80] ont utilisé le procédé PGSS pour sécher une émulsion huile essentielle dans eau (le surfactant étant de la lécithine). L'émulsion est tout d'abord saturée en CO₂ dans un autoclave équipé d'un agitateur magnétique à la pression de 0,1 MPa et à la température de 303 K. L'émulsion est ensuite mise en contact avec du CO₂ supercritique dans un mélangeur statique (pression comprise entre 6 et 10 MPa et température comprise entre 373 et 403 K). La mise en contact émulsion/CO₂ dure quelques secondes avant que le mélange biphasique soit détendu au travers d'un capillaire provoquant l'atomisation de l'émulsion et au final, la formation de phospholipides divisés. Les particules produites sont fines mais agglomérées avec des tailles comprises entre 1,4 et 24,8 µm et une efficacité d'incorporation d'huile essentielle variant de 3 à 14,5%. Les phospholipides divisés ont ensuite été hydratés pour former des liposomes de tailles comprises entre 0,5 et 1,5 µm.

I-2.7.3. Synthèse sur les procédés supercritiques et conclusions

Pour conclure sur ces procédés, la Figure I-16 présente une frise montrant l'évolution dans le temps des procédés supercritiques de formation de liposomes ou de phospholipides divisés (micronisés) en fonction de l'utilisation du CO₂ supercritique (procédés solvant ou procédés anti-solvant ou autres). Les procédés solvant de formation des liposomes sont apparus dans les années 90 alors que les procédés anti-solvant sont apparus plus tardivement, dans les années 2000. Les procédés solvant et anti-solvant sont chacun au nombre de cinq. Les procédés solvant se sont surtout développés à la fin des années 90 alors que les procédés anti-solvant font l'objet d'une attention continue depuis l'année 2006 avec une publication par an.

D'après le Tableau I-11 et le Tableau I-12, les procédés solvant sont des procédés batch alors que les procédés anti-solvant sont soit des procédés batch, soit des procédés semi-continus. Les procédés solvant nécessitent des pressions opératoires comprises entre 16,5 et 30 MPa (moyenne à 22 MPa) alors que les procédés anti-solvant requièrent des pressions opératoires plus faibles, comprises entre 9,5 et 16 MPa (moyenne à 12 MPa). Concernant la température opératoire, les procédés solvant fonctionnent avec des températures comprises entre 314 et 338 K (moyenne à 331 K) alors que les procédés anti-solvant nécessitent des températures opératoires comprises entre 308 et 335,5 K (moyenne à 315,2 K). Les procédés anti-solvant semblent ainsi être plus avantageux en termes de dépenses énergétiques ; mais de plus, l'utilisation de températures de travail plus douces représente un avantage pour encapsuler des principes actifs thermolabiles dans les liposomes. Concernant l'emploi de co-solvant ou de solvant, les procédés solvant utilisent de l'éthanol comme co-solvant alors que les procédés anti-solvant emploient indifféremment de l'éthanol ou des solvants plus nocifs tels que le méthanol, le chloroforme ou le dichlorométhane. Les procédés anti-solvant sont des procédés en deux étapes avec une partie du procédé réalisée sous pression et la seconde partie du procédé réalisée sous pression ambiante (après dépressurisation et ouverture de l'autoclave). Les procédés solvant nécessitent souvent deux étapes (une partie sous haute pression et la seconde sous pression ambiante), mais contrairement aux procédés anti-solvant, les auteurs des procédés solvant présentent des dispositifs intégrés avec deux autoclaves montés en série par exemple et ces procédés apparaissent donc comme des procédés plus compacts. Enfin, les liposomes produits sont de taille plus petite avec les procédés solvant (de la dizaine à la centaine de nanomètres) qu'avec les procédés anti-solvant (de l'ordre du

micromètre). Au regard des molécules encapsulées, il apparaît que dans les travaux réalisés sur les procédés solvant, les molécules encapsulées sont des marqueurs « modèles » et le but de l'encapsulation est de caractériser le procédé. A l'inverse, dans le cas des procédés anti-solvant, les travaux réalisés portent sur des principes actifs à visées thérapeutiques et le but de l'encapsulation est de présenter une application médicale des liposomes. Ainsi, on peut en conclure que les procédés solvant ont été mis au point dans des perspectives de développement et d'amélioration de procédé, alors que les procédés anti-solvant ont été étudiés avec une visée thérapeutique. Cela peut s'expliquer par le fait qu'entre les années 90 et 2000, l'utilisation des liposomes comme vecteurs de principes actifs dans l'organisme humain est passée du stade laboratoire au stade clinique avec, entre autre, le développement des connaissances sur la stabilisation des liposomes, le ciblage, la délivrance contrôlée. Ainsi, à partir des années 2000, les liposomes étaient formés pour leur finalité (dans un but thérapeutique) et non plus comme les produits d'un procédé. Cela explique ce changement d'orientation dans les publications à partir des années 2000.

Suite à cette synthèse, on remarque que les procédés anti-solvant sont plus avantageux que les procédés solvant en termes de pression et de température de travail. Il serait ainsi intéressant de développer un procédé anti-solvant continu.

Procédés solvant	Castor	Frederiksen <i>et al.</i>	Otake <i>et al.</i>	Bridson <i>et al.</i> Otake <i>et al.</i>	Wen <i>et al.</i>	
	1993	1997	2001	2006	2010	
Procédés anti-solvant	Magnan <i>et al.</i>		Badens <i>et al.</i>	Kunstitchai <i>et al.</i>	Sankar Kadimi <i>et al.</i>	Li <i>et al.</i> Naik <i>et al.</i>
	2000 2001		2000 2001	2006	2007	2008 2010
Autres procédés					Meure <i>et al.</i>	Varona <i>et al.</i>
					2009	2011

Figure I-16 - Evolution dans le temps des procédés supercritiques de formation de liposomes et de phospholipides divisés (micronisés) comme précurseurs de liposomes

Chapitre II : Comportement du système ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression-Application à la formation des liposomes

Introduction

Cette nouvelle section bibliographique a été dissociée de la synthèse bibliographique initiale car elle justifie une étude propre et vient appuyer les développements expérimentaux visant à mettre au point un procédé innovant proposé dans le Chapitre IV. Cette étude vise à comprendre les mécanismes de formation des liposomes et à faire ressortir des tendances en fonction de la façon dont la phase d'hydratation est réalisée (sous pression ou pendant la phase de dépressurisation). Les procédés supercritiques de formation des liposomes présentés dans le Chapitre I sont ainsi à nouveau étudiés et classifiés. Cette étude et les conclusions formulées s'appuient sur une étude préalable menée sur les systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression et sur la formation et la stabilité des émulsions eau-dans-CO₂ et CO₂-dans-eau. Cette étude aborde deux thèmes (la formation et la stabilité des émulsions CO₂/eau sous pression et la formation des liposomes par des procédés utilisant les fluides supercritiques) dans le but de mettre en avant des pistes sur la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la formation des liposomes. Ce travail présente un caractère tout à fait innovant et a fait l'objet d'une publication sous forme de *review* [102].

Pour mieux comprendre les motivations de cette étude, il est intéressant de rappeler les éléments qui ont conduit à ces interrogations. L'objectif de ce travail de recherche est de mettre au point un procédé innovant de formation des liposomes utilisant les fluides supercritique. Dans le but de concevoir un procédé innovant et qui fonctionne en continu, nous avons imaginé de mettre en présence simultanément le CO₂ supercritique, la lécithine et l'eau. Pour réaliser ces essais, nous avons utilisé un autoclave muni de fenêtres pour visualiser le comportement des phases au cours du procédé et déterminer les conditions expérimentales pour lesquelles le comportement des phases est stable. Nous avons donc étudié le comportement des émulsions eau-dans-CO₂ et CO₂-dans-eau et essayé de comprendre en quoi l'existence préalable de ces émulsions pouvait influencer sur la formation des liposomes. Une étude bibliographique sur les systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant a rapidement montré que les phases observées dans notre autoclave sous pression avaient déjà été répertoriées. L'évolution d'une phase à l'autre en fonction des paramètres opératoires avaient également été étudiée pour des surfactants bien définis. Cependant, aucune étude ne traitait du cas des phospholipides comme surfactant dans l'étude des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant.

Dans les publications portant sur la formation des liposomes avec des procédés utilisant du CO₂ supercritique, seuls Otake *et al.* [66, 71] se sont intéressés aux différents comportements de phases dans l'autoclave avant la formation des liposomes au moment de la dépressurisation. Frederiksen *et al.* [67] ont signalé la formation de mousse lorsque le CO₂ s'échappait du mélange eau/phospholipide lors de la dépressurisation. Il restait alors à établir un lien entre les données de la littérature sur les systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant et la formation des liposomes avec des procédés utilisant du CO₂ supercritique, en passant par le système ternaire CO₂/eau/phospholipide ou le système quaternaire CO₂/eau/phospholipide/éthanol et en tenant compte du fait que les liposomes se forment lors de la dépressurisation.

L'objectif de cette étude est ambitieux et toutes les questions soulevées n'ont pas trouvé de réponses. L'objectif est de proposer des pistes de réflexion, de développer les connaissances par l'apport de premiers éléments de compréhension sur les mécanismes de formation des liposomes dans les procédés utilisant le CO₂ supercritique.

II-1. Des émulsions aux liposomes

Lors de la formation des liposomes par des procédés utilisant des fluides supercritiques, la présence simultanée de CO₂, de surfactant et d'eau conduit à l'apparition de mousse, de phase transparente (microémulsion), de phase opaque laiteuse (macroémulsion), de phase riche en eau, de phase riche en CO₂, ou d'autres phases [66, 67, 71, 96, 103]. L'apparition et l'évolution de ces différentes phases caractérisent le comportement du système quaternaire CO₂/solvant/phospholipide/eau sous pression ou du système ternaire CO₂/solvant/phospholipide sous pression. En ce qui concerne l'utilisation de solvant, la quantité utilisée est réduite dans le cas des techniques supercritiques appliquées à la formation des liposomes. Par ailleurs, le solvant le plus employé dans ces techniques est l'éthanol. Comme l'éthanol est miscible en toutes proportions dans l'eau et qu'il est utilisé en faible quantité, on peut admettre que le comportement du système quaternaire CO₂/solvant/phospholipide/eau sous pression se rapproche de celui du système ternaire CO₂/phospholipide/eau sous pression. Il est ainsi plus aisé de travailler sur les systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression pour étudier qualitativement les différents mécanismes précédant la formation des liposomes dans les procédés utilisant les fluides supercritiques. Enfin, pour appuyer nos hypothèses, des études fournies dans la littérature sur les systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant montrent que dans chaque cas, les mêmes phénomènes sont observés qualitativement avec la formation de mousse, de phase transparente, de phase opaque et de phase aqueuse [104-108]. Le comportement des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant fait ainsi l'objet d'une étude détaillée dans la première partie de ce chapitre afin de mieux comprendre, par la suite, les phénomènes mis en jeu lors de la formation des liposomes.

II-1.1. Etude des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression

Une émulsion, ou une macroémulsion, est un système dispersé hors équilibre (thermodynamiquement instable), à la différence d'une microémulsion qui est un système thermodynamiquement stable. L'étude des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression est décrite depuis une vingtaine d'années dans la littérature [104-130] et se réfère le plus souvent au comportement des systèmes ternaires huile/eau/surfactant. Dans le cas des systèmes ternaires huile/eau/surfactant, deux compositions sont préférentiellement étudiées

[131] : le cas où le ternaire est riche en huile (systèmes à micelle inverse) et le cas où les compositions eau/huile sont équivalentes dans le système (systèmes de Winsor). Dans le cas des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression, la littérature s'inspire largement des systèmes ternaires huile/eau/surfactant et les mêmes concepts sont appliqués en remplaçant l'huile par le CO₂ [106, 111, 116]. Les procédés supercritiques de formation des liposomes se distinguent selon la phase d'hydratation : (i) soit le procédé consiste, dans un premier temps, à former un système ternaire CO₂/solvant/phospholipide sous pression et ensuite la phase aqueuse est ajoutée lors de la dépressurisation ; (ii) soit la phase aqueuse est introduite dès le début du procédé et ce dernier s'articule autour du système quaternaire CO₂/solvant/phospholipide/eau sous pression. Dans ces deux cas, des systèmes à micelles inverses et des systèmes de Winsor sont observés.

II-1.1.1. Les systèmes à micelles inverses

Les systèmes à micelles inverses sont des systèmes dans lesquels la quantité de CO₂ excède largement la quantité d'eau présente dans le système. Le but du paragraphe suivant est d'expliquer la formation de ces systèmes.

Considérons un système dans lequel un surfactant est solubilisé dans du CO₂ supercritique (Figure II-1). Lorsque le mélange est homogène (a), de l'eau est lentement introduite dans le système. Les molécules de surfactant vont alors s'associer de façon à mettre en contact leurs têtes hydrophiles avec l'eau et à projeter leurs queues hydrophobes vers la phase continue supercritique. Pour de faibles quantités d'eau introduites dans le système, des micro-domaines d'eau sont ainsi dispersés par les molécules de surfactant formant des micelles inverses (b) et l'aspect du mélange reste transparent et uniforme. Le système est une microémulsion eau-dans-CO₂ thermodynamiquement stable [109]. Le rapport molaire corrigé eau sur surfactant W_o^c est utilisé pour décrire à la fois la dispersion de l'eau par les molécules de surfactant lors de la formation de micelles inverses, mais également la part d'eau solubilisée dans le CO₂ supercritique [104, 125]. Ce rapport se définit selon l'Équation 1.

$$W_o^c = \frac{[H_2O]_o - [H_2O]_s}{[\text{surfactant}]_o} \quad \text{Équation 1}$$

Où $[H_2O]_o$ correspond au nombre de moles d'eau total dans le système, $[H_2O]_s$ est le nombre de moles d'eau solubilisées dans la phase légère et $[\text{surfactant}]_o$ est le nombre de moles de surfactant total dans le système. La taille des micelles est liée à W_o^c [132]. En

augmentant la quantité d'eau dans le système, une séparation de phases se produit avec l'apparition d'une phase légère riche en CO₂ et d'une phase riche en eau.

La Figure II-2 décrit une particularité des systèmes à micelles inverses : leur dépendance vis-à-vis de la température. Sur la Figure II-2, le domaine à une phase possède deux limites : une limite supérieure appelée courbe de solubilisation, au-delà de laquelle les micelles inverses rejettent une certaine quantité d'eau, entraînant l'apparition d'une phase aqueuse dans le système (c'est-à-dire la formation d'un système biphasique) ; et une limite inférieure appelée courbe de point de vapeur et qui dépend de la courbure du surfactant à l'interface CO₂/eau. En dessous de cette limite, le surfactant et la phase aqueuse forment une seconde phase riche en surfactant liée aux interactions micelles-micelles [131].

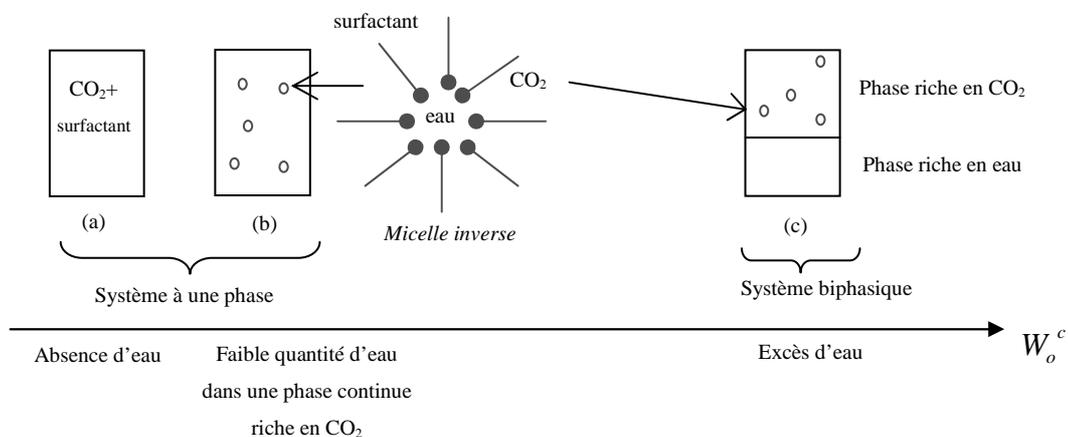


Figure II-1 - Représentation schématique du comportement d'un système CO₂/surfactant/eau lors de l'ajout progressif d'eau : (a) une phase continue CO₂/surfactant (sans eau). (b) Formation de micelles inverses. (c) Apparition d'une seconde phase

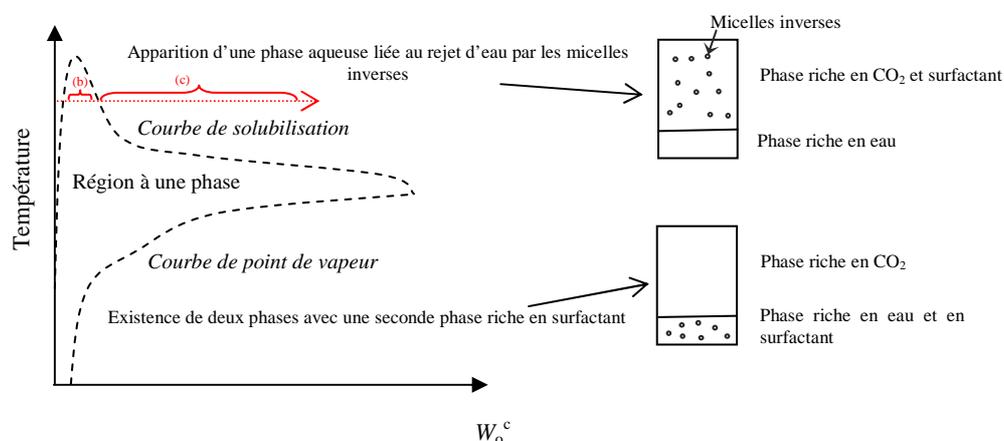


Figure II-2 - Comportement type du système ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression en présence d'une faible quantité d'eau [131] (les indications (b) et (c) à température constante renvoient à la Figure II-1)

II-1.1.2. Les systèmes de Winsor

Dans les systèmes de Winsor, des quantités équivalentes de CO₂ et d'eau sont présentes dans le système avec le surfactant. Selon la température, la pression et l'équilibre hydrophile/CO₂-phile, le système ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression présente à l'équilibre une ou plusieurs phases. Winsor [133] a étudié et classifié ces différents équilibres de phases pour les systèmes ternaires huile/eau/surfactant. Dans le cas du ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression, la même séquence d'équilibre existe mais cette fois, de petites variations de pression ou de température ont un effet considérable sur la densité du milieu et donc, sur le pouvoir solvant ou anti-solvant du CO₂. Ainsi, l'utilisation du CO₂ supercritique permet de contrôler l'activité du surfactant à l'interface CO₂/eau [111]. En utilisant les notations introduites par Winsor [133], un système de Winsor de comportement de type I (noté $\underline{2}$) correspond à un système pour lequel une microémulsion CO₂-dans-eau (micelles normales) est en équilibre avec une phase riche en CO₂. Un système de Winsor de comportement de type II (noté $\bar{2}$) fait référence à une situation pour laquelle une microémulsion eau-dans-CO₂ (micelles inverses) est en équilibre avec une phase riche en eau. Un système de Winsor de comportement de type III (noté 3ϕ) se rapporte à la situation dans laquelle une microémulsion de milieu de phases est en équilibre à la fois avec une phase riche en CO₂ et avec une phase riche en eau. Cet équilibre à trois phases est considéré comme optimal lorsque les mêmes quantités de surfactant sont présentes avec le CO₂ et l'eau. Enfin, un système de Winsor de comportement de type IV (noté 1ϕ) décrit la situation dans laquelle le système ne contient qu'une seule phase (microémulsion).

Dans un diagramme représentant la concentration en surfactant en fonction des paramètres opératoires, la limite des domaines d'existence des quatre systèmes de Winsor a une forme caractéristique en forme de poisson [106, 111, 116, 121, 123, 133] comme présenté sur la Figure II-3. La ligne centrale qui coupe le poisson correspond à la ligne des points d'inversion de phase du système (température et pression d'inversion de phase). La valeur de la tension interfaciale atteint ainsi un minimum au niveau de cette ligne. Dans ces conditions, le surfactant a une affinité équivalente pour la phase aqueuse et pour la phase CO₂. Dans les autres cas, la phase continue est la phase dans laquelle le surfactant est le plus soluble : c'est la règle de Bancroft [134, 135].

A partir de cette ligne centrale et en modifiant la valeur d'un des paramètres expérimentaux, le surfactant devient préférentiellement soluble dans une phase [109]. Ainsi, sur la Figure II-3, la tête du poisson correspond au domaine d'existence à trois phases avec une microémulsion de milieu de phases en équilibre avec une phase riche en eau et une phase riche en CO₂ [121]. Lorsque la température augmente, le surfactant migre de la phase aqueuse pour former une microémulsion de milieu de phases et rejoindre ensuite la phase riche en CO₂. Une transition de phases de $\underline{2}$ vers 3 vers $\bar{2}$ est alors observée [131]. L'influence de la pression dépend quant à elle de la nature du surfactant et fera l'objet d'une étude plus détaillée par la suite. Dans le cas de la formation de liposomes avec des procédés utilisant du CO₂ supercritique, la lécithine joue le rôle de surfactant. La lécithine de soja utilisée dans cette étude est principalement constituée de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine. En considérant le système ternaire CO₂/eau/lécithine, une augmentation de pression entraîne une transition $\underline{2}$ -3- $\bar{2}$ [106, 111, 116, 121, 123].

II-1.2. Déstabilisation des émulsions

Comme il l'a déjà été présenté ultérieurement, les émulsions ou les macroémulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. Lors de la formation des liposomes, des phénomènes de floculation (agrégation des gouttes liée à des forces attractives entre les queues des molécules de surfactants), de sédimentation (dépôt du surfactant lié à des phénomènes de précipitation), de crémage (dépôt du surfactant au dessus de la phase aqueuse lorsque le pouvoir solvant diminue) et de mûrissement d'Ostwald (rupture de l'émulsion) ont été observés lors de la variation des paramètres opératoires. Ces phénomènes font l'objet d'une étude approfondie dans les paragraphes suivants. Nous considérerons que le système est un système de Winsor et les paramètres opératoires seront étudiés les uns après les autres.

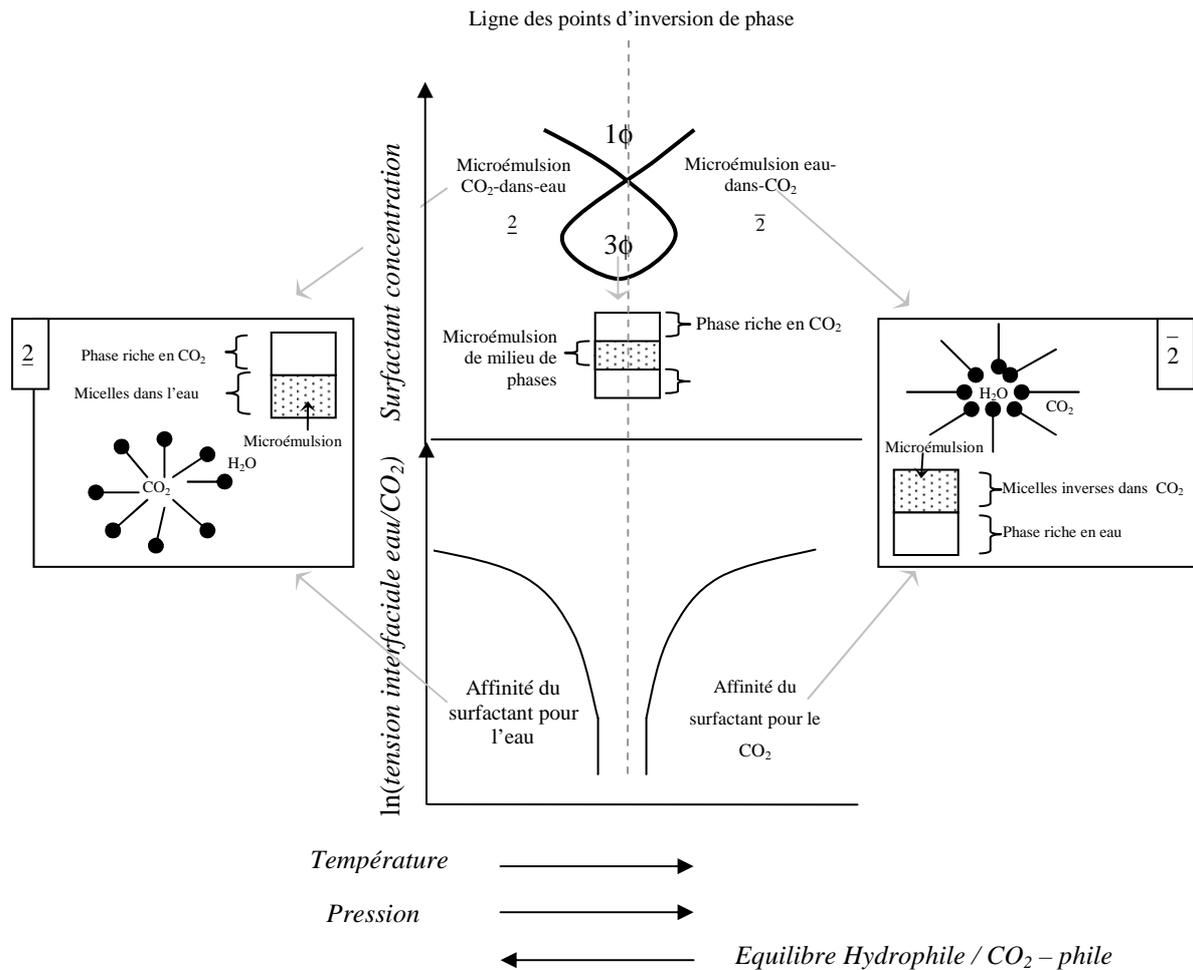


Figure II-3 - Concentration en surfactant et tension interfaciale eau/CO₂ en fonction des paramètres opératoires et représentation schématique des équilibres de phase du système de Winsor [106, 111, 116, 121, 123, 133]

II-1.2.1. Influence de la pression

Le système CO₂/eau/surfactant est initialement considéré sous haute pression (Figure II-4). Au départ, le système est supposé être constitué d'une microémulsion eau-dans-CO₂ uniforme et transparente (d). A partir de cet état, les changements de phase du système sont étudiés en fonction des variations de pression, comme présenté sur la Figure II-4. Une faible diminution de pression entraîne une diminution de la quantité d'eau solubilisée dans la phase supercritique (W_o^c augmente) et la taille des agrégats a tendance à augmenter (c). Lorsque la valeur de la densité du CO₂ est abaissée en dessous de la valeur de la densité critique de floculation (illustrée sur la Figure II-4 par la pression critique de floculation ou PCF), le solvant quitte les sites occupés au niveau des queues des molécules de surfactant provoquant

une rapide floculation des gouttes d'eau (b) [126]. Plus généralement, la diminution de la densité du CO₂ conduit à la migration du surfactant vers la phase aqueuse. Une inversion de phase d'une émulsion eau-dans-CO₂ vers une émulsion CO₂-dans-eau est observée (a) lorsque la valeur de la densité du CO₂ atteint la densité d'inversion de phase (illustrée sur la Figure II-4 par la pression d'inversion de phase ou PIP). Si on diminue encore la pression, le crémage combiné à la coalescence des gouttes conduit à une séparation des phases.

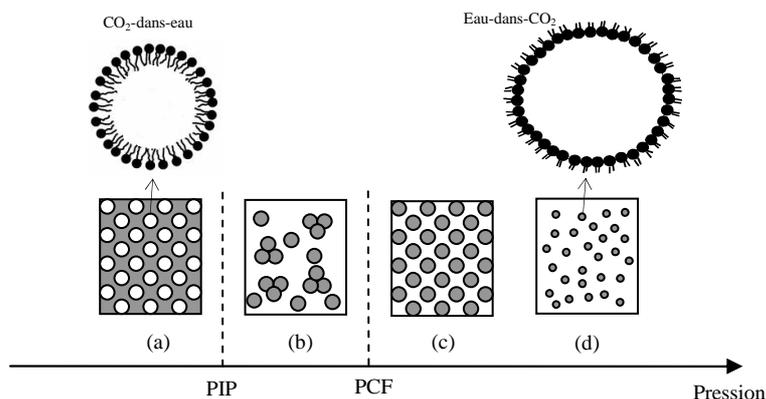


Figure II-4 - Représentation schématique de l'évolution d'un système ternaire CO₂/eau/surfactant de Winsor en fonction de la pression : (a) émulsion CO₂-dans-eau. (b) Floculation des gouttes d'eau. (c) émulsion eau-dans-CO₂. (d) microémulsion eau-dans-CO₂ (PIP signifie pression d'inversion de phase et PCF pression critique de floculation)

II-1.2.2. Influence de la température

Comme la pression, la température a un effet sur la densité. Ce point a déjà été traité dans le paragraphe précédent et ne sera pas abordé ici. La température affecte également la structure des surfactants. Des variations de température autour de la température de transition de phase des phospholipides conduisent à des transitions de phase d'une phase gel-lamellaire vers une phase fluide liquide-cristalline.

II-1.2.3. Influence de la quantité d'eau

L'ajout d'eau dans un système CO₂/surfactant sous haute pression entraîne la formation de systèmes complexes. En effet, le rapport eau/CO₂ a un effet important sur la formation et la stabilité des émulsions [126]. Afin de mieux comprendre le comportement des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression lors de l'augmentation de la quantité d'eau dans le système, le comportement de ce système ternaire est étudié au travers du diagramme ternaire (sous pression et température fixées) présenté sur la Figure II-5. Ce diagramme est divisé en plusieurs domaines. Le domaine central correspond à la région

d'existence d'une phase unique 1ϕ (microémulsion). Cette région est délimitée par deux frontières : la frontière haute qui marque l'apparition d'une phase lamellaire ; et la frontière basse qui correspond à l'apparition d'un domaine à trois phases 3ϕ (forme triangulaire) où une émulsion de milieu de phases coexiste avec deux phases : une phase riche en eau et l'autre phase riche en CO₂ ; et d'un domaine à deux phases 2ϕ (autour de la forme triangulaire) où des microémulsions coexistent avec une phase riche en CO₂ et une phase riche en eau. A partir d'un système CO₂/surfactant et en l'absence d'eau (point A), le passage d'une microémulsion à une macroémulsion (point E) est illustré sur la Figure II-5. Du point A au point B, le chemin suit une droite appelée ligne de dilution. De A à B, la faible quantité d'eau introduite dans le système est dispersée dans la phase continue. Au point B, la phase CO₂ est saturée en eau et une nouvelle phase apparaît. Une addition d'eau supplémentaire conduit à l'apparition d'un système à trois phases (point E).

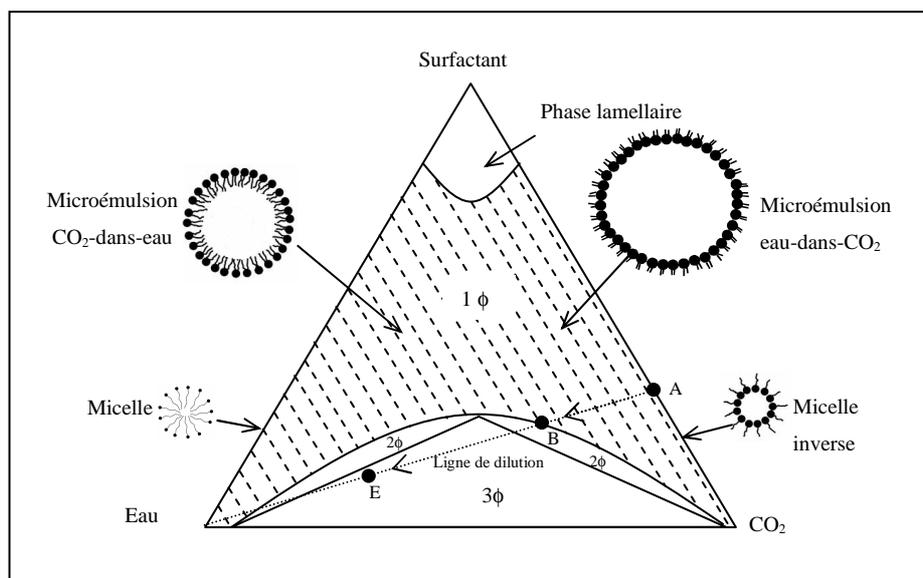


Figure II-5 - Diagramme ternaire du système CO₂/eau/surfactant [107, 109, 119, 136].

Le cas des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression pour lesquels le rapport CO₂/eau varie a été abordé plusieurs fois dans la littérature. Sagisaka *et al.* [127] ont formé une macroémulsion opaque à partir d'une microémulsion transparente en augmentant la fraction volumique en eau du système. Au-delà d'une certaine quantité d'eau, ils ont observé l'apparition d'une phase précipitée de surfactant. En augmentant la quantité d'eau présente dans le système sous haute pression, Lee *et al.* [126] ont observé une seconde inversion de phase d'une émulsion eau-dans-CO₂ vers une émulsion CO₂-dans-eau. Deux raisons peuvent expliquer ce changement de phase : la première est qu'une augmentation de la quantité d'eau modifie les proportions des différents constituants au sein du système et cela entraîne

l'apparition de nouvelles phases comme illustré sur la Figure II-3 ; la seconde raison est qu'en augmentant la quantité d'eau dans le système, la fraction volumique de la phase dispersée augmente d'où cette inversion de phase. Ainsi, la quantité d'eau influe fortement sur l'évolution du système ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression.

II-1.3. La formation des liposomes

La formation des liposomes à partir d'un mélange CO₂-eau-phospholipide porté dans certaines conditions de température et de pression résulte d'une succession complexe de changements de phases conduisant à la formation de micelles normales, de micelles inverses, d'émulsions de milieu de phases, ou d'émulsions macro- ou microscopiques. Comme nous allons le montrer, la formation de ces systèmes et les différents changements de phases influencent les propriétés des liposomes [71]. Pour mieux comprendre ces phénomènes et leurs effets sur les liposomes, les éléments développés précédemment (II-1.2) sont repris dans le cas précis de la formation des liposomes. Dans le paragraphe suivant, la lécithine (principalement constituée de phosphatidylcholine) est utilisée comme surfactant et la représentation schématique de Winsor ($\underline{2}$, $\bar{2}$, 3ϕ et 1ϕ) est adoptée.

II-1.3.1. Influence de la chute de pression.

Considérons une émulsion eau-dans-CO₂ en présence d'un excès de phase aqueuse ($\bar{2}$ sur la Figure II-3). En diminuant progressivement la densité du CO₂, le pouvoir solvant du CO₂ décroît et par conséquent, le surfactant va migrer vers la phase aqueuse, formant tout d'abord une émulsion de milieu de phases (3ϕ sur la Figure II-3), puis une émulsion CO₂-dans-eau avec une seconde phase riche en CO₂ ($\underline{2}$ sur la Figure II-3). Le chemin suivi est visualisable sur la Figure II-3, en diminuant la pression à concentration en surfactant constante. L'influence de la chute de pression sur la taille des liposomes a déjà été abordée dans la littérature [71, 137]. En prenant en compte ce qui a été vu précédemment pour les émulsions et d'après la Figure II-4, lorsque la pression diminue, une microémulsion se transforme en une émulsion. La différence entre une microémulsion et une émulsion réside dans la taille des micelles (des gouttes d'eau). Or, ce sont les molécules de surfactant formant les micelles qui vont se réorganiser pour former des liposomes lors de la dépressurisation. Ainsi, la chute de pression qui se produit pendant la dépressurisation aura un effet important sur la taille des micelles, c'est-à-dire sur la taille des liposomes. Il est possible que la vitesse de dépressurisation ait également un effet sur la taille des liposomes.

II-1.3.2. Influence de la température

Le comportement des molécules de surfactant est fortement dépendant des conditions de température, et de la température de transition de phase du surfactant. Pour la lécithine (Figure II-6), une phase gel-lamellaire (a) est observée à des températures inférieures à la température de transition de phase ; à l'inverse, des températures supérieures à la température de transition de phase caractérise le domaine d'existence de la phase fluide cristal-liquide (b) (paragraphe I-2.2.2).

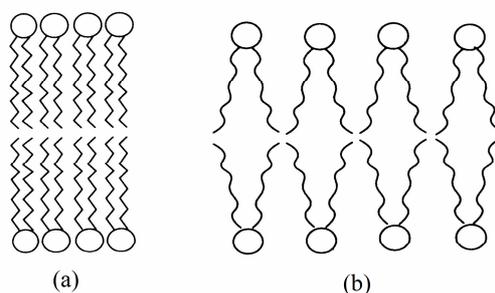


Figure II-6 - Représentation schématique des transitions de phase des phospholipides : (a) phase gel-lamellaire. (b) phase fluide cristal-liquide

De telles transitions sont principalement induites par des interactions de van der Waals entre les chaînes lipidiques adjacentes. L'intensité de ces interactions dépend de la longueur des chaînes du surfactant et de la densité d'assemblage des chaînes [138]. En présence de CO₂, la température de transition de phase du surfactant est réduite car les molécules de CO₂ sont localisées au niveau des chaînes lipidiques, diminuant ainsi les interactions entre chaînes. Le domaine d'existence de la phase fluide cristal-liquide est alors élargi [139]. Ainsi, en opérant avec du CO₂ supercritique et avec des températures relativement douces, des procédés « solvant » sont envisageables pour former des liposomes encapsulant des molécules thermolabiles. Au final, lors de la dépressurisation, le CO₂ est libéré et par conséquent, il quitte les sites occupés sur les chaînes des molécules de surfactant. Par conséquent, les interactions entre les queues des molécules de surfactant sont plus fortes et les phospholipides s'associent en bicouches pour réduire ces interactions. En même temps, la température de transition de phase augmente pour retrouver sa valeur initiale. Alors, les surfactants subissent une transition de phase fluide cristal-liquide vers gel-lamellaire qui permet de rigidifier la membrane.

II-1.3.3. Influence de la quantité d'eau

Comme présenté précédemment, la quantité d'eau joue un rôle important sur la formation et la stabilité des émulsions. Concernant la formation de liposomes avec des procédés hautes pressions, l'eau peut être ajoutée avant ou après la dépressurisation.

Si la phase aqueuse est ajoutée avant la dépressurisation, dans une phase homogène CO₂/surfactant, alors il se formera des micelles inverses puis, lorsque la quantité d'eau aura atteint une valeur critique [71], une phase aqueuse apparaîtra formant un système biphasique. Ainsi, la présence de CO₂ permet une dispersion des phospholipides (sous la forme de micelles inverses) dans la phase continue. Des liposomes de taille contrôlée sont formés lors de la dépressurisation.

Dans le cas des procédés où l'eau est injectée après la dépressurisation, le chemin suivi par les molécules de surfactant n'est pas le même. Il n'y a pas de formation d'émulsions sous pression. Lorsque le mélange est détendu, les phospholipides se regroupent pour former des agrégats. La formation de liposomes par ajout d'eau à partir de ces agrégats est plus difficile que dans le cas précédent (les liposomes se formeront mais il est plus difficile de contrôler leurs propriétés physico-chimiques). En effet, le matériel phospholipidique est moins divisé donc la formation de bicouches phospholipidiques est moins évidente.

L'existence préalable à la formation des liposomes d'un système ternaire CO₂/eau/surfactant semble avantageuse. En opérant avec le système ternaire CO₂/eau/lécithine, le contrôle de l'état du système avant la dépressurisation est primordial, comme par exemple, au travers de la régulation du débit d'injection d'eau.

II-1.3.4. Influence de la dissolution du CO₂

En présence d'eau, une partie du CO₂ va se solubiliser [140-142] et être ionisée pour former des ions H⁺ et HCO₃⁻. Ce point a été étudié par Bothun *et al.* [139] qui a remarqué que les ions HCO₃⁻ se liaient aux têtes des molécules de phospholipides (groupes phosphates) et créaient des répulsions électrostatiques entre les têtes voisines, pouvant entraîner un mouvement des phospholipides au sein de la couche phospholipidique dans le cas des micelles normales et inverses, et au sein de la bicouche pour les liposomes. Bothun *et al.* [139] ont ainsi conclu que la présence de molécules de CO₂ solubilisées provoquait l'apparition de points de faiblesses dans la membrane phospholipidique.

II-1.3.5. Conclusion

L'étude du comportement du système ternaire CO₂/eau/surfactant est importante pour comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la formation des liposomes. La formation d'émulsion eau-dans-CO₂ et/ou CO₂-dans-eau préalable à la dépressurisation offre un meilleur contrôle des propriétés physico-chimiques des liposomes.

II-2. Les procédés utilisant du CO₂ supercritique

Précédemment, les techniques supercritiques de formation des liposomes ont été présentées en fonction du rôle joué par le fluide supercritique : solvant ou anti-solvant (Tableau II-1). A présent, une nouvelle approche est proposée en fonction de la façon d'introduire la phase aqueuse dans le système : soit la phase d'hydratation intervient alors que le système est encore sous pression et dans ce cas, il y a formation d'un système ternaire CO₂/eau/surfactant dans l'autoclave ; soit la phase d'hydratation est réalisée après la dépressurisation. Ainsi, dans la suite de cette section, les procédés supercritiques seront classés en fonction de la phase d'hydratation ; et, grâce à ce qui a été présenté sur les émulsions, des pistes seront proposées pour mieux comprendre les mécanismes de formation des liposomes.

II-2.1. Les techniques utilisées et les caractéristiques des liposomes formés

Parmi les procédés recensés dans le Tableau II-1, seuls les procédés pour lesquels la phase d'hydratation est réalisée sous pression ou pendant la dépressurisation seront étudiés plus en détails dans cette section. Les procédés pour lesquels la phase d'hydratation est réalisée une fois le système ramené dans les conditions ambiantes ou ceux pour lesquels la phase d'hydratation n'est pas réalisée ne sont pas développés dans cette section.

II-2.1.1. La phase d'hydratation est réalisée alors que le système est sous pression

Parmi les procédés pour lesquels la phase d'hydratation est réalisée alors que le système est sous pression, on compte quatre procédés présentés dans le Tableau II-1 : la méthode de la décompression de Castor *et al.* [92, 94], la méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse (scRPE) d'Otake *et al.* [71, 96-98, 143], la méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse améliorée (IscRPE) d'Otake *et al.* [66] et la méthode présentée par Sankar Kadimi *et al.* [68]. Le principe de ces procédés est rappelé ci-dessous.

- La méthode de la décompression [92, 94]: les phospholipides sont solubilisés dans la phase supercritique en présence de co-solvant et de la phase aqueuse et le mélange est ensuite détendu au travers d'une buse dans un autoclave non pressurisé.
- La méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse (scRPE) [71, 96-98, 143] : les phospholipides sont mélangés avec du co-solvant et du CO₂ supercritique ; une fois que le mélange est parfaitement homogène, une phase aqueuse est lentement introduite puis le mélange est dépressurisé.
- La méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse améliorée (IscRPE) [66] : les phospholipides et la phase aqueuse sont préalablement placés dans la cellule puis le CO₂ supercritique est introduit sous agitation. Après un certain temps, le mélange est dépressurisé.
- Application du procédé GAS (Gas Anti-Solvent) [68] : la solution organique dans laquelle les phospholipides ont été solubilisés est introduite dans l'autoclave avant la montée en pression. Une fois les conditions expérimentales de pression et température atteintes, une phase aqueuse est introduite dans la cellule. Enfin, le mélange est dépressurisé.

Tableau II-1 – Procédés sous haute pression présentés dans la littérature en fonction de l'utilisation du CO₂ supercritique dans le procédé

Le CO ₂ est utilisé comme solvant					Le CO ₂ est utilisé comme anti-solvant				
Nom du procédé	Méthode	Volume de l'autoclave / cm ³	Diamètre des liposomes / μm	Références	Nom du procédé	Méthode	Volume de l'autoclave / cm ³	Diamètre des liposomes / μm	Références
Méthode de l'injection	Batch	(*)	0,06 - 2	Castor <i>et al.</i> [92, 94]	Application du procédé SAS pour microniser les phospholipides, suivi ou non d'une phase d'hydratation sous agitation pour former des liposomes	Semi-continue	500	(*)	Magnan <i>et al.</i> [4, 100]
							(*)	0,269	Naik <i>et al.</i> [78]
Méthode de la décompression	Batch	(*)	0,01 – 0,3	Castor <i>et al.</i> [92, 94]	Application du procédé ASES pour microniser les phospholipides, suivi ou non d'une phase d'hydratation sous agitation pour former des liposomes	Semi-continue	(*)	2,7 – 6,7 (pH=4,0) 3,6 – 9,4 (pH=7,2)	Kunastitchai <i>et al.</i> [72]
Méthode « Supercritical liposomes »	Batch	(*)	0,02 – 0,05 0,25	Frederiksen <i>et al.</i> [67, 95, 103]	GAS	Batch	(*)	0,15 - 3	Sankar Kadimi <i>et al.</i> [68]
			0,2	Bridson <i>et al.</i> [76]					
Méthode scRPE	Batch	50 (cellule à fenêtres)	0,1 – 1,2	Otake <i>et al.</i> [71, 96-98, 143]	SEDS	Semi-continue	250	(*)	Li <i>et al.</i> [73]
Méthode IscRPE	Batch	200 (cellule à fenêtres)	1,5	Otake <i>et al.</i> [66]					
Méthode RESS modifiée	Batch	100	0,173	Wen <i>et al.</i> [79]					
<i>Le CO₂ est utilisé comme soluté ou agent dispersant</i>									
Méthode DESAM	Semi-continue	150 (Chambre d'expansion et chambre de formation des vésicules)	0,05 – 0,2	Meure <i>et al.</i> [70]					

(*) Paramètre non défini

La méthode de la décompression [92, 94] a permis de former des liposomes unilamellaires de diamètres moyens compris entre 0,01 et 0,3 µm. La méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse (scRPE) [71, 96-98, 143] a produit des liposomes de forme ellipsoïdale avec un diamètre compris entre 0,1 et 1,2 µm. La méthode supercritique d'évaporation du solvant en phase inverse améliorée (IscRPE) [66] permet de former des liposomes de diamètre moyen 1,5 µm. Enfin, la méthode développée par Sankar Kadimi *et al.* [68] a produit des liposomes sphériques, de taille moyenne comprise entre 0,15 et 3 µm.

II-2.1.2. La phase d'hydratation est réalisée au moment de la dépressurisation

Dans ce cas, le mélange supercritique est détendu dans la phase aqueuse. Trois procédés présentés dans le Tableau II-1 sont caractérisés par une phase d'hydratation réalisée au moment de la dépressurisation : La méthode de l'injection de Castor *et al.* [92, 94], la méthode « supercritical liposomes » de Frederiksen *et al.* [67, 95, 103] et la méthode DESAM de Meure *et al.* [70]. Le principe de ces procédés est rappelé ci-dessous.

- La méthode de l'injection [92, 94] : les phospholipides sont solubilisés dans le CO₂ supercritique avec ajout d'un co-solvant. Puis, le mélange est détendu dans un second autoclave qui contient la phase aqueuse.
- La méthode « supercritical liposomes » de Frederiksen *et al.* [67, 95, 103] : les phospholipides sont solubilisés dans le CO₂ supercritique en présence d'un co-solvant. La formation d'un mélange homogène est assurée grâce à une boucle de recirculation sous haute pression. Ensuite, le mélange est transféré vers la partie sous pression ambiante du procédé au travers d'un capillaire d'encapsulation où la phase aqueuse est ajoutée aux phospholipides. Cette partie est également munie d'une boucle de recirculation.
- La méthode DESAM [70] : les phospholipides et le cholestérol sont solubilisés dans une solution organique et introduits dans l'autoclave. Ensuite, le CO₂ est introduit et utilisé comme agent dispersant sous des conditions subcritiques. Les liposomes se forment dans un second autoclave.

La méthode de l'injection [92, 94] permet de former des liposomes de diamètre moyen compris entre 0,06 et 2 μm . La méthode « supercritical liposomes » [67, 95, 103] produit deux populations de liposomes : une population majoritaire de petits liposomes unilamellaires de taille moyenne comprise entre 0,02 et 0,05 μm et un petit nombre de liposomes multilamellaires de diamètre moyen 0,25 μm . La méthode DESAM [70] permet de former des petits liposomes unilamellaires de diamètres moyens compris entre 0,05 et 0,2 μm .

II-2.2. Les mécanismes de formation des liposomes

Le but de cette section est d'apporter des éléments nouveaux et des bases de réflexion sur les mécanismes de formation des liposomes grâce à la synthèse des données fournies dans la littérature et en s'appuyant sur ce qui a été développé précédemment. Les données de la littérature utilisées dans le paragraphe précédent sont listées dans le Tableau II-2 en fonction des conditions de mise en contact des phases (supercritique et aqueuse). Les conclusions présentées dans ce paragraphe s'appuient sur les données du Tableau II-2, sur les théories introduites dans la première partie de ce chapitre et enfin, sur le concept des fragments de bicouches phospholipidiques (*bilayered phospholipid fragments* ou BPF) introduit par Lasic *et al.* [82] et repris par Castor *et al.* [92]. D'après le concept du BPF, les phospholipides solubilisés dans un continuum supercritique forment des fragments de bicouche phospholipidique (BPF), dans lesquels les queues des surfactants sont en contact avec la phase supercritique (apolaire), et les têtes des phospholipides se font face. Les BPF sont des structures intermédiaires à la formation des liposomes.

Tableau II-2 - Morphologie et taille des liposomes en fonction de la phase d'hydratation

Hydratation sous pression				Hydratation pendant la dépressurisation			
Méthode	Diamètre des liposomes / μm	Classe des liposomes	Références	Méthode	Diamètre des liposomes / μm	Classe des liposomes	Références
Méthode de la décompression	0,01-0,3	UV	Castor <i>et al.</i> [92, 94]	Méthode de l'injection	0,06-2	MLV	Castor <i>et al.</i> [92, 94]
Méthode scRPE	0,1-1,2	LUV	Otake <i>et al.</i> [71, 96-98, 143]	Méthode "supercritical liposomes"	0,02-0,05 0,25	SUV MLV	Frederiksen <i>et al.</i> [67, 95, 103]
GAS	0,15-3	Liposomes de petites tailles	Sankar Kadimi <i>et al.</i> [68]	Méthode DESAM	0,05-0,2	SUV	Meure <i>et al.</i> [70]
Méthode IscRPE	1,5	Liposomes dont la structure forme des bandes	Otake <i>et al.</i> [66]				

II-2.2.1. Préambule : cas des méthodes conventionnelles

Les méthodes conventionnelles permettent de former des LUV et des MLV. Dans la plupart des cas, les suspensions de LUV sont transformées en suspension de SUV par mise en contact de la suspension avec un fort cisaillement. Les MLV sont formés par ajout d'eau dans un ballon contenant un film phospholipidique sec (résultat de l'évaporation du solvant d'une solution organique dans laquelle ont été solubilisés les phospholipides) [2, 144]. Dans ce cas, l'ajout d'eau entraîne le gonflement des couches phospholipidiques déposées dans le fond du ballon, formant des tubes ou fibrilles. Ces tubes s'allongent et finissent par se détacher des couches phospholipidiques planes pour former des liposomes [82]. Les LUV sont formés par la méthode d'élimination du solvant, la méthode de l'injection et la méthode d'évaporation du solvant en phase inverse. Dans chacun de ces cas, des micelles inverses sont formées comme structures intermédiaires avant la formation des liposomes. L'existence initiale de micelles inverses favoriserait donc la formation de LUV. Cette tendance a également été observée dans les techniques supercritiques, comme présenté ci-après.

II-2.2.2. Hydratation alors que le système est sous pression

D'après le Tableau II-2, les liposomes formés alors que la phase d'hydratation est réalisée sous pression sont de type unilamellaire avec un diamètre moyen de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Otake *et al.* [71, 96] ont montré que la formation de LUV résulte d'une double inversion de phase : une première inversion de phase d'une émulsion eau-dans-CO₂ vers une émulsion CO₂-dans-eau ; puis une inversion de phase d'une émulsion CO₂-dans-eau vers les liposomes. Pour expliquer ces phénomènes, considérons la phase continue supercritique dans laquelle les phospholipides sont solubilisés (en présence de co-solvant). Dans ce milieu, il existe des BPF de différentes tailles. Par ajout de phase aqueuse, des micelles inverses sont formées et coexistent avec les BPF. Si la quantité d'eau augmente, la formation de micelles inverses sera favorisée (car les têtes polaires des molécules de phospholipides se rapprocheront de la phase aqueuse). Lors de la dépressurisation, le CO₂ quitte les sites occupés sur les queues des molécules de surfactant, augmentant ainsi l'attraction entre les queues des molécules de surfactant [126]. Les micelles gonflent et les phospholipides s'associent pour former des liposomes de type LUV.

II-2.2.3. Hydratation au moment de la dépressurisation

D'après le Tableau II-2, les liposomes formés par des procédés dans lesquels la phase d'hydratation est réalisée au moment de la dépressurisation sont de type multilamellaire ou unilamellaire. Concernant la taille de ces liposomes, ils sont plus petits que les liposomes formés par des procédés dans lesquels la phase d'hydratation est réalisée alors que le système est sous pression : de la dizaine à la centaine de nanomètres. Otake *et al.* [71, 96] ont étudié la formation des MLV et ils ont observé que les MLV étaient le résultat d'une simple inversion de phase : d'une émulsion CO₂-dans-eau vers les liposomes. Considérons un mélange CO₂/surfactant dans lequel la phase aqueuse est introduite au moment de la dépressurisation. Dans ce cas, les BPF sont dispersés de façon continue dans la phase aqueuse. En contact avec la phase aqueuse, les BPF s'organisent de façon à orienter les parties polaires des phospholipides vers la phase aqueuse. En parallèle, le CO₂ est libéré et quitte les sites occupés sur les queues des molécules de surfactant. Il en résulte une force d'attraction entre ces queues. Ainsi, des structures plus complexes sont formées telles que des MLV. Concernant la taille de ces MLV, ces vésicules sont de plus petites tailles que les LUV normalement formés lorsque la phase d'hydratation est réalisée alors que le système est sous pression car dans le cas présent, les dernières structures intermédiaires avant les liposomes sont les BPF, qui sont plus petits en taille que les micelles inverses gonflées en présence de phase aqueuse. De plus, une émulsion CO₂-dans-eau a de grandes chances d'apparaître temporairement lorsque la phase d'hydratation est réalisée au moment de la dépressurisation. Cela pourrait expliquer l'existence de vésicules unilamellaires qui proviendraient des micelles normales. Ainsi, au final, deux types de vésicules coexistent : les MLV et les LUV, mais la proportion de MLV est plus importante que la proportion de LUV car les BPF sont plus nombreux comme structures intermédiaires.

II-2.2.4. Conclusion

Dans les procédés hautes pressions, le mode de mise en contact des phases a une importance significative sur les caractéristiques des liposomes formés. Ainsi, lorsque la phase d'hydratation est réalisée alors que le système est sous pression, les liposomes résultent d'une double inversion de phase : eau-dans-CO₂ vers CO₂-dans-eau et CO₂-dans-eau vers les liposomes. Dans ce cas, les liposomes sont de type LUV. Lorsque la phase d'hydratation est conduite au moment de la dépressurisation, les liposomes résultent d'une simple inversion de

phase : CO₂-dans-eau vers liposomes ; et dans ce cas, les liposomes formés sont de types MLV ou LUV (les MLV étant majoritaires).

II-3. Conclusion

Cette étude bibliographique aborde les procédés supercritiques de formation des liposomes sous un nouvel angle. L'importance du mode de mise en contact des phases a été démontrée et des tendances ont été mises en avant pour expliquer dans quel cas les liposomes formés sont unilamellaires, multilamellaires, de tailles moyennes ou de tailles plus grandes. Ces éléments constituent des outils pour le développement de nouveaux procédés de formation des liposomes et en particulier, pour la mise au point d'un procédé continu comme présenté dans le Chapitre IV.

**Chapitre III : Etude du procédé
Supercritical Anti-Solvent (SAS) -
Application à la formation de
phospholipides divisés et comparaison avec
une méthode conventionnelle**

Introduction

Cette étude expérimentale met en avant l'utilisation du CO₂ supercritique pour microniser des phospholipides au travers d'un procédé anti-solvant connu et utilisé au sein de l'équipe Procédés et Fluides Supercritiques : le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent). Une fois micronisés, les phospholipides sont hydratés sous agitation dans les conditions ambiantes de température et de pression pour former des liposomes. Dans la littérature, les phospholipides micronisés sont souvent appelés proliposomes. Nous préférons les appeler phospholipides micronisés ou divisés pour ne pas semer la confusion. Cette étude commence par une comparaison entre le procédé SAS et la méthode conventionnelle de Bangham. Les deux méthodes ont été réalisées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec la même source de phospholipides (lécithine de soja), avec le même solvant organique (éthanol) et avec le même système d'agitation.

Une étude plus complète du procédé SAS comprenant l'analyse de l'influence de la variation de certains paramètres opératoires (pression, rapport molaire CO₂/solvant et concentration en soluté) sur les caractéristiques des particules formées et des liposomes produits a ensuite été proposée. Dans chaque cas, la formation des liposomes est complétée par une phase de caractérisation des phospholipides divisés et des liposomes comprenant la détermination de la morphologie, de la taille et du taux de solvant résiduel des phospholipides divisés après traitement et de la morphologie, de la taille, de l'efficacité d'encapsulation des liposomes. Cette étude illustre plusieurs aspects de la section bibliographique présentée dans le chapitre I : les propriétés des fluides supercritiques, la comparaison des méthodes de formation des liposomes, la mise en œuvre des techniques de caractérisation et le problème de la stabilité des liposomes.

La micronisation des phospholipides par le procédé SAS a été introduite par Magnan *et al.* [4, 101] en 2000. Ils ont étudié l'influence des variations de plusieurs paramètres (pression, débit d'injection de la solution organique et concentration en soluté) sur les caractéristiques des phospholipides micronisés (ou divisés). Dans ces travaux, les phospholipides divisés n'ont pas été hydratés pour former des liposomes. Trois valeurs de pression ont été étudiées par Magnan *et al.* [4] : $P = 8, 10$ et 11 MPa avec une température de

308 K, un débit massique de CO₂ de 400 g.h⁻¹, un débit de solution organique de 10 mL.h⁻¹ et une concentration en soluté de la solution organique d'éthanol de 15% massique. Ils n'ont pas noté d'influence significative des variations de pression sur les caractéristiques des phospholipides divisés. Magnan *et al.* [4] ont ensuite testé deux valeurs de débits de la solution organique : 10 et 28 mL.h⁻¹ ($P = 8$ MPa, $T = 308$ K, débit de CO₂ = 400 g.h⁻¹ et concentration en soluté de la solution organique d'éthanol de 15% massique). Ils ont noté que plus le débit de solution organique était élevé, plus les particules de phospholipides formées étaient petites et avec une distribution de taille comportant un pic majoritaire d'intensité élevée. Magnan *et al.* [4] ont enfin étudié l'influence de la concentration en soluté. Ils ont observé deux tendances en fonction du débit de solution organique : pour un débit de solution organique faible (10 mL.h⁻¹), plus la solution organique est concentrée, plus les particules sont grosses ; à l'inverse, pour un débit de solution organique élevé (28 mL.h⁻¹), les particules les plus grosses sont obtenues avec les plus faibles concentrations.

Plus récemment, Naik *et al.* [78] ont micronisés des phospholipides avec le procédé SAS et ils ont hydraté les phospholipides divisés pour former des liposomes.

Cette étude vient compléter les travaux de Magnan *et al.* [4]. Cette fois, les phospholipides divisés ont systématiquement été hydratés pour former des liposomes.

III-1. Matériels et méthodes

Dans cette section, les différents produits chimiques utilisés, mais aussi l'ensemble du matériel, les procédures d'expérimentation et les méthodes d'analyse sont présentés.

III-1.1. Les produits

III-1.1.1. Les phospholipides

La lécithine de soja est utilisée comme source de phospholipides. Ce produit présente l'avantage de posséder une teneur en phospholipides élevée et d'être disponible en grande quantité dans le commerce. La lécithine de soja pourrait être utilisée en vue d'une production industrielle de liposomes comme cela a été le cas pour les laboratoires LAPHAL [145] dans les années 90. La lécithine de soja utilisée est fournie par la société LIPOID KG. Elle se présente sous forme d'agglomérats, de couleur jaune-orange. La gamme de lécithine de soja commercialisée par LIPOID KG propose différentes compositions en phospholipides. Deux lécithines de soja ont ainsi été sélectionnées (la lécithine S75 et la lécithine S100) pour leur pureté. En effet, la présence d'autres espèces que les phospholipides dans la lécithine de soja peut fortement influencer sur le comportement du mélange CO₂/solvant/lécithine de soja sous pression au cours de la formation des liposomes. Les spécifications en phospholipides des lécithines de soja S75 et S100 sont présentées dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 – Spécification en phospholipides de la lécithine commercialisée

<i>Appellation commerciale de la lécithine</i>	<i>Composition en phosphatidylcholine (PC) / %</i>	<i>Composition en phosphatidylethanolamine (PE) / %</i>	<i>Composition en lysophosphatidylcholine (LPC) / %</i>
S75	68 - 73	7 - 10	3
S100	94	0,1	3

III-1.1.2. Les autres produits

Le dioxyde de carbone (pureté de 99,7% molaire) est fourni par la société Air Liquide. L'éthanol absolu (pureté de 99,8% molaire) provient de la société Carlo Erba (France). La

calcéine (Bis[N,N-bis(carboxyméthyle) aminométhyle]fluorescéine) est un marqueur fluorescent qui permet de déterminer l'efficacité d'encapsulation des liposomes. Elle est fournie par la société Sigma Aldrich. Du cholestérol (Sigma Aldrich) est utilisé pour augmenter la stabilité des liposomes. Enfin, du chlorure de cobalt hexahydraté et du Triton X-100 (octylphénol polyéthoxylé) sont utilisés pour mesurer l'efficacité d'encapsulation des liposomes et sont fournis par la société Sigma Aldrich. La phase aqueuse utilisée pour l'hydratation de la poudre sèche de phospholipides est principalement constituée d'eau distillée.

III-1.2. La préparation des liposomes

Deux méthodes sont présentées dans cette section : le procédé SAS et la méthode de Bangham. Ces méthodes sont divisées en deux étapes : une étape de division des phospholipides et une étape d'hydratation des phospholipides divisés ; l'étape d'hydratation est commune aux deux méthodes. Dans les deux cas, la lécithine traitée (phospholipides divisés) doit être hydratée très rapidement sous peine de détérioration des phospholipides divisés au contact de l'air [4].

Le procédé SAS est un procédé utilisant du CO₂ supercritique pour microniser la lécithine. Le procédé SAS consiste à disperser une phase organique contenant le soluté (lécithine) à précipiter dans un continuum de fluide supercritique (dans notre cas, le CO₂ supercritique). Les deux phases sont introduites en parallèle. Le CO₂ supercritique est solubilisé dans la phase liquide tandis que le solvant diffuse dans la phase supercritique. Ces transferts conduisent à une forte diminution de la solubilité du soluté dans le mélange CO₂/solvant et donc à la sursaturation en soluté, provoquant la précipitation de ce dernier.

La méthode de Bangham est une méthode conventionnelle qui consiste à solubiliser la lécithine brute dans un solvant organique et dans un deuxième temps, à évaporer le solvant sous agitation pour former un film phospholipidique dans le fond d'un ballon.

Par souci de comparaison, le procédé SAS et la méthode de Bangham ont été conduites dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec les mêmes phospholipides (lécithine de soja) et le même solvant organique (éthanol).

Cette section se divise en deux parties : tout d'abord, la micronisation de la lécithine et ensuite, la phase d'hydratation.

III-1.2.1. Production de phospholipides divisés

III-1.2.1.1. Le procédé SAS

Le procédé SAS consiste à injecter une solution organique (éthanol absolu) contenant le soluté solubilisé (lécithine de soja et cholestérol) au travers d'un capillaire dans un continuum de CO₂ supercritique. La solubilisation simultanée du fluide supercritique dans la phase liquide et la diffusion du solvant organique dans la phase supercritique conduit à la sursaturation du soluté dans la phase liquide et sa précipitation.

L'autoclave de précipitation est préalablement rempli de CO₂ pour atteindre la pression de travail ; puis de l'éthanol absolu pur est injecté jusqu'à l'obtention du rapport molaire CO₂/solvant souhaité. Ensuite, un débit de CO₂ est établi et le rapport molaire CO₂/solvant est maintenu. C'est dans ces conditions que la solution organique est injectée dans l'autoclave conduisant à la micronisation de la lécithine de soja. Une fois que la quantité souhaitée de solution organique a été introduite dans l'autoclave, une étape de lavage est réalisée de façon à éliminer les traces de solvant organique de l'autoclave. La phase de lavage est réalisée avec du CO₂ pur dans les mêmes conditions opératoires que lors de la phase d'injection. Etant donné que le CO₂ pur est plus léger que le mélange CO₂+éthanol absolu, l'autoclave se comporte durant cette étape comme un autoclave piston [146, 147]. Le lavage est effectué durant un temps égal à deux fois le temps nécessaire pour renouveler le contenu de l'autoclave.

Le montage expérimental pour le procédé SAS est présenté sur la Figure III-1. La solution organique est injectée grâce à une pompe volumétrique (Gilson, modèle 307) dans l'autoclave (autoclave en acier Fedegari de 650 cm³) au moyen d'un capillaire d'injection de diamètre interne 127 µm (Chrompack). Le CO₂ gazeux est transformé en CO₂ liquide grâce à un groupe froid pour être pompé par une pompe volumétrique haute pression (Dosapro Milton Roy, Pompe à membrane). En sortie de pompe, le CO₂ est chauffé grâce à un groupe chaud. Le fond de l'autoclave est équipé d'un fritté métallique permettant de ne pas entraîner les particules solides. Un piège à solvant froid (séparateur) permet de récupérer le solvant et le CO₂ est renvoyé à l'atmosphère ou recyclé en tête de procédé.

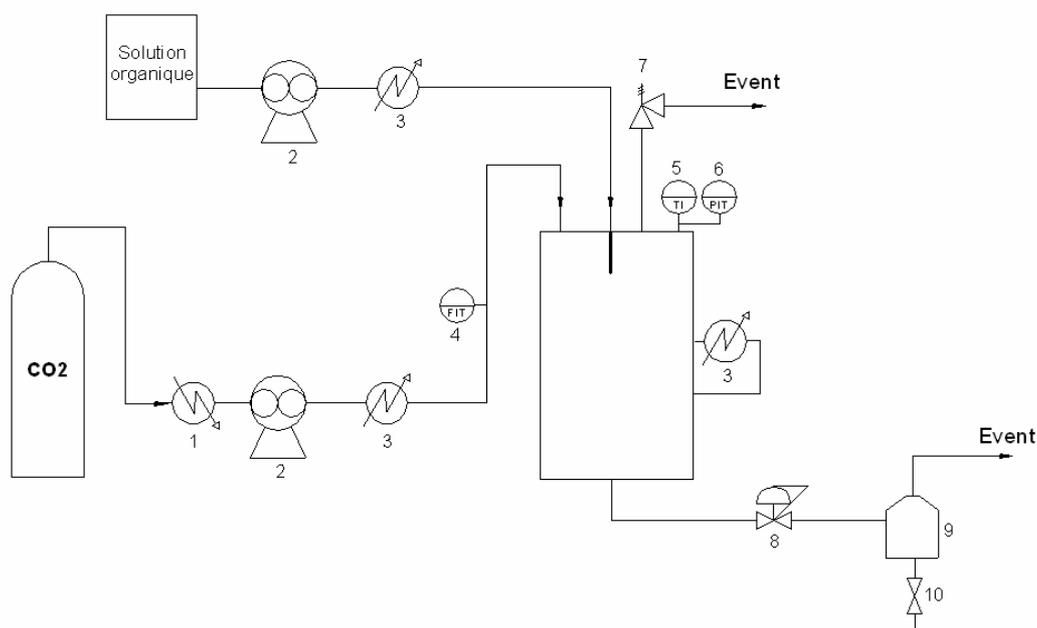


Figure III-1 - Schéma du procédé SAS

1	Groupe froid	7	Soupape de sécurité
2	Pompe volumétrique	8	Déverseur
3	Groupe chaud	9	Séparateur
4	Débitmètre	10	Vanne de soutirage
5	Capteur de température		
6	Manomètre		

Le procédé SAS a été appliqué dans des conditions de pressions allant de 9 à 13 MPa, des concentrations en lécithine comprises entre 15 et 25 % massique et des rapports molaires CO₂/solvant allant de 50 à 100. Pour chaque expérience, la température dans l'autoclave est de 308 K, le débit d'injection de solution de 22,8 mL.h⁻¹ et deux grammes de lécithine ont été micronisés dans l'autoclave. Ces conditions expérimentales ont été définies suite à l'étude du diagramme de phase du système CO₂/lécithine/éthanol réalisée par Magnan *et al.* [4]. La Figure III-2 présente la courbe de transition entre le domaine biphasique (liquide-solide ou supercritique-solide) et le domaine triphasique (liquide-vapeur-solide) du système CO₂/lécithine/éthanol sous pression. Pour réaliser nos expériences, nous avons choisi des conditions de température et de pression telles que le système se situe dans le domaine biphasique. En effet, la lécithine a une forte affinité pour l'éthanol et la micronisation ne se fait pas si l'on se place dans des conditions pour lesquelles la phase continue fluide est liquide-vapeur.

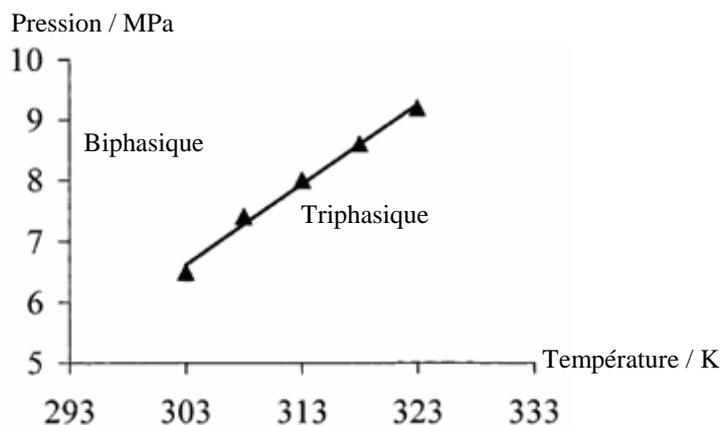


Figure III-2 - Diagramme de phase du système : CO₂ (90% massique)/lécithine de soja S75 (2% massique)/éthanol

III-1.2.1.2. La méthode de Bangham

Le procédé de Bangham comprend également une étape de comminution de la lécithine de soja et une phase d'hydratation conduisant à la formation des liposomes. La phase d'hydratation, commune aux deux méthodes, sera détaillée dans le paragraphe suivant. Pour ce qui concerne le traitement de la lécithine de soja, la méthode de Bangham consiste à évaporer le solvant organique (323 K) dans lequel la lécithine de soja a été solubilisée grâce à un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide (Heidolph Laborota 4000eco). Après un certain laps de temps, un film homogène de phospholipides se forme dans le fond du ballon. Dans le but de comparer le procédé SAS avec la méthode de Bangham, pour chaque expérience réalisée avec la méthode de Bangham, 2 grammes de lécithine ont été traités.

III-1.2.2. Hydratation et encapsulation

Les particules de phospholipides micronisées obtenues par le procédé SAS et le film phospholipidique résultant de la méthode de Bangham sont hydratés de la même façon pour aboutir à la formation de liposomes encapsulant un marqueur fluorescent : la calcéine. Cette hydratation est réalisée par ajout d'une solution aqueuse de calcéine (0,062 g.mL⁻¹) dans l'autoclave ramené dans les conditions ambiantes pour le procédé SAS ou dans le ballon d'évaporation pour la méthode de Bangham. La température est maintenue égale à la température ambiante (soit environ 298 K) lors de cette phase d'hydratation. Le mélange est ensuite agité avec un agitateur à fort cisaillement (Ika Labortechnik, Ultraturax T25) à 11 000 tr.min⁻¹ pendant 10 minutes. D'après Oku *et al.* [75], le volume de solution aqueuse de calcéine est calculé en sachant que le rapport massique calcéine/lécithine doit être égal à 0,008 (rapport massique lécithine/eau égal à 0,013). Les suspensions liposomiales ainsi obtenues sont conservées à 277,5 K.

III-1.3. La caractérisation

III-1.3.1. Caractérisation des particules de lécithine micronisées

III-1.3.1.1. Rendement

Le rendement de micronisation est calculé par détermination de la masse de lécithine de soja présente dans l'autoclave à la fin du procédé et par la connaissance de la masse introduite. Un bilan matière est effectué en comparant la masse de lécithine introduite dans l'autoclave avec la somme des masses de lécithine collectées à la fois dans l'autoclave et dans le piège à solvant et les tubes d'évacuation de la phase fluide.

III-1.3.1.2. Taille et morphologie

La taille et la morphologie des particules de phospholipides micronisées sont déterminées par observation à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Hitachi, modèle S-3000). Comme les phospholipides sont non-conducteurs, chaque échantillon est soumis à une métallisation avant l'observation au microscope électronique à balayage. Le métalliseur (Quorum Technologies, modèle SC7620) assure le recouvrement de la surface des échantillons par une fine couche d'un mélange d'or et de palladium (2 nm). Les images obtenues par observation au microscope électronique à balayage sont analysées de manière qualitative. Aucun logiciel d'analyse d'images n'a été utilisé pour cette étude. Il est important de souligner que la détermination de la taille des particules micronisées par analyse granulométrique n'a pas été entreprise car la lécithine micronisée ne peut pas être manipulée.

III-1.3.1.3. Existence de traces de solvant résiduel

La présence ou non de solvant résiduel dans les phospholipides après traitement par le procédé SAS ou par la méthode de Bangham est déterminée par une méthode comparative utilisant la spectroscopie infrarouge (spectrophotomètre infrarouge de la marque Thermo utilisé avec le logiciel d'acquisition OMNIC). Cette méthode ne permet pas de quantifier le solvant organique présent dans la poudre de lécithine mais elle permet de vérifier par comparaison si des traces de solvant organique sont présentes dans les échantillons de poudre. Deux bandes caractéristiques d'absorption ont été choisies sur les spectres d'absorption. La première à 1735 cm^{-1} est représentative de la fonction ester des phospholipides et la seconde à 1058 cm^{-1} représente le groupement hydroxyle. Pour chaque spectre, le rapport des intensités (des hauteurs) de ces deux bandes caractéristiques, $h_{1058\text{cm}^{-1}}/h_{1735\text{cm}^{-1}}$ est calculé et ensuite comparé aux valeurs des rapports obtenus pour le spectre de l'éthanol pur et d'échantillons de

lécithine contenant des quantités connues d'éthanol. Cette méthode n'est pas répertoriée dans la littérature mais elle s'inspire des travaux de Bridson *et al.* [76]. Ils ont déterminé si les poudres de phospholipides produites contenaient ou non des traces de solvant organique par une méthode infrarouge en comparant les spectres d'absorption des phospholipides traités avec ceux des phospholipides non traités, mais également, avec ceux de phospholipides chargés avec une quantité connue de solvant organique. La sensibilité de l'appareil utilisé pour cette étude est de 1%.

III-1.3.2. Caractérisation des liposomes en suspension

III-1.3.2.1. Morphologie

La morphologie des liposomes a été étudiée grâce à un microscope optique à contraste de phase Reichert-Jung, Polyvar (objectif plan 4x/10x/25x/40x).

III-1.3.2.2. Taille

La taille des liposomes a été déterminée en utilisant un granulomètre laser (Malvern Instrument, modèle Mastersizer S). Cet instrument couvre une gamme de tailles de particules allant de 50 nm à 3 mm. Toutes les analyses ont été réalisées le jour de la formation des liposomes et chaque mesure a été reproduite trois fois. La courbe de distribution de taille obtenue présente la répartition de la population de liposomes (en pourcentage volumique) en fonction du diamètre des liposomes. A partir des valeurs obtenues, il a été possible de diviser la population des liposomes en trois classes : la première classe de taille inférieure à 1 μm ($d_1 / \%$) ; la deuxième de taille comprise entre 1 et 10 μm ($d_2 / \%$) ; et la dernière de taille supérieure à 10 μm ($d_3 / \%$). Enfin, pour étudier la stabilité des liposomes dans le temps, ces mesures ont été reconduites un mois après la date de formation des liposomes.

III-1.3.2.3. Efficacité d'encapsulation

La détermination de l'efficacité d'encapsulation des liposomes est réalisée par dosage fluorimétrique de la calcéine à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, modèle Luminescence Spectrometer LS50) selon la méthode développée par Kendall and MacDonald [74]. La longueur d'onde d'excitation est égale à 490 nm, la longueur d'onde d'émission est égale à 520 nm [75]. Le spectrofluorimètre est réglé pour fonctionner en excitation-émission synchrone entre 400 et 600 nm avec un décalage de longueur d'onde constant égal à 23 nm [75]. Cette méthode consiste à mesurer tout d'abord la fluorescence totale F_{tot} de l'échantillon ($V_{\text{suspension après dilution d'un facteur } 20} = 80 \text{ mL}$), c'est-à-dire la fluorescence de la calcéine encapsulée

et de la calcéine non encapsulée. Ensuite, une solution de chlorure de cobalt (200 μL à 10 mM ajoutée à la suspension de 80 mL) est ajoutée à la suspension pour neutraliser par complexation la fluorescence de la calcéine non encapsulée. Après un temps donné, déterminé comme étant égal de 15 minutes, la fluorescence restante correspondant à la fluorescence de la calcéine encapsulée F_{int} est mesurée. Enfin, les liposomes sont cassés par ajout d'un détergent appelé Triton X-100 (3 mL dans la suspension d'environ 80 mL) sous agitation manuelle. Après 48 heures, la fluorescence dite résiduelle F_{totq} est alors mesurée. L'Équation 2 permet de calculer l'efficacité d'encapsulation des liposomes connaissant F_{tot} , F_{int} et F_{totq} .

$$\text{Efficacité d'encapsulation(\%)} = \frac{F_{\text{int}} - F_{\text{totq}} \cdot r}{F_{\text{tot}} - F_{\text{totq}} \cdot r} \cdot 100 \quad \text{Équation 2}$$

Où r est le facteur de dilution lié à l'ajout de Triton X-100 (ici, $r = 1,037$).

III-2. Résultats

Les résultats expérimentaux présentés dans cette section ont fait l'objet d'une publication dans The Journal of Supercritical Fluids [99].

III-2.1. Préambule

III-2.1.1. Choix de la lécithine de soja

Les premiers essais de micronisation avec le procédé SAS ont été conduits avec la lécithine de soja S100 (LIPOID KG). La lécithine de soja S100 avait été choisie pour sa teneur élevée en phosphatidylcholine (environ 94% massique). Cependant, au cours de ces essais, il s'est avéré que la lécithine de soja S100 était partiellement soluble dans le CO_2 supercritique ce qui entraînait des pertes de lécithine en dehors de l'autoclave. Nous avons ainsi préféré travailler avec la lécithine S75 pour laquelle ces problèmes n'ont pas été rencontrés.

III-2.1.2. Rappel sur les températures opératoires choisies

Pour cette étude, l'étape de micronisation de la lécithine par le procédé supercritique SAS est réalisée à 308 K. Après la dépressurisation, la phase d'hydratation des phospholipides divisés est conduite dans les conditions ambiantes de température, soit environ 298 K, c'est-à-dire à une température inférieure à la température de transition de phase de la phosphatidylcholine (température considérée comme généralement égale à 323 K).

III-2.2. Comparaison entre le procédé supercritique SAS et la méthode classique de Bangham

Cinq critères ont été mesurés pour comparer le procédé supercritique SAS et la méthode classique de Bangham : la présence de solvant résiduel dans la lécithine après l'étape de traitement, la reproductibilité, la morphologie des liposomes, l'efficacité d'encapsulation des liposomes et la stabilité des liposomes. L'éthanol a été utilisé comme solvant dans les deux méthodes.

III-2.2.1. Présence de solvant résiduel dans la lécithine après traitement

La présence éventuelle de solvant organique (éthanol) dans la lécithine micronisée (pour le procédé SAS) et dans le film phospholipidique formé dans le fond du ballon (pour la méthode de Bangham) a été déterminée grâce à une méthode infrarouge. Pour chaque échantillon, une comparaison a été effectuée entre l'intensité (la hauteur) du pic représentatif de la fonction ester à 1735 cm^{-1} et l'intensité du pic représentatif de la fonction hydroxyle à 1058 cm^{-1} , comme présenté sur la Figure III-3.

Les valeurs obtenues pour les rapports $h_{1058\text{cm}^{-1}}/h_{1735\text{cm}^{-1}}$ ont été comparées aux valeurs obtenues pour des échantillons de lécithine préalablement chargés avec des quantités connues d'éthanol (1, 5,5 et 10% massique). Ces valeurs sont présentées dans le Tableau III-2.

Pour des échantillons formés avec le procédé SAS, les valeurs du rapport $h_{1058\text{cm}^{-1}}/h_{1735\text{cm}^{-1}}$ sont comprises entre 0,76 et 1,1 et pour la méthode de Bangham (en utilisant l'éthanol comme solvant), la valeur du rapport $h_{1058\text{cm}^{-1}}/h_{1735\text{cm}^{-1}}$ est de 1,2. Il existe donc des traces de solvant organique dans les échantillons de lécithine produits après traitement. La méthode infrarouge utilisée ne permet pas de quantifier ces traces de solvant résiduelles mais les résultats du Tableau III-2 permettent de voir que ces traces sont de l'ordre de 10% massique. De plus, il apparaît que les traces de solvant résiduel sont plus importantes pour la lécithine traitée avec la méthode de Bangham que pour la lécithine micronisée avec le procédé SAS. Les résultats sont résumés dans le Tableau III-3.

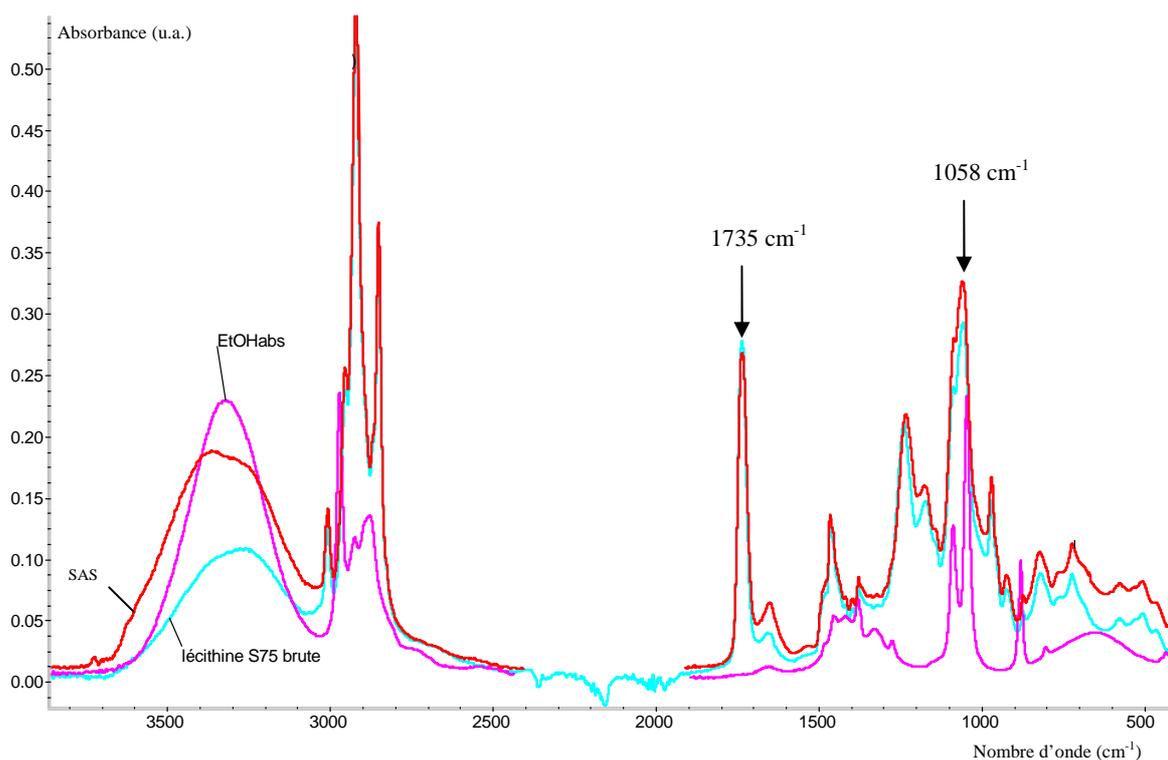


Figure III-3 – Spectres d’absorption infrarouge de la lécithine brute S75, de l’éthanol et d’une poudre de phospholipides obtenues par le procédé SAS (9 MPa, 308 K, rapport molaire CO₂/solvant = 60, concentration en soluté = 15%mass., débit de solution organique = 22,8 mL.h⁻¹)

Tableau III-2 - Valeurs des rapports des hauteurs des pics représentant respectivement les groupements alcool (1058 cm⁻¹) et carboxyle (1736 cm⁻¹)

Echantillon	$h_{1058\text{cm}^{-1}}/h_{1735\text{cm}^{-1}}$
Lécithine brute	0,966
Lécithine chargée à 1% massique en éthanol absolu	1,004
Lécithine chargée à 5,5% massique en éthanol absolu	1,039
Lécithine chargée à 10% massique en éthanol absolu	1,095

Pour le procédé SAS, ces résultats ne sont pas satisfaisants malgré un temps de lavage important. Ce temps de lavage a été calculé rigoureusement. Cependant, étant donné que l'éthanol possède un point d'ébullition élevé, on peut craindre que ce temps de lavage ne soit, en réalité, pas suffisant. En comparant nos valeurs avec celles de la littérature, des taux de solvants résiduels de l'ordre de 14 et 17% (volume/volume) ont été mesurés par Frederiksen *et al.* [67] pour l'éthanol ; ce qui correspond à nos résultats. Meure *et al.* [70], qui ont utilisé un mélange éthanol-chloroforme, ont déterminé un taux de solvant résiduel compris entre 1,4 et 3,9% (volume/volume) pour l'éthanol et un taux de solvant résiduel de 0,4% pour le chloroforme. On se rend ainsi compte que la séparation solvant/phospholipide est plus

difficile dans le cas où le solvant est de l'éthanol que pour d'autres solvants avec des points d'ébullition moins élevés comme le chloroforme. Une solution pourrait être d'augmenter le temps de lavage.

Il apparaît donc que l'utilisation de l'éthanol comme solvant pour former des liposomes avec le procédé SAS pose un problème (même si l'éthanol n'est pas toxique). On peut cependant se poser la question du rôle que va jouer l'éthanol résiduel sur la stabilité des liposomes.

Tableau III-3 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : taux de solvant résiduel

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Taux de solvant résiduel	10%	> 10%

III-2.2.2. Reproductibilité

III-2.2.2.1. Procédé SAS

La reproductibilité du procédé SAS a été évaluée en réalisant trois expériences dans les mêmes conditions ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 60$, concentration en soluté : 15% massique). La reproductibilité a été estimée à partir des images obtenues au microscope électronique à balayage des phospholipides micronisés (Figure III-4), mais également à partir des courbes de distributions de tailles des liposomes formés par hydratation des phospholipides micronisés (Figure III-5).

La reproductibilité est validée pour la lécithine micronisée. En ce qui concerne les liposomes (Figure III-5), la reproductibilité est validée pour les liposomes de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm .

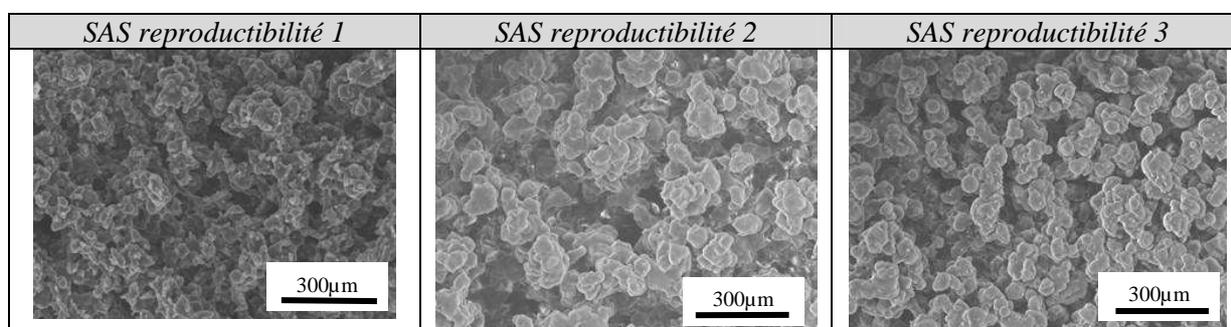


Figure III-4 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour les mêmes conditions expérimentales du procédé SAS ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 60$ et concentration en soluté : 15 % massique)

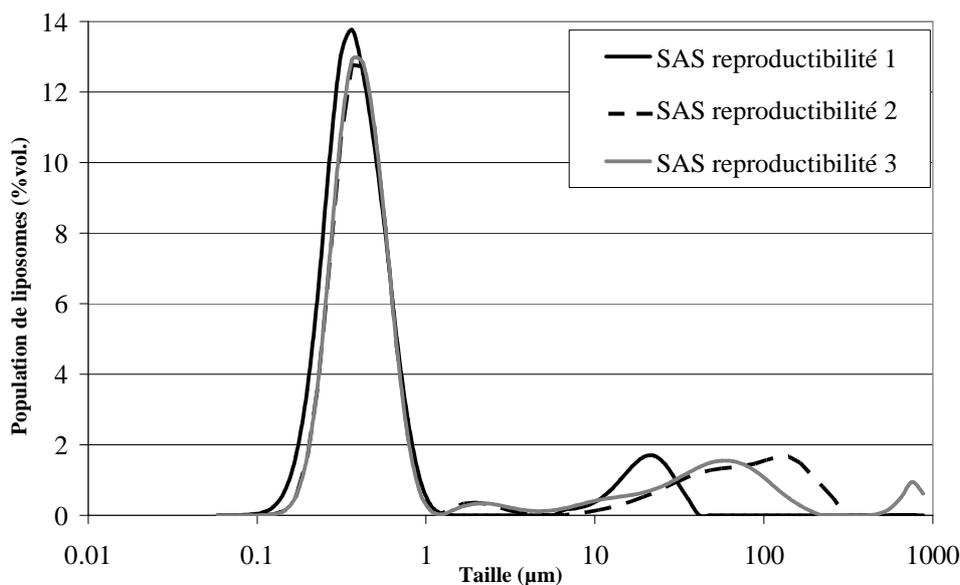


Figure III-5 - Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS pour l'étude de reproductibilité ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 60$ et concentration en soluté : 15 % massique)

III-2.2.2.2. Méthode de Bangham

La reproductibilité de la méthode de Bangham a été testée en réalisant trois expériences dans les mêmes conditions (en utilisant l'éthanol comme solvant), respectivement notées Bangham 1, 2 et 3. Par souci de comparaison avec le procédé SAS, les conditions expérimentales choisies pour la méthode de Bangham se rapprochent de celles du procédé SAS : 2 grammes de lécithine ont été utilisés et la solution organique à évaporer possède une concentration de 15% massique en soluté (dans l'éthanol). L'évaporation a été réalisée à 323 K. La Figure III-6 présente les distributions de taille des liposomes obtenus. Il est clairement visible que dans les conditions opératoires testées, la méthode de Bangham n'est pas reproductible.

III-2.2.2.3. Conclusion sur la reproductibilité

Dans les conditions testées (en utilisant l'éthanol comme solvant), le procédé SAS est reproductible alors que la méthode de Bangham ne l'est pas. De meilleurs résultats auraient pu être obtenus pour la méthode de Bangham en utilisant des solvants organiques plus toxiques tels que le chloroforme. Mais dans cette étude, l'objectif était de comparer le procédé supercritique SAS avec la méthode classique de Bangham et ainsi, le même solvant organique a été utilisé pour les deux méthodes (l'éthanol). Les résultats sont résumés dans le Tableau III-4.

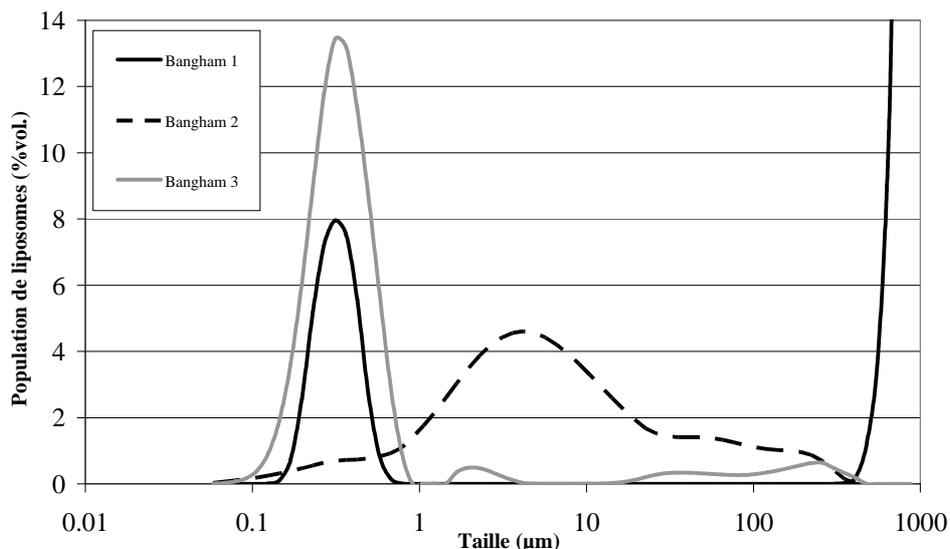


Figure III-6 - Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine, solution organique d'éthanol à 15% massique en soluté et température d'évaporation à 323 K)

Tableau III-4 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : reproductibilité

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Reproductibilité	validée partiellement	non validée

III-2.2.3. Morphologie des liposomes

III-2.2.3.1. Procédé SAS

La morphologie des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS dans des conditions données est visible sur la Figure III-7. Les images de cette figure présente trois liposomes différents présents dans la suspension fabriquée. Pour choisir ces liposomes, deux prélèvements d'une même suspension ont été analysés et pour chaque prélèvement, au moins cinq liposomes ont été observés. Ces liposomes sont sphériques et leur membrane est épaisse. La largeur d'une bicouche phospholipidique mesurant quelques nanomètres et vue l'épaisseur de la membrane des liposomes observés, il apparaît que ces liposomes sont multilamellaires.

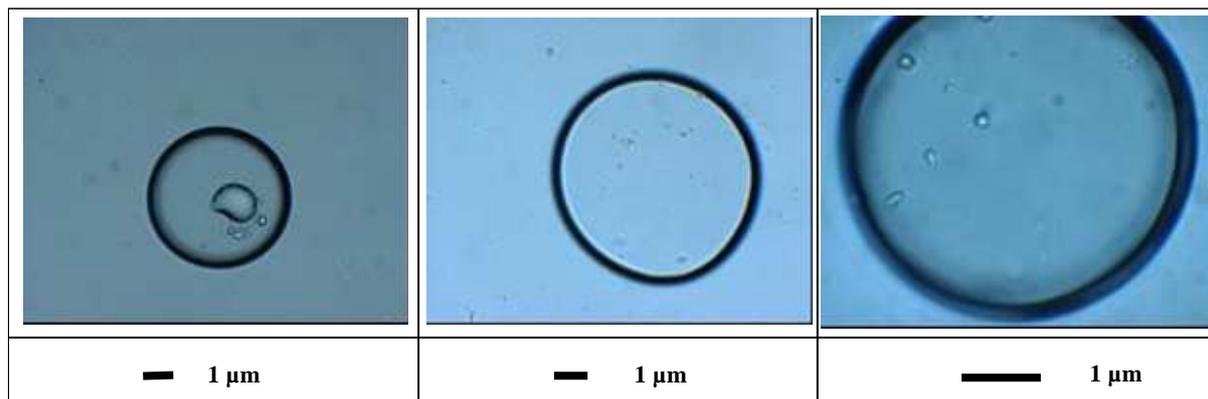


Figure III-7 – Images obtenues au microscope optique à contraste de phase présentant des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 100$ et concentration en soluté : 15 % massique)

III-2.2.3.2. Méthode de Bangham

La morphologie des liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (en utilisant l'éthanol comme solvant) est visible sur les images de la Figure III-8. Les liposomes présentés ont été sélectionnés car ils étaient représentatifs de la suspension étudiée (deux prélèvements ont été analysés et au moins cinq liposomes ont été observés). On remarque tout d'abord que ces liposomes ne sont pas tous sphériques et sont de tailles différentes. Comme précédemment, ces liposomes sont multilamellaires. D'autre part, la membrane de ces vésicules est moins épaisse que la membrane des vésicules produites par le procédé SAS. Ensuite, des structures particulières apparaissent avec par exemple une vésicule géante enfermant des petites vésicules. On peut en conclure que la suspension n'est pas homogène. De plus, ces liposomes seront difficilement caractérisables au regard de leur forme.

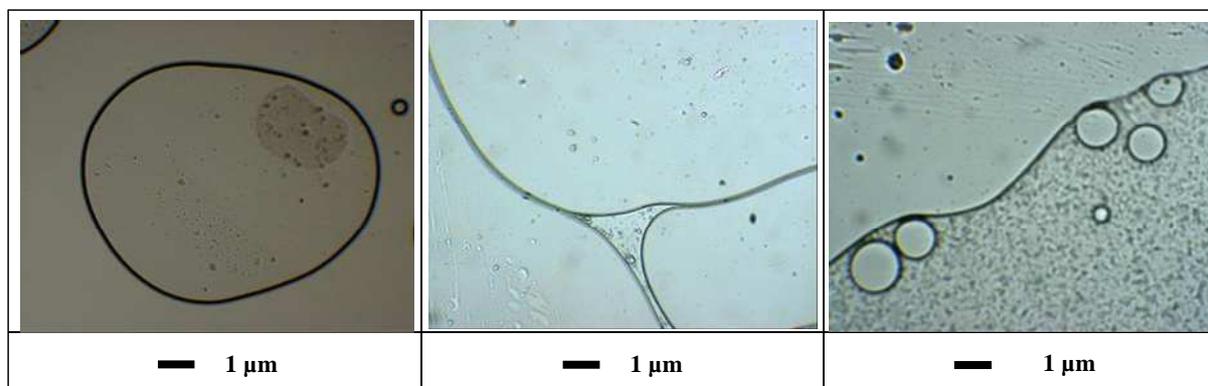


Figure III-8 - Images obtenues au microscope optique à contraste de phase présentant les liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine traité, solution organique d'éthanol à 15% massique et température d'évaporation de 323 K)

III-2.2.3.3. Conclusion sur la morphologie des liposomes

Cette étude montre clairement que les liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS sont sphériques et bien homogènes dans la suspension. A l'inverse, dans les conditions étudiées (en utilisant l'éthanol comme solvant), les liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham présentent une hétérogénéité en taille et en forme. Les liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS sont donc plus facilement caractérisables que les liposomes produits à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham. Cela constitue un atout pour le procédé SAS. Les résultats sont résumés dans le Tableau III-5.

Tableau III-5 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : morphologie

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Morphologie	Sphérique (multilamellaire)	Sphérique et ellipsoïdale (multilamellaire)

III-2.2.4. Efficacité d'encapsulation des liposomes

Les efficacités d'encapsulation des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} = 60$, concentration en soluté = 15% massique) et à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine traité, solution organique d'éthanol à 15% massique et température d'évaporation de 323 K) ont été déterminées pour être ensuite comparées.

La Figure III-9 présente les courbes d'intensité obtenues lors de la mesure de F_{tot} , F_{int} et F_{totq} (échantillon de suspension liposomiale fabriqué par la méthode de Bangham) permettant de calculer l'efficacité d'encapsulation des liposomes selon l'Equation 2. La hauteur du pic d'intensité est déterminée et on obtient dans ce cas particulier : F_{tot} égale à 407, F_{int} égale à 111 et F_{totq} égale à 65. Dans le cas présent, l'efficacité d'encapsulation de cet échantillon préparé à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham est égale à 7%.

Plusieurs essais ont été réalisés dans les conditions testées. L'efficacité d'encapsulation des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS est comprise entre 10 et 20%. Les liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (en utilisant l'éthanol comme solvant) présentent eux une efficacité d'encapsulation comprise entre 4 et 20%. Il est important de souligner qu'en

utilisant un autre solvant (le chloroforme), la méthode de Bangham a permis de former des liposomes avec des efficacités d'encapsulation (pour de l'huile essentielle) supérieures à 66% (Varona *et al.* [63, 80]).

Ces résultats ne sont pas satisfaisants tant au niveau des valeurs déterminées qu'au niveau des écarts dans les mesures. Ces écarts pourraient s'expliquer par le fait que les liposomes ne sont pas stables en suspension. Cependant, face à ce problème, chaque mesure a été réalisée le jour de la formation des liposomes.

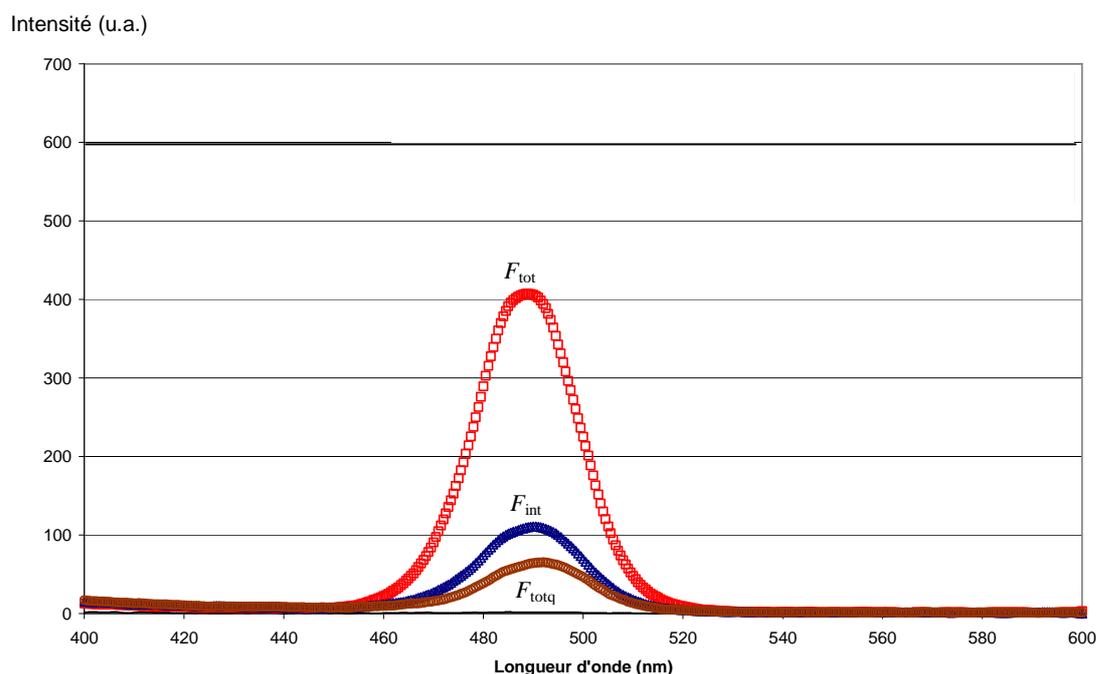


Figure III-9 – Spectres synchrones représentant la fluorescence de la calcéine : F_{tot} fluorescence totale de la suspension liposomiale, F_{int} fluorescence interne aux liposomes et F_{totq} fluorescence résiduelle

Les résultats sont résumés dans le Tableau III-6. A partir des résultats obtenus, il n'est pas possible de comparer le procédé SAS et la méthode de Bangham. On peut juste dire que ces méthodes donnent des résultats relativement semblables.

Tableau III-6 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : efficacité d'encapsulation

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Efficacité d'encapsulation	10 – 20%	4-20%

III-2.2.5. Stabilité des liposomes

La stabilité des liposomes a été déterminée par des mesures granulométriques effectuées le jour de la formation des liposomes et un mois après leur date de formation. Pendant cette période, les liposomes ont été conservés à l'abri de la lumière et à une température de 277 K. La stabilité a ainsi été étudiée pour les liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} = 60$, concentration en soluté = 15% massique) et pour des liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine traités, solution organique d'éthanol à 15% massique et température d'évaporation de 323 K).

Les résultats sont présentés sur la Figure III-10 pour le procédé SAS. Les liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS ne sont pas stables sur une durée d'un mois. Les mêmes résultats ont été obtenus pour la méthode de Bangham (non présentés dans cette étude). Encore une fois, il est important de souligner qu'en utilisant un autre solvant (chloroforme), la méthode de Bangham a permis de former des liposomes stables pendant au moins un mois (Varona *et al.* [63, 80]).

D'après les éléments développés dans le Chapitre I, ces résultats étaient prévisibles car les liposomes ne sont pas stables en suspension. Cependant, nous avons utilisé du cholestérol pour augmenter la stabilité des liposomes. On peut alors s'interroger sur l'influence néfaste de la présence d'éthanol résiduel dans les liposomes formés à partir de phospholipides traités par le procédé SAS et par la méthode de Bangham (III-2.2.1). Dans une publication, Otake *et al.* [71] ont suggéré que l'éthanol pouvait éventuellement avoir une influence négative sur les liposomes. Au regard de ces différents éléments, on peut dire que l'éthanol n'est pas toxique mais qu'il est difficile à éliminer de la suspension liposomiale.

Il est important de souligner qu'au regard de l'évolution de tailles des liposomes sur un mois, il semblerait que la géométrie sphérique des liposomes ne soit pas conservée.

Les résultats sont résumés dans le Tableau III-12. A partir des résultats obtenus en terme de stabilité, il n'est pas possible de comparer le procédé SAS et la méthode de Bangham.

Tableau III-7 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : stabilité

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Stabilité des liposomes	Pas stable	Pas stable

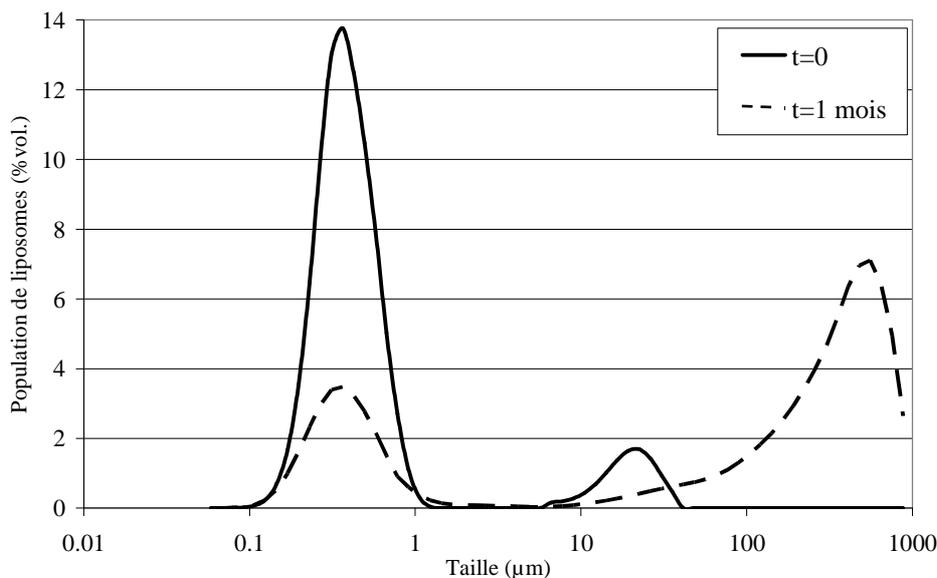


Figure III-10 - - Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS ($T = 308\text{K}$, $P = 9\text{ MPa}$, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 100$ et concentration en soluté : 15 % massique) : à $t=0$ (le jour de formation) et à $t=1$ mois (1 mois après la formation)

III-2.2.6. Bilan sur la comparaison des deux procédés

Les résultats de la comparaison sont reportés dans le Tableau III-8. D'après cette étude, le procédé SAS permet, dans les conditions testées, de produire des liposomes sphériques (donc facilement caractérisables) avec des efficacités d'encapsulation comprises entre 10 et 20% et ce, de façon reproductible. Dans les conditions testées (en utilisant l'éthanol comme solvant), la méthode de Bangham présente des points négatifs tels que le fait que les liposomes formés ne sont pas tous sphériques. De plus, dans les conditions testées, la méthode de Bangham n'est pas reproductible. En utilisant l'éthanol comme solvant, il existe donc un réel intérêt à utiliser le procédé SAS pour former des liposomes à partir de phospholipides micronisés.

Tableau III-8 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham

Méthode	Procédé SAS	Méthode de Bangham
Taux de solvant résiduel	10%	> 10%
Reproductibilité	validée	non validée
Morphologie	Sphérique (multilamellaire)	Sphérique et ellipsoïdale (multilamellaire)
Efficacité d'encapsulation	10 – 20%	4-20%
Stabilité des liposomes	Pas stable	Pas stable

L'utilisation du procédé SAS est développée dans le paragraphe suivant avec l'étude de l'influence de la variation des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques des phospholipides divisés et des liposomes formés par hydratation de ces phospholipides divisés.

III-2.3. Etude de l'influence de la variation des paramètres expérimentaux pour le procédé SAS

Dans cette section, nous avons étudié l'influence de la variation des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques des phospholipides divisés et des liposomes formés par hydratation de ces phospholipides divisés.

Les conditions opératoires testées sont les suivantes :

- Température : 308 K
- Pression de précipitation : 9 à 13 MPa
- Concentration en soluté : 15 à 25% massique
- Débit de solution : 22,8 mL.h⁻¹
- Rapport molaire CO₂/solvant : 50 à 100

Pour chaque expérience, les valeurs de la pression, concentration en soluté et rapport molaire CO₂/solvant sont reportées dans le Tableau III-9. Le rapport massique CO₂/lécithine est indiqué pour une éventuelle extrapolation du procédé.

La pression, la concentration en soluté et le rapport molaire CO₂/solvant sont les trois variables dont l'influence des variations a été testée à la fois sur les phospholipides micronisés et sur les liposomes en termes de :

- Rendement, morphologie, taille et taux de solvant résiduel pour les phospholipides micronisés
- Taille et efficacité d'encapsulation pour les liposomes

Tableau III-9 - Conditions expérimentales pour le procédé SAS

N°expérience	P / MPa	Rapport molaire CO ₂ /solvant	Concentration en soluté / % massique	Rapport massique CO ₂ /lécithine
1	9	60	15	763
2	10	60	15	763
3	11	60	15	817
4	13	60	15	845
5	9	50	15	747
6	9	80	15	867
7	9	100	15	972
8	9	60	20	745
9	9	60	25	845

III-2.3.1. Rendement

Les particules de lécithine micronisées récupérées dans le fond de l'autoclave sont visibles sur la Figure III-11. La lécithine micronisée a une couleur jaune claire alors que la lécithine brute a une couleur jaune foncé (brun).



Figure III-11 - Visualisation de la lécithine micronisée dans le fond de l'autoclave

Des rendements variant de 75 à 85% ont été obtenus. Les faibles valeurs des rendements obtenus sont liées à la solubilisation partielle de la lécithine dans la phase supercritique. Une faible proportion de lécithine micronisée est entraînée avec le flux de CO₂ et des particules de lécithine ont été retrouvées dans le piège à solvant. Ensuite, comme le bilan entre la masse de lécithine injectée et la masse de lécithine collectée dans l'autoclave et dans le piège à solvant ne boucle pas (erreur comprise entre 10 et 25%), la méthode de récupération de la lécithine micronisée dans le fond de l'autoclave (avec une spatule) ne doit

pas être suffisamment efficace et il resterait une fraction non négligeable de lécithine dans l'autoclave. Il est toutefois intéressant de souligner que ces pertes seraient atténuées en travaillant avec des autoclaves de plus gros volumes, et avec de plus grandes quantités de lécithine.

III-2.3.2. Influence de la variation des paramètres opératoires

III-2.3.2.1. Influence de la pression

Influence des variations de la pression sur les caractéristiques des phospholipides micronisés.

Pour évaluer l'effet de la pression sur la micronisation, plusieurs expériences ont été conduites, respectivement à 9, 10, 11 et 13 MPa (les autres paramètres restant constants : 308 K ; débit de solution : 22,8 mL.h⁻¹ ; concentration en soluté : 15% massique ; rapport molaire CO₂/solvant : 60). La Figure III-12 présente les images observées au microscope électronique à balayage des phospholipides divisés obtenus pour ces différentes valeurs de pression (expériences 1, 2, 3 et 4). Les images présentent des particules sphériques et agglomérées de taille comprise entre 5 et 50 µm. Pour les pressions les plus faibles (9 ou 10 MPa), les particules semblent fusionnées en de gros agrégats ; ce phénomène ne semble pas se produire pour les pressions les plus élevées (11 et 13 MPa) et les particules semblent plus individualisées. Cependant, ces différences ne sont pas flagrantes et dans la gamme de pression considérée, l'influence de la pression sur la micronisation des particules de lécithine (taille et morphologie) reste faible. Les mêmes tendances avaient déjà été observées par Magnan et *al.* [4] pour une gamme de pression testée allant de 8 à 11 MPa (308 K), par Badens et *al.* [100] avec des pressions allant de 8 à 12 MPa (de 303 à 323 K), et par Kunastitchai et *al.* [72] pour des pressions variant de 8,5 à 10,5 MPa (de 304 à 333 K). A l'inverse, en opérant entre 8 et 12 MPa avec des températures variant de 303 à 313 K, Li et *al.* [73] ont conclu que plus la pression est élevée, plus grande est la taille des particules de phospholipides micronisés. D'après Reverchon et *al.* [148], la pression ne devrait pas avoir d'influence sur la taille des particules micronisées tant que l'on se situe dans le domaine biphasique du diagramme de phase du système CO₂/soluté/solvant. D'après la Figure III-2, à 308 K et en opérant entre 9 et 13 MPa, on se situe dans le domaine biphasique du diagramme de phase du système ternaire CO₂/soluté/solvant. Cela permet de justifier le fait que dans les conditions expérimentales testées, la pression n'a pas d'influence sur les caractéristiques des particules de phospholipides micronisés.

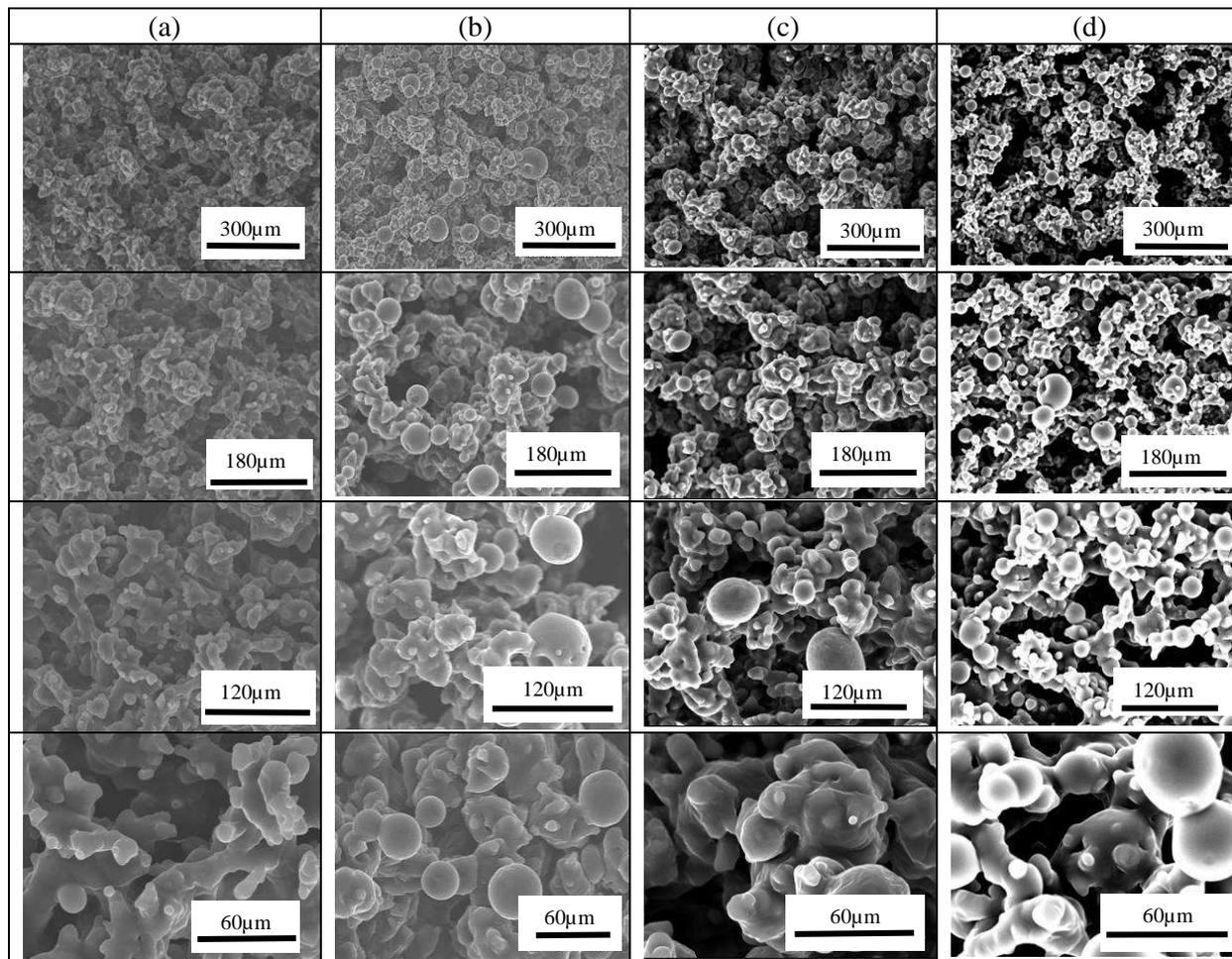


Figure III-12 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée par le procédé SAS pour différentes valeurs de pression : (a) 9 MPa. (b) 10 MPa. (c) 11 MPa. (d) 13 MPa (rapport molaire CO_2 /solvant : 60 et concentration en soluté : 15 % massique)

Dans cette étude sur l'influence des variations de pression, nous justifions le choix d'une gamme d'étude relativement basse (de 9 à 13 MPa) par le fait que le procédé SAS est efficace sous basse pression ($< 10\text{MPa}$). Nous avons ainsi estimé qu'il n'était pas utile de travailler à plus forte pression car cela représente, à la fois, un coût en équipement (puissance des pompes) et un coût en fonctionnement (consommation de fluide).

Influence des variations de la pression sur la taille des liposomes.

Les phospholipides micronisées à différentes pressions ont été soumis à une phase d'hydratation et d'agitation pour former des liposomes. La taille de ces liposomes a été déterminée et les distributions de taille sont présentées sur la Figure III-13. La répartition des liposomes en fonction de leur taille (en pourcentage volumique cumulé) est présentée dans le Tableau III-10.

Sur les courbes de la Figure III-13, comme sur les courbes de la Figure III-5, on observe une population majoritaire avec des diamètres compris entre 0,1 et 1 μm et les autres populations avec des diamètres compris entre 8 et 500 μm . Comme la reproductibilité est validée pour les populations de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm , nous ne nous intéresserons qu'à cette partie des courbes présentées sur la Figure III-13. Il apparaît que la proportion de liposomes de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm diminue lorsque la pression augmente : $d_1 = 89,34\%$ à 9 MPa, $d_1 = 85,37\%$ à 10 MPa, $d_1 = 67,49\%$ à 11 MPa et $d_1 = 58,79\%$ à 13 MPa. Cette tendance est difficile à interpréter car la valeur de la pression n'a pas d'influence significative sur les phospholipides micronisés.

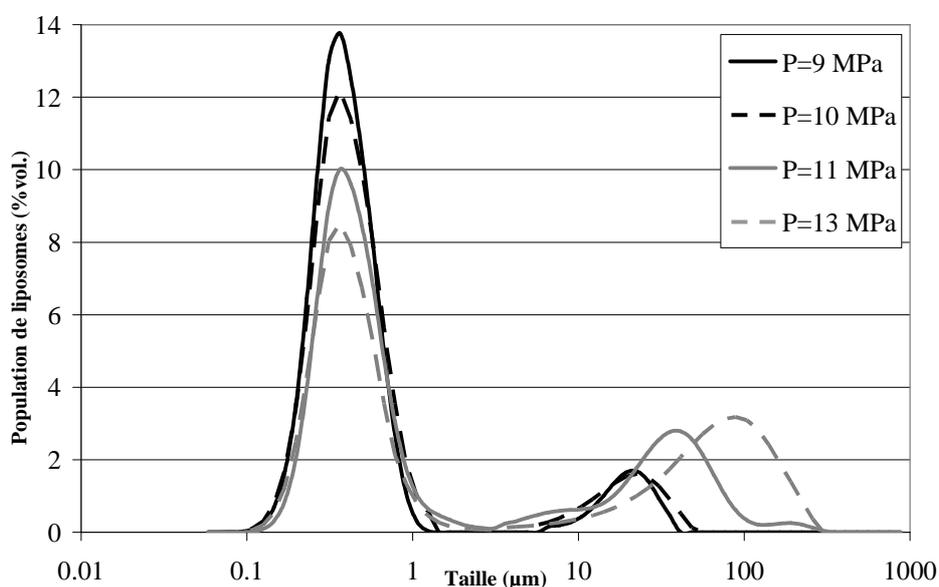


Figure III-13 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression de micronisation

Tableau III-10 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction de la pression de micronisation (courbes de la Figure III-13)

	$d_1 / \% (< 1 \mu\text{m})$	$d_2 / \% (1 - 10 \mu\text{m})$	$d_3 / \% (> 10 \mu\text{m})$
$P = 9 \text{ MPa}$	89,34	1,41	9,25
$P = 10 \text{ MPa}$	85,37	3,69	10,94
$P = 11 \text{ MPa}$	67,49	6,94	25,57
$P = 13 \text{ MPa}$	58,79	3,90	37,31

III-2.3.2.2. Influence du rapport molaire CO_2 /solvant

Influence des variations du rapport molaire CO_2 /solvant sur les caractéristiques des phospholipides micronisés.

Le procédé SAS a été testé avec des rapports molaires CO_2 /solvant variant de 50 à 100 (308 K, 9 MPa, concentration en soluté : 15% massique et débit de la solution : $22,8 \text{ mL.h}^{-1}$), correspondant aux expériences 1, 5, 6 et 7. La Figure III-14 présente les images obtenues au microscope électronique à balayage des phospholipides micronisés. Pour un rapport molaire CO_2 /solvant de 50, les phospholipides ne sont pas correctement micronisés, c'est-à-dire que les particules ne sont pas finement divisées (Figure III-15). Au-delà de 50, la valeur du rapport molaire CO_2 /solvant n'influence plus les caractéristiques des phospholipides micronisés. Les phospholipides micronisés forment des agrégats ; les particules ne sont pas individualisées. Il en résulte la formation d'amas. Le rapport molaire CO_2 /solvant influence à la fois la cinétique et la thermodynamique du procédé. Du point de vue cinétique, une diminution du rapport molaire CO_2 /solvant entraîne des transferts de matière plus lents entre la phase liquide et la phase supercritique.

Un rapport molaire CO_2 /solvant de 60 a donc été fixé pour la suite des expériences.

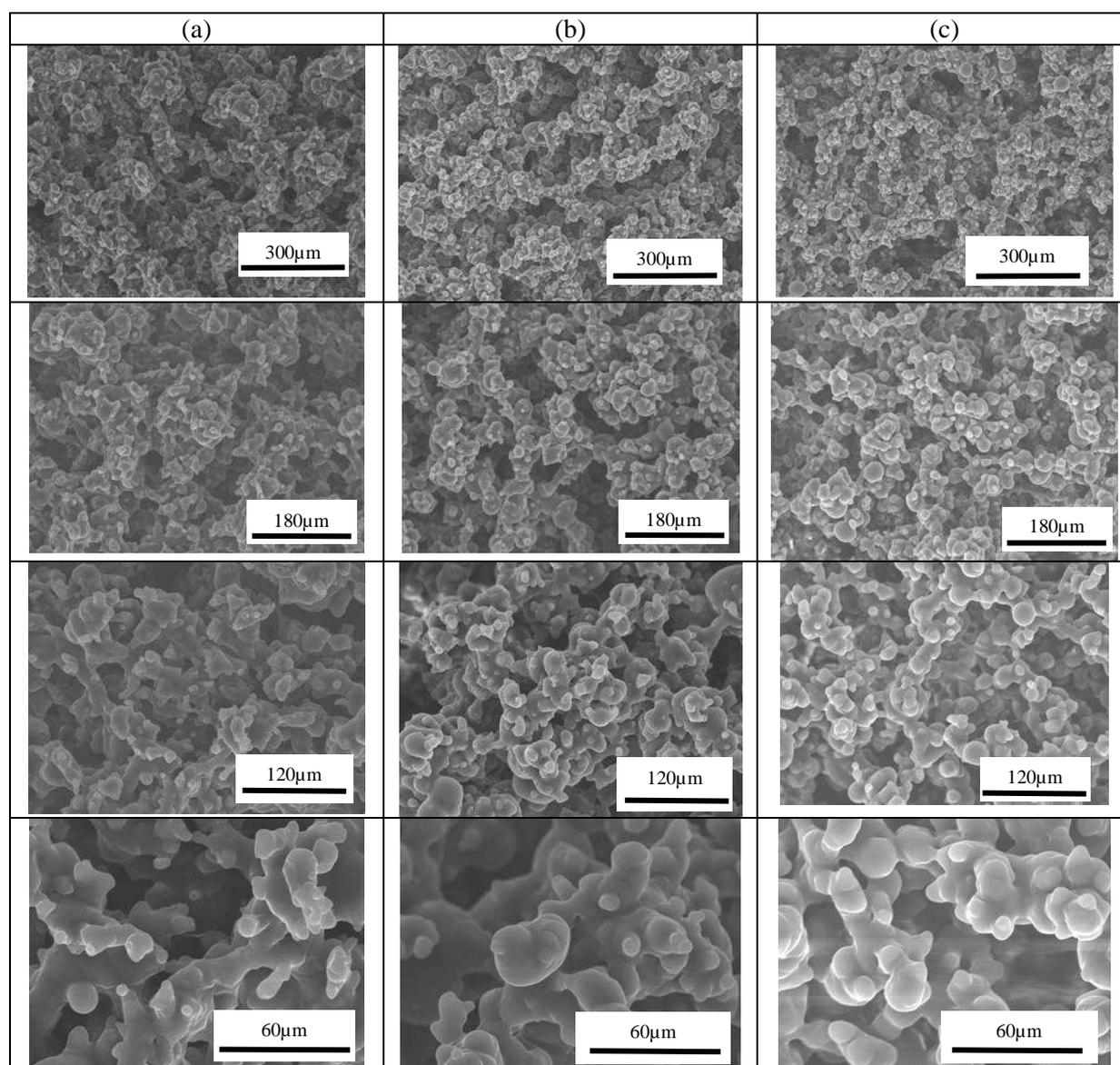


Figure III-14 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour différentes valeurs du rapport molaire CO_2 /solvant : (a) 60. (b) 80. (c) 100 ($P = 9 \text{ MPa}$, concentration en soluté : 15 % massique)

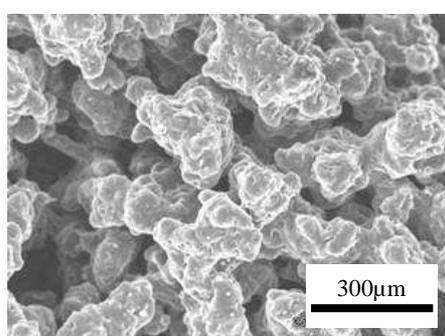


Figure III-15 - Image obtenue au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour un rapport molaire CO_2 /solvant de 50

Influence du rapport molaire CO₂/solvant sur la taille des liposomes.

Les liposomes ont ensuite été formés à partir de phospholipides micronisés et les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure III-16. Les valeurs des pourcentages volumiques cumulés en fonction des tailles des liposomes sont regroupées dans le Tableau III-11. Comme précédemment, nous ne considérerons que les populations de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm (pour lesquelles la reproductibilité est validée) pour notre analyse. Dans cette gamme de taille, la population de liposomes diminue lorsque le rapport molaire CO₂/solvant augmente : $d_1 = 89,34\%$ pour un rapport molaire CO₂/solvant de 60, $d_1 = 81,03\%$ pour un rapport molaire CO₂/solvant de 80 et $d_1 = 62,38\%$ pour un rapport molaire CO₂/solvant de 100. Il est difficile d'interpréter cette tendance car l'influence du rapport molaire CO₂/solvant sur les caractéristiques des phospholipides micronisés n'était pas significative. La force de cisaillement de l'agitateur ($11\,000\text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$) impacte l'organisation des phospholipides dans l'eau.

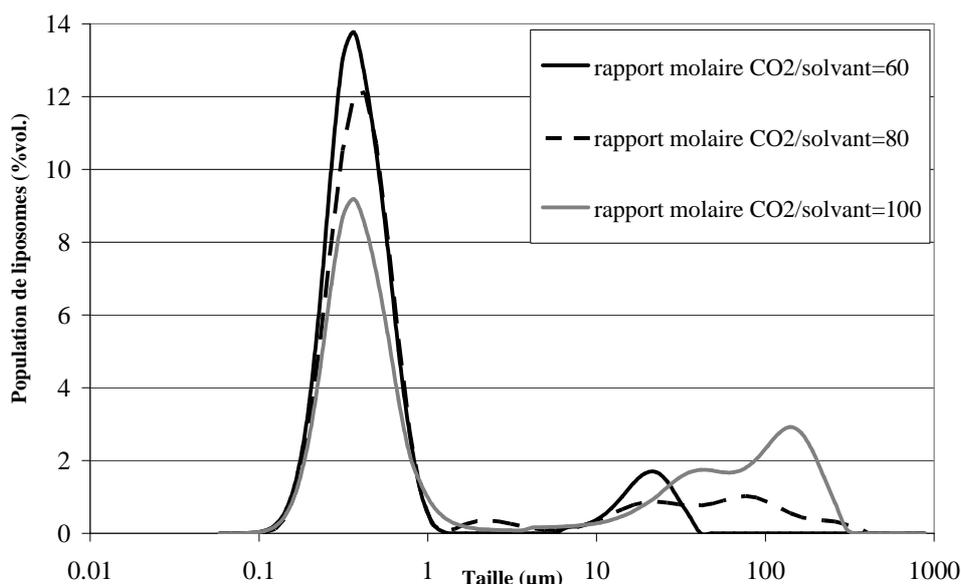


Figure III-16 - Distribution de taille des liposomes en fonction du rapport molaire CO₂/solvant lors de la micronisation

Tableau III-11 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction du rapport molaire CO₂/solvant lors de la micronisation (courbes de la Figure III-16)

	$d_1 / \% (< 1 \mu\text{m})$	$d_2 / \% (1 - 10 \mu\text{m})$	$d_3 / \% (> 10 \mu\text{m})$
<i>Rapport molaire CO₂/solvant = 60</i>	89,34	1,41	9,25
<i>Rapport molaire CO₂/solvant = 80</i>	81,03	3,40	15,57
<i>Rapport molaire CO₂/solvant = 100</i>	62,38	3,65	33,97

III-2.3.2.3. Influence de la concentration en soluté

Influence de la concentration en soluté sur les phospholipides micronisés.

La lécithine a été précipitée par le procédé SAS pour différentes concentrations en soluté. Les concentrations testées varient de 15 à 25% massique (308 K, 9 MPa, débit de solution : 22,8 mL.h⁻¹ et rapport molaire CO₂/solvant : 60). La Figure III-17 présente les images des phospholipides micronisés obtenus au microscope électronique à balayage pour différentes concentrations en lécithine (expériences 1, 8 et 9). Cette fois, l'influence du paramètre étudié est significative. La taille des phospholipides micronisés augmente de 20 à 60 µm lorsque la concentration en lécithine croît de 15 à 25% massique. En outre, il apparaît que plus la concentration est élevée, plus les particules formées sont individualisées.

Li et *al.* [73] ont également observé que la concentration en soluté (lécithine de soja contenant 70% en masse de phosphatidylcholine) avait une influence significative sur la morphologie des particules formées : plus la concentration en soluté augmente, plus les particules micronisées sont grosses et bien individualisées. Kunastitchai et *al.* [72] ont constaté qu'au-delà de 16,7% massique, une augmentation de la concentration en soluté (90% de phosphatidylcholine) entraînait un phénomène de cristallisation avec l'apparition de formes en cube ou en aiguille (308 K et 8 MPa).

L'influence de la variation de la concentration peut avoir les effets suivants :

Tout d'abord, des variations de concentration modifient la nature des phases en présence dans l'autoclave. Les équilibres de phase sont ainsi différents, d'où les différences observées sur les images de la Figure III-17.

Ensuite, des variations de concentrations entraînent des variations de sursaturation. En cristallisation, l'influence de la sursaturation sur la croissance du cristal est un phénomène bien connu. L'étude de la variation de la taille du cristal en fonction de la sursaturation montre qu'il existe deux domaines principaux : le premier domaine pour de faibles sursaturations lorsque la nucléation est le phénomène dominant et le second domaine pour des valeurs élevées de la sursaturation lorsque le mûrissement d'Ostwald devient le mécanisme dominant de la croissance du cristal. Des valeurs de sursaturation élevées peuvent ainsi conduire à la formation de particules plus grosses. Reverchon et *al.* [149] ont proposé une autre explication à ce phénomène. D'après leurs travaux, lorsque des solutions peu concentrées sont injectées, les phénomènes de saturation et de précipitation apparaissent

tardivement lors de l'expansion des gouttes ; alors, la nucléation est le phénomène dominant et ainsi, les particules formées sont plus petites. Lorsque des solutions plus concentrées sont injectées, la précipitation du soluté apparaît au début du phénomène d'expansion et cette fois, la croissance cristalline devient le mécanisme dominant conduisant à la formation de particules plus grandes.

Enfin, la troisième explication aux phénomènes observés s'appuie sur le fait que des variations de la concentration en lécithine dans la solution organique entraînent des variations de la viscosité de la solution organique. Or, la dispersion dans l'autoclave est influencée par la viscosité de la solution et ainsi, l'hydrodynamique de l'injection sera modifiée. Cette troisième et dernière explication permet de comprendre les variations observées sur la Figure III-17.

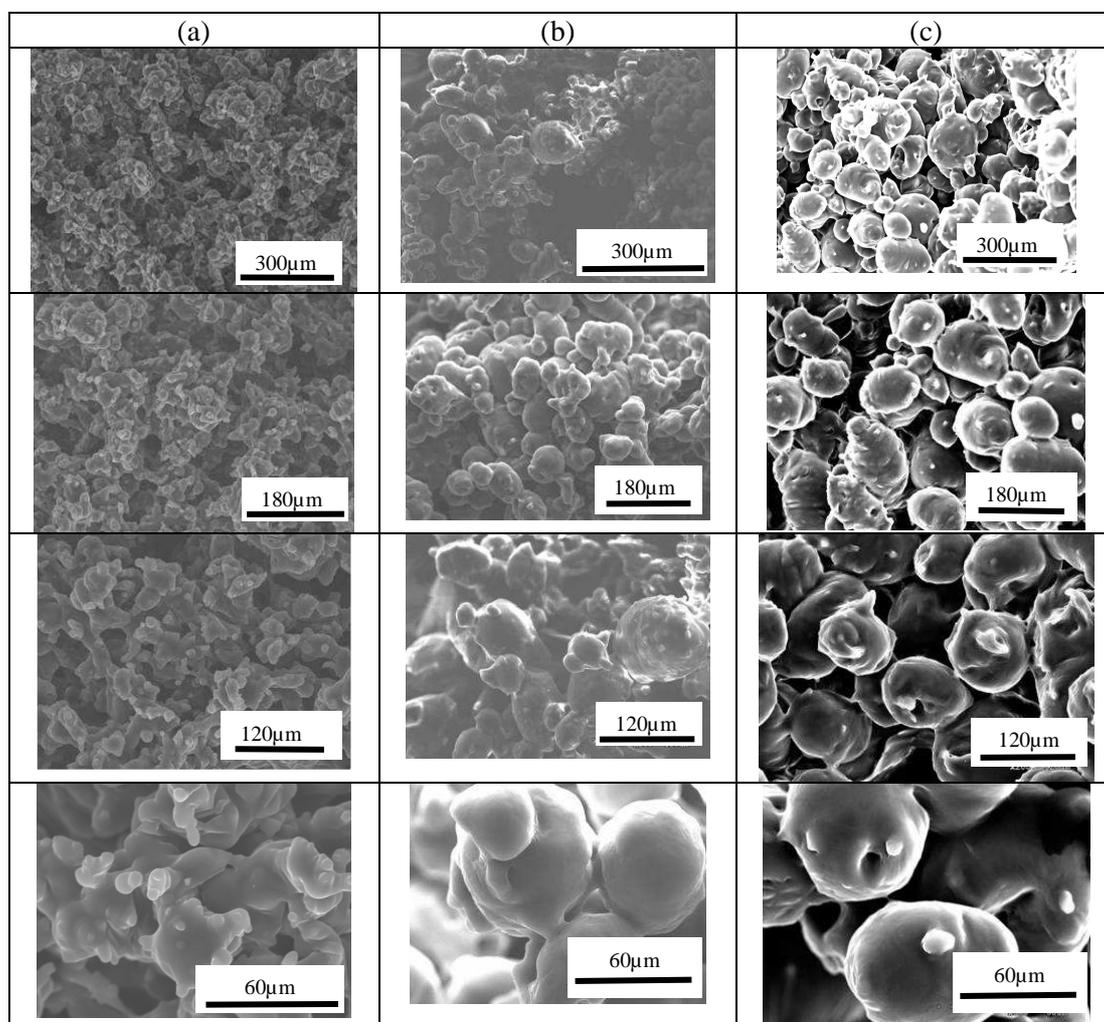


Figure III-17 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour différentes valeurs de la concentration en soluté : (a) 15% massique. (b) 20% massique. (c) 25% massique ($P= 9$ MPa, rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant} : 60$)

Influence de la concentration en soluté sur la taille des liposomes.

La Figure III-18 présente les distributions de taille des liposomes formés par hydratation de phospholipides micronisés. Les valeurs des pourcentages volumiques cumulés en fonction des tailles des liposomes sont regroupées dans le Tableau III-12.

Comme précédemment, nous ne considérerons que les populations de tailles comprises entre 0,1 et 1 μm (pour lesquelles la reproductibilité est validée) pour notre analyse. Dans cette gamme de taille, l'influence des variations de la concentration en soluté sur les variations de tailles des liposomes n'est pas significative : $d_1 = 89,34\%$ pour une concentration en soluté de 15% massique, $d_1 = 51,71\%$ une concentration en soluté de 20% massique et $d_1 = 86,79\%$ une concentration en soluté de 25% massique. Ainsi, alors que les variations de ce paramètre avaient une influence significative sur les caractéristiques des phospholipides micronisés, l'influence de la concentration en soluté sur la taille des liposomes formés n'est pas pertinente. A nouveau, la Figure III-18 illustre l'influence du cisaillement engendré par l'agitation sur l'organisation des phospholipides dans l'eau.

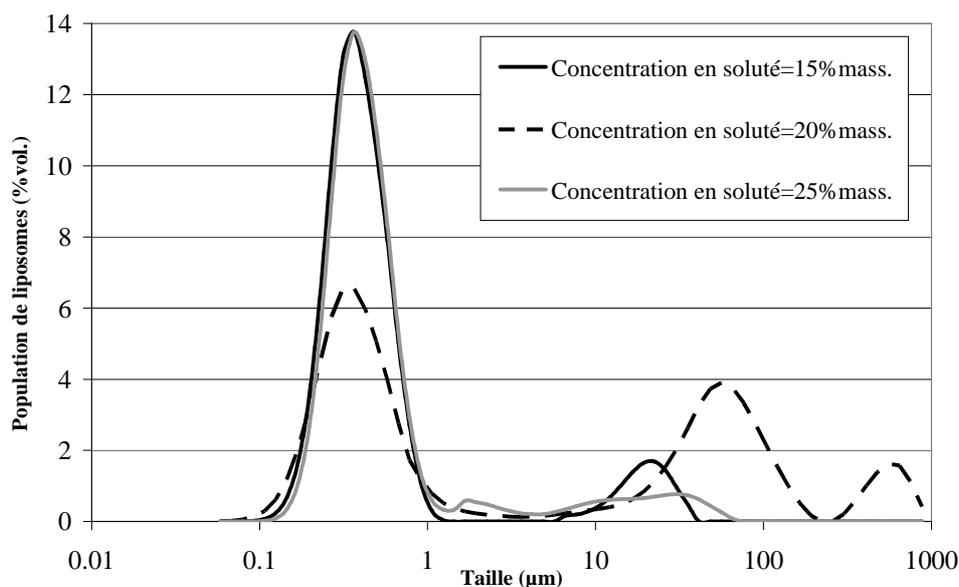


Figure III-18 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la concentration en soluté lors de la micronisation

Tableau III-12 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction du rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant}$ lors de la micronisation (courbes de la Figure III-18)

	$d_1 / \% (< 1 \mu\text{m})$	$d_2 / \% (1 - 10 \mu\text{m})$	$d_3 / \% (> 10 \mu\text{m})$
Concentration en soluté = 15 % massique	89,34	1,41	9,25
Concentration en soluté = 20 % massique	51,71	4,46	43,82
Concentration en soluté = 25 % massique	86,79	6,31	6,90

III-2.3.2.4. Conclusion

Le procédé SAS permet de diviser finement la lécithine pour former des microparticules, favorisant la formation des liposomes lors de la phase d'hydratation. Si la pression et le rapport molaire CO₂/solvant (au-delà de 60) n'ont pas d'influence sur les caractéristiques des phospholipides micronisés, la taille des phospholipides micronisés évolue lorsque la concentration en soluté varie. Ainsi, des particules plus grosses ont été obtenues en augmentant la concentration en soluté. Cependant, dans tous les cas, les résultats en termes de tailles des liposomes ne sont pas significativement différents. Certaines tendances apparaissant alors qu'elles n'existaient pas au niveau de la micronisation et inversement, lorsqu'une tendance se dégage des résultats de micronisation, elle n'est pas visible sur les distributions de taille des liposomes. La force de cisaillement de l'agitateur (11 000 tr.min⁻¹) influence certainement l'organisation des phospholipides dans l'eau et peut expliquer ces résultats. Par conséquent, les conditions expérimentales du procédé SAS ont été choisies par rapport à des critères de consommation de fluides et de temps de procédé et non pas par rapport à l'efficacité du procédé SAS. Les conditions expérimentales suivantes ont ainsi été retenues pour le fonctionnement du procédé SAS : $P = 9$ MPa, rapport molaire CO₂/solvant = 60 et la concentration en soluté = 15% massique à $T = 308$ K et avec un débit de solution égal à 22,8 mL h⁻¹.

III-3. Conclusion

Cette étude a permis de comparer deux méthodes de traitement des phospholipides : le procédé supercritique SAS et la méthode conventionnelle de Bangham. Chaque méthode est réalisée en deux étapes avec une phase de traitement de la lécithine brute propre à chaque méthode et une phase d'hydratation/agitation commune aux deux méthodes.

Dans les conditions testées (en utilisant l'éthanol comme solvant), il est apparu que le procédé SAS présente certains avantages par rapport à la méthode de Bangham. Les liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS sont sphériques et de type multilamellaire. Le fait qu'ils soient sphériques permet de les caractériser plus facilement, ce qui n'est pas le cas pour les liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham. De plus, contrairement à la méthode de Bangham, le procédé SAS est reproductible. Le Tableau III-13 résume les résultats présentés dans ce chapitre sur la comparaison du procédé SAS et de la méthode de Bangham dans les conditions

testées. Il est important de souligner que de meilleurs résultats peuvent être obtenus avec la méthode de Bangham en utilisant d'autres solvants que l'éthanol (par exemple, avec le chloroforme dans l'étude de Varona *et al.* [63, 80]).

Le procédé SAS est ainsi un procédé efficace pour microniser la lécithine de soja brute. L'hydratation de la lécithine micronisée par le procédé SAS permet d'obtenir des liposomes de tailles majoritairement comprises entre 0,1 et 1 μm , avec des efficacités d'encapsulation comprises entre 10 et 20%. Ces valeurs sont acceptables au regard des données de la littérature, même si les efficacités d'encapsulation mesurées restent faibles. Ce dernier point pourrait être amélioré en utilisant des stabilisants (phospholipides chargés et autres). Concernant la taille des liposomes, pour être utilisés comme systèmes de délivrance de médicaments, la taille optimale des liposomes doit être comprise entre 2 et 5 μm .

Cette étude a montré l'intérêt du procédé SAS pour former des liposomes en deux étapes. Cependant, la mise en contact des phospholipides divisés avec l'air engendre leur dégradation. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler sur un procédé supercritique en une seule étape utilisant le principe du procédé SAS (Chapitre IV).

Tableau III-13 – Tableau comparatif du procédé SAS et de la méthode de Bangham (dans les conditions opératoires utilisées)

	<i>Critères</i>	<i>Procédé SAS</i>	<i>Méthode de Bangham</i>
<i>Méthode ou procédé employé(e)</i>	Reproductible	oui	non
	Solvants organiques utilisés	éthanol	Solvants utilisés généralement toxiques (isopropanol, dyéthyl éther, chloroforme et méthanol [4])
	Température opératoire / K	308	323
	Extrapolation	envisageable	Difficilement envisageable
<i>Caractéristiques des liposomes obtenus</i>	Morphologie	sphériques	sphériques et ellipsoïdaux
	Taille / μm	0,1 – 1	0,1 - 100
	Efficacité d'encapsulation / %	10 – 20	< 20
	Solvant résiduel	De l'ordre de 10% massique	De l'ordre de 10% massique
	Stabilité à un mois	non	non

Chapitre IV : Mise au point d'un procédé innovant - Le procédé Continu Anti-Solvant (CAS)

Introduction

Dans le Chapitre III, le procédé supercritique SAS a permis de diviser des phospholipides qui ont ensuite été hydratés, dans les conditions ambiantes de température et de pression, pour former des liposomes. Cette méthode de formation des liposomes en deux étapes s'est révélée efficace même si les phospholipides divisés se dégradent au contact de l'air. A présent, l'objectif est de mettre au point un procédé de formation de liposomes sous pression en une seule étape. Dans la littérature, il existe des procédés de formation des liposomes en une seule étape [66, 71]. Le procédé mis au point tire son caractère innovant du fait qu'il s'agit d'un procédé continu. L'enjeu de ce travail de recherche a donc été de mettre au point un procédé continu et en une seule étape. En 2003, Imura *et al.* [143] ont envisagé de mettre au point un tel procédé mais cette idée ne s'est jamais concrétisée. Par la suite, les publications de la littérature portant sur les liposomes se sont concentrées sur l'encapsulation dans les liposomes avec des principes actifs à visées thérapeutiques. Ces travaux étaient pour la plupart réalisés dans le cadre d'une association entre le monde du génie des procédés et le monde du corps médical ou pharmaceutique. La formation des liposomes était ainsi abordée sous l'angle médical. Les molécules encapsulées présentant une haute valeur ajoutée, elles étaient utilisées en faible quantité. Le procédé de formation pouvait donc être mené sur des autoclaves de faible volume, utilisés en mode batch. Le travail de mise au point d'un procédé innovant, continu et en une seule étape se détache donc des problématiques actuelles liées à l'utilisation des liposomes pour le traitement du cancer ou autre. Du point de vue du génie des procédés, la mise au point d'un tel procédé relève d'un intérêt certain.

IV-1. Présentation du procédé Continuous Anti-Solvent

IV-1.1. Introduction

Le procédé mis au point dans le cadre de ce travail de recherche est basé sur le procédé SAS. Ce nouveau procédé est avant tout un procédé supercritique anti-solvant et c'est pourquoi il a été nommé le procédé Continuous Anti-Solvent ou CAS. Dans le Chapitre III de ce manuscrit, le procédé supercritique SAS a été utilisé pour microniser de la lécithine de soja brute. Une fois ramenée dans les conditions ambiantes, la lécithine micronisée est hydratée sous agitation pour former des liposomes. Dans le Chapitre III, il a été démontré que la micronisation de la lécithine par le procédé SAS permet de former des liposomes à géométrie sphérique et de manière reproductible. Mais ce procédé est un procédé en deux étapes : la micronisation étant réalisée sous haute pression et la phase d'hydratation avec agitation étant réalisée dans les conditions ambiantes de température et de pression. L'étude expérimentale présentée dans le Chapitre III a montré que la lécithine micronisée est un composé délicat à manipuler, ce qui implique que l'étape d'hydratation doit être réalisée dès l'ouverture de l'autoclave après la dépressurisation. La mise au point du procédé CAS repose sur l'idée d'un couplage entre l'étape de micronisation et l'étape d'hydratation avec agitation, permettant ainsi de s'affranchir du risque de dénaturation de la lécithine micronisée ; la phase d'hydratation étant réalisée dans l'autoclave au cours du procédé haute pression, avec une formation des liposomes au cours de la dépressurisation.

IV-1.2. Montage expérimental du procédé Continuous Anti-Solvent

Dans ce procédé, présenté sur la Figure IV-1, l'autoclave possède trois entrées : une entrée de CO₂, une entrée de solution organique et une entrée d'eau.

L'introduction du CO₂ et de la solution organique sont réalisées par le haut de l'autoclave alors que l'eau est injectée par le bas de l'autoclave.

Une turbine Rushton permet d'assurer le mélange de la phase aqueuse pendant tout le procédé.

La suspension liposomiale est évacuée par le bas de l'autoclave.

Pour ce qui concerne l'évacuation du CO₂, deux cas sont possibles : soit le CO₂ est évacué par le haut de l'autoclave, soit par le bas de l'autoclave (par l'évacuation utilisée pour la suspension liposomiale). Les deux cas ont été testés : CAS1 à une seule sortie, c'est-à-dire que la suspension liposomiale et le CO₂ sont évacués par le même orifice situé en bas de l'autoclave ; et CAS2 à deux sorties, c'est-à-dire que la suspension liposomiale est évacuée par le bas de l'autoclave et le CO₂ par le haut de l'autoclave.

Les entrées et les sorties du nouveau procédé pour les configurations CAS1 et CAS2 sont représentées sur le schéma simplifié de la Figure IV-2.

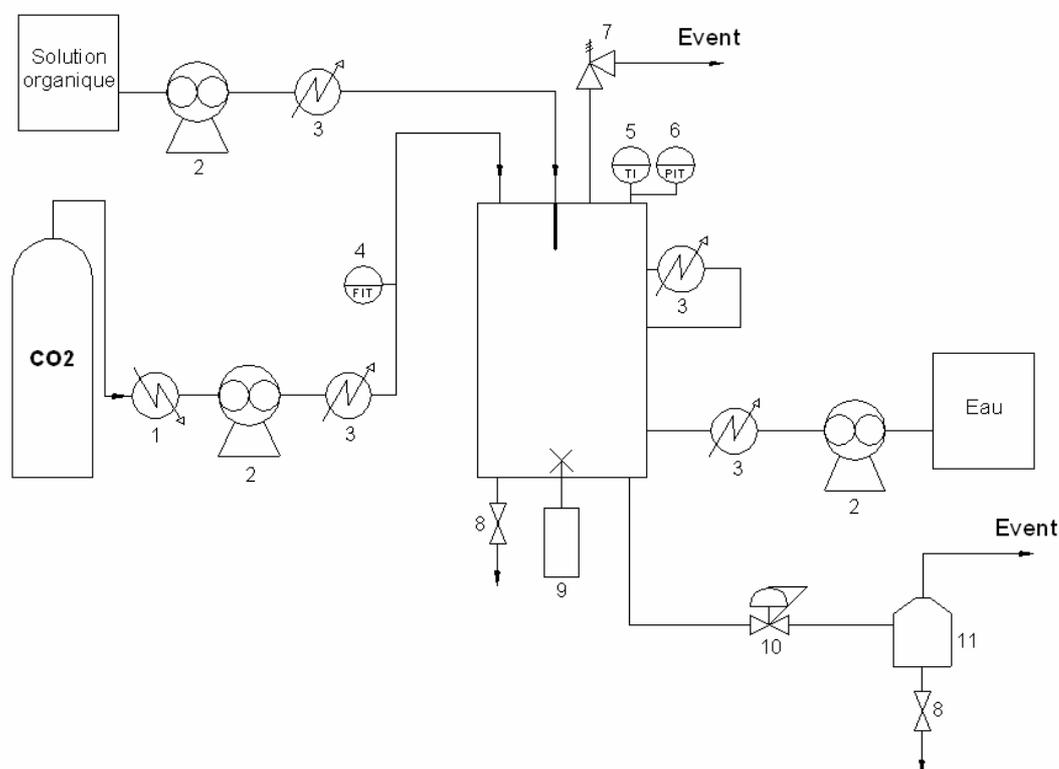


Figure IV-1 - Schéma simplifié du procédé CAS

1	Groupe froid	7	Soupape de sécurité
2	Pompe volumétrique	8	Vanne de soutirage
3	Groupe chaud	9	Agitateur
4	Débitmètre	10	Déverseur
5	Capteur de température	11	Séparateur
6	Manomètre		

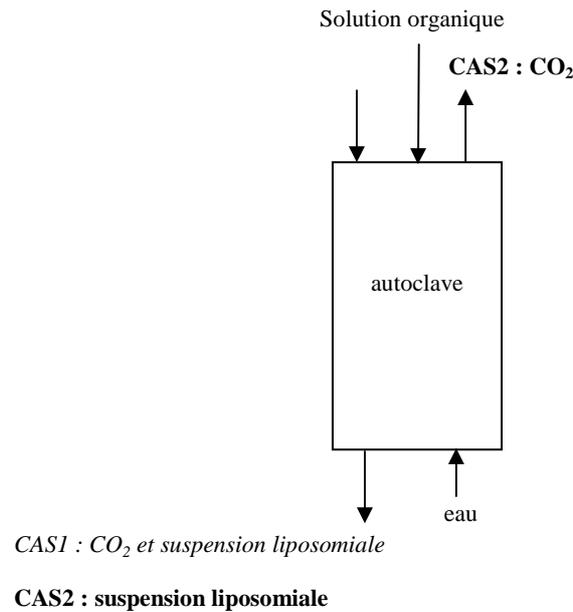


Figure IV-2 – Schéma simplifié des entrées et des sorties dans la configuration CAS1 (une sortie) et CAS2 (deux sorties)

Avant de tester le procédé en mode continu, il nous est paru utile de connaître les conditions expérimentales pour lesquelles, les phases en présence sont stables. Nous avons ainsi travaillé sur le procédé en mode semi-batch pour déterminer l'influence de la vitesse d'agitation, de la quantité d'eau, de la pression, de la vitesse de dépressurisation et du mode d'introduction des phases sur la stabilité des phases en présence dans l'autoclave.

Enfin, tel qu'il a été testé à l'échelle laboratoire, le procédé est entièrement manuel. Il n'y a pas de régulation entre l'injection d'eau et le soutirage de la suspension liposomiale. C'est pourquoi les essais ont été réalisés avec un autoclave muni de fenêtres permettant d'agir sur les vannes en fonction de l'évolution des phases dans l'autoclave.

Des informations sur le matériel utilisé sont fournies dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 – Informations sur les différents éléments du montage expérimental du procédé CAS

<i>Elément</i>	<i>Modèle</i>	<i>Marque</i>	<i>Spécificités</i>
Autoclave à fenêtres		New Ways of Analytics, Allemagne	Autoclave cylindrique en acier de volume 763 cm ³ pouvant résister à une pression maximale de 15 MPa à 318 K avec deux fenêtres en borosilicate se faisant face
Autoclave	Autoclave "fermé"	Fedegari	Autoclave cylindrique en acier de volume 650 cm ³ pouvant résister à une pression supérieure à 15 MPa à 318 K
Pompe CO ₂	Dosapro	Milton Roy, Pont-Saint-Pierre, France	Débit maximal de 2,13 L.h ⁻¹ à 48 MPa
Pompe solution organique	Gilson 307 HPLC	Gilson, France	Débit maximum de 25 mL.min ⁻¹ à 60 MPa
Capillaire d'injection		Chrompack	Diamètre interne 127 µm
Pompe eau	Gilson 307 HPLC	Gilson, France	Débit maximum de 25 mL.min ⁻¹ à 60 MPa
Agitateur	Turbine Rushton		6 pales droites (diamètre 4 cm)
Caméra	Pulnix TM-6CN	Pulnix, France	25 images/seconde avec un temps d'exposition de 1/2000 s

IV-1.3. Protocole expérimental

IV-1.3.1. Procédé semi-batch

Tout d'abord, une quantité d'eau donnée (m_0) est introduite dans l'autoclave avant la mise sous pression. Ensuite, l'autoclave est chargé en CO₂ pour atteindre la pression de travail. La température de travail est fixée grâce à des bains chauds régulés. Une fois que la pression souhaitée est atteinte, un courant de CO₂ est établi. La solution organique est alors injectée dans une phase riche en CO₂. Le procédé est ainsi continu vis-à-vis du CO₂ et batch vis-à-vis du soluté. On se trouve alors dans les conditions du procédé SAS : le CO₂ se comporte comme un anti-solvant par rapport au soluté (lécithine S100) mais est complètement miscible avec le solvant organique (éthanol absolu). L'effet anti-solvant du CO₂ et la diffusion du solvant organique vers la phase légère entraîne la sursaturation du soluté et sa précipitation. La lécithine précipitée est alors directement dans l'eau. L'agitation de l'eau

permet d'assurer une bonne répartition du matériel micronisé dans l'eau. Lorsqu'un volume donné de solution organique a été injecté dans l'autoclave, la phase fluide est évacuée et lorsque la pression dans l'autoclave atteint 2 MPa, la vanne de soutirage est actionnée et une suspension liposomiale est récupérée.

La lécithine de soja S100 a été utilisée pour ces essais car elle est plus pure que la lécithine de soja S75 (LIPOID KG).

Les conditions expérimentales choisies s'appuient sur les résultats des essais conduits avec le procédé SAS. Toutes les expériences sont réalisées à 308 K, avec une pression variant de 9 à 14 MPa, avec un débit massique de CO₂ compris entre 750 et 800 g.h⁻¹, avec une concentration en lécithine dans la solution organique de 15 % massique, et avec un débit de solution organique de 240 mL.h⁻¹. Les vitesses d'agitation testées sont comprises entre 110 et 300 tr.min⁻¹. La composition initiale en eau dans l'autoclave (rapport massique CO₂/eau) varie de 26 à 39%.

IV-1.3.2. Procédé CAS

Deux procédures ont été testées pour le procédé CAS. Comme il l'a été expliqué en détail dans le paragraphe IV-1.2, nous avons voulu tester le cas où le CO₂ et la suspension liposomiale sont évacués par la même sortie (CAS1) et le cas où le CO₂ est évacué par le haut de l'autoclave et la suspension liposomiale par le bas de l'autoclave (CAS2) afin de connaître l'influence de la détente du CO₂ sur la formation des liposomes.

CAS1 est un procédé à une seule sortie. Tout d'abord, une quantité d'eau donnée (m_0) est introduite dans l'autoclave. Ensuite, l'autoclave est chargé en CO₂. Une fois la pression opératoire atteinte, la solution organique est injectée dans l'autoclave et pendant ce temps, la phase aqueuse est agitée. Lorsque la phase aqueuse devient blanche et homogène, la vanne de soutirage (située en bas de l'autoclave) est actionnée et réglée pour obtenir le débit de CO₂ souhaité. En même temps que le CO₂, la suspension liposomiale est soutirée de l'autoclave (par le même orifice que le CO₂). L'injection de l'eau est alors réglée visuellement en fonction du niveau de l'émulsion dans l'autoclave.

CAS2 est un procédé à deux sorties. Tout d'abord, une quantité d'eau donnée (m_0) est introduite dans l'autoclave. Ensuite, l'autoclave est chargé en CO₂. Une fois la pression

opératoire atteinte, le débit de CO₂ est réglé (le CO₂ est évacué par le haut de l'autoclave). Puis, la solution organique est injectée dans l'autoclave et pendant ce temps, la phase aqueuse est agitée. Lorsque la phase aqueuse devient blanche et homogène, la vanne de soutirage (située en bas de l'autoclave) est actionnée pour obtenir un débit de suspension liposomiale. L'injection de l'eau est alors réglée visuellement en fonction du niveau de l'émulsion dans l'autoclave.

Les conditions expérimentales de départ ont été choisies en fonction de notre expérience sur l'utilisation du procédé SAS. Toutes les expériences menées ont ainsi été réalisées à 308 K, avec une concentration en soluté dans le solvant organique de 15% massique, avec un débit de solution organique de 240 mL.min⁻¹ et avec une vitesse d'agitation de 300 tr.min⁻¹.

Les résultats de ces expériences seront traduits en termes de morphologie et de taille. Les méthodes d'analyse ont déjà été présentées dans le Chapitre III de ce mémoire et ne seront pas détaillées dans cette section.

IV-2. Détermination d'un point de fonctionnement en mode semi-batch

Les essais visant à déterminer un point de fonctionnement ont été réalisés en mode semi-batch. Les valeurs des paramètres opératoires sont présentées ci-dessous :

- Vitesse d'agitation : 100, 225 et 300 tr.min⁻¹ (essais n°1, 2 et 3)
- Rapport massique eau/lécithine : entre 16 et 24 (essais n°2 et 4 à 9)
- Pression : 9 et 12 MPa (essais n°4 et 11)
- Vitesse de dépressurisation : 0,02 et 0,2 MPa.s⁻¹ (essais n°12 et 13)
- Effet du mode d'introduction de la solution organique dans l'autoclave (essais n°2 et 10)
- Concentration en soluté dans la solution organique : 15% massique
- Débit de solution organique : 240 mL.h⁻¹
- Température : 308 K
- Débit massique de CO₂ : 750 g.h⁻¹

L'influence de la variation des paramètres opératoires a été évaluée en fonction de la taille des liposomes (protocole de détermination de la taille des liposomes détaillé dans le paragraphe III-1.3.2.2) et de la stabilité des phases en présence.

Le Tableau IV-2 présente les valeurs des paramètres opératoires pour chaque essai réalisé en mode semi-batch et les résultats obtenus en termes de tailles de liposomes.

Tableau IV-2 – Conditions expérimentales testées pour le procédé batch et taille des liposomes formés

Essai N°	P / MPa	Vitesse d'agitation / tr.min ⁻¹	m ₀ / g	Composition initiale en eau / %mass.	Vitesse de dépressurisation / MPa s ⁻¹	Rapport massique eau/lécithine	d ₁ / %	d ₂ / %	d ₃ / %
1	9	100	190	33,37	0,002	22	54,32	42,65	3,03
2	9	225	190	33,37	0,002	22	12,06	78,85	9,09
3	9	300	190	33,37	0,002	22	4,26	26,45	69,29
4	9	225	150	26,98	0,002	16	0,04	26,22	73,74
5	9	225	230	39,46	0,002	26	9,17	84,86	5,95
6	9	225	190	33,37	0,002	19	2,04	33,84	64,12
7	9	225	190	33,37	0,002	20	0,27	22,34	77,39
8	9	225	150	26,98	0,002	21	7,12	86,71	6,16
9	9	225	150	26,98	0,002	24	25,12	64,77	10,12
10	9	225	190	33,37	0,002	-	25,13	71,88	2,99
11	12	225	150	26,98	0,002	-	7,81	74,03	18,16
12	14	225	110 (*)	33,4	0,02	-	0,00	21,23	78,77
13	14	225	110 (*)	33,4	0,2	-	0,79	18,73	80,49

d₁ : Pourcentage de liposomes / diamètre < 1,00 µm (pourcentage volumique cumulé)

d₂ : Pourcentage de liposomes / 1,00 µm < diamètre < 10,00 µm (pourcentage volumique cumulé)

d₃ : Pourcentage de liposomes / diamètre > 10,00 µm (pourcentage volumique cumulé)

(*) Utilisation de l'autoclave sans fenêtres dit "fermé"

IV-2.1. Comportement des phases

La composition du système quaternaire CO₂/eau/surfactant/éthanol sous pression évolue en fonction des conditions opératoires (débits des phases, concentrations,...). Le but de ce paragraphe est de suivre l'évolution du comportement du mélange dans l'autoclave en fonction de la composition. Cette étude est une étude qualitative et les conditions expérimentales ont été choisies de façon à visualiser les différentes phases décrites au Chapitre II pour ce type de système. La représentation de Winsor [133] est adoptée pour décrire le comportement des phases.

La Figure IV-3 présente les images du comportement du mélange dans l'autoclave en fonction de l'évolution de la composition en lécithine dans l'autoclave (paramètre nommé Z). Comme présenté sur la Figure IV-1, l'autoclave possède deux fenêtres, chacune avec une partie haute et une partie basse. Durant toute la phase d'injection, la partie haute des fenêtres reste transparente (phase riche en CO₂) et ainsi, seule la partie basse des fenêtres est représentée sur la Figure IV-3. Cette étude s'appuie sur l'étude bibliographique présentée dans le Chapitre II et prend tout son intérêt par son aspect expérimental. Sur la Figure IV-3.a, l'injection démarre alors que sur la Figure IV-3.f, l'injection s'achève. La Figure IV-3.g représente l'étape de dépressurisation.

A l'état initial, c'est-à-dire avant l'injection de la solution organique, le système est biphasique avec une phase légère riche en CO₂ supercritique et une phase lourde riche en eau. L'agitation est mise en marche lors de l'injection de la solution organique.

Le jet atomisé est observé durant la phase d'injection sur la Figure IV-3.a. Au bout d'un certain temps dépendant des conditions opératoires, l'injection de la solution organique entraîne la formation d'une troisième phase située à l'interface entre la phase riche en CO₂ et la phase riche en eau (Figure IV-3.b). Cette phase opaque de couleur blanche est constituée de particules de lécithine micronisée.

X							
Y	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Atomisation</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en eau</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase constituée de particules</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en eau</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Couche blanche de lécithine</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en eau</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Macro-émulsion</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Lécithine solide</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Macro-émulsion</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en eau</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Macro-émulsion</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Phase riche en CO₂</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Suspension liposomiale</div>
Z	0,00	0,17	0,34	0,67	1,28	1,43	2,29
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g) <i>dépressurisation</i>

Figure IV-3 - Images du comportement des phases dans l'autoclave en fonction de la composition en CO₂

X : Visualisation des phases dans l'autoclave (seule la partie basse de l'autoclave est représentée)

Y : Schématisation du comportement des phases dans l'autoclave

Z : composition en lécithine (fraction massique en %)

Deux phénomènes sont observés sur la Figure IV-3.c : tout d'abord, une couche solide blanche composée principalement de lécithine apparaît à la surface de l'eau ; ensuite, une phase blanchâtre est également présente au dessus de l'eau. Concernant le premier phénomène, au départ, la lécithine flotte avant d'être mélangée de façon homogène avec l'eau. Le mélange n'est pas instantané. Le second phénomène est lié à la dispersion des gouttes d'eau dans la phase supercritique (liée à l'agitation) et entraîne la formation de micelles inverses, c'est-à-dire une émulsion eau-dans-CO₂ en équilibre à la fois avec une phase riche en CO₂ dans la partie haute de l'autoclave et avec une phase riche en eau dans la partie basse de l'autoclave [114].

Sur la Figure IV-3.d, une phase solide blanche apparaît dans l'eau. Au départ, comme du CO₂ est solubilisé dans l'eau, des micelles normales se forment dans l'eau mais quand la concentration en lécithine augmente, l'agitation n'est pas suffisante pour empêcher l'agrégation des particules de lécithine. Un certain temps est nécessaire pour que le mélange s'homogénéise.

Après un certain temps dépendant des conditions opératoires, l'émulsion de milieu de phases et la phase aqueuse se combinent pour former une macroémulsion CO₂-dans-eau (Figure IV-3.e et Figure IV-3.f).

Durant la dépressurisation (Figure IV-3.g), les molécules de CO₂ se retirent des sites occupés sur les queues des molécules de surfactant produisant une forte attraction entre ces queues. Alors, les parties hydrophobes des molécules de phospholipides s'associent pour minimiser les interactions avec la phase aqueuse. Dans certaines conditions, la libération du CO₂ entraîne une expansion volumique de la macroémulsion CO₂-dans-eau. En fin de dépressurisation, une suspension liposomiale (blanche et homogène) est visible dans le fond de l'autoclave.

IV-2.2. Etude des paramètres expérimentaux

IV-2.2.1. La vitesse d'agitation

Trois vitesses d'agitation ont été testées, respectivement 100, 225 et 300 tr.min⁻¹ (essais n°1, 2 et 3). Les valeurs des autres paramètres expérimentaux restant constantes ($P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h⁻¹, débit massique de CO₂ = 750 g.h⁻¹ et rapport massique eau/lécithine = 22).

Par son action, l'agitation permet d'atteindre plus rapidement l'équilibre. Par ailleurs, pour de fortes intensités d'agitation (300 tr.min⁻¹), le jet de solution organique atomisé est directement en contact avec la phase aqueuse. Dans ce cas, il est difficile d'affirmer que l'atomisation du jet est toujours réalisée et ce point sera traité dans le paragraphe IV-2.2.5.

Les distributions de taille des liposomes formés par le procédé semi-batch en fonction des vitesses d'agitation sont présentées sur la Figure IV-4. La répartition des liposomes en fonction de leur taille (en pourcentage volumique cumulé) est présentée dans le Tableau IV-2.

L'influence de la vitesse d'agitation sur la taille des liposomes est visible. Il apparaît un déplacement du pic majoritaire vers les plus grandes tailles lorsque la vitesse d'agitation augmente. Pour une faible vitesse d'agitation (100 tr.min^{-1}), la distribution de taille des liposomes est bimodale. Pour cette vitesse d'agitation, le mélange des phases n'est sûrement pas suffisant pour assurer un mélange homogène des phases. Pour une vitesse d'agitation moyenne (225 tr.min^{-1}), la distribution de taille des liposomes est pratiquement unimodale avec principalement une population de liposomes de taille comprise entre 1 et $10 \mu\text{m}$ ($d_2 = 78,85\%$). Enfin, pour une vitesse d'agitation élevée (300 tr.min^{-1}), les liposomes ont une distribution de taille unimodale et principalement située au dessus de $10 \mu\text{m}$ ($d_3 = 69,29\%$). Ainsi, plus la vitesse d'agitation est élevée, plus la taille des liposomes est importante.

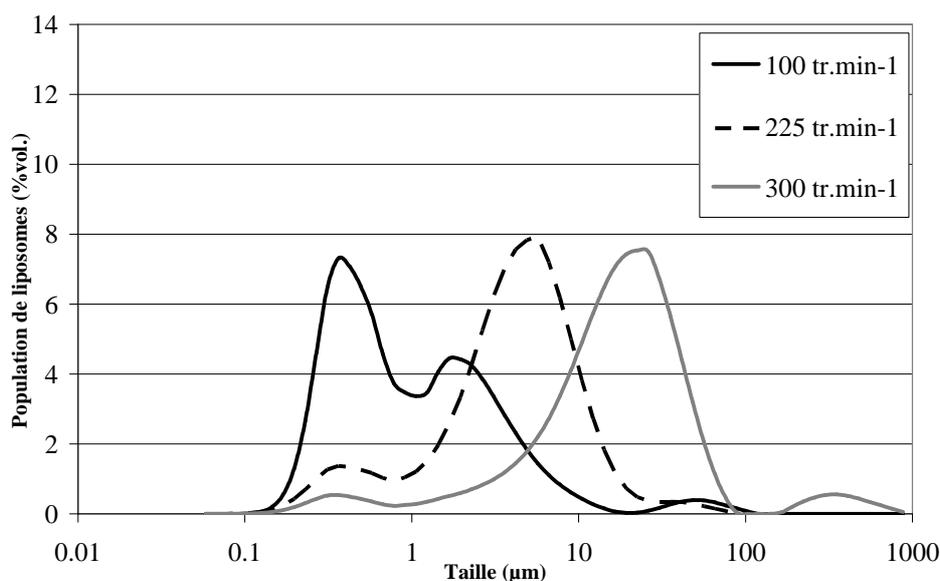


Figure IV-4 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la vitesse d'agitation pour le procédé semi-batch ($P = 9 \text{ MPa}$, $T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de $\text{CO}_2 = 750 \text{ g.h}^{-1}$)

La Figure IV-5 présente les images du comportement des phases dans l'autoclave juste avant la dépressurisation, en fonction de la vitesse d'agitation. Pour une vitesse d'agitation faible (Figure IV-5.a, 100 tr.min^{-1}), la phase aqueuse reste claire. Le mélange n'est pas efficace. La Figure IV-5.b (225 tr.min^{-1}) montre la formation d'une émulsion de milieu de phases en équilibre à la fois avec une phase légère riche en CO_2 et une phase riche en eau

(comportement de type III dans la représentation de Winsor). L'émulsion de milieu de phases est une phase riche en surfactant. Contrairement au cas précédent, pour une vitesse d'agitation élevée (Figure IV-5.c, 300 tr.min^{-1}), une macroémulsion CO_2 -dans-eau est déjà formée avant la dépressurisation, c'est-à-dire que les surfactants sont déjà dans la phase aqueuse. Cela peut s'expliquer par le fait que le mélange est plus efficace pour une vitesse d'agitation élevée. Cependant, lors de la dépressurisation, cette macroémulsion subit une forte expansion volumique. Au final, lorsque le CO_2 a totalement quitté l'autoclave, une mousse sèche apparaît sur les vitres de l'autoclave et la phase aqueuse située au fond de l'autoclave est peu concentrée. Le procédé est plus difficilement contrôlable lorsque la vitesse d'agitation est de 300 tr.min^{-1} . Une vitesse d'agitation de 225 tr.min^{-1} a finalement été choisie pour la suite des expériences.

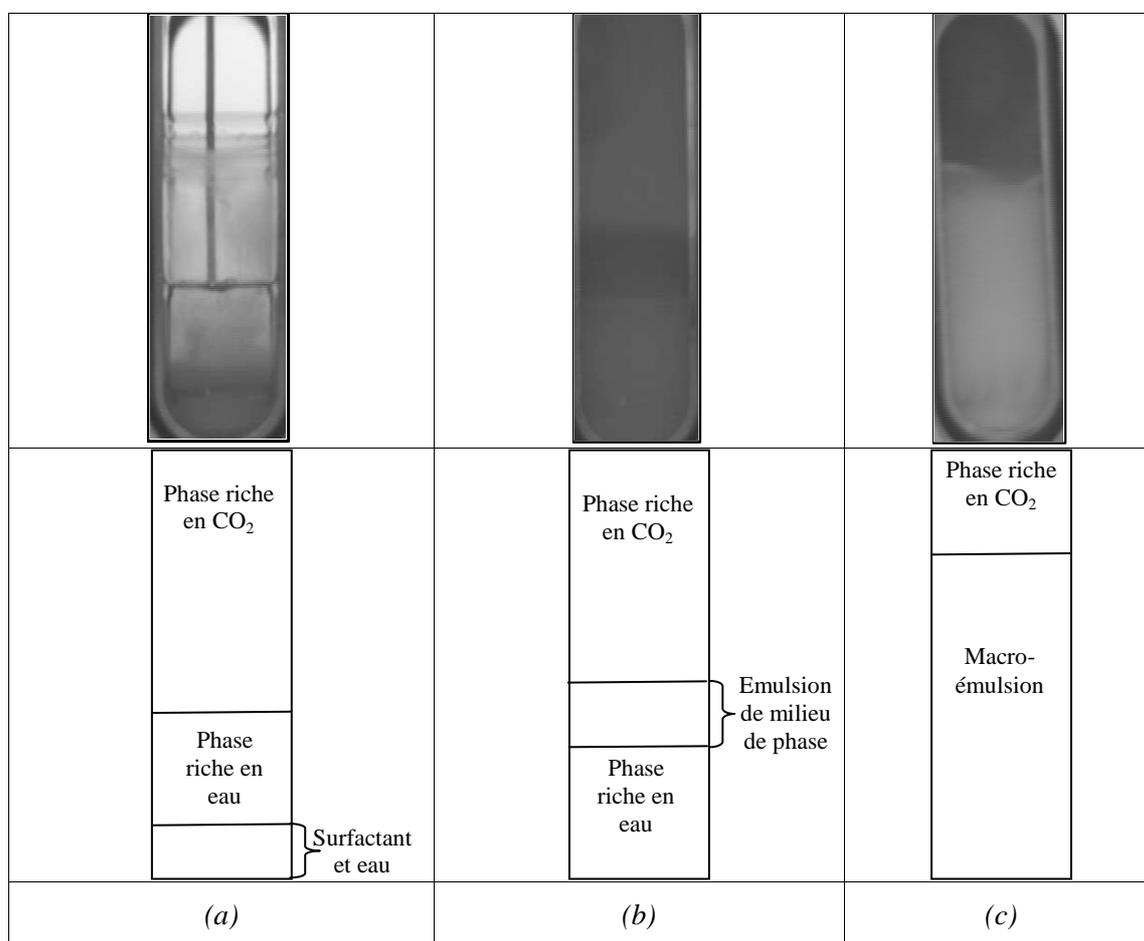


Figure IV-5 – Images du comportement des phases dans l'autoclave juste avant la dépressurisation en fonction de la vitesse d'agitation : (a) 100 tr.min^{-1} , (b) 225 tr.min^{-1} et (c) 300 tr.min^{-1}

IV-2.2.2. Le rapport massique eau/lécithine

Le rapport massique eau/lécithine est étudié pour mesurer l'influence de l'ajout d'eau dans l'autoclave sur le comportement des phases en présence. La difficulté d'introduire de l'eau dans un mélange CO₂/surfactant sous pression a été soulignée par Lee *et al.* [126] et il nous est apparu intéressant d'étudier ce paramètre.

Plusieurs expériences (essais n°2 et 4 à 9) ont été réalisées en faisant varier le rapport massique eau/lécithine entre 16 et 26. Les autres paramètres expérimentaux restant constants, comme précisé dans le Tableau IV-2 ($P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h⁻¹, débit massique de CO₂ = 750 g.h⁻¹ et vitesse d'agitation = 225 tr.min⁻¹). La Figure IV-6 présente la répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé selon leur taille (respectivement d_1 , d_2 et d_3) en fonction du rapport massique eau/lécithine. Des tendances significatives apparaissent sur ce graphe. Tout d'abord, la proportion de liposomes de taille moyenne (d_2) passe de 20 à 80% lorsque la valeur du rapport massique eau/lécithine dépasse 20. A l'opposé, la proportion de gros liposomes (d_3) décroît dans les mêmes proportions dans cette gamme de valeurs du rapport massique eau/lécithine.

Pour mieux comprendre ces variations, trois valeurs spécifiques du rapport massique eau/lécithine ont été étudiées plus en détail : (i) un rapport massique eau/lécithine de 16 (essai n°4), (ii) un rapport massique eau/lécithine de 21 (essai n°8) et (iii) un rapport massique eau/lécithine de 24 (essai n°9). Les autres paramètres opératoires restant constants pendant ces essais ($P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h⁻¹, débit massique de CO₂ = 750 g.h⁻¹, vitesse d'agitation = 225 tr.min⁻¹ et composition initiale en eau = 26,98%).

Les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure IV-7. La répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction de leur taille est détaillée dans le Tableau IV-2 (essais n°4, 8 et 9). Pour un rapport massique eau/lécithine de 16, la distribution de taille des liposomes est quasiment unimodale et les liposomes ont globalement une taille supérieure à 10 µm ($d_3 = 73,74\%$). La distribution de taille des liposomes formés avec un rapport massique eau/lécithine de 21 est unimodale et la taille des

liposomes est majoritairement comprise entre 1 et 10 μm ($d_2 = 86,71\%$). Pour un rapport massique eau/lécithine de 24, la distribution de taille des liposomes est bimodale ($d_1 = 25,12\%$, $d_2 = 64,77\%$ et $d_3 = 10,12\%$).

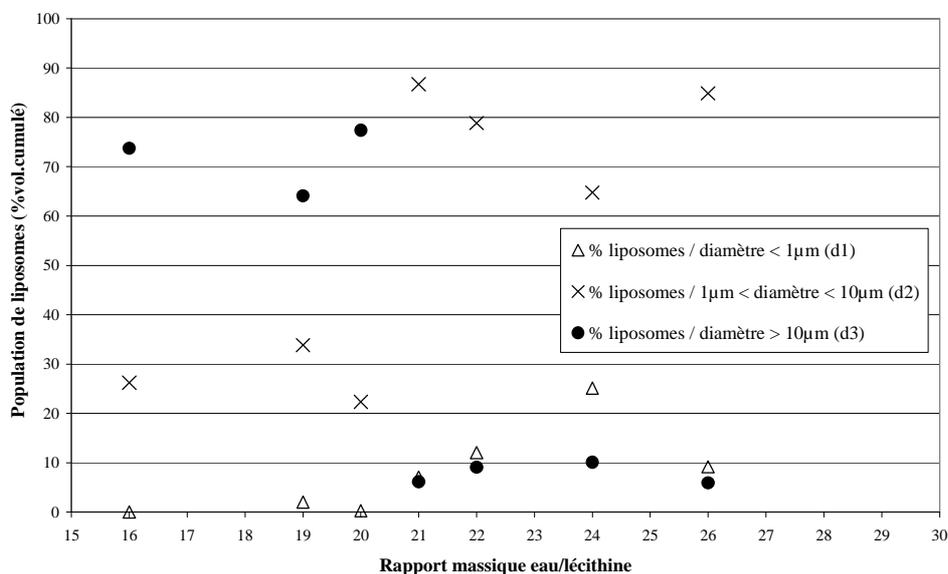


Figure IV-6 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction du rapport massique eau/lécithine pour le procédé semi-batch

Le comportement des phases dans l'autoclave avant la dépressurisation (pour les trois valeurs testées du rapport massique eau/lécithine : 16, 21 et 24) est présenté sur la Figure IV-8. Pour un rapport massique eau/lécithine de 16 (image a), on observe la présence d'une macroémulsion de milieu de phases entre une phase légère riche en CO_2 et une phase riche en eau. La phase aqueuse présente une couleur blanche traduisant la présence de lécithine. Le mélange est plus homogène pour un rapport massique eau/lécithine de 21 (image b). Dans ce cas, la phase aqueuse et l'émulsion de milieu de phases ont fusionné pour former une macroémulsion de couleur blanche. Une phase légère riche en CO_2 est visible dans la partie haute de l'autoclave. Pour un rapport massique eau/lécithine de 24, une grande quantité de la lécithine est concentrée dans une émulsion de milieu de phases (macroémulsion) comprise entre une phase riche en eau et une phase riche en CO_2 . Mais cette fois, la phase riche en eau est bien claire (transparente) ce qui traduit la quasi-absence de lécithine dans l'eau. On peut ainsi conclure qu'un rapport massique eau/lécithine de 21 permet d'obtenir le meilleur mélange des phases dans l'autoclave. Cette valeur sera donc conservée pour la suite.

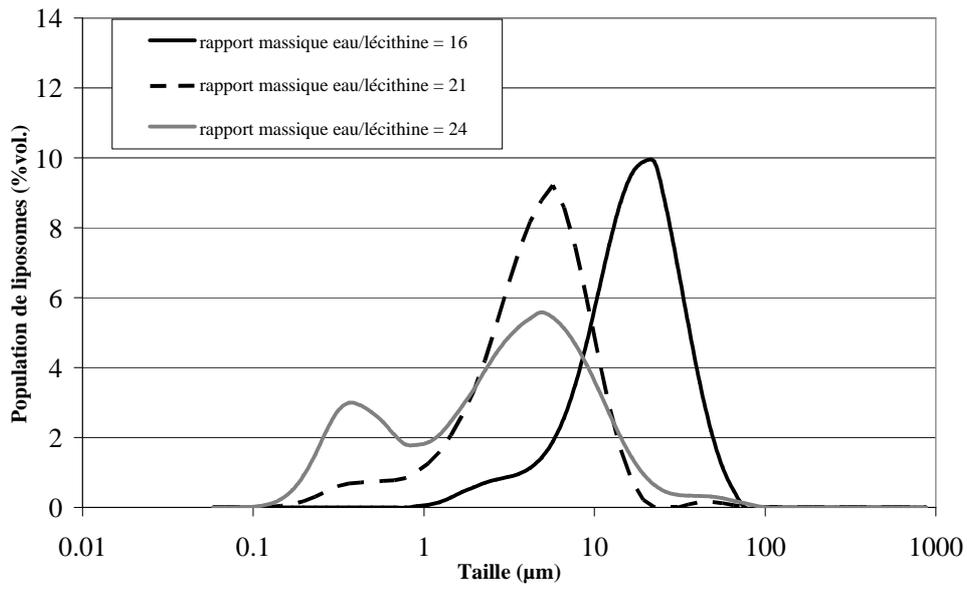


Figure IV-7 - Distribution de taille des liposomes en fonction du rapport massique eau/lécithine pour le procédé semi-batch

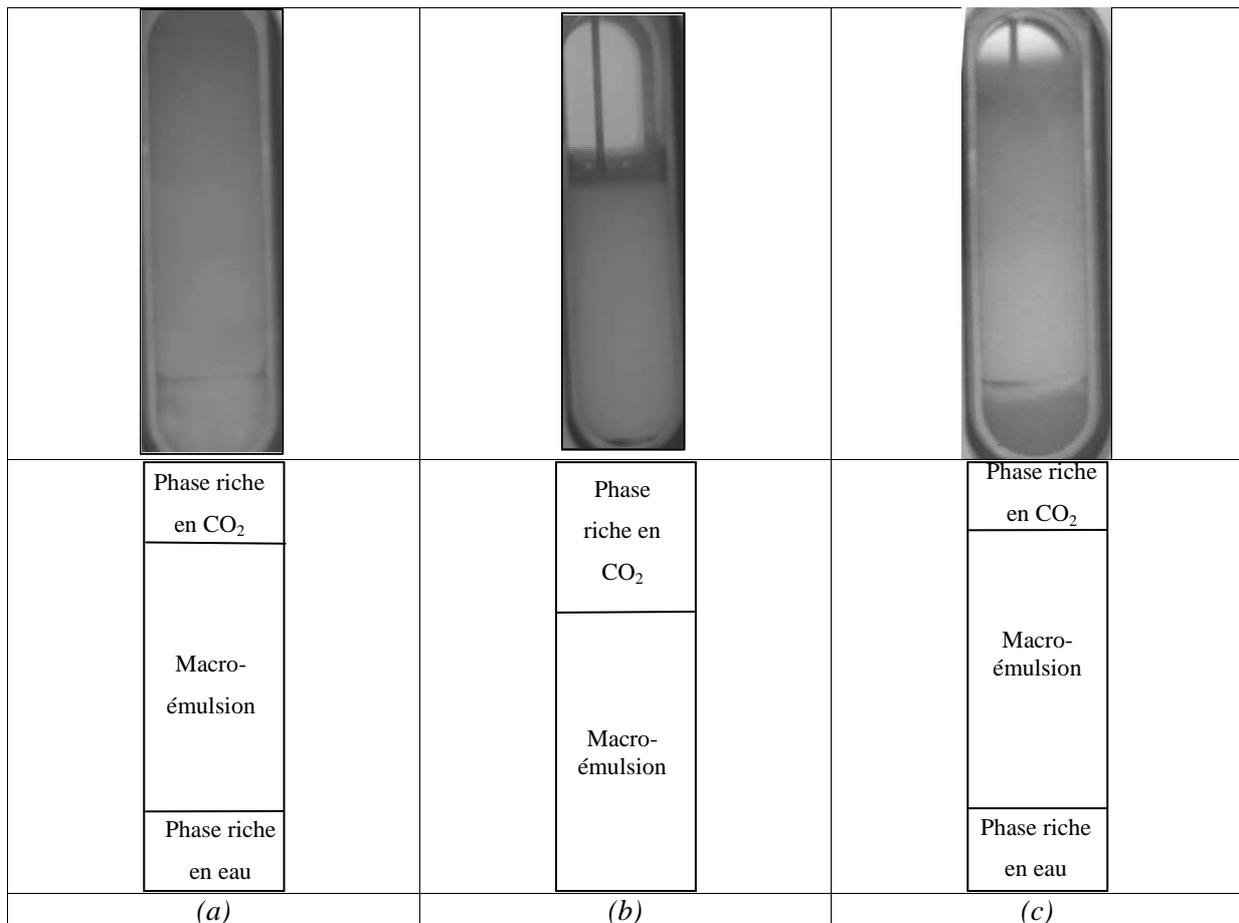


Figure IV-8 - Images du comportement des phases dans l'autoclave juste avant la dépressurisation en fonction du rapport massique eau/lécithine : (a) 16, (b) 21 et (c) 24

IV-2.2.3. La pression

Deux expériences ont été menées pour étudier l'influence de la variation de pression, respectivement à 9 et 12 MPa (essais n°4 et 11). Les autres paramètres opératoires restent constants ($T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de $\text{CO}_2 = 750 \text{ g.h}^{-1}$, vitesse d'agitation = 225 tr.min^{-1} et composition initiale en eau = 26,98%). Les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure IV-9. La répartition des liposomes en pourcentages volumiques cumulés en fonction de leur taille est présentée dans le Tableau IV-2. On observe un déplacement du pic majoritaire vers les petites tailles lorsque la pression augmente. Une augmentation de pression entre 9 et 12 MPa entraîne la formation de liposomes plus petits : $d_2 = 26,22\%$ à 9 MPa et $d_2 = 74,03\%$ à 12 MPa.

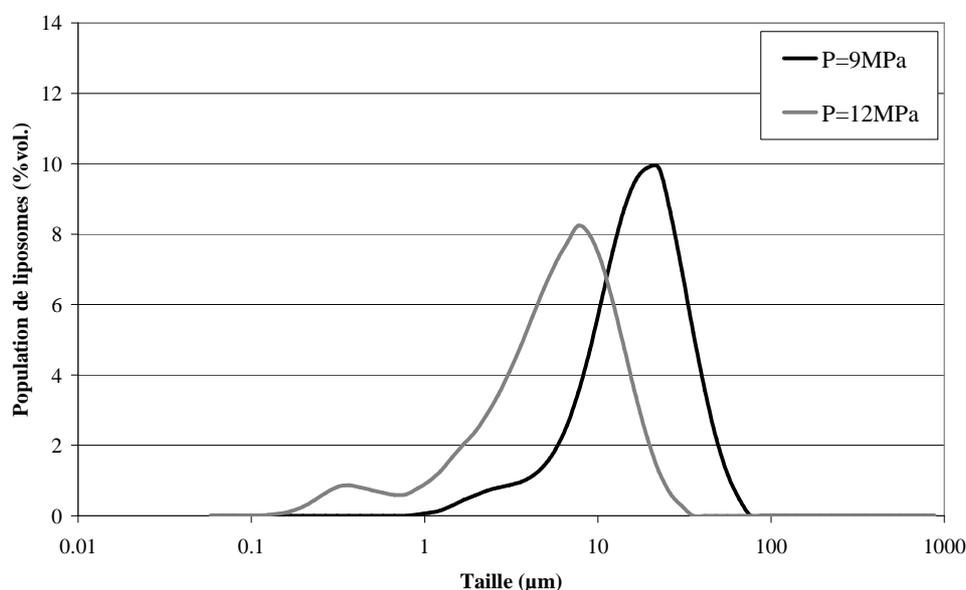


Figure IV-9 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression pour le procédé semi-batch

Il n'existe pas d'autres procédés anti-solvant pour lesquels la phase d'hydratation est réalisée sous pression dans la littérature. Nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats avec les données de la littérature.

IV-2.2.4. La vitesse de dépressurisation

Le procédé semi-batch a été testé en fonction de la vitesse de dépressurisation, respectivement à $0,02$ et $0,2 \text{ MPa.s}^{-1}$ (essais n°12 et 13). Ces valeurs de dépressurisation sont des valeurs macroscopiques, calculées à partir d'un temps de dépressurisation globale. Les autres paramètres opératoires sont maintenus constants pendant ces expériences ($P = 14 \text{ MPa}$,

$T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de $\text{CO}_2 = 750 \text{ g.h}^{-1}$, vitesse d'agitation = 225 tr.min^{-1} et composition initiale en eau = 33,4%). Les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure IV-10. Le détail sur la répartition des liposomes en fonction de leur taille est fourni dans le Tableau IV-2. On s'aperçoit que dans la gamme étudiée, la vitesse de dépressurisation n'a pas d'influence sur la taille des liposomes formés. La même tendance avait déjà été observée par Otake *et al.* [66] pour des vitesses de dépressurisation comprises entre $0,0033$ et $0,2 \text{ MPa.s}^{-1}$ (à 20 MPa et 333 K et avec une concentration de soluté de 0,22% mass.).

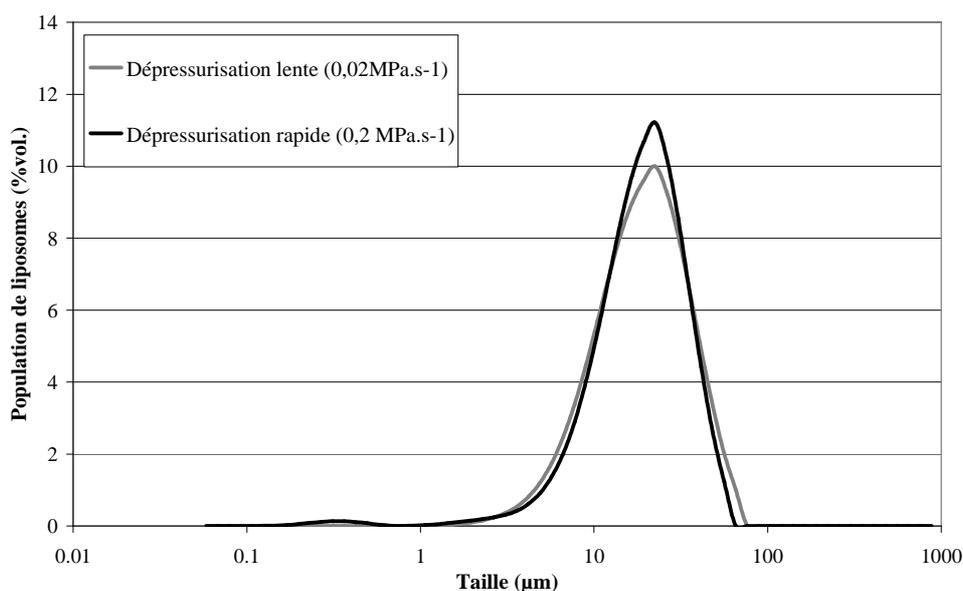


Figure IV-10 – Distribution de taille des liposomes en fonction de la vitesse de dépressurisation pour le procédé semi-batch

IV-2.2.5. Effet du mode d'introduction de la solution organique dans l'autoclave

Dans la plupart des expériences, la formation d'une émulsion de milieu de phases entraîne l'immersion du capillaire dans l'émulsion. Les conditions de dispersion de la solution organique et de mélange des phases (et donc de précipitation) ne sont pas les mêmes que celles classiquement observées en SAS. Nous avons voulu vérifier que la dispersion de la solution organique à l'aide d'un capillaire a une influence significative sur les liposomes formés. Une expérience a été menée sans injection de solution organique (essai n°10) ; la solution organique ayant été préalablement introduite dans l'autoclave, avec la phase aqueuse, avant la montée en pression. La suite du protocole expérimental (la montée en pression à la température souhaitée et l'établissement d'un courant de CO_2) restant semblable. Cette expérience a été comparée à l'essai n°2 ($P = 9 \text{ MPa}$, $T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de

$\text{CO}_2 = 750 \text{ g.h}^{-1}$, vitesse d'agitation = 225 tr.min^{-1} et composition initiale en eau = 33,37%). Les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure IV-11. Il apparaît que l'effet du mode d'introduction de la solution organique dans l'autoclave influence de façon significative la distribution de taille des liposomes. Sans dispersion par jet, la distribution de taille des liposomes est trimodale avec une population majoritaire de taille comprise entre 1 et $10 \mu\text{m}$ ($d_2 = 71,88\%$) et les deux autres populations de tailles comprises entre 0,1 et $1 \mu\text{m}$ ($d_1 = 25,13\%$) et autour de $800 \mu\text{m}$ ($d_3 = 2,99\%$). A l'inverse, avec dispersion par jet, la distribution de taille est pratiquement unimodale et la taille des liposomes est majoritairement incluse entre 1 et $10 \mu\text{m}$ ($d_2 = 78,85\%$).

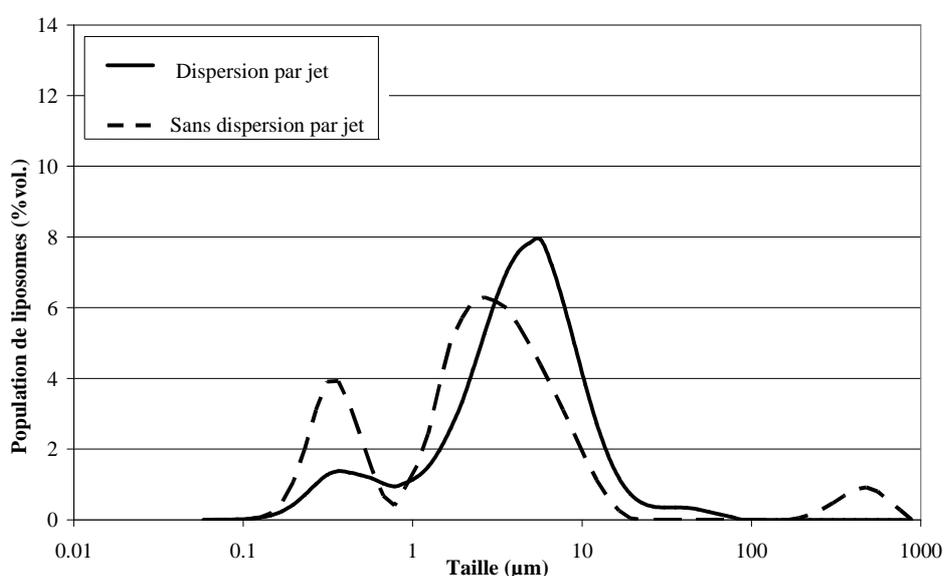


Figure IV-11 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la dispersion par jet pour le procédé semi-batch

Ainsi, même si dans certains cas (selon les conditions opératoires), le jet de solution organique semble être immergé dans une phase de type émulsion, l'effet anti-solvant permet de microniser finement les phospholipides ce qui assure la formation de liposomes avec une distribution de taille unimodale comprise entre 1 et $10 \mu\text{m}$.

IV-2.2.6. Conclusion sur le mode semi-batch

L'étude du procédé en mode semi-batch nous a permis d'étudier le comportement des phases dans l'autoclave et la taille des liposomes produits. On peut noter qu'une tendance se dégage de ces résultats : dans chaque cas, lorsqu'un paramètre opératoire varie, en observant les courbes de distribution de taille, on remarque que le pic de population majoritaire s'affine (distributions plus resserrées) en se déplaçant vers les populations de plus grandes tailles. On

peut observer cette tendance sur la Figure IV-6 (rapport molaire eau/lécithine = 16) et sur la Figure IV-9 ($P = 9$ MPa). Dans ces conditions, le procédé semble mieux maîtrisé.

Au regard des résultats de distribution de taille des liposomes et de comportement des phases dans l'autoclave, une plage de fonctionnement du procédé semi-batch a été définie : une vitesse d'agitation de 225 tr.min^{-1} et un rapport massique eau/lécithine de 21 ($P = 9$ MPa, $T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} et débit massique de $\text{CO}_2 = 750 \text{ g.h}^{-1}$). Ces conditions nous serviront de base pour le développement du procédé en continu.

IV-3. Essais préliminaires du procédé Continuous Anti-Solvent (CAS)

Les expériences en continu ont été menées en tenant compte des essais réalisés sur le procédé en mode semi-batch. Comme expliqué auparavant, deux procédures ont été testées : CAS1 (une sortie) et CAS2 (deux sorties). Ces deux procédures sont évaluées en fonction de la distribution de taille des liposomes et du comportement des phases dans l'autoclave.

Le Tableau IV-3 présente les valeurs des paramètres opératoires pour chaque essai réalisé en mode continu (CAS1 ou CAS2) et les résultats obtenus en termes de tailles de liposomes (protocole de détermination de la taille des liposomes détaillé dans le paragraphe III-1.3.2.2).

Tableau IV-3 - Conditions expérimentales testées pour le procédé CAS et taille des liposomes formés

Essai N°	Procédure	P / MPa	m ₀ / g	Débit de CO ₂ / g.h ⁻¹	Débit d'eau / mL.h ⁻¹	d ₁ / %	d ₂ / %	d ₃ / %
14	CAS1	9	158	300	180	0,03	11,42	88,56
15	CAS2	9	150	750	180	13,91	71,81	14,28
16	CAS1	9	158	300	180	0,26	16,59	83,15
17	CAS1	9	158	300	180	0,00	19,62	80,38
18	CAS1	9	120 (*)	350	150	22,34	74,47	3,20
19	CAS1	12	120 (*)	350	150	27,49	69,97	2,54
20	CAS1	20	120 (*)	350	150	18,11	81,89	0,00

d₁ : Pourcentage de liposomes / diamètre < 1,00 μm (pourcentage volumique cumulé)

d₂ : Pourcentage de liposomes / 1,00 μm < diamètre < 10,00 μm (pourcentage volumique cumulé)

d₃ : Pourcentage de liposomes / diamètre > 10,00 μm (pourcentage volumique cumulé)

(*) Utilisation de l'autoclave sans fenêtres dit "fermé"

IV-3.1. Procédé CAS1

Des essais ont été conduits avec la procédure CAS1 (une seule sortie). Le contrôle du procédé est effectué manuellement. Tout d'abord, l'autoclave est fermé et la solution organique est injectée alors que la phase aqueuse est agitée. Au bout d'un temps considéré comme suffisant pour obtenir une émulsion homogène et blanche dans la partie basse de l'autoclave (temps estimé à 10 min), la vanne de sortie est ouverte. Cette vanne permet à la fois de régler le débit de CO₂ et de régler le débit de soutirage de la suspension liposomiale. Le premier réglage consiste à ouvrir cette vanne pour fixer le débit de CO₂. Ensuite, l'injection d'eau est ajustée en fonction du niveau de l'émulsion dans l'autoclave. Ce régime est maintenu pendant environ 20 min. Dans cette étude, nous tendons vers un équilibre.

La distribution de taille des liposomes obtenus pour l'essai n°14 ($P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h⁻¹, débit massique de CO₂ = 300 g.h⁻¹, vitesse d'agitation = 225 tr.min⁻¹, masse d'eau initialement placée dans l'autoclave = 158 g et débit d'eau = 180 mL.h⁻¹) est présentée sur la

Figure IV-12. Les détails sur la répartition des liposomes en fonction de leur taille sont fournis dans le Tableau IV-3. La distribution de taille est unimodale et la proportion de liposomes de grandes tailles (comprises entre 10 et 100 μm) est importante : $d_3 = 88,56\%$.

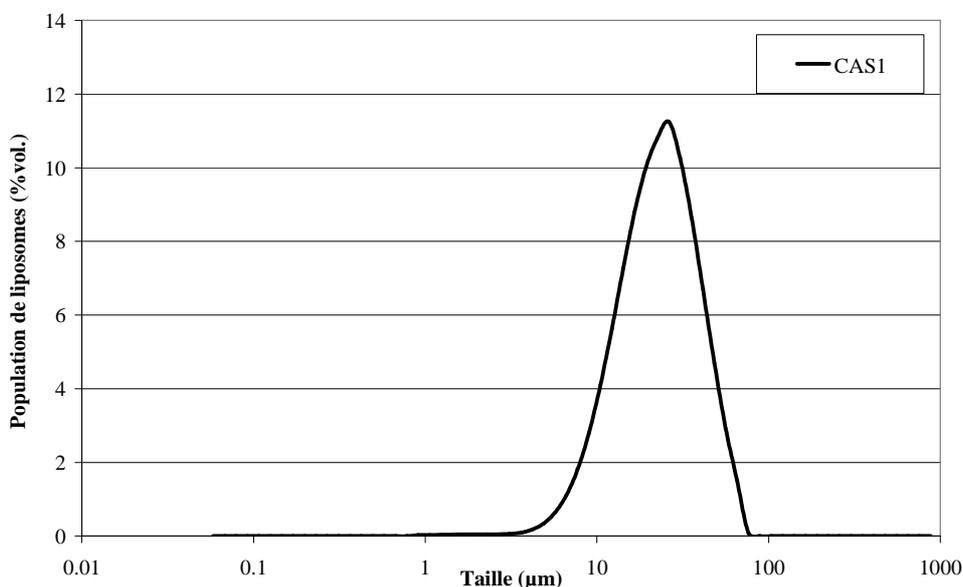


Figure IV-12 - Distribution de taille des liposomes pour le procédé continu CAS1

Le comportement du mélange dans l'autoclave au cours de l'injection est présenté sur la Figure IV-13. Une macroémulsion CO_2 -dans-eau (blanche et homogène) se forme dès le début de l'injection et cet équilibre macroémulsion CO_2 -dans-eau (dans la partie basse de l'autoclave)/phase fluide riche en CO_2 (dans la partie haute de l'autoclave) reste stable pendant toute la durée de l'injection. Le procédé CAS1 permet donc d'obtenir un mélange efficace des phases dans l'autoclave. Et, dans ces conditions, des liposomes avec des distributions de taille unimodales sont formés.

En fonctionnement manuel, l'utilisation d'un autoclave à fenêtres permet de contrôler le débit d'injection de l'eau en fonction du niveau de la macroémulsion dans l'autoclave.

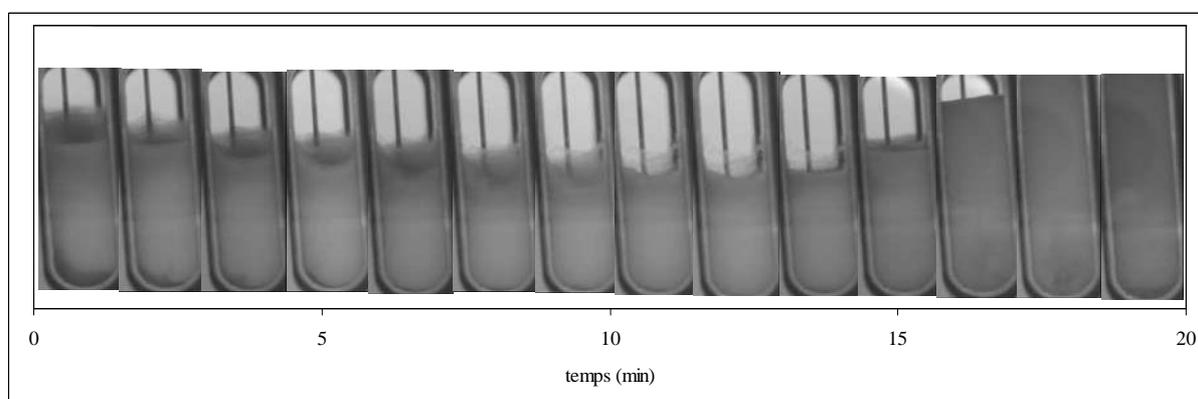


Figure IV-13 – Evolution des phases dans l'autoclave au cours de l'injection pour le procédé CAS1

IV-3.2. Procédé CAS2

Des essais ont été menés avec la procédure CAS2 (2 sorties). Cette fois, le débit de CO₂ est directement fixé (sortie du CO₂ par le haut de l'autoclave). La solution organique est injectée alors que la phase aqueuse est agitée. Une fois que le mélange obtenu dans la partie basse de l'autoclave est bien blanc et homogène (temps estimé à environ 10 min), la vanne de sortie (contrôlant le soutirage de la suspension liposomiale) est ouverte. Son ouverture est déterminée afin d'obtenir un soutirage jugé suffisant et compensé par l'injection d'eau. Ce régime est maintenu pendant environ 20 min. Encore une fois, il est important de souligner que dans cette étude, nous tendons vers un équilibre.

La distribution de taille des liposomes obtenus pour l'essai n°15 ($P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h⁻¹, débit massique de CO₂ = 750 g.h⁻¹, vitesse d'agitation = 225 tr.min⁻¹, masse d'eau initialement placée dans l'autoclave = 158 g et débit d'eau = 180 mL.h⁻¹) est présentée sur la Figure IV-14. Les détails sur la répartition des liposomes en fonction de leur taille sont fournis dans le Tableau IV-3. CAS2 permet de former des liposomes avec une distribution de taille bimodale. La majorité de ces liposomes a une taille comprise entre 1 et 10 μm ($d_2 = 71,81\%$).

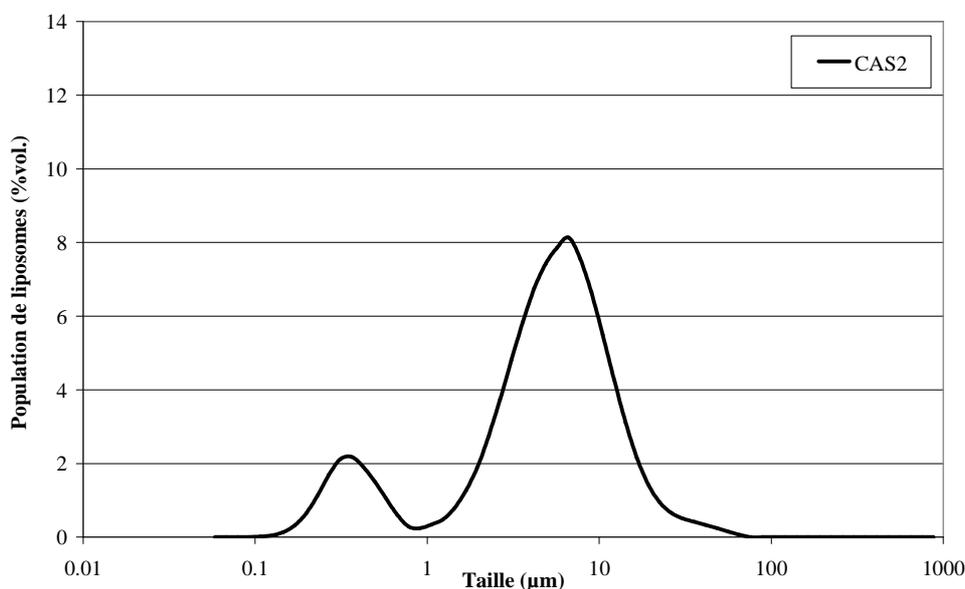


Figure IV-14 - Distribution de taille des liposomes pour le procédé continu CAS2

La visualisation du comportement des phases dans l'autoclave au cours de l'injection est pratiquement semblable au comportement décrit pour le procédé en mode semi-batch (Figure IV-15).

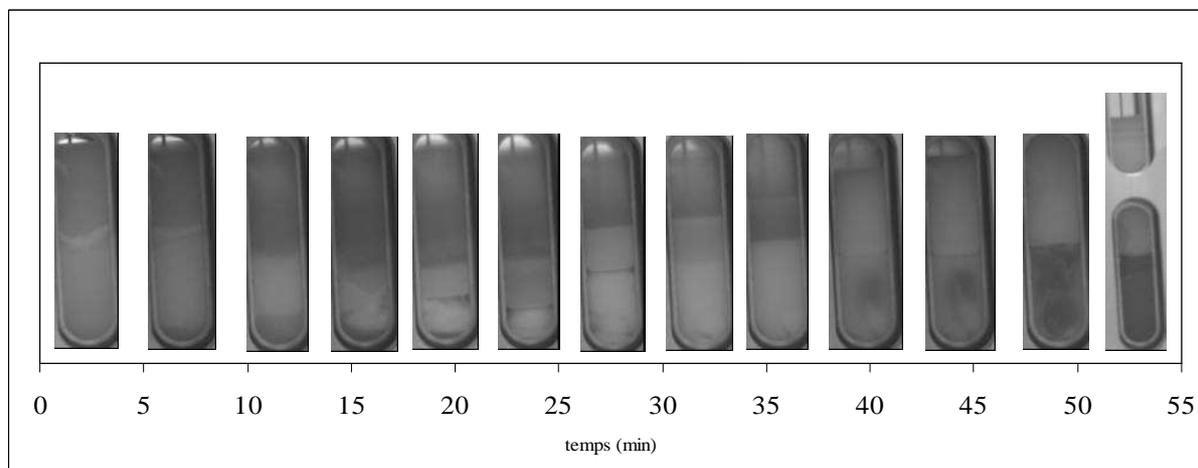


Figure IV-15 - Evolution des phases dans l'autoclave au cours de l'injection pour le procédé CAS2

Des changements de phase significatifs sont observés dans l'autoclave au cours de l'injection de la solution organique dans l'autoclave. On peut en conclure que le régime permanent n'est pas atteint pendant la durée de l'injection. Et finalement, les liposomes obtenus ne présentent pas une distribution de taille unimodale.

L'un des points faibles de la configuration CAS2 réside dans le fait que la sortie du CO₂ est placée à côté de l'entrée de CO₂ sur l'extrémité supérieure de l'autoclave. Cela ne permet pas un bon brassage de la phase aqueuse par le courant de CO₂.

IV-3.3. Discussion

Dans les deux configurations testées (CAS1 et CAS2), les phospholipides sont micronisés selon le principe du procédé SAS et les particules micronisées sont directement mélangées avec la phase aqueuse au sein de l'autoclave. D'après les résultats obtenus, le procédé CAS1 apparaît être le procédé le plus efficace car il permet d'obtenir un mélange blanc et homogène dans l'autoclave et ce, durant toute la durée de la phase continue du procédé. Les liposomes formés par le procédé CAS1 ont une distribution de taille unimodale comprise entre 10 et 100 μm . Entre les deux procédures testées CAS1 et CAS2, une étude plus approfondie du procédé CAS1 va être présentée.

IV-4. Développements autour du procédé CAS

D'autres essais ont été conduits sur le procédé CAS pour étudier, tout d'abord, la reproductibilité du procédé. L'influence de la pression a également été étudiée. La morphologie des liposomes formés par le procédé CAS a été observée avec un microscope optique à contraste de phase (appareil et méthode présentés dans le paragraphe III-1.3.2.1 du Chapitre III).

IV-4.1. Reproductibilité

La Figure IV-16 présente les distributions de taille des liposomes obtenus lors des essais de reproductibilité (essais n°14, 16 et 17 : $P = 9$ MPa, $T = 308$ K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de $\text{CO}_2 = 300 \text{ g.h}^{-1}$, vitesse d'agitation = 225 tr.min^{-1} , masse d'eau initialement placée dans l'autoclave = 158 g et débit d'eau = 180 mL.h^{-1}).

Il apparaît que les liposomes ont une taille comprise entre 10 et 100 μm . Les essais sont parfaitement reproductibles. Le contrôle manuel de l'injection d'eau et du soutirage de l'émulsion présente dans l'autoclave (émulsion qui formera une suspension liposomiale lors de la dépressurisation) par visualisation directe permet d'obtenir un bon niveau de reproductibilité. La reproductibilité du procédé CAS est validée.

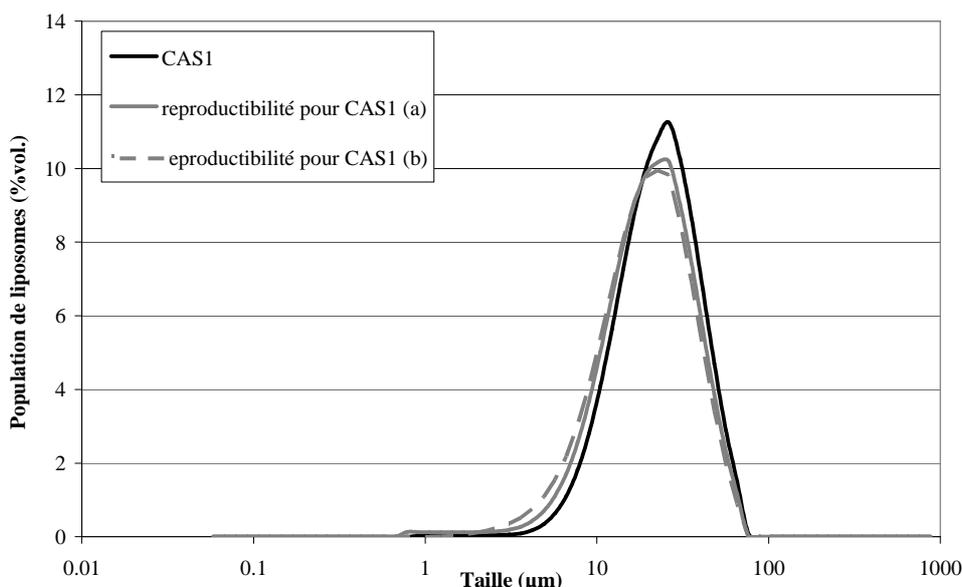


Figure IV-16 – Essais de reproductibilité sur la distribution de taille des liposomes pour le procédé CAS

IV-4.2. Influence des variations de la pression sur le procédé CAS

Trois essais ont été réalisés pour tester l'influence de la pression à 9, 12 et 20 MPa (soit respectivement les essais n°18, 19 et 20). Les autres paramètres opératoires restant constants ($T = 308 \text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h^{-1} , débit massique de $\text{CO}_2 = 350 \text{ g.h}^{-1}$, vitesse d'agitation = 225 tr.min^{-1} , masse d'eau initialement placée dans l'autoclave = 120 g et débit d'eau = 150 mL.h^{-1}).

Ces essais ont été réalisés dans un autoclave sans fenêtres (autoclave dit « fermé »). L'autoclave utilisé précédemment, muni de fenêtres, possède un volume de 763 cm^3 , alors que l'autoclave utilisé pour ces essais, autoclave dit « fermé », a un volume de 650 cm^3 . Nous avons conservé le même capillaire d'injection pour la solution organique ; donc, le débit d'injection de la solution organique n'a pas changé. Les débits d'eau et de CO_2 ont été ajustés pour être à nombre de Reynolds constant. Les temps d'injection sont identiques entre les deux autoclaves.

Les distributions de taille des liposomes sont présentées sur la Figure IV-17. Les détails sur la répartition des liposomes en fonction de leur taille sont présentés dans le Tableau IV-3.

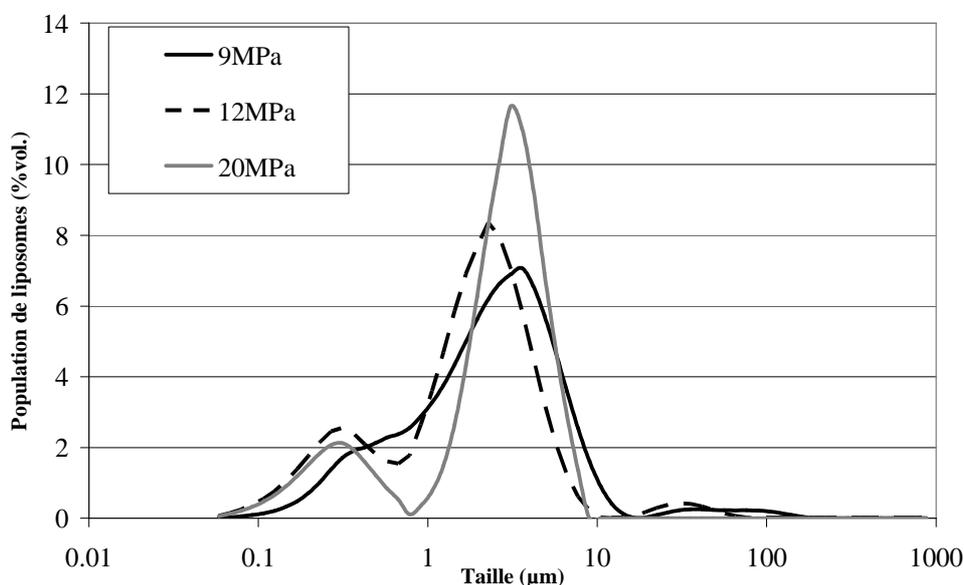


Figure IV-17 – Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression pour le procédé CAS

Les courbes de distribution de taille présentées sur la Figure IV-17 sont pratiquement bimodales. Entre 1 et 10 μm , la population de liposomes varie avec la pression de la façon suivante : $d_2 = 74,47\%$ à 9 MPa (essai n°18), $d_2 = 69,97\%$ à 12 MPa (essai n°19) et

$d_2 = 81,89\%$ à 20 MPa (essai n°20). On peut également noter les variations suivantes entre 0,1 et 1 μm : $d_1 = 22,34\%$ à 9 MPa (essai n°18), $d_1 = 27,49\%$ à 12 MPa (essai n°19) et $d_1 = 18,11\%$ à 20 MPa (essai n°20). Les liposomes ont majoritairement une taille comprise entre 1 et 10 μm . Aucune tendance ne ressort de ces résultats : l'influence de la pression sur la distribution de taille des liposomes formés par le procédé CAS n'est pas significative.

Cependant, au niveau de la gamme de taille des liposomes, les essais réalisés en autoclave dit « fermé » (essais n°18, 19 et 20) ne donnent pas les mêmes résultats que les essais réalisés avec l'autoclave muni de fenêtres (essais n°14, 16 et 17). Avec l'autoclave dit « fermé », les liposomes formés par le procédé CAS ont une taille comprise entre 1 et 10 μm (Figure IV-17), alors qu'avec l'autoclave muni de fenêtres, les liposomes formés ont une taille comprise entre 10 et 100 μm (Figure IV-16). Ces essais ne sont pas comparables car les conditions opératoires ne sont pas les mêmes. Cela montre que le procédé CAS permet de former des liposomes avec une taille comprise entre 1 et 10 μm ou entre 10 et 100 μm selon les conditions opératoires

IV-4.3. Etude de la morphologie des liposomes formés par le procédé CAS

Des liposomes formés avec le procédé continu et en une étape CAS ($P = 9\text{MPa}$, $T = 308\text{ K}$, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = $240\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, débit massique de $\text{CO}_2 = 300\text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$, vitesse d'agitation = $225\text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$, masse d'eau initialement placée dans l'autoclave = 150 g et débit d'eau = $180\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$) ont été observés avec un microscope optique à contraste de phase (protocole détaillé dans le paragraphe III-1.3.2.1).

Les images obtenues sont présentées sur la Figure IV-18. Les images choisies montrent des liposomes représentatifs de l'échantillon (pour rappel : deux prélèvements d'une même suspension ont été analysés et pour chaque prélèvement, au moins cinq liposomes ont été observés). Ces liposomes sont sphériques et leur membrane est épaisse. La largeur d'une bicouche phospholipidique mesurant quelques nanomètres et vue l'épaisseur de la membrane des liposomes observés, il apparaît que ces liposomes sont multilamellaires. Pour chaque image, on observe la présence d'une multitude de petits liposomes entourant un gros liposome central (rapport des diamètres : 1/20). Les tailles des liposomes formés par le procédé CAS sont comprises entre 10 et 100 μm (Figure IV-16) ce qui peut expliquer cette grande disparité entre les tailles des liposomes présents sur les images de la Figure IV-18.

En considérant les images des liposomes formés avec le procédé SAS (Chapitre III - Figure III-7), on remarque que la taille des liposomes est plus homogène dans le cas du procédé SAS que dans le cas du procédé CAS. On remarque également que la membrane des liposomes formés par hydratation de phospholipides divisés par le procédé SAS est plus épaisse que celle des liposomes formés par le procédé CAS. Cependant, ces expériences ont été réalisées dans des conditions opératoires différentes et ne sont donc pas comparables (la concentration en lécithine dans l'eau est égale à $0,013 \text{ g.mL}^{-1}$ pour le procédé SAS et $0,063 \text{ g.mL}^{-1}$ pour le procédé CAS).

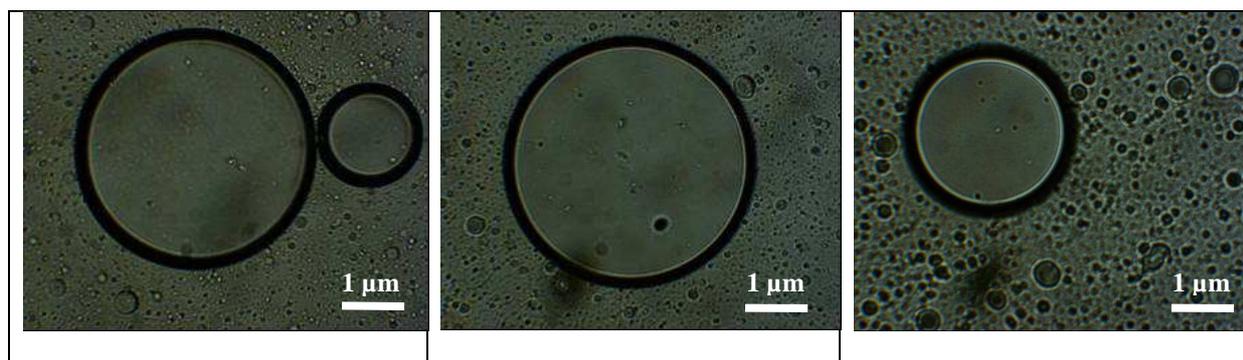


Figure IV-18 – Images obtenues au microscope optique à contraste de phase pour le procédé CAS

IV-4.4. Elimination de l'éthanol présent dans la suspension liposomiale

Une partie de l'éthanol présent dans la solution organique atomisée se retrouve dans la phase aqueuse présente dans le fond de l'autoclave. La suspension liposomiale formée lors de la dépressurisation contient donc de l'éthanol.

L'objectif de cette section est de proposer un procédé pour éliminer l'éthanol de la suspension liposomiale sans dénaturer les liposomes.

Un procédé de séparation membranaire appelé diafiltration, c'est-à-dire filtration à volume constant, pourrait être mis en œuvre pour laver la suspension liposomiale. Le schéma du montage expérimental (schéma simplifié dans le cadre d'une étude de faisabilité) est présenté sur la Figure IV-19.

Dans ce procédé, le solvant dans lequel se trouvent initialement les liposomes (solvant constitué d'un mélange d'eau et d'éthanol) est progressivement remplacé par un solvant pur (l'eau dans notre cas). La séparation membranaire est réalisée grâce à une cellule de diafiltration (Figure IV-19) dans laquelle a été préalablement placée la suspension liposomiale

(cellule de volume 400 mL). Le perméat est constitué d'une solution d'eau et d'éthanol. Le seuil de coupure de la membrane (50 kD) a été déterminé en fonction du diamètre des liposomes. La surpression en amont de la membrane dans la cellule est assurée par poussée grâce à une entrée d'air comprimé à 0,2 MPa. Une agitation douce (100 tr. min^{-1}) par un barreau aimanté empêche la formation d'une couche de polarisation (colmatage) à la surface de la membrane. La masse de perméat est évaluée en temps réel grâce à une balance. Un chronomètre est utilisé pour mesurer le temps de filtration.

Le titre de dilution est déterminé par analyse chromatographique afin d'éliminer totalement l'éthanol. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-20. Il apparaît qu'au bout de 4 lavages, l'éthanol n'est plus détecté par l'analyseur. Un compteur à particules a été utilisé pour déterminer le nombre de liposomes présent dans la suspension avant et après le procédé de diafiltration. Cette expérience a permis de montrer que les liposomes n'avaient pas été dénaturés au cours du procédé de diafiltration.

La diafiltration pourrait donc être mise en œuvre pour traiter la suspension liposomiale formée par le procédé CAS.

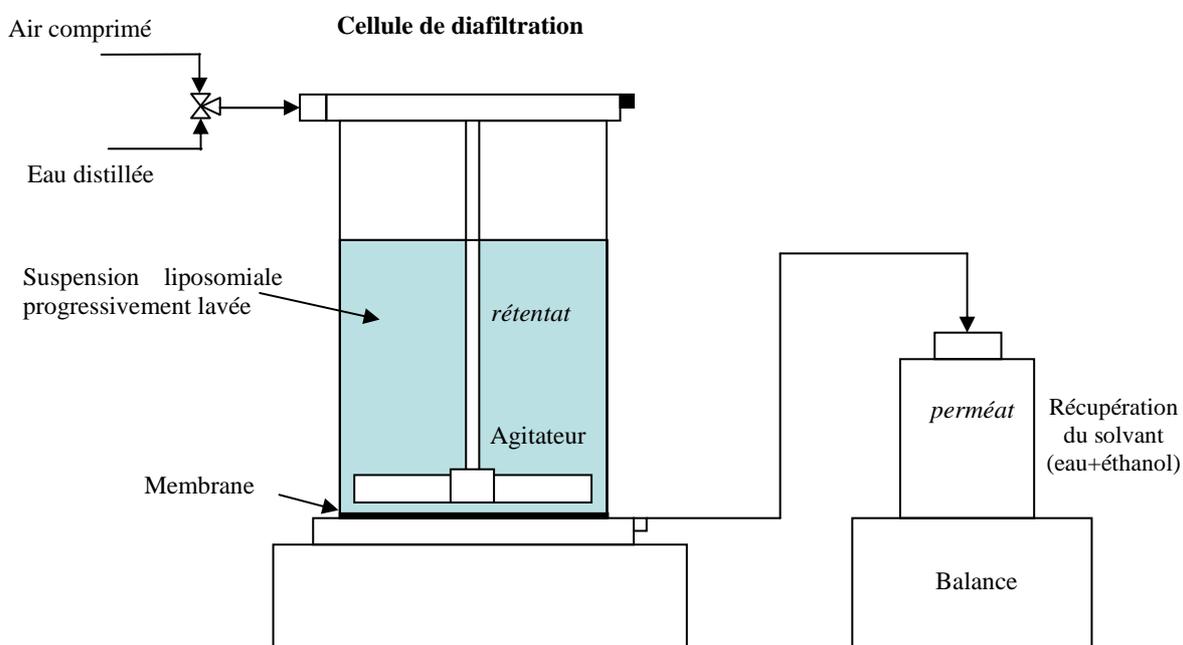


Figure IV-19 – Schéma du procédé de diafiltration

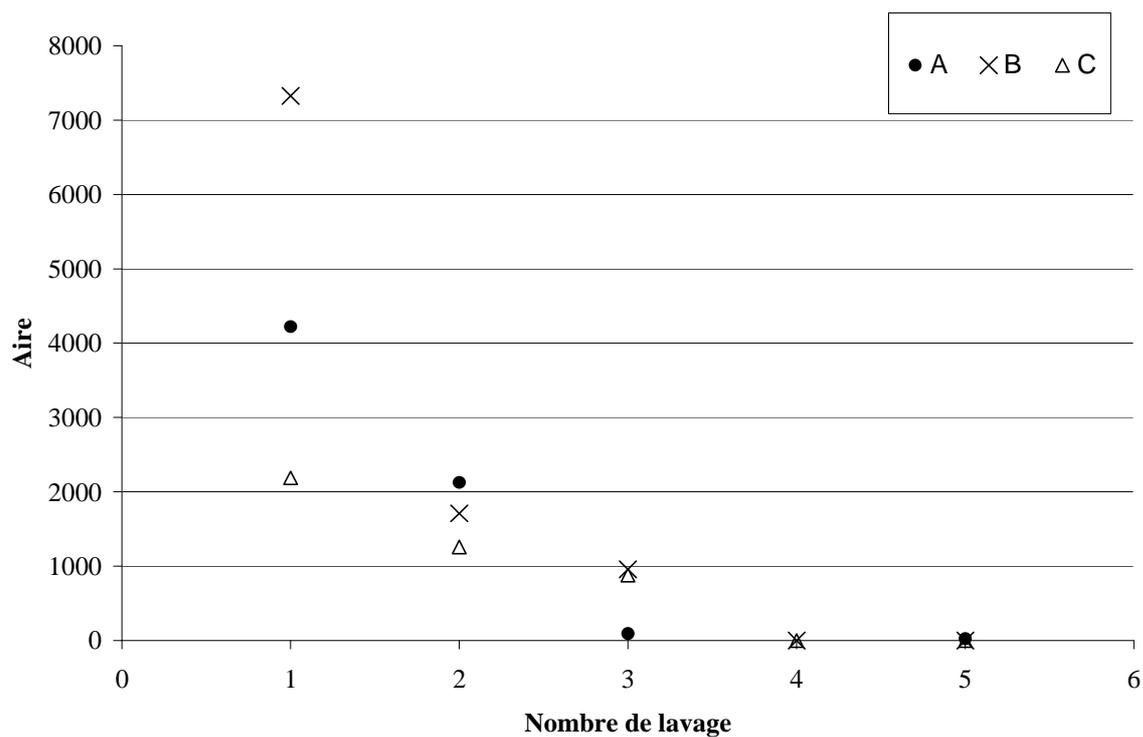


Figure IV-20 – Evolution de l'aire sous la courbe représentative du composé éthanol obtenu par analyse chromatographique (A, B et C représentent trois échantillons testés dans les conditions détaillées précédemment)

IV-5. Conclusion

Un procédé supercritique innovant a été mis au point pour former des liposomes : le procédé Continuous Anti-Solvent (CAS). Ce procédé est basé sur le procédé SAS ; mais cette fois, la lécithine de soja micronisée est directement mélangée avec la phase aqueuse dans l'autoclave sous pression. Les risques de dénaturation du matériel micronisé sont donc éliminés.

Innovant car continu et en une seule étape, le procédé CAS a permis de former de manière reproductible des liposomes sphériques et multilamellaires avec des diamètres compris entre 10 et 100 μm .

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'est articulé autour de quatre axes :

- Une première synthèse bibliographique.
- Une seconde étude bibliographique portant sur le comportement du système ternaire CO₂/eau/surfactant et visant à comprendre les mécanismes de formation des liposomes mis en jeu dans les procédés supercritiques.
- Une étude expérimentale comparative entre un procédé supercritique de micronisation de la lécithine de soja utilisé pour former des liposomes et une méthode conventionnelle de formation des liposomes (la méthode de Bangham).
- Une étude expérimentale sur la mise au point du procédé innovant.

La première synthèse bibliographique présente les enjeux de ce sujet de recherche qui a consisté à travailler à la fois avec des procédés haute pression utilisant des fluides supercritiques, mais également à manipuler des liposomes qui sont des systèmes dynamiques complexes.

La seconde synthèse bibliographique propose une nouvelle approche des procédés supercritiques de formation des liposomes au regard du comportement du système ternaire CO₂/eau/surfactant sous pression. L'importance de la mise en contact des phases dans l'autoclave est étudiée en détail. Ce travail a fait l'objet d'une publication [102] sous la forme d'une review.

La première partie expérimentale vise à comparer deux procédés de formation des liposomes : le procédé supercritique SAS et la méthode conventionnelle de Bangham. Dans les deux cas, ces procédés s'opèrent en deux étapes avec une phase de traitement de la lécithine de soja (source de phospholipides) et une phase d'hydratation avec agitation (phase réalisée à température et pression ambiantes et commune aux deux méthodes). Le procédé SAS permet de microniser la lécithine de soja brute avec du CO₂ supercritique. La méthode conventionnelle de Bangham assure la comminution de la lécithine de soja en utilisant des solvants organiques souvent toxiques et un système d'évaporation à température élevée

(323 K). Il apparaît que le procédé SAS permet de former de façon reproductible des liposomes sphériques, de tailles majoritairement comprises entre 0,1 et 1 μm avec des efficacités d'encapsulation comprise entre 10 et 20%. A l'inverse, en utilisant l'éthanol comme solvant, la méthode conventionnelle de Bangham n'est pas reproductible (dans les conditions testées) et les liposomes formés ne sont pas tous sphériques ce qui rend difficile leur caractérisation. De plus, la méthode de Bangham a souvent été étudiée sur de petits volumes et il existe peu d'éléments concernant son extrapolation.

Une étude plus poussée du procédé SAS se justifie et c'est pourquoi, l'influence de la variation des paramètres opératoires sur le procédé SAS a ensuite été étudiée. Des caractérisations ont été effectuées à la fois sur la lécithine micronisée et sur les liposomes formés. Il apparaît que des variations de pression (entre 9 et 13 MPa) et de rapport molaire $\text{CO}_2/\text{solvant}$ (au-delà de 60) n'ont qu'une faible influence sur la lécithine micronisée. A l'inverse, des variations de concentration en soluté (entre 15 et 25% massique) influent fortement sur les caractéristiques de la lécithine micronisée (la taille des particules augmente lorsque la concentration augmente). Concernant les caractéristiques des liposomes formés, les résultats obtenus ne sont pas significatifs. La phase d'hydratation réalisée sous fort cisaillement influence fortement l'organisation des phospholipides dans l'eau. Ce travail a donné lieu à une publication [99].

Enfin, la quatrième partie de ce manuscrit présente la mise au point d'un procédé innovant. Innovant car continu et en une seule étape, ce procédé repose sur l'idée d'un couplage entre le procédé supercritique anti-solvant SAS et la phase d'hydratation/agitation. Ce procédé se nomme ainsi Continuous Anti-Solvant (CAS). Il a d'abord été testé en mode semi-batch afin de déterminer un point de fonctionnement permettant un mélange efficace des différentes phases présentes dans l'autoclave. Ensuite, deux procédures ont été testées pour le fonctionnement en mode continu : CAS1 à une sortie et CAS2 à deux sorties. La procédure à une seule sortie (CAS1 appelée CAS) a été retenue pour des développements ultérieurs. Le procédé CAS a permis de former de façon reproductible des liposomes sphériques, multilamellaires et de tailles comprises entre 10 et 100 μm .

Comme il l'a déjà été souligné, l'association CO₂ supercritique et liposomes était un projet ambitieux et difficile. En effet, malgré tous les avantages des procédés utilisant du CO₂ supercritique, les liposomes produits constituaient une nouvelle difficulté en soi tant par leur instabilité que par le difficile choix des matières premières et des méthodes de caractérisation.

Pour conclure sur ce travail de recherche, l'objectif a été atteint avec la mise au point d'un procédé supercritique innovant de formation de liposomes. Innovant car continu et en une seule étape, le procédé CAS a fourni des résultats prometteurs. Des verrous scientifiques ont ainsi été levés. Ce travail a soulevé de nombreuses perspectives.

De manière générale, pour le procédé SAS ou pour le procédé CAS, il serait utile de tester l'ajout de composés à la lécithine de soja pour améliorer la stabilité des liposomes formés ou bien de tester des méthodes de conservation des liposomes plus performantes. Il serait également utile de réaliser l'hydratation des phospholipides micronisés par le procédé SAS à plus haute température (au-dessus de la température de transition de phase des phospholipides) afin d'effectuer des comparaisons avec les résultats présentés dans le Chapitre III en termes de morphologie, taille, efficacité d'encapsulation et stabilité des liposomes formés.

Afin de compléter le travail sur le procédé CAS, il serait intéressant de poursuivre les investigations sur l'influence de la variation des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques des liposomes formés avec un montage expérimental plus instrumenté et automatisé (contrôle de la pression et des débits).

Il pourrait également être entrepris une étude plus approfondie sur l'utilisation de la diafiltration pour éliminer l'éthanol présent dans la suspension liposomiale.

Enfin, cette étude n'a pas abordé le problème de changement d'échelle du procédé CAS. Les points à étudier pour envisager cette étape sont le calcul des consommations de fluides, le choix d'une technique de recyclage et de purification des solvants, le choix d'un mode de collecte des suspensions/particules et enfin, le choix du mode d'introduction des phases. Ce travail s'avère essentiel pour le développement futur du procédé CAS.

Par ailleurs, cette étude était focalisée sur la mise au point du procédé mais il faudrait à présent travailler sur l'encapsulation d'un composé avec une réelle valeur ajoutée.

Afin d'élargir le champ d'application du procédé CAS, on pourrait imaginer remplacer l'injection de la solution organique de phospholipides par l'injection d'une solution organique d'un soluté à cristalliser. Les microparticules formées seraient stables en solution et cela permettrait de les conserver. Il serait ainsi possible de s'affranchir de la manipulation de

nanoparticules ; manipulation qui pose souvent des problèmes. L'utilisation du procédé CAS pourrait donc toucher de nombreux domaines.

Bibliographie

- [1] C. Magnan, Etude de la micronisation de phospholipides par fluides supercritiques, Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III (1998) France.
- [2] A. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 238-252.
- [3] A. Bangham, M. M. Standish and G. Weissmann, The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations, *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 253-259.
- [4] C. Magnan, E. Badens, N. Commenges and G. Charbit, Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent -- influence of process parameters, *The Journal of Supercritical Fluids*. 19 (2000) 69-77.
- [5] C. Cagnard de la Tour, Sur les effets qu'on obtient par application simultanée de la chaleur et de la compression à certains liquides, *Annales de Chimie*. 23 (1823) 410-415.
- [6] T. Andrews, On the continuity of the gaseous and liquid states of matter, *Nature*. 2 (1870) 278-281.
- [7] K. Zosel, Process for decaffeination of coffee, U.S Patent 4260639. (1981).
- [8] J. Galy, K. Sawada, B. Fournel, P. Lacroix-Desmazes, S. Lagerge and M. Persin, Decontamination of solid substrates using supercritical carbon dioxide - application with trade hydrocarbonated surfactants, *Journal of Supercritical Fluids*. 42 (2007) 69-79.
- [9] S. Abd El-Fatah, M. Goto, A. Kodama and T. Hirose, Supercritical fluid extraction of hazardous metals from CCA wood, *The Journal of Supercritical Fluids*. 28 (2004) 21-27.
- [10] K. Nguyen, P. Barton and J. S. Spencer, Supercritical carbon dioxide extraction of vanilla, *The Journal of Supercritical Fluids*. 4 (1991) 40-46.
- [11] L. Calvo, B. Muguerza and E. Cienfuegos-Jovellanos, Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO₂, *The Journal of Supercritical Fluids*. 42 (2007) 80-87.
- [12] K. Mishima, Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2008) 411-432.
- [13] E. Shieh, A. Paszczyński, C. M. Wai, Q. Lang and R. L. Crawford, Sterilization of *Bacillus pumilus* spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions, *Journal of Microbiological Methods*. 76 (2009) 247-252.
- [14] E. Reverchon, M. Cleofe Volpe and G. Caputo, Supercritical fluid processing of polymers: composite particles and porous materials elaboration, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 7 (2003) 391-397.
- [15] Y. Shimoyama, Y. Ogata, R. Ishibashi and Y. Iwai, Drying processes for preparation of titania aerogel using supercritical carbon dioxide, *Chemical Engineering Research and Design*. 88 (2010) 1427-1431.

- [16] M. R. De Giorgi, E. Cadoni, D. Maricca and A. Piras, Dyeing polyester fibres with disperse dyes in supercritical CO₂, *Dyes and Pigments*. 45 (2000) 75-79.
- [17] M. D. Bermejo and M. J. Cocero, Supercritical water oxidation: A technical review, *AIChE Journal*. 52 (2006) 3933-3951.
- [18] J. Fages, H. Lochard, J.-J. Letourneau, M. Sauceau and E. Rodier, Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology, *Powder Technology*. 141 (2004) 219-226.
- [19] M. Perrut and J. Y. Clavier, Supercritical Fluid Formulations : Process Choice and Scale-up, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 42 (2003) 6375-6383.
- [20] R. Podlipec and J. Strancar, Interaction of liposomes on endothelial cells, University of Ljubljana, Slovenia. (2010).
- [21] M. Brandl, Liposomes as drug carriers: a technological approach, *Biotechnology annual review*. 7 (2001) 59-85.
- [22] J. Delattre, P. Couvreur, F. Puisieux, J.-R. Philippot and F. Schuber, *Les Liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, L. é. INSERM, **1993**, p. 266.
- [23] C. Tanford, *The Hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, Wiley. (1980).
- [24] R. Lipowsky and E. Sackmann, Structure and dynamics of membranes, *Handbook of biological physics* (Elsevier). 1A (1995).
- [25] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas and R. Brasseur, *Les Liposomes: description, fabrication et applications*, *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 8 (2004).
- [26] B. Cabane and S. Hénon, *Liquides: solutions, dispersions, émulsions, gels*, N. é.-B. C. Echelles), **2007**, p.
- [27] V. P. Torchilin and V. E. Weissiq, *Liposomes: a practical approach* (2nd Edition) Oxford University Press, New-York. (2003) Chapter 1.
- [28] E. Shechter, *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. 2ème édition, Paris. Masson (2002).
- [29] M. Grit and D. J. A. Crommelin, Chemical stability of liposomes - implications for their physical stability, *Chemistry and Physics of Lipids*. 64 (1993) 3-18.
- [30] R. C. Macdonald and R. I. Macdonald, Application of freezing and thawing in liposome technology, In: Gregoriadis, G. (ED.) *Liposome technology*. CRC Press, Boca Raton, FL. (1993) 209-229.
- [31] P. R. Harrigan, T. D. Madden and P. R. Cullis, Protection of liposomes during dehydration or freezing, *Chemistry and Physics of Lipids*. 52 (1990) 139-149.
- [32] Y. Darwis and I. W. Kellaway, The lyophilisation and aerosolisation of liposomes for pulmonary drug administration, *STP pharma sciences*. 12 (2002) 91-96.

- [33] S. Vemuri, Y. Cheng-Der, J. S. Degroot, V. Wangsatornthnakum and S. Venkataram, Effect of sugars on freeze-thaw and lyophilization of liposomes, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 17 (1991) 327-348.
- [34] P. Machy and L. D. Leserman, *Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie*, L. E. Inserm, **1987**, p. 1576.
- [35] T. Pillot, M. Goethals, B. Vanloo, C. Talussot, R. Brasseur, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu and L. Lins, Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 28757-28765.
- [36] R. N. Rowland and J. F. Woodley, The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase, *Biochemistry Biophysical Acta*. 620 (1980) 400-409.
- [37] D. D. Lasic, J. F. Martin, A. Gabizon, C. K. Huang and D. Papahadjopoulos, Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times, *Biochemistry Biophysical Acta*. 1070 (1991) 187-192.
- [38] V. P. Torchilin, V. G. Omelyanenko, M. I. Papisov, A. A. Bogdanov Jr, V. S. Trubetskoy, J. N. Herron and C. A. Gentry, Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity, *Biochemistry Biophysical Acta*. 1195 (1994) 11-20.
- [39] N. Van Rooijen and R. Van Nieuwmegen, Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own, *Immunological Communications*. 9 (1980) 243-256.
- [40] J. W. Park, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos and C. C. Benz, Immunoliposomes for cancer treatment, *Advances in Pharmacology*. 40 (1997) 399-435.
- [41] X. Gao and L. Huang, Cationic liposomes and polymers for gene transfer, *The Journal of Liposome Research*. 3 (1993) 17-30.
- [42] J. G. Smith, R. L. Walzem and J. B. German, Liposomes as agents of DNA transfer, *Biochemistry Biophysical Acta*. 21 (1993) 871-878.
- [43] D. D. Lasic and D. Papahadjopoulos, *Medical applications of liposomes*, Elsevier. (1998).
- [44] N. C. Phillips and C. Tsoukas, Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome, *Blood*. 79 (1992) 1137-1143.
- [45] A. Désormeaux and M. G. Bergeron, Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection, *Journal of Drug Targeting*. 6 (1998) 1-15.
- [46] J. Bestman-Smith, A. Désormeaux, M. J. Tremblay and M. G. Bergeron, Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, *AIDS*. 14 (2000) 2457-2465.
- [47] A. Gabizon, D. Goren, A. T. Horowitz, D. Tzemach, A. Lossos and T. Siegal, Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 24 (1997) 337-344.
- [48] D. Lasic, Novel applications of liposomes, *Trends in Biotechnology*. 16 (1998) 307-321.

- [49] C. R. Alving, Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria (review), *Trends in Parasitology*. 2 (1986) 101-107.
- [50] J. J. Bergers, W. D. Otter and D. J. A. Crommelin, Liposome-based cancer vaccines, *Journal of Liposome Research*. 6 (1996) 339-355.
- [51] S. Gould-Fogerite and R. J. Mannino, Mucosal and systemic immunization using cochleate and liposome vaccines, *Journal of Liposome Research*. 6 (1996) 357-379.
- [52] U. Jakobsen and S. Vogel, Chapter 12: DNA-controlled assembly of liposomes in diagnostics, *Methods in Enzymology*. 464 (2009) 233-248.
- [53] W. Krause, R. Klopp, J. Leike, A. Sachse and G. Schuhmann-Giampieri, Liposomes in diagnostic imaging - comparison of modalities - In-vivo visualization of liposomes, *Journal of Liposome Research*. 5 (1995) 1-26.
- [54] V. P. Torchilin and V. S. Trubetskoy, In vivo visualizing of organs and tissues with liposomes, *Journal of Liposome Research*. 5 (1995) 795-812.
- [55] C. Ropert, Liposomes as a gene delivery system, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32 (1999) 163-169.
- [56] A. D. Miller, Cationic liposomes for gene therapy, *Angewandte Chemie International Edition*. 37 (1998) 1768-1785.
- [57] S. Ebrahim, G. A. Peyman and P. J. Lee, Applications of liposomes in ophthalmology, *Survey of Ophthalmology*. 50 (2005) 167-182.
- [58] D. Raskovic and P. Piazza, Liposomes: a promising future for dermatocosmetology and clinical dermatology, *Journal of Liposome Research*. 3 (1993) 737-751.
- [59] H. Barani and M. Montazer, A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing, *Journal of Liposome Research*. 18 (2008) 249-262.
- [60] M. Montazer, A. Zolfaghari, T. Toliat and M. B. Moghadam, Modification of wool surface by liposomes for dyeing with weld, *Journal of Liposome Research*. 19 (2009) 173-179.
- [61] I. S. C. de Sousa, E. M. S. Castanheira, J. I. N. Rocha Gomes and M. E. C. D. Real Oliveira, Study of the release of a microencapsulated acid dye in polyamide dyeing using mixed cationic liposomes, *Journal of Liposome Research*. under submission (2010).
- [62] H. Kim and I. C. Baianu, Novel liposomes microencapsulation techniques for food applications, *Food Science and Technology*. 2 (1991) 49-77.
- [63] S. Varona, A. Martin and M. J. Cocero, Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by PGSS (Particles from Gas-Saturated Solutions), *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 50 (2011) 2088-2097.
- [64] D. D. Lasic and Y. Barenholz, *Handbook of non medical applications of liposomes: from gene therapy and diagnostics to ecology*, CRC Press. IV (1996).
- [65] A. Barenholz, F. Fishel, E. Yakir, S. Gatt, Y. Barenholz and H. Bercovier, Liposomes enhance bioremediation of oil-contaminated soil, *Journal of Liposome Research*. 13 (2003) 173-186.

- [66] K. Otake, T. Shimomura, T. Goto, T. Imura, T. Furuya, S. Yoda, Y. Takebayashi, H. Sakai and M. Abe, Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method *Langmuir*. 22 (2006) 2543-2550.
- [67] Frederiksen, Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 86 (1997) 921.
- [68] U. Sankar Kadimi, D. Raja Balasubramanian, U. Rani Ganni, M. Balaraman and V. Govindarajulu, In vitro studies on liposomal amphotericin B obtained by supercritical carbon dioxide-mediated process, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 3 (2007) 273-280.
- [69] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita and T. Yoshimura, Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 68 (2009) 98-105.
- [70] L. A. Meure, R. Knott, N. R. Foster and F. Dehghani, The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes, *Langmuir*. 25 (2009) 326-337.
- [71] K. Otake, T. Imura, H. Sakai and M. Abe, Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide, *Langmuir*. 17 (2001) 3898-3901.
- [72] S. Kunastitchai, L. Pichert, N. Sarisuta and B. W. Müller, Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form, *International Journal of Pharmaceutics*. 316 (2006) 93-101.
- [73] Y. Li, D.-J. Yang, S.-L. Chen, S.-B. Chen and A. S.-C. Chan, Process parameters and morphology in puerarin, phospholipids and their complex microparticles generation by supercritical antisolvent precipitation, *International Journal of Pharmaceutics*. 359 (2008) 35-45.
- [74] D. A. Kendall and R. C. MacDonald, Characterization of a fluorescence assay to monitor changes in aqueous volume of lipid vesicles, *Analytical Biochemistry* 134 (1983) 26-33.
- [75] N. Oku, D. A. Kendall and R. C. MacDonald, A simple procedure for the determination of the trapped volume of liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 691 (1982) 332-240.
- [76] R. H. Bridson, R. C. D. Santos, B. Al-Duri, S. M. McAllister, J. Robertson and H. O. Alpar, The preparation of liposomes using compressed carbon dioxide: strategies, important considerations and comparison with conventional techniques, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58 (2006) 775-785.
- [77] M. Takahashi, K. Inafuku, T. Miyagi, H. Oku, K. Wada, T. Imura and D. Kitamoto, Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method, *Journal of Oleo Science*. 56 (2007) 35-42.
- [78] S. Naik, D. Patel, N. Surti and A. Misra, Preparation of PEGylated liposomes of docetaxel using supercritical fluid technology, *The Journal of Supercritical Fluids*. 54 (2010) 110-119.
- [79] Z. Wen, B. Liu, Z. Zheng, X. You, Y. Pu and Q. Li, Preparation of liposomes entrapping essential oil from *atractylodes macrocephala koidz* by modified RESS technique, *Chemical Engineering Research and Design*. 88 (2010) 1102-1107.
- [80] S. Varona, A. Martin and M. J. Cocero, Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a conventional method and by PGSS, 12th European Meeting on Supercritical Fluids, Graz, Austria, May 9-12. Proceedings (2010).

- [81] P. V. Gogineni, P. A. Crooks and R. B. Murty, Gas chromatographic determination of residual levels of tert.-butanol from lyophilized liposomal formulations, *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 620 (1993) 83-88.
- [82] D. Lasic, The mechanism of vesicle formation: review article, *Biochemistry Journal*. 256 (1988) 1-11.
- [83] J. Brunner, P. Skrabal and H. Hauser, Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physico-chemical properties, *Biochemica et Biophysica Acta*. 455 (1976) 322-331.
- [84] S. Batzri and E. D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochemica et Biophysica Acta*. 298 (1973) 1015-1019.
- [85] D. Deamer and A. D. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method, *Biochemica et Biophysica Acta*. 443 (1976) 629-634.
- [86] F. Szoka and D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 75 (1978) 4194-4198.
- [87] M. M. Lapinski, A. Castro-Forero, A. J. Greiner, R. Y. Ofoli and G. J. Blanchard, Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore, *Langmuir*. 23 (2007) 11677-11683.
- [88] A. Jahn, N. V. Wyatt, D. L. De Voe, L. E. Locascio and M. Gaitan, Microfluidic Directed Formation of Liposomes of Controlled Size, *Langmuir*. 23 (2007) 6289-6293.
- [89] J. R. Evans, F. J. T. Fildes and J. E. Oliver, Process for preparing freeze-dried liposome compositions, US patent 4311712. 19 January (1982).
- [90] S. Amselem, A. Gabizon and Y. Barenholz, Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 79 (1990) 1045-1052.
- [91] C. Li and Y. Deng, A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 93 (2004) 1403-1404.
- [92] T. P. Castor, Methods and apparatus for liposomes preparation, World Patent. WO9427581 (1994).
- [93] J. H. van den Berg, K. Oosterhuis, W. E. Hennink, G. Storm, L. J. van der Aa, J. F. J. Engbersen, J. B. A. G. Haanen, J. H. Beijnen, T. N. Schumacher and B. Nuijen, Shielding the cationic charge of nanoparticle-formulated dermal DNA vaccines is essential for antigen expression and immunogenicity, *Journal of Controlled Release*. 141 (2010) 234-240.
- [94] T. P. Castor, Methods and apparatus for making liposomes, United States Patent US005554382A. (1993).
- [95] L. Frederiksen, P. Van Hoogevest and K. Anton, Method and apparatus for liposome production, US Patent 6534018. (1994).
- [96] K. Otake, T. Imura, S. Yoda, Y. Takebayashi, T. Sugeta, N. Nakazawa, H. Sakai and M. Abe, Formation and physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method, 6th International Symposium on Supercritical Fluids, Versailles, France. (2003).

- [97] T. Imura, T. Goto, K. Otake, S. Yoda, Y. Takebayashi, S. Yokoyama, H. Takebayashi, H. Sakai, M. Yuasa and M. Abe, Control of physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method, *Langmuir*. 19 (2003) 2021-2025.
- [98] T. Imura, K. Otake, S. Hashimoto, T. Goto, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J. F. Rathman and M. Abe, Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 27 (2002) 133-140.
- [99] L. Lesoin, C. Crampon, O. Boutin and E. Badens, Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method, *The Journal of Supercritical Fluids*. 57 (2011) 162-174.
- [100] E. Badens, C. Magnan and G. Charbit, Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes, *Biotechnology and Bioengineering*. 72 (2001) 194-204.
- [101] C. Magnan, N. Commenges, E. Badens and G. Charbit, Fine phospholipid particles formed by precipitation with a compressed fluid antisolvent, *Proceedings of the GVC-Fachausschub High Pressure Chemical Engineering, Hamburg (Germany)*. (1999) 231-234.
- [102] L. Lesoin, O. Boutin, C. Crampon and E. Badens, CO₂/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO₂: a review, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 377 (2011) 1-14.
- [103] L. Frederiksen, K. Anton, B. J. Barratt, P. Van Hoogevest and H. Leuenberger, Use of supercritical carbon dioxide for preparation of pharmaceutical formulations, *3rd International Symposium on Supercritical Fluids, Strasbourg, France*. 3 (1994) 235-240.
- [104] M. Sagisaka, D. Koike, S. Yoda, H. Takebayashi, T. Furuya, A. Yoshizawa, H. Sakai, M. Abe and K. Otake, Optimum tail length of fluorinated double-tail anionic surfactant for water/supercritical CO₂ microemulsion formation, *Langmuir*. 23 (2007) 8784-8788.
- [105] V. V. Dhanuka, J. L. Dickson, W. Ryoo and K. P. Johnston, High internal phase CO₂-in-water emulsions stabilized with a branched nonionic hydrocarbon surfactant, *Journal of Colloid and Interface Science*. 298 (2006) 406-418.
- [106] S. R. P. da Rocha, J. L. Dickson, D. Cho, P. J. Rossky and K. P. Johnston, Stubby surfactants for stabilization of water and CO₂ emulsions: Trisiloxanes, *Langmuir*. 19 (2003) 3114-3120.
- [107] E. J. Singley, W. Liu and E. J. Beckman, Phase behavior and emulsion formation of novel fluoroether amphiphiles in carbon dioxide, *Fluid Phase Equilibria*. 128 (1997) 199-219.
- [108] K. A. Bartscherer, M. Minier and H. Renon, Microemulsions in compressible fluids - a review, *Fluid Phase Equilibria*. 107 (1995) 93-150.
- [109] R. M. Lemert, R. A. Fuller and K. P. Johnston, Reverse micelles in supercritical fluids 3.amino acid solubilization in ethane and propane, *Journal of Physical Chemistry*. 94 (1990) 6021-6028.
- [110] K. Harrison, J. Goveas and J. K.P., Water-in-carbon dioxide microemulsions with a fluorocarbon-hydrocarbon hybrid surfactant, *Langmuir*. 10 (1994) 3536-3541.
- [111] S. R. P. da Rocha, K. L. Harrison and K. P. Johnston, Effect of surfactants on the interfacial tension and emulsion formation between water and carbon dioxide, *Langmuir*. 15 (1999) 419-428.

- [112] Y. Sutjiadi-Sia, P. Jaeger and R. Eggers, Interfacial phenomena of aqueous systems in dense carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 46 (2008) 272-279.
- [113] S. S. Adkins, X. Chen, I. Chan, E. Torino, Q. P. Nguyen, A. W. Sanders and K. P. Johnston, Morphology and stability of CO₂-in-water foams with nonionic hydrocarbon surfactants, *Langmuir*. 26 (2010) 5335-5348.
- [114] B. Bharatwaj and S. R. P. Rocha, Interfacial phenomena at the compressed CO₂-water interface, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 23 (2006) 183-190.
- [115] R. Butler, C. M. Davies and A. I. Cooper, Emulsion templating using high internal phase supercritical fluid emulsions, *Advanced Materials*. 13 (2001) 1459.
- [116] S. R. P. Da Rocha, P. A. Psathas, E. Klein and K. P. Johnston, Concentrated CO₂-in-water emulsions with nonionic polymeric surfactants, *Journal of Colloid and Interface Science*. 239 (2001) 241-253.
- [117] J. Eastoe, Z. Bayazit and S. Martel, Droplet structure in a water-in-CO₂ microemulsion, *Langmuir*. 12 (1996) 1423-1424.
- [118] J. Eastoe and B. M. H. Cazelles, Water-in-CO₂ microemulsions studied by small-angle neutron scattering, *Langmuir*. 13 (1997) 6980-6984.
- [119] M. Haruki, H. Yawata, M. Nishimoto, M. Tanto, S.-I. Kihara and S. Takishima, Study on phase behaviors of supercritical CO₂ including surfactant and water, *Fluid Phase Equilibria*. 261 (2007) 92-98.
- [120] M. Haruki, K. Matsuura, Y. Kaida, S.-I. Kihara and S. Takishima, Microscopic phase behavior of supercritical carbon dioxide + non-ionic surfactant + water systems at elevated pressures, *Fluid Phase Equilibria*. 289 (2010) 1-5.
- [121] P. A. Psathas, S. R. P. Da Rocha, C. T. J. Lee and K. P. Johnston, Water-in-carbon dioxide emulsions with poly(dimethylsiloxane)-based block copolymer ionomers, *Industrial Engineering Chemistry Research*. 39 (2000) 2655-2664.
- [122] H. Takebayashi, Y. Mashimo, D. Koike, S. Yoda, T. Furuya, M. Sagisaka, K. Otake, H. Sakai and M. Abe, Fourier transform infrared spectroscopic study of water-in-supercritical CO₂ microemulsion as a function of water content, *The Journal of Physical Chemistry B*. 112 (2008) 8943-8949.
- [123] K. P. Johnston and S. R. P. da Rocha, Colloids in supercritical fluids over the last 20 years and future directions, *The Journal of Supercritical Fluids*. 47 (2009) 523-530.
- [124] K. P. Johnston, D. Cho, S. R. P. Da Rocha, P. A. Psathas and W. Ryoo, Water in carbon dioxide macroemulsions and miniemulsions with a hydrocarbon surfactant, *Langmuir*. 17 (2001) 7191-7193.
- [125] M. Sagisaka, D. Koike, Y. Mashimo, S. Yoda, H. Takebayashi, T. Furuya, A. Yoshizawa, H. Sakai, M. Abe and K. Otake, Water/supercritical CO₂ microemulsions with mixed surfactant systems, *Langmuir*. 24 (2008) 10116-10122.
- [126] C. T. Lee, P. A. Psathas, K. P. Johnston, J. de Gracia and T. W. Randolph, Water-in-carbon dioxide emulsions: formation and stability, *Langmuir*. 15 (1999) 6781-6791.

- [127] M. Sagisaka, T. Fujii, D. Koike, S. Yoda, H. Takebayashi, T. Furuya, A. Yoshizawa, H. Sakai, M. Abe and K. Otake, Surfactant-mixing effects on the interfacial tension and the microemulsion formation in water/supercritical CO₂ system, *Langmuir*. 23 (2007) 2369-2375.
- [128] W. Li, J. Zhang, S. Cheng, B. Han, C. Zhang, X. Feng and Y. Zhao, Enhanced stabilization of vesicles by compressed CO₂, *Langmuir*. 25 (2009).
- [129] W. Ryoo, S. E. Webber and K. P. Johnston, Water-in-Carbon dioxide microemulsions with methylated branched hydrocarbon surfactants, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 42 (2003) 6348-6358.
- [130] E. Torino, E. Reverchon and K. P. Johnston, Carbon dioxide/water, water/carbon dioxide emulsions and double emulsions stabilized with a nonionic biocompatible surfactant, *Journal of Colloid and Interface Science*. 348 (2010) 469-478.
- [131] G. J. McFann and K. P. Johnston, Phase behavior of nonionic surfactant/oil/water systems containing light alkanes, *Langmuir*. 9 (1993) 2942-2948.
- [132] J. S. Wang and C. M. Wai, Transporting metal ions using reverse micelles in alcohol modified supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 40 (2007) 176-182.
- [133] M. Bourrel and R. S. Schechter, Microemulsions and related systems: formulation, solvency, and physical properties, *Surfactant Science Series 30*. Marcel Dekker (1988) New-York.
- [134] W. D. Bancroft, The theory of emulsification, V, *Journal of Physical Chemistry*. 17 (1913) 501-519.
- [135] W. D. Bancroft, The theory of emulsification, VII, *Journal of Physical Chemistry*. 19 (1915) 513-529.
- [136] M. E. Cates, D. Andelman and S. A. Safran, Theory of microemulsion: comparison with experimental behavior, *Langmuir*. 4 (1988) 802-806.
- [137] K. Otake, T. Shimomura, T. Goto, T. Imura, T. Furuya, S. Yoda, Y. Takebayashi, H. Sakai and M. Abe, One-Step Preparation of Chitosan-Coated Cationic Liposomes by an Improved Supercritical Reverse-Phase Evaporation Method, *Langmuir*. 22 (2006) 4054-4059.
- [138] N. K. Pandit, *Introduction of Pharmaceutical Sciences*, Lippincott Williams&Wilkins. (2007).
- [139] G. D. Bothun, B. L. Knutson, H. J. Strobel and S. E. Nokes, Liposome fluidization and melting point depression by pressurized CO₂ determined by fluorescence anisotropy, *Langmuir*. 21 (2005) 530-536.
- [140] R. Wiebe and V. L. Gaddy, The solubility in water of carbon dioxide at 50, 75 and 100°C, at pressures to 700 atmospheres, *The Journal of the American Chemical Society*. 61 (1939) 315-318.
- [141] R. Wiebe and V. L. Gaddy, The solubility of carbon dioxide in water at various temperature from 12 to 40° and at pressures to 500 atmospheres: critical phenomena, *The Journal of the American Chemical Society*. 62 (1940) 815-817.
- [142] R. Wiebe, The binary system carbon dioxide-water under pressure, *Chemical Reviews*. 29 (1941) 475.

- [143] T. Imura, T. Goto, S. Yoda, K. Otake, H. Takebayashi, M. Yokosuka, H. Sakai and M. Abe, Development of continuous batch system for mass production of liposomes, *Material Technology*. 21 (2003) 30-35.
- [144] A. D. Bangham and R. W. Horne, *Journal of Molecular Biology*. 8 (1964) 660-668.
- [145] A. LAPHAL, Communication interne. (1998).
- [146] E. Carretier, Y. Wyart, P. Guichardon, E. Badens, O. Boutin, J.-C. Vallejos and G. Charbit, New insight into micromixing in supercritical CO₂ using a chemical method, *Journal of Supercritical Fluids*. 38 (2006) 332-338.
- [147] E. Carretier, E. Badens, P. Guichardon, O. Boutin and G. Charbit, Hydrodynamics of Supercritical Antisolvent Precipitation: Characterization and Influence on Particle Morphology, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 42 (2003) 331-338.
- [148] E. Reverchon, Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nano-particles, *The Journal of Supercritical Fluids*. 15 (1999) 1-21.
- [149] E. Reverchon, G. Della Porta and M. G. Falivene, Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation, *The Journal of Supercritical Fluids*. 17 (2000) 239-248.

Liste des Tableaux

Tableau I-1 - Coordonnées critiques de quelques corps purs.....	15
Tableau I-2 - Propriétés physicochimiques des fluides supercritiques	16
Tableau I-3 - Applications des technologies supercritiques en fonction du domaine d'application.....	18
Tableau I-4 – Exemples de groupement chimique associé au groupement phosphate des phospholipides.....	23
Tableau I-5 – Tableau récapitulatif des différentes classes de liposomes [27].....	28
Tableau I-6 – Images de liposomes en suspension obtenues par deux méthodes : microscopie électronique à transmission et microscopie optique à contraste de phase.....	35
Tableau I-7 - Données bibliographiques sur les composés encapsulés dans des liposomes formés par des procédés utilisant les fluides supercritiques	38
Tableau I-8 - Données bibliographiques sur l'encapsulation par des liposomes formés avec des procédés utilisant les fluides supercritiques.....	39
Tableau I-9 - Données bibliographiques sur les méthodes de détermination du taux de solvant résiduel dans les suspensions liposomiales ou dans les phospholipides divisés formés par des techniques utilisant les fluides supercritiques	41
Tableau I-10 – Les méthodes classiques de formation des liposomes (données de la littérature)	45
Tableau I-11 – Conditions expérimentales et caractéristiques des liposomes formés pour les procédés utilisant le CO ₂ supercritique comme solvant.....	53
Tableau I-12 - Conditions expérimentales et caractéristiques des phospholipides divisés pour les procédés utilisant le CO ₂ supercritique comme anti-solvant	58

Tableau II-1 – Procédés sous haute pression présentés dans la littérature en fonction de l'utilisation du CO ₂ supercritique dans le procédé.....	78
Tableau II-2 - Morphologie et taille des liposomes en fonction de la phase d'hydratation.....	80
Tableau III-1 – Spécification en phospholipides de la lécithine commercialisée.....	87
Tableau III-2 - Valeurs des rapports des hauteurs des pics représentant respectivement les groupements alcool (1058 cm ⁻¹) et carboxyle (1736 cm ⁻¹)	96
Tableau III-3 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : taux de solvant résiduel.....	97
Tableau III-4 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : reproductibilité	99
Tableau III-5 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : morphologie	101
Tableau III-6 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : efficacité d'encapsulation.....	102
Tableau III-7 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham : stabilité	103
Tableau III-8 – Bilan sur la comparaison entre le procédé SAS et la méthode de Bangham	104
Tableau III-9 - Conditions expérimentales pour le procédé SAS	106
Tableau III-10 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction de la pression de micronisation (courbes de la Figure III-14)	109
Tableau III-11 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction du rapport molaire CO ₂ /solvant lors de la micronisation (courbes de la Figure III-17)	112
Tableau III-12 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulé en fonction du rapport molaire CO ₂ /solvant lors de la micronisation (courbes de la Figure III-19)	115

Tableau III-13 – Tableau comparatif du procédé SAS et de la méthode de Bangham (dans les conditions opératoires utilisées).....	118
Tableau IV-1 – Informations sur les différents éléments du montage expérimental du procédé CAS.....	124
Tableau IV-2 – Conditions expérimentales testées pour le procédé batch et taille des liposomes formés.....	127
Tableau IV-3 - Conditions expérimentales testées pour le procédé CAS et taille des liposomes formés.....	140

Liste des Figures

Figure I-1 - Diagramme de phase d'un corps pur	15
Figure I-2 – Schéma développé d'une molécule de phospholipide	23
Figure I-3 – Configuration trans et gauche des phospholipides au sein de la membrane phospholipidique [25]	24
Figure I-4 – Schéma simplifié d'une micelle normale (a), d'une micelle inverse (b) et d'un phospholipide (c).....	25
Figure I-5 – Schéma simplifié d'un liposome (a) et d'un phospholipide (b).....	26
Figure I-6 – Exemples de phases possibles pour des molécules amphiphiles dans l'eau [24]	26
Figure I-7 - Structures des liposomes.....	28
Figure I-8 – Schéma d'un liposome avec des substances encapsulées ou complexées	32
Figure I-9 – Schéma du montage expérimental de Castor et al. [94].....	47
Figure I-10 – Schéma du montage expérimental de Frederiksen et al. [67, 95]	48
Figure I-11 - Schéma du montage expérimental d'Otake et al. (scRPE) [71, 96-98]	49
Figure I-12 - Schéma du montage expérimental d'Otake et al. (IscRPE) [66]	50
Figure I-13 - Schéma du montage expérimental de Wen et al. [79]	52
Figure I-14 - Schéma du montage expérimental du procédé SAS [4, 101]	55
Figure I-15 - Schéma du montage expérimental du procédé ASES [72].....	56
Figure I-16 - Evolution dans le temps des procédés supercritiques de formation de liposomes et de phospholipides divisés (micronisés) comme précurseurs de liposomes.....	61
Figure II-1 - Représentation schématique du comportement d'un système CO ₂ /surfactant/eau lors de l'ajout progressif d'eau : (a) une phase continue CO ₂ /surfactant (sans eau). (b) Formation de micelles inverses. (c) Apparition d'une seconde phase	67

Figure II-2 - Comportement type du système ternaire CO ₂ /eau/surfactant sous pression en présence d'une faible quantité d'eau [131] (les indications (b) et (c) à température constante renvoient à la Figure II-1)	67
Figure II-3 - Concentration en surfactant et tension interfaciale eau/CO ₂ en fonction des paramètres opératoires et représentation schématique des équilibres de phase du système de Winsor [106, 111, 116, 121, 123, 133]	70
Figure II-4 - Représentation schématique de l'évolution d'un système ternaire CO ₂ /eau/surfactant de Winsor en fonction de la pression : (a) émulsion CO ₂ -dans-eau. (b) Flocculation des gouttes d'eau. (c) émulsion eau-dans-CO ₂ . (d) microémulsion eau-dans-CO ₂ (PIP signifie pression d'inversion de phase et PCF pression critique de flocculation)	71
Figure II-5 - Diagramme ternaire du système CO ₂ /eau/surfactant [107, 109, 119, 136].	72
Figure II-6 - Représentation schématique des transitions de phase des phospholipides : (a) phase gel-lamellaire. (b) phase fluide cristal-liquide	74
Figure III-1 - Schéma du procédé SAS	90
Figure III-2 - Diagramme de phase du système : CO ₂ (90% massique)/lécithine de soja S75 (2% massique)/éthanol	91
Figure III-3 – Spectres d'absorption infrarouge de la lécithine brute S75, de l'éthanol et d'une poudre de phospholipides obtenues par le procédé SAS (9 MPa, 308 K, rapport molaire CO ₂ /solvant = 60, concentration en soluté = 15%mass., débit de solution organique = 22,8 mL.h ⁻¹).....	96
Figure III-4 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour les mêmes conditions expérimentales du procédé SAS (T = 308K, P = 9 MPa, rapport molaire CO ₂ /solvant : 60 et concentration en soluté : 15 % massique)....	97

Figure III-5 - Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS pour l'étude de reproductibilité (T = 308K, P = 9 MPa, rapport molaire CO ₂ /solvant : 60 et concentration en soluté : 15 % massique)	98
Figure III-6 - Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine, solution organique d'éthanol à 15% massique en soluté et température d'évaporation à 323 K)	99
Figure III-7 – Images obtenues au microscope optique à contraste de phase présentant des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS (T = 308K, P = 9 MPa, rapport molaire CO ₂ /solvant : 100 et concentration en soluté : 15 % massique) 100	
Figure III-8 - Images obtenues au microscope optique à contraste de phase présentant les liposomes formés à partir de phospholipides divisés par la méthode de Bangham (2 grammes de lécithine traité, solution organique d'éthanol à 15% massique et température d'évaporation de 323 K).....	100
Figure III-9 – Spectres synchrones représentant la fluorescence de la calcéïne : F _{tot} fluorescence totale de la suspension liposomiale, F _{int} fluorescence interne aux liposomes et F _{totq} fluorescence résiduelle.....	102
Figure III-10 - – Distribution de taille des liposomes formés à partir de phospholipides micronisés par le procédé SAS (T = 308K, P = 9 MPa, rapport molaire CO ₂ /solvant : 100 et concentration en soluté : 15 % massique) : à t=0 (le jour de formation) et à t=1 mois (1 mois après la formation)	104
Figure III-11 - Visualisation de la lécithine micronisée dans le fond de l'autoclave.....	106
Figure III-12 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée par le procédé SAS pour différentes valeurs de pression : (a) 9 MPa. (b) 10 MPa. (c) 11 MPa. (d) 13 MPa (rapport molaire CO ₂ /solvant : 60 et concentration en soluté : 15 % massique).....	108

Figure III-13 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression de micronisation	109
Figure III-14 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour différentes valeurs du rapport molaire CO ₂ /solvant : (a) 60. (b) 80. (c) 100 (P = 9 MPa, concentration en soluté : 15 % massique).....	111
Figure III-15 - Image obtenue au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour un rapport molaire CO ₂ /solvant de 50.....	111
Figure III-16 - Distribution de taille des liposomes en fonction du rapport molaire CO ₂ /solvant lors de la micronisation.....	112
Figure III-17 - Images obtenues au microscope électronique à balayage montrant la lécithine micronisée pour différentes valeurs de la concentration en soluté : (a) 15% massique. (b) 20% massique. (c) 25% massique (P= 9 MPa, rapport molaire CO ₂ /solvant : 60)	114
Figure III-18 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la concentration en soluté lors de la micronisation	115
Figure IV-1 - Schéma simplifié du procédé CAS	122
Figure IV-2 – Schéma simplifié des entrées et des sorties dans la configuration CAS1 (une sortie) et CAS2 (deux sorties).....	123
Figure IV-3 - Images du comportement des phases dans l'autoclave en fonction de la composition en CO ₂	129
Figure IV-4 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la vitesse d'agitation pour le procédé semi-batch (P = 9 MPa, T = 308 K, concentration en soluté = 15% massique, débit de solution organique = 240 mL.h ⁻¹ , débit massique de CO ₂ = 750 g.h ⁻¹).....	131
Figure IV-5 – Images du comportement des phases dans l'autoclave juste avant la dépressurisation en fonction de la vitesse d'agitation : (a) 100 tr.min ⁻¹ , (b) 225 tr.min ⁻¹ et (c) 300 tr.min ⁻¹	132

Figure IV-6 - Répartition des liposomes en pourcentage volumique cumulée en fonction du rapport massique eau/lécithine pour le procédé semi-batch.....	134
Figure IV-7 - Distribution de taille des liposomes en fonction du rapport massique eau/lécithine pour le procédé semi-batch	135
Figure IV-8 - Images du comportement des phases dans l'autoclave juste avant la dépressurisation en	135
Figure IV-9 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression pour le procédé semi-batch	136
Figure IV-10 – Distribution de taille des liposomes en fonction de la vitesse de dépressurisation pour le procédé semi-batch	137
Figure IV-11 - Distribution de taille des liposomes en fonction de la dispersion par jet pour le procédé semi-batch.....	138
Figure IV-12 - Distribution de taille des liposomes pour le procédé continu CAS1	141
Figure IV-13 – Evolution des phases dans l'autoclave au cours de l'injection pour le procédé CAS1	141
Figure IV-14 - Distribution de taille des liposomes pour le procédé continu CAS2	142
Figure IV-15 - Evolution des phases dans l'autoclave au cours de l'injection pour le procédé CAS2	143
Figure IV-16 – Essais de reproductibilité sur la distribution de taille des liposomes pour le procédé CAS	144
Figure IV-17 – Distribution de taille des liposomes en fonction de la pression pour le procédé CAS	145
Figure IV-18 – Images obtenues au microscope optique à contraste de phase pour le procédé CAS	147
Figure IV-19 – Schéma du procédé de diafiltration	148

Figure IV-20 – Evolution de l'aire sous la courbe représentative du composé éthanol obtenu par analyse chromatographique (A, B et C représentent trois échantillons testés dans les conditions détaillées précédemment)	149
---	-----

FORMATION DE LIPOSOMES PAR UN PROCÉDE INNOVANT UTILISANT LES FLUIDES SUPERCRITIQUES

Résumé : Cette thèse est une étude théorique et expérimentale sur la formation de liposomes par des procédés utilisant le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique. Les liposomes sont des vésicules sphériques nano- ou micrométriques dont la paroi est composée d'une ou plusieurs bicouches concentriques de phospholipides séparant un milieu aqueux d'un autre. L'efficacité des procédés supercritiques, comme alternative aux méthodes conventionnelles pour former des liposomes, a déjà été démontrée. Une synthèse critique des résultats de la littérature a été réalisée au cours de ce travail. Parallèlement, une étude fondamentale sur le comportement des systèmes ternaires CO₂/eau/surfactant sous pression a été menée et il a été démontré qu'en fonction du type d'émulsions formées au cours du procédé sous pression, les caractéristiques des liposomes produits lors de la dépressurisation sont différentes. Le procédé Supercritical Anti-Solvent a été utilisé pour microniser des phospholipides. Des liposomes sphériques, multilamellaires et de tailles comprises entre 0,1 et 1µm ont ensuite été formés de manière reproductible par hydratation des phospholipides micronisés. Dans les mêmes conditions (même solvant), la méthode conventionnelle de Bangham n'a pas donné des résultats reproductibles et les liposomes formés n'étaient pas tous sphériques. Le résultat majeur de ce travail est la mise au point d'un procédé supercritique innovant. Innovant car continu et en une seule étape, le procédé Continuous Anti-Solvent permet de former de manière reproductible des liposomes sphériques, multilamellaires et de tailles comprises entre 10 et 100µm.

Mots-clés : Fluide supercritique, Dioxyde de carbone, Liposome, Encapsulation, Phospholipide, Procédé anti-solvant, Continu, Emulsion.

LIPOSOME FORMATION USING SUPERCRITICAL FLUID PROCESSES

Abstract: The present thesis is dedicated to liposome formation using supercritical carbon dioxide (CO₂). Liposomes are spherical vesicles composed of one or more concentric phospholipid bilayers surrounding an aqueous core. Dense gas processes offer reliable alternatives to conventional methods in liposome formation. We present a review of the literature and we summarized all of the results in a discussion section, with particular attention to emulsion formation under pressure. As it has been shown, the phase behaviour of the ternary CO₂/water/surfactant system under pressure greatly influences liposome formation during depressurization. The Supercritical Anti-Solvent process has been used to micronize phospholipids. Then, the micronized particles were hydrated to form spherical and multilamellar liposomes with diameters between 0.1 and 1µm in a reproducible way. Using the same conditions (the same solvent), the conventional Bangham method did not provide reproducible assay results and formed liposomes were not all spherical. The main result of this work is the design of a new supercritical process dedicated to liposome formation. Unlike the current dense gas technologies, the Continuous Anti-Solvent method breaks new ground because it is a single step and continuous process. Liposomes prepared with the Continuous Anti-Solvent method are spherical and multilamellar with diameters between 10 and 100µm.

Keywords: Supercritical Fluid, Carbon dioxide, Liposome, Encapsulation, Phospholipid, Anti-solvent process, Continuous, Emulsion.

Discipline: **GENIE DES PROCÉDES**

*Laboratoire Mécanique, Modélisation et Procédés Propres
Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III
UMR CNRS 6181
Europôle de l'Arbois, bâtiment Laënnec, hall C
13545 Aix-en-Provence cedex 4*