

Vésicules de tensioactifs bicaténaires mixtes: caractérisation et stabilité de ces systèmes moléculaires organisés

M. Gaysinski^a, J.P. Le Forestier^a, A. Cambon^{a,*}, J.M. Devoiselle^b, H. Maillols^b, P. Chang^c

^a Laboratoire de Chimie Organique du Fluor, Université de Nice—Sophia Antipolis, Parc Valrose, B.P. 71, 06108 Nice Cedex 2, France

^b Laboratoire de Technique Pharmaceutique Industrielle, U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques, 15 av Charles Flahault, 34060 Montpellier, France

^c C.N.R.S., U.A 671, Villefranche-sur-Mer, France

Received 21 October 1996; accepted 11 February 1997

Abstract

The aggregation behaviour in water of 16 ammonium amphiphiles containing one long perfluoroalkyl tail and one long hydrocarbon tail have been studied. Upon sonication, the corresponding vesicular systems were identified by freeze fracture electron microscopy. Their size distribution and mean diameter were investigated by photon correlation spectroscopy (PCS). Long term storage of these systems, showed that their stability is a function of the temperature and of the amphiphilic structure: hydrocarbon chain length and nature of the connector. The crystal to liquid-crystal transition temperature (T_c) of these systems could not be determined by differential scanning calorimetry (DSC) and light scattering experiments.

Résumé

Nous avons étudié l'aptitude à la vésiculation en solution aqueuse de 16 ammonium quaternaires diméthylés possédant une longue chaîne perfluoroalkylée et une longue chaîne hydrocarbonée. Après sonication, tous les composés testés forment des systèmes vésiculaires comme le montrent les photographies prises au microscope électronique après cryofracture. Leur distribution en taille ainsi que leur diamètre moyen ont été caractérisés par spectroscopie par corrélation de photons (PCS). Si la stabilité à long terme des vésicules obtenues dépend des conditions de stockage et en particulier de la température, elle est également fonction de la structure des tensioactifs utilisés à savoir, la longueur de la chaîne lipophile et la nature du connecteur. Enfin, que ce soit par calorimétrie différentielle par balayage de température (DSC) ou par mesure de l'intensité de lumière diffusée à 90° par les vésicules en fonction de la température, nous n'avons pas pu déterminer la température critique de transition de phase entre l'état gel et l'état cristal-liquide (T_c) de nos systèmes. © 1997 Elsevier Science S.A.

Keywords: Quaternary ammonium salt; Bitailed; Perfluoroalkylated; Hydrocarbonated; Vesicles; PCS; DSC; Freeze fracture electron microscopy; T_c ; Stability

1. Introduction

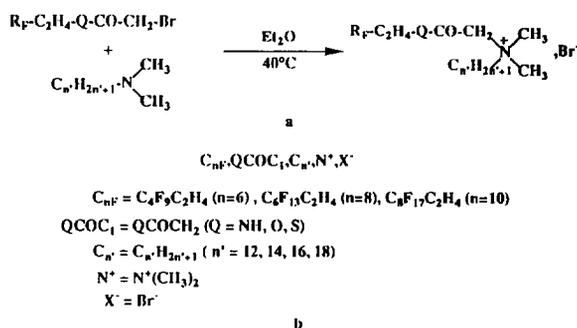
Utilisés par voie topique, les liposomes [1,2], les sphingosomes [3,4] ou encore les niosomes [2,5] permettent non seulement d'améliorer l'action des principes actifs [6–16], mais également de réhydrater la peau [17], de limiter le flux d'eau transépidermique [2,18] et de pallier les carences lipidiques de l'épiderme [2,19–21]. Cependant, ces vecteurs sont instables [22,23] ce qui limite leur efficacité dans le temps. De plus, bien que l'addition de substances telles que les phospholipides saturés [2], le cholestérol [22] ou les anti-oxydants [22] permette d'améliorer la stabilité physique et (ou) chimique des vésicules, cette solution a pour inconvé-

nient majeur de conduire à des systèmes complexes, difficiles à étudier et présentant des propriétés difficilement modulables [24].

Pour tenter de résoudre ces problèmes, nous avons mis au point la synthèse de tensioactifs bicaténaires de type cationique [25,26], anionique [27], amphotère [28] et non ionique [29] possédant à la fois un caractère lipophile et fluophile marqué. Notre objectif était d'obtenir des systèmes vésiculaires simples (sans additif), possédant la stabilité des vésicules perfluorées [30] et le caractère biocompatible de leurs analogues hydrocarbonées.

Parmi ces composés, les tensioactifs perfluorés bicaténaires mixtes (une chaîne hydrophobe hydrocarbonée et une chaîne hydrophobe perfluorée) de type cationique nous ont

* Corresponding author.



Schema 1. (a) Préparation des ammoniums quaternaires bicaténaires mixtes saturés de type cationique; (b) nom de code générique.

paru constituer le groupe le plus intéressant dans la perspective d'une application industrielle.

En effet, ces amphiphiles [25], obtenus par réaction de quaternisation d'une amine tertiaire grasse diméthylée commerciale par un agent alkylant perfluoroalkylé [31] (cf. Schema 1(a)), sont facilement accessibles par voie synthétique et offrent une modulabilité structurale importante.

Récemment nous avons décrit la synthèse de ces composés et étudié leurs propriétés de surface [25,31,32], dans ce travail nous rapportons l'étude de leur aptitude à la vésiculation en solution aqueuse. Après sonication, la caractérisation des systèmes a été réalisée par microscopie électronique après cryofracture, leur distribution en taille et leur diamètre moyen évalués par spectroscopie par corrélation de photons (PCS) et leur stabilité étudiée qualitativement (aspect des solutions) et quantitativement (mesure du diamètre moyen) après stockage durant 1 mois à température ambiante à 37 °C et à 50 °C. Enfin, nous avons tenté d'évaluer leur température critique de transition de phase entre l'état gel et l'état cristallin (T_c) par calorimétrie différentielle par balayage de température (DSC) et par mesure de l'intensité diffusée par les vésicules à 90° en fonction de la température.

2. Résultats, discussion

Les tensioactifs bicaténaires mixtes de type cationique que nous avons étudiés sont présentés sur le Schema 1.

Ces sels d'ammonium quaternaires diméthylés se différencient par la longueur de la chaîne lipophile ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$, $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), la longueur de la chaîne perfluorée (C_4F_9 , C_6F_{13} , C_8F_{17}) et par la nature du connecteur reliant la chaîne 2-F-alkyléthyle à l'atome d'azote quaternaire (QCOCH_2 avec $Q = \text{NH, O, S}$). Afin de les désigner plus simplement, nous leur avons donné un nom de code générique, $\text{C}_{nF}\text{.QCOC}_1\text{.C}_n\text{.N}^+\text{.X}^-$ (cf. Schema 1(b)) où:

- C_{nF} correspond au nombre de carbone de la chaîne 2-F-alkyléthyle ($n = 6, 8, 10$)
- QCOC_1 indique la nature du connecteur (QCOCH_2 avec $Q = \text{NH, O, S}$)
- C_n correspond au nombre de carbones de la chaîne hydrocarbonée ($n' = 12, 14, 16, 18$)

- N^+ indique qu'il s'agit d'un ammonium quaternaire diméthylé
- X^- correspond au contre ion (ici Br^-).

3. Formation des systèmes vésiculaires et caractérisation par microscopie électronique après cryofracture

Tous les composés ont été mis en solution aqueuse à une concentration pondérale de 30 g l^{-1} . Les échantillons obtenus après hydratation à 70 °C ont un aspect bleuté légèrement trouble. Après sonication et retour à la température ambiante, les 16 solutions sont limpides, bleuées et plus ou moins visqueuses. L'analyse des photographies, prises au microscope électronique après cryofracture indique, par comparaison avec celles réalisées dans le cas de solutions de liposomes [33] ou vésiculaires [34–36], la présence de vésicules dans tous les échantillons testés. De manière générale, les systèmes vésiculaires formés sont unilamellaires de forme sphérique (cf. Fig. 1: $\text{C}_{8F}\text{.NHCOC}_1\text{.C}_{12}\text{.N}^+\text{.Br}^-$) ou ovoïde (cf. Fig. 2: $\text{C}_{8F}\text{.NHCOC}_1\text{.C}_{18}\text{.N}^+\text{.Br}^-$) et polydisperses en taille. Dans certains cas on note également la présence de vésicules multilamellaires (cf. Fig. 3: $\text{C}_{8F}\text{.NHCOC}_1\text{.C}_{14}\text{.N}^+\text{.Br}^-$).

4. Distribution en taille et diamètre moyen des systèmes vésiculaires

Nous avons évalué, par spectroscopie par corrélation de photons (PCS), la distribution en taille des populations vésiculaires présentes dans les 16 échantillons testés. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 1.

L'analyse de l'intensité diffusée par les vésicules en fonction du pourcentage de lumière qu'elles diffusent indique la présence, dans chaque échantillon, de deux pics d'égale intensité centrés respectivement aux alentours de 100 nm et de

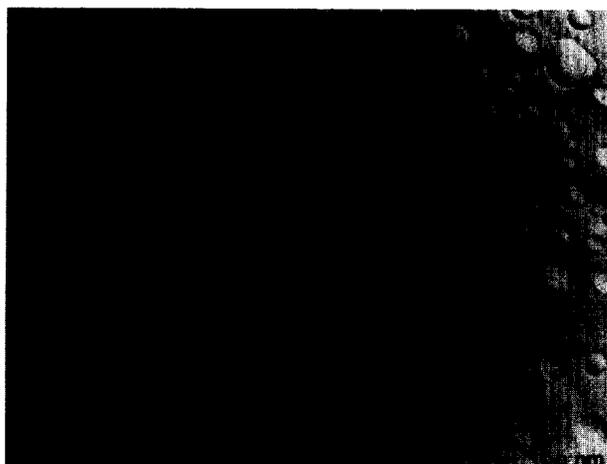


Fig. 1. Microscopie électronique après cryofracture réalisée sur l'échantillon $\text{C}_{8F}\text{.NHCOC}_1\text{.C}_{12}\text{.N}^+\text{.Br}^-$.

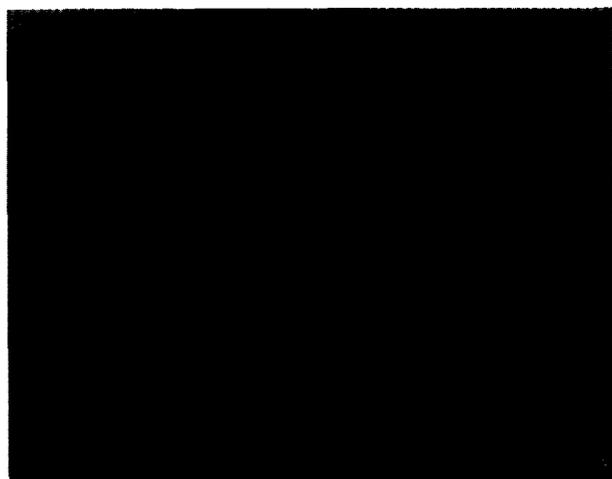


Fig. 2. Microscopie électronique après cryofracture réalisée sur l'échantillon $C_{8F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$.



Fig. 3. Microscopie électronique après cryofracture réalisée sur l'échantillon $C_{8F}NHCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$.

600 nm. Pour confirmer ce résultat et compte tenu du fait que les vésicules de grosse taille diffusent plus de lumière que celles de petite taille, nous avons procédé à une analyse de l'intensité diffusée en fonction du nombre de particules diffusantes (les résultats sont exprimés en intensité). Dans ce cas, on constate que plus de 90% de la lumière est diffusée par des particules dont le diamètre moyen est inférieur à 100 nm. Ces deux résultats montrent que les populations vésiculaires testées possèdent une distribution en taille de type unimodale, la bimodalité constatée lors de la première analyse ayant pour origine la relative polydispersité observée par microscopie électronique après cryofracture. Nous avons donc procédé, pour caractériser globalement le diamètre moyen de nos systèmes vésiculaires, à une analyse de l'intensité diffusée en mode unimodal. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 2. Toutes solutions confor-

dues, le diamètre moyen varie entre 116 nm et 185 nm avec une fréquence plus importante autour de 130 nm. Bien que supérieures, ces valeurs se recoupent avec celles obtenues lors des analyses précédentes si on tient compte des déviations standards associées. Enfin, le caractère polydispersé en taille des échantillons est souligné par les valeurs relativement élevées des indices de polydispersité, respectivement comprises entre 0,207 et 0,350.

5. Stabilité des vésicules au stockage

Afin d'évaluer la stabilité de nos échantillons, nous les avons stockés durant 1 mois à trois températures différentes: température ambiante (conditions de l'utilisateur), 37 °C et

Table 1
Distribution en taille des systèmes vésiculaires évaluée par PCS

Structure	Distribution en fonction du % d'intensité diffusée par les particules diffusantes: diamètres moyens (nm) ^a	Distribution en fonction du nombre de particules diffusantes: diamètre moyen (nm) ^b
$C_{6F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	109 et 435	76,8
$C_{8F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	91,4 et 615	76,8
$C_{10F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	88,5 et 892	79
$C_{8F}NHCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$	114 et 916	114
$C_{8F}NHCOC_1, C_{16}, N^+, Br^-$	134 et 639	79,9
$C_{8F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	113 et 760	95
$C_{6F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	67,2 et 380	67,2
$C_{10F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	79,9 et 320	67,2
$C_{8F}OCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	95 et 639	79,9
$C_{8F}OCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$	95 et 639	79,9
$C_{8F}OCOC_1, C_{16}, N^+, Br^-$	90 et 520	80
$C_{8F}OCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	67,2 et 537	79,8
$C_{8F}SCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	79,9 et 639	79,9
$C_{8F}SCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$	95 et 639	79,9
$C_{8F}SCOC_1, C_{16}, N^+, Br^-$	95 et 639	79,9
$C_{8F}SCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	79 et 639	79,9

^a % d'intensité équivalent pour les deux pics (valeurs au sommet des pics).

^b Intensité du pic supérieure à 90%.

Table 2
Diamètre moyen des systèmes vésiculaires évalué par PCS en mode cumulant

Structure	Diamètre moyen (nm)	Déviatoin standard (nm)	Indice de polydispersité
C _{6F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	133,4 ± 7,2	60,8 ± 4,1	0,207 ± 0,012
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	131,0 ± 4,6	72,3 ± 2,2	0,305 ± 0,011
C _{10F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	112,4 ± 4,6	59,7 ± 2,0	0,282 ± 0,012
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	185,1 ± 5,4	109,3 ± 2,6	0,348 ± 0,010
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	140,5 ± 5,1	77,3 ± 2,4	0,303 ± 0,011
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	158,3 ± 5,1	90,2 ± 2,4	0,325 ± 0,010
C _{6F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	128,1 ± 5,1	75,7 ± 2,1	0,350 ± 0,014
C _{10F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	117,0 ± 6,7	61,3 ± 3,5	0,275 ± 0,016
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	137,7 ± 5,7	74,1 ± 2,9	0,289 ± 0,012
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	137,6 ± 6,6	74,3 ± 3,1	0,291 ± 0,014
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	120,2 ± 8,3	59,5 ± 4,5	0,245 ± 0,018
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	116,6 ± 6,0	62,3 ± 2,8	0,285 ± 0,015
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	137,0 ± 5,0	76,4 ± 2,3	0,311 ± 0,017
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	131,3 ± 5,0	72,5 ± 2,1	0,305 ± 0,012
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	131,2 ± 5,0	71,1 ± 2,3	0,298 ± 0,018
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	124,6 ± 5,0	67,7 ± 2,2	0,295 ± 0,012

50 °C. Après conservation, nous avons procédé à une analyse qualitative en notant l'aspect des échantillons.

Les observations que nous avons faites sont rassemblées dans le Tableau 3. A titre indicatif, nous y avons également inclu celles réalisées après sonication.

Après conservation 1 mois à température ambiante, si on prend en compte la formation de dépôts, 12 solutions sont stables et cinq le sont moins à savoir, celles obtenues à partir des tensioactifs répondant au nom de code C_{10F}NHCOC₁, C₁₂, N⁺, Br⁻, C_{8F}SCOC₁, C₁₂, N⁺, Br⁻, C_{8F}SCOC₁, C₁₄, N⁺, Br⁻, C_{8F}SCOC₁, C₁₆, N⁺, Br⁻ et C_{8F}SCOC₁, C₁₈, N⁺, Br⁻.

Si après stockage 1 mois à 37 °C et 1 mois à 50 °C, l'instabilité des vésicules formées à partir des tensioactifs à connecteur SCO est confirmée par la présence de précipité blanc, dans les autres cas, elle se manifeste après stockage 1 mois à 50 °C sous la forme d'un gel bleuté et principalement pour des longueurs de la chaîne lipophile de 12 et 14 atomes de carbone.

L'analyse de ce gel par microscopie électronique après cryofracture, montre qu'il s'agit de très grosses vésicules (cf. Fig. 4: C_{8F}NHCOC₁C₁₂N⁺, Br⁻), le surnageant étant composé de vésicules de plus petite taille (cf. Fig. 5: C_{8F}NHCOC₁, C₁₂N⁺, Br⁻).

Table 3
Aspect des échantillons après stockage 1 mois à t. amb., 37 °C et 50 °C

Structure	Après sonication	1 mois à t. amb.	1 mois à 37°C	1 mois à 50°C
C _{6F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux	gel bleuté
C _{10F} NHCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, incolore précipité blanc	limpide, bleuté quelques agrégats	limpide, bleuté
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté	limpide, bleuté visqueux	limpide, bleuté visqueux
C _{8F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté légèrement visqueux	limpide, bleuté	limpide, bleuté
C _{6F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté	limpide, légèrement bleuté	limpide, incolore
C _{10F} NHCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté légèrement turbide	limpide, bleuté légèrement turbide	gel bleuté
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleutée légèrement turbide	limpide, bleutée légèrement turbide gel bleuté	limpide, bleutée
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleutée	limpide, bleuté légèrement turbide	limpide, bleuté légèrement turbide	gel bleuté
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté légèrement turbide et visqueux	limpide, bleuté légèrement turbide et visqueux	limpide, bleuté
C _{8F} OCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté quelques agrégats	limpide, bleuté	limpide, bleuté
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₂ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté précipité blanc	limpide, bleuté	limpide, incolore
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₄ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté précipité blanc	liquide, bleuté légèrement turbide, quelques agrégats	limpide, incolore précipité blanc
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₆ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté précipité blanc	limpide, incolore précipité blanc	limpide, incolore précipité blanc
C _{8F} SCOC ₁ , C ₁₈ , N ⁺ , Br ⁻	limpide, bleuté	limpide, bleuté précipité blanc	gel bleuté précipité blanc	limpide, incolore précipité blanc



Fig. 4. Microscopie électronique après cryofracture réalisée sur le gel bleuté présent dans l'échantillon $C_{8F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$ après stockage 1 mois à $50\text{ }^\circ\text{C}$.



Fig. 5. Microscopie électronique après cryofracture réalisée sur le surmeant de l'échantillon $C_{8F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$, après stockage 1 mois à $50\text{ }^\circ\text{C}$.

Enfin, le cas de la solution obtenue à partir du tensioactif $C_{10F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$ est particulier. En effet, si après stockage 1 mois à température ambiante on note la présence

d'un précipité blanc, ce dernier disparaît après stockage 1 mois à $37\text{ }^\circ\text{C}$ et 1 mois à $50\text{ }^\circ\text{C}$. Il semble donc que ce système vésiculaire soit, qualitativement, plus stable à température élevée qu'à température ambiante. L'hypothèse d'une modification de l'organisation en bicouche des ces tensioactifs en un autre système organisé [37] de type hexagonal, tubulaire ou autre est en cours d'analyse.

Pour compléter cette étude, nous avons procédé à une mesure du diamètre moyen des vésicules après stockage. Les résultats obtenus, par PCS en mode cumulant, sont rassemblés dans le Tableau 4.

Compte tenu de leur instabilité, nous n'avons pas analysé les systèmes vésiculaires formés à partir des tensioactifs $C_{8F}SCOC_1, C_{n'}, N^+, Br^-$ ($n' = 12, 14, 16, 18$).

Comme on peut le constater, pour une longueur de chaîne fluophile constante et égale à C_6F_{13} , les vésicules les plus stables en taille, quelle que soit la température de stockage, sont obtenues à partir des tensioactifs possédant une longueur de chaîne hydrocarbonée à 16 et 18 atomes de carbone. Lorsque la longueur de la chaîne lipophile diminue, la stabilité en taille décroît. Les systèmes les moins stables sont obtenus à partir des tensioactifs $C_{8F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$ et $C_{8F}OCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$. Le cas des systèmes vésiculaires formés à partir des tensioactifs de formule $C_{8F}QCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$ est intermédiaire: la stabilité en taille décroît lorsque la température de conservation augmente ($T_{amb} > 37\text{ }^\circ\text{C} > 50\text{ }^\circ\text{C}$).

6. Tentative de détermination de la T_c

En série hydrocarbonée, l'accroissement en taille d'un système vésiculaire en fonction du temps et dans des conditions données, s'explique par un mécanisme d'agrégation ou (et) de fusion [38]. Dans le cas des vésicules possédant une charge de surface positive si le mécanisme de fusion est privilégié, sa cinétique dépend principalement de la température critique de transition de phase entre l'état gel et l'état cristal-liquide des tensioactifs utilisés [38,39].

Table 4
Diamètre moyen après stockage 1 mois à différentes température évalué par PCS en mode cumulant

Structure	Δ après 1 mois à t. amb. ^a (nm)	Δ après 1 mois à $37\text{ }^\circ\text{C}$ ^a (nm)	Δ après 1 mois à $50\text{ }^\circ\text{C}$ ^a (nm)
$C_{6F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	^b	-4,2	+0,8
$C_{8F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	+164	+155	+1096
$C_{10F}NHCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	-23,4	+9,8	-44
$C_{8F}NHCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$	+1	+169	+148
$C_{8F}NHCOC_1, C_{16}, N^+, Br^-$	-32	+6	+68
$C_{8F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	-69	-68	+59
$C_{6F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	^b	+37	^b
$C_{10F}NHCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	+15	-6	+45
$C_{8F}OCOC_1, C_{12}, N^+, Br^-$	+154	+517	+524
$C_{8F}OCOC_1, C_{14}, N^+, Br^-$	+32	+67	+264
$C_{8F}OCOC_1, C_{16}, N^+, Br^-$	-19	-64	^b
$C_{8F}OCOC_1, C_{18}, N^+, Br^-$	-33	-45	-43

^a Δ = diamètre moyen après sonication - diamètre moyen après stockage.

^b Non déterminé.

Afin d'évaluer la T_c de nos systèmes vésiculaires, nous avons fait appel à deux techniques largement utilisées dans la littérature: La micro-calorimétrie différentielle par balayage de température (DSC) [40,41] et la mesure de l'intensité diffusée à 90° par les vésicules en fonction de la température [42].

Cependant, par DSC, sur une plage de température comprise entre 5°C et 90°C et un gradient de 1°C min^{-1} , quel que soit le tensioactif employé et la méthode de préparation utilisée (sonication ou mélange), aucun pic endothermique, correspondant à la fusion des chaînes hydrophobes, n'est observé. Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de chute brutale de l'intensité diffusée à 90° par les vésicules entre 9°C et 63°C (gradient 2°C min^{-1}), pouvant être associée à un changement d'indice de réfraction de la bicouche. La décroissance est lente et régulière.

Ces résultats confirment, tout en les généralisant, ceux publiés dans la littérature pour des structures tensioactives analogues [37,43]. La présence d'une chaîne hydrocarbonée et d'une chaîne perfluoroalkylée dans la même structure tensioactive devrait conduire à un arrangement préférentiel au sein de la bicouche (RF–RF, RH–RH) [30,43] et à une réduction des interactions hydrophobes [44]. On doit s'attendre donc à un phénomène beaucoup moins marqué (SH et hauteur de pic plus faibles), voire différent [45] et se produisant sur une gamme de température plus étendue (pic élargi).

7. Matériel et méthodes

7.1. Formation des vésicules par sonication

D'une manière générale, on introduit successivement, dans une ampoule en verre de 10 ml, 150 mg de tensioactif et 5 ml d'eau distillée désionisée (concentrations comprises entre 0,034 M et 0,05 M). Après avoir scellé l'ampoule, la solution est hydratée à 70°C pendant 15 min, homogénéisée au vortex (LABINO BV Model L 24, vitesse maximum), puis portée à nouveau à 70°C durant 15 min.

La sonication de l'échantillon est effectuée par l'intermédiaire d'une sonotrode à gobelet (BRANSON SONIFIER 450, diamètre 60 mm), pendant 30 min à une puissance de 160 W, en mode continu. Un bain thermostaté (POLYSTAT 44 Bioblock Scientific), relié au dispositif par une circulation d'eau, permet de maintenir une température constante de 70°C pendant toute la durée de l'expérimentation.

7.2. Formation des bicouches par agitation

D'une manière générale, on introduit successivement, dans un tube à émolyse de 10 ml, 150 mg de tensioactif et 5 ml d'eau distillée désionisée (concentrations comprises entre 0,034 M et 0,05 M). La solution est homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique durant 30 min à 70°C .

7.3. Microscopie électronique après cryofracture

0,5 μl d'échantillon est disposé entre deux plaques de cuivre. Ce "sandwich" est congelé dans du propane à usage domestique, liquéfié par de l'azote liquide (-196°C). Après congélation, le "sandwich" est placé dans un porte-échantillon, puis introduit dans un appareil à cryofracture (CRYOFRACT 190 REICHERT). La fracture est faite à -135°C sous un vide de 10^{-6} Pa. Après ombrage à 45° avec Pt–C, la réplique est stabilisée par recouvrement rotatif à 75° à l'aide d'une couche de carbone. La réplique est ensuite plongée dans une solution saturée en KOH [46], lavée à l'eau, puis trempée dans une solution d'eau de javel commerciale. Après lavage à l'eau, la réplique est disposée sur une grille pour être observée au microscope électronique (HITACHI H 600 100 kV).

7.4. Mesure de la taille par PCS

La granulométrie de nos vésicules a été mesurée à l'aide d'un spectrogoniomètre 633 équipé d'un corrélateur RTG (SEMATECH Nice France).

Afin de ne pas fausser les mesures par une viscosité variable, ou par des phénomènes de diffusions multiples en solution, nous avons dilué les solutions 10 fois (concentrations comprises entre $3,4 \times 10^{-3}$ M et 5×10^{-3} M).

Un tube contenant 3 ml d'échantillon est placé dans une cuve porte-échantillon baignée par du toluène. Un laser Néon–Hélium émet un rayonnement laser, à une longueur d'onde de 633,8 nm, sur l'échantillon. L'intensité diffusée est détectée par le photomultiplicateur du spectrogoniomètre (SEM 633), placé à un angle de 90° par rapport au rayon incident.

La fonction d'auto-corrélation est analysée en mode auto-normalisé par un algorithme d'inversion mis au point par P. Pike, M. Bertero et C. Demol. Un ordinateur type PC, équipé d'un logiciel RTG, permet de visualiser en temps réel la fonction d'auto-corrélation.

L'analyse en temps réel permet d'ajuster le temps d'échantillonnage, la durée de l'expérimentation et l'ouverture du diaphragme en fonction du nombre de photons détectés et de l'aspect de la courbe d'auto-corrélation. Le temps d'échantillonnage est fixé à 9 μs , l'ouverture du diaphragme est de 50, la durée de l'expérience est de 400 s.

7.5. Calorimétrie différentielle par balayage de température (DSC)

Les mesures de calorimétrie différentielle par balayage de température ont été réalisées à l'aide d'un MICROCAL MC-2 équipé d'un ordinateur type PC permettant d'enregistrer et d'analyser (logiciel Origin) les données brutes obtenues lors de chaque expérience. Afin de ne pas se placer sous le seuil de sensibilité de l'appareil [47], nous avons travaillé dans un domaine de concentration compris entre $2,3 \times 10^{-3}$ M et $2,15 \times 10^{-2}$ M. D'une manière générale, 2 ml d'échantillon

à analyser et 2 ml d'eau distillée désionisée sont prélevés à l'aide d'une seringue en verre et introduits, respectivement, dans la cellule échantillon ($V = 1,2$ ml) et dans la cellule de référence ($V = 1,2$ ml) du Microcal MC-2. Afin d'éviter toute variation de volume lors de la montée en température, l'échantillon étudié et la solution de référence sont dégazés (30 min) et les deux cellules de mesures placées sous atmosphère d'azote. Les deux solutions sont équilibrées à la température de départ durant 60 min, puis la programmation en température est lancée: $T_{\text{départ}} = 5$ °C; $T_{\text{finale}} = 90$ °C; vitesse de programmation = 1 °C min^{-1} . Entre deux mesures, et afin d'éviter toute contamination, les cellules de mesures sont lavées successivement avec du chloroforme, de l'éthanol, de l'eau savonneuse chaude, de l'eau distillée désionisée chaude et de l'eau distillée désionisée froide. Dans chaque cas, la programmation en température a été réalisée au moins quatre fois.

7.6. Intensité diffusée à 90°

Les mesures de l'intensité diffusée par les vésicules présentes dans les différents échantillons analysés, ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre SHIMADZU RF-5000 équipé d'une lampe xénon (150 W) et d'un photomultiplicateur (R452-01) placé à un angle de 90° par rapport à la source émettrice. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont fixées à 500 nm. Afin de ne pas fausser les mesures par une viscosité variable, nous avons travaillé avec des échantillons dilués, soit une concentration comprise entre $1,9 \times 10^{-2}$ M et $3,8 \times 10^{-2}$ M.

D'une manière générale, 2,5 ml d'échantillon sont introduits dans une cuve en quartz (prise 3 ml, trajet optique 1 cm), placée dans la cellule de mesure du spectrofluorimètre.

Un thermostat HAAKE F3-C équipé d'un programmeur de température HAAKE PG-20 permet de fixer la température de départ T_0 de l'échantillon à analyser. Après stabilisation et contrôle de la température grâce à un thermocouple (NiCr, Ni (K)), placé dans la cuve et relié à un thermodigit N 800, La montée en température, entre 9 °C et 63 °C, est effectuée avec une pente de 2 °C min^{-1} . L'homogénéisation de la température au sein de l'échantillon est assurée par l'intermédiaire d'un agitateur magnétique à vitesse variable HELIMA, CUV-O-STIR model 333. L'intensité diffusée à 90° par l'échantillon étudié est affichée en temps réel sur l'écran du microprocesseur équipant le spectrofluorimètre. Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, les mesures ont été réalisées au moins trois fois.

8. Conclusion

L'étude que nous avons réalisée montre que les tensioactifs bicaténaires mixtes de type cationique sont d'excellents précurseurs de systèmes vésiculaires simples et stables en solution aqueuse. Du fait de la dualité structurale de ces composés, les vésicules obtenues présentent des propriétés similaires à

celles de leurs analogues totalement hydrocarbonés ou totalement perfluorés. Nous avons pu ainsi mettre en évidence l'effet stabilisant produit au sein de la bicouche par une augmentation des interactions hydrophobes, ainsi que par la présence d'éléments structuraux sur la partie fluophile capables d'induire la formation de liaisons hydrogène (connecteur amide) et (ou) dipolaires (connecteur ester). Enfin, nous n'avons pas pu caractériser la température critique de transition de phase entre l'état gel et l'état cristal-liquide de ces systèmes. Mécanisme de transition différent ou technique de mesure non adaptée car trop peu sensible, la réponse à cette question est en cours d'étude.

Actuellement, nous procédons à l'évaluation des capacités d'encapsulation et de relargage de nos systèmes ainsi qu'à une première série de tests toxicologiques. Ces résultats feront l'objet d'une publication ultérieure.

Acknowledgements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de la société SEPORGA en association avec l'ANRT (CIFRE 619/17) et l'Université de Nice—Sophia Antipolis.

References

- [1] A. Blume, dans O. Braun-Falco, H.C. Korting, H.I. Maibach, *Liposome dermatics*, Springer, Berlin, 1992, p. 29.
- [2] J.T. Simonnet, *Cosmet. Toil. Mag.* 109 (1994) 45.
- [3] P.W. Wertz, dans O. Braun-Falco, H.C. Korting, H.I. Maibach, *Liposome dermatics*, Springer, Berlin, 1992, p. 39.
- [4] R.R. Schmidt, dans O. Braun-Falco, H.C. Korting, H.I. Maibach, *Liposome dermatics*, Springer, Berlin, 1992, p. 45.
- [5] R.M. Handjani-Vila, A. Ribier, G. Vanlerberghie, dans F. Puisieux, J. Delattre, *Les liposomes, applications thérapeutiques*, Tec & Doc—Lavoisier, 1985, p. 297.
- [6] E. Toutitou, F. Levi-Schaffer, N. Dayan, F. Alhaique, F. Ricciari, *Int. J. Pharm.* 103 (1994) 131.
- [7] M. Mezei, dans G. Gregariadis, *Liposomes as drug carriers*, Wiley, New York, 1988, p. 663.
- [8] M. Mezei, V. Gulasekharan, *Life Sci.* 26 (1980) 1473.
- [9] M. Foldvari, A. Gesztes, M. Mezei, *J. Microencapsulation* 7 (1990) 479.
- [10] C.I. Price, J.W. Horton, C.R. Baxter, *J. Surg. Res.* 49 (1990) 174.
- [11] K. Suzuki, K. Sakon, *Cosmet Toil.* 105 (1990) 65.
- [12] D. Raskovic, P. Piazza, *J. Lipo. Res.* 3 (1993) 737.
- [13] S.J. Strianse, *Cosmet Toil.* 93 (1978) 37.
- [14] M.M. Rieger, *Cosmet Toil.* 96 (1981) 35.
- [15] A.A. Siciliano, *Cosmet Toil.* 100 (1985) 43.
- [16] R.M. Handjani-Vila, A. Ribier, B. Rondot, G. Vanlerberghie, *Int. J. Cosmet. Sci.* 1 (1979) 303.
- [17] J.A. Hayward, W.P. Smith, *Cosmet Toil.* 105 (1990) 47.
- [18] M. Ghyczy, J. Gareiss, T. Kovats, *Cosmet Toil. Mag.* 109 (1994) 75.
- [19] H.E. Junginger, H.E.J. Hofland, J.A. Bouwstra, *Cosmet. Toil.* 106 (1991)
- [20] J.E. Surlève-Bazeille, M. Mercier, R. le Menn, A. Fructus, J. Arnaud-Battandier, *Int. J. Cosmet. Sci.* 15 (1993) 101.
- [21] M.H. Schmid, H.C. Korting, *Clin. Investig.* 71 (1993) 649.
- [22] J. Delattre, M.P. Vasson, dans F. Puisieux, J. Delattre, *Les liposomes, applications thérapeutiques*, Tec & Doc—Lavoisier, 1985, p. 115.

- [23] I. Bourdial, *Sci. Vie* 906 (1993) 54.
- [24] M. Foldvari, A. Gesztes, M. Mezei, L. Cardinal, I. Kowalczyk, M. Behl, *Drug Dev. Ind. Pharmacy* 19 (1993) 2499.
- [25] A. Sismondi, S. Szönyi, P. Abenin, L. Joncheray, A. Cambon, *Tenside Surf. Det.* 29 (1992) 3.
- [26] A. Sismondi, S. Szönyi, P. Abenin, L. Joncheray, A. Jouani, A. Cambon, *Tenside Surf. Det.* 29 (1992) 5.
- [27] H. Trabelsi, A. Cambon, *Brevet M.C (France)*, n° 2338 le 4.4.96.
- [28] F. Benomar, E. Rouvier, A. Cambon, *Brevet M.C (France)*, n° 2271 le 5.7.94.
- [29] F. Guittard, E. Taffin de Givenchy, A. Cambon, *Brevet M.C (France)*, n° 2273 le 27.4.94.
- [30] T. Kunitake, N. Higashi, *Makromol. Chem; Suppl.* 14 (1985) 81.
- [31] A. Sismondi, P. Abenin, L. Joncheray, A. Cambon, *J. Fluorine Chem.* 59 (1992) 127.
- [32] M. Gaysinski, *Thèse de doctorat nouveau régime, Nice—Sophia Antipolis, 1995.*
- [33] M. Postel, P. Chang, J-P. Roland, M-P. Krafft, J.G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* 1086 (1991) 95.
- [34] T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S-I. Yasunami, K. Takarabe, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5401.
- [35] M. Ambühl, F. Bangerter, P.L. Luisi, P. Skrabal, H.J. Watzke, *Langmuir* 9 (1993) 36.
- [36] H. Meinert, P. Reuter, W. Röhlke, A. cambon, S. Szönyi, M. Gaysinski, *J. Fluorine Chem.* 66 (1994) 203.
- [37] F. Guillod, *Thèse de doctorat nouveau régime, Nice—Sophia Antipolis, 1994.*
- [38] J.Y. Lai, D. D. Chow, K. J. Hwang, *J. Pharm. Sci.* 77 (1988) 432.
- [39] H.L. Kantor, S. Marbrey, J.H. Prestegard, J.M. Sturtevant, *Biochim. Biophys. Acta* 466 (1977) 402.
- [40] J.M. Sturtevant, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38 (1987) 463.
- [41] J-M. Kim, T. Kunitake, *Mem. Fac. Eng. Kyushu Univ.* 49 (1989) 93.
- [42] P.N. Yi, R.C. Macdonald, *Chem. Phys. Lipids* 11 (1973) 114.
- [43] T. Kunitake, S-I. Tawaki, N. Nakashima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56 (1983) 3235.
- [44] C. Santaella, *Thèse de doctorat nouveau régime, Nice—Sophia Antipolis, 1991.*
- [45] T. Kunitake, N. Higashi, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 692.
- [46] G.C. Rubben, *J. Electron Microsc. Techn.* 13 (1989) 335.
- [47] M.J. Blandamer, B. Briggs, P.M. Cullis, J.A. Green, M. Waters, G. Soldi, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88 (1992) 3431.