

Conception de vésicules à partir de la membrane du globule gras du lait (MFGM), de babeurres et de certaines de leurs fractions lipidiques

Auteur : Mulkers, Valentin

Promoteur(s) : Blecker, Christophe

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18072>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**CONCEPTION DE VESICULES A PARTIR DE
LA MEMBRANE DU GLOBULE GRAS DU LAIT
(MFGM), DE BABEURRES ET DE CERTAINES
DE LEURS FRACTIONS LIPIDIQUES**

VALENTIN MULKERS

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022 - 2023

PROMOTEUR : PROF. CHRISTOPHE BLECKER

Copyright©. Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**CONCEPTION DE VESICULES A PARTIR DE
LA MEMBRANE DU GLOBULE GRAS DU LAIT
(MFGM), DE BABEURRES ET DE CERTAINES
DE LEURS FRACTIONS LIPIDIQUES**

VALENTIN MULKERS

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022 - 2023

PROMOTEUR : PROF. CHRISTOPHE BLECKER

Ce travail de fin d'études a été réalisé au sein du laboratoire de Sciences des Aliments et Formulation (SAF) faisant partie de l'unité de recherche et d'enseignement Terra de la faculté Gembloux Agro-Bio Tech (ULiège).

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail de fin d'études ainsi que celles et ceux qui m'ont soutenu durant cette période.

Je remercie tout d'abord mon promoteur, le Prof. Christophe Blecker pour son implication, son aide précieuse et son travail de relecture. Je le remercie également de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie aussi le doctorant Laurent Seutin pour le partage de ses connaissances sur le sujet de ce travail ainsi que pour son aide au laboratoire, son travail de relecture, sa disponibilité et son soutien.

J'exprime toute ma gratitude au Dr. Nicolas Jacquet pour son aide technique et ses explications quant à l'utilisation du microfluidiseur.

Je remercie le Dr. Magali Deleu pour son aide précieuse pour la mise en place du protocole de production *thin-film hydration* et le Prof. Sabine Danthine pour le partage de ses connaissances et de ses techniques d'analyse de la MFGM.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel et les doctorants du laboratoire de sciences des aliments. Je souhaite particulièrement exprimer ma gratitude à Marjorie pour la bienveillance et la disponibilité sans faille dont elle a fait preuve ainsi qu'à Sandrino pour l'aide technique qu'il m'a apportée.

J'aimerais également remercier tous les TFistes du Terra sans qui le quadrimestre aurait paru beaucoup plus long. Je remercie particulièrement Michael, Sarah, Antoine et Théo pour la bonne ambiance et le soutien moral qu'ils ont su apporter. Je remercie également Michael pour son aide au laboratoire.

Pour finir, j'aimerais particulièrement remercier ma famille et mes proches pour leur soutien durant ce quadrimestre et durant toutes mes études.

Résumé

Les applications des liposomes dans l'industrie agro-alimentaire sont nombreuses en raison notamment du nombre important de molécules bioactives sensibles qui y sont utilisées. Cependant, le coût des matières premières actuellement utilisées pour leur formation et les techniques de production peu adaptées à cette application constituent un frein important à leur développement au sein de ce secteur.

Le présent travail vise à investiguer la faisabilité d'une production de liposomes à partir d'un sous-produit riche en phospholipides et abondant dans l'industrie agro-alimentaire, les babeurres, ainsi que d'une méthode de production physique adaptable à grande échelle et sans danger pour le consommateur, la microfluidisation.

Pour ce faire, la formation de liposomes a été testée sur deux babeurres et sur de la MFGM ainsi que sur les lipides totaux et polaires de ces trois matières premières. Avant de procéder à la formation de liposomes par microfluidisation, celle-ci a d'abord été effectuée au moyen de la méthode *thin-film hydration*.

Des vésicules de tailles moyennes comprises entre 130 et 450 nm ont pu être formées à partir de toutes les matières premières par cette technique et une influence de la composition en lipides et de la concentration en phospholipides a été démontrée. Des vésicules d'une taille moyenne comprise entre 100 et 200 nm ont ensuite été obtenues par microfluidisation des babeurres bruts et de certaines de leurs fractions. Les fractions enrichies en lipides polaires ont permis l'obtention des particules de plus petite taille, démontrant une influence de la concentration en phospholipides des matières premières sur la taille des vésicules formées. L'impact des paramètres de microfluidisation tels que la pression, le nombre de passages et la géométrie de la chambre a également été démontré. Le potentiel ζ des suspensions a aussi été étudié, mettant en lumière un éventuel problème de stabilité pour la plupart des suspensions formées.

Mots-clés : liposome, microfluidisation, babeurre, MFGM, thin-film hydration, phospholipide

Abstract

Liposomes have many applications in the food industry, not only because of the large number of sensitive bioactive molecules used. However, the cost of the raw materials currently used to form them and the ill-suited production techniques are major obstacles to their development in this sector.

The aim of this work is to investigate the feasibility of producing liposomes from a by-product rich in phospholipids and abundant in the food industry : buttermilk, and a physical production method that can be adapted on a large scale and is safe for the consumer : microfluidisation.

Vesicles with average sizes of between 130 and 450nm were formed from all the raw materials using this technique, and an influence of lipid composition and phospholipid concentration was demonstrated. Vesicles with an average size of between 100 and 200 nm were then obtained by microfluidisation of the raw buttermilks and some of their fractions. Fractions enriched with polar lipids produced smaller particles, demonstrating the influence of the concentration of phospholipids in the raw materials on the size of the vesicles formed. The impact of microfluidisation parameters such as pressure, number of passages and chamber geometry was also demonstrated. The ζ potential of the suspensions was also studied, highlighting a possible stability issue for most of the suspensions formed.

Keywords : liposome, microfluidisation, buttermilk, MFGM, thin-film hydration, phospholipid

Table des matières

1.	Introduction	1
2.	Etat de l'art	2
2.1.	La membrane du globule gras du lait (MFGM)	2
2.1.1.	Origine et structure	2
2.1.2.	Composition	3
2.1.3.	Méthodes d'extraction	4
2.2.	Les babeurres	5
2.2.1.	Définition, types et caractéristiques	5
2.2.2.	Enrichissement en phospholipides issus de la MFGM.....	6
2.3.	Les liposomes	7
2.3.1.	Définition.....	7
2.3.2.	Structures	7
2.3.3.	Matières premières	8
2.3.4.	Méthodes de production	8
2.3.5.	Stabilité.....	11
2.3.6.	Liposomes formés à partir de la MFGM	11
2.3.7.	Utilisations dans l'industrie agro-alimentaire	13
3.	Objectif et stratégie expérimentale.....	15
4.	Matériel et méthodes	16
4.1.	Matières premières	16
4.2.	Extraction de la MFGM et calcul du rendement d'extraction	16
4.3.	Caractérisation des matières premières	17
4.3.1.	Extraction et quantification des lipides totaux	17
4.3.2.	Fractionnement et quantification des lipides polaires, neutres et des acides gras libres	
4.3.3.	Quantification des phospholipides	18
4.3.4.	Quantification des protéines	19
4.3.5.	Caractérisation des propriétés interfaciales	19
4.4.	Formation des liposomes par la méthode thin-film hydration.....	19
4.5.	Formation des liposomes par microfluidisation	20
4.6.	Sonication	20
4.7.	Caractérisation des liposomes	20
4.7.1.	Taille moyenne des particules et répartition de tailles.....	20

4.7.2.	Potentiel ζ	21
4.7.3.	Microscopie optique	21
4.8.	Traitement statistique des données	21
5.	Résultats et discussion.....	22
5.1.	Caractérisation des matières premières	22
5.1.1.	Composition générale	22
5.1.2.	Composition lipidique	23
5.1.3.	Propriétés interfaciales	24
5.2.	Taille moyenne des particules.....	27
5.2.1.	Méthode thin-film hydration	27
5.2.2.	Formation de liposomes par microfluidisation.....	32
5.2.3.	Comparaison des résultats obtenus par la méthode thin-film hydration et par microfluidisation	38
5.2.4.	Indices de polydispersité et répartition de la taille des particules	39
5.3.	Potentiel ζ et stabilité	40
6.	Contribution personnelle	43
7.	Conclusion et perspectives	44
8.	Bibliographie.....	46

Liste des abréviations

MFGM : membrane du globule gras du lait / Milk Fat Globule Membrane

SM2 : babeurre SM2

SM3 : babeurre SM3

LP MFGM : lipides polaires de la membrane du globule gras du lait

LP SM2 : lipides polaires du babeurre SM2

LP SM3 : lipides polaires du babeurre SM3

LT MFGM : lipides totaux de la membrane du globule gras du lait

LT SM2 : lipides totaux du babeurre SM2

LT SM3 : lipides totaux du babeurre SM3

PL Soja : phospholipides de soja

TFH : méthode *thin-film hydration*

MLV : multilamellar vesicle

MVV : multivesicular vesicle

ULV : unilamellar vesicle

SUV : small unilamellar vesicle

LUV : large unilamellar vesicle

GUV : giant unilamellar vesicle

Liste des figures

Figure 1. Structure de la MFGM selon Vanderghem et al. ⁹ . La partie non colorée de la membrane représente un morceau de la bicouche qui se détache du globule gras. Abréviations: ADPH, adipophiline; XDH/XO, xanthine déshydrogénase/oxydase; FABP, protéine de liaison aux acides gras; PP3, protéose-peptone (fraction 3); CD36, cluster de différenciation 36; MUC 1, mucine 1; MUC 15, mucine 15.	3
Figure 2. Structure des liposomes, illustration tirée de la publication de Jash et al. ⁴¹	7
Figure 3. Isothermes de compression des films monocouches des lipides polaires à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : PL Soja, phospholipides de soja; LP MFGM, lipides polaires de la MFGM; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3; LP SM2, lipides polaires du babeurre SM2.	24
Figure 4. Isothermes de compression des films monocouches des lipides totaux à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : LT MFGM, lipides totaux de la MFGM; LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LT SM2, lipides totaux du babeurre SM2.	25
Figure 5. Isothermes de compression des films monocouches des matières premières brutes à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	26
Figure 6. Image d'un échantillon formé à partir de MFGM lors des tests préliminaires et illustrant l'inefficacité du protocole testé. Photo prise par le microscope Eclipse E400 (objectif x20).	27
Figure 7. Tailles moyennes des particules obtenues par la méthode thin-film hydration. Abréviations : SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides	30
Figure 8. Evolution de la taille moyenne des particules en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur M-110EH. Abréviations : LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3; PL Soja, phospholipides de soja.	34
Figure 9. Evolution de l'aspect d'une suspension de lipides polaires du babeurre SM3 en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur M-110EH. La première cuvette en partant de la gauche correspond à 0 passages et la cuvette la plus à droite à 5 passages.	35
Figure 10. Evolution de la taille moyenne des particules en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur 110T. Abréviations : LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3, PL Soja, phospholipides de soja.	36
Figure 11. Comparaison des tailles moyennes obtenues pour le microfluidiseur M110-EH et le microfluidiseur 110T après, respectivement, 5 et 10 passages. Abréviations : PL Soja, phospholipides de soja; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3.	36
Figure 12. Comparaison des tailles moyennes obtenues pour l'ensemble des méthodes. Abréviations : TFH, méthode thin-film hydration; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	38
Figure 13. Comparaison des indices de polydispersité obtenus pour l'ensemble des résultats. Abréviations : TFH, méthode thin-film hydration; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	39
Figure 14. Comparaison des potentiels ζ des suspensions. Abréviations: TFH, méthode thin-film hydration; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	40

Figure 15. Image de l'échantillon SM2 prise au moyen du microscope Eclipse Ti2 (objectif x100, immersion dans l'huile) illustrant le phénomène d'agrégation des particules. 42

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition en lipides polaires principaux de la MFGM selon la littérature.....	4
Tableau 2. Composition des babeurre selon la littérature exprimée en % de matière sèche. Données issues du tableau 1 de Vanderghem et al. ¹¹ et mises à jour avec les données de Barry et al. ³⁰ (a) et Costa et al. ³² (b).	6
Tableau 3. Tailles des catégories de liposomes selon la littérature.	8
Tableau 4. Liste de publications sur la production de liposomes à partir de MFGM.	13
Tableau 5. Composition générale des matières premières. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	22
Tableau 6. Composition lipidique des matières premières. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.	23
Tableau 7. Composition lipidique des matières premières rapportées aux lipides totaux. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.....	23
Tableau 8. <i>Points caractéristiques des isothermes de compression et élasticités. Abréviations: LP, lipides polaires; LT, lipides totaux; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; A₀, surface marquant le début de l'isotherme de compression; A₁, surface de la première transition; A₂, surface de la deuxième transition; π_1, pression de surface à la première transition; π_2, pression de surface à la deuxième transition.</i>	26
Tableau 9. Résultats des principaux tests préliminaires de la méthode thin-film hydration. Abréviations : SM3, babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3.	28
Tableau 10. Taux de réduction de la taille moyenne des particules après sonication des suspensions à 8 mg/mL formées par la méthodes thin-film hydration. Un taux négatif est significatif d'une augmentation de la taille des particules.	32
Tableau 11. Comparaison avec la littérature des tailles moyennes et des répartitions de tailles des particules formées par microfluidisation des phospholipides de soja.....	33

1. Introduction

L'utilisation grandissante de composés bioactifs sensibles au sein de l'industrie agro-alimentaire, en réponse aux demandes du marché pour des produits plus nutritifs et plus naturels, pose deux questions majeures : comment protéger ces composés du début du procédé de fabrication jusqu'à leur objectif technologique ou nutritionnel et comment les rendre disponibles au moment opportun ?

Une solution réside dans la conception de systèmes physico-chimiques tels que les liposomes. En effet, ces vésicules composées de phospholipides et pouvant emprisonner des molécules de type hydrophile ou hydrophobe grâce à leur(s) bicouche(s) phospholipidique(s) et leur cœur aqueux sont utilisées depuis de nombreuses années dans les secteurs pharmaceutique et cosmétique pour répondre aux mêmes problématiques.

Cependant, ces industries utilisent traditionnellement des phospholipides purifiés provenant du soja ou de l'œuf et des procédés peu adaptés à l'industrie agro-alimentaire¹.

D'autres matières premières riches en phospholipides produites en grandes quantités par l'industrie agro-alimentaire sont les babeurres. En effet, ces sous-produits de la fabrication du beurre sont riches en fractions de la membrane du globule gras du lait (MFGM), elle-même riche en phospholipides. Couplée à une méthode de production adaptée telle que la microfluidisation, la production de liposomes à partir de ces babeurres ou de fractions enrichies de ceux-ci pourrait rendre leur utilisation plus rentable dans le secteur agro-alimentaire et accélérer leur développement.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la faisabilité d'une production de liposomes à partir de babeurres industriels par microfluidisation, un procédé physique applicable à l'échelle industrielle. Pour atteindre cet objectif, la formation de liposomes sera au préalable testée à l'échelle laboratoire par la méthode conventionnelle de production *thin-film hydration*. Les tests seront d'abord menés sur la MFGM puis sur des fractions de moins en moins pures des babeurres afin d'évaluer la nécessité d'une purification préalable de ce sous-produit.

2. Etat de l'art

2.1. La membrane du globule gras du lait (MFGM)

2.1.1. Origine et structure

La membrane du globule gras du lait ou « Milk fat globule membrane » (MFGM) se définit comme une triple couche constituée de lipides polaires et de protéines entourant les globules gras présents dans le lait. Les rôles de la MFGM sont nombreux. Elle joue le rôle d'émulsifiant et de stabilisant des globules gras dans la phase aqueuse. Elle empêche de ce fait leur floculation et leur coalescence mais elle empêche également leur dégradation par les lipases²⁻⁴. Outre ces propriétés physico-chimiques, la MFGM possède également des propriétés anti-inflammatoires, anticancérigènes et favorise le développement du cerveau des nouveaux nés grâce à sa composition spécifique en phospholipides^{1,5-7}

La triple couche de la MFGM trouve son origine lors de la formation des globules gras. La première couche, dite couche interne, se forme à la surface des gouttelettes de triglycérides formées dans le cytoplasme et provenant du réticulum endoplasmique. Elle est composée de lipides polaires et de protéines dites « à électrons denses »⁸. La deuxième couche se forme lors du bourgeonnement de ces gouttelettes hors des cellules sécrétrices des glandes mammaires. Cette deuxième membrane est en réalité une bicouche ayant la même composition et structure que la membrane plasmique apicale des cellules sécrétrices dont elle est issue³. Entre ces deux couches se trouve un espace de 10 à 20 nm rempli de matériel « électron-dense »^{2,4,9}.

La structure de la MFGM a été étudiée en détail, notamment par Danthine et al², Evers¹⁰, Vanderghem et al¹¹ et Dewettinck et al.¹².

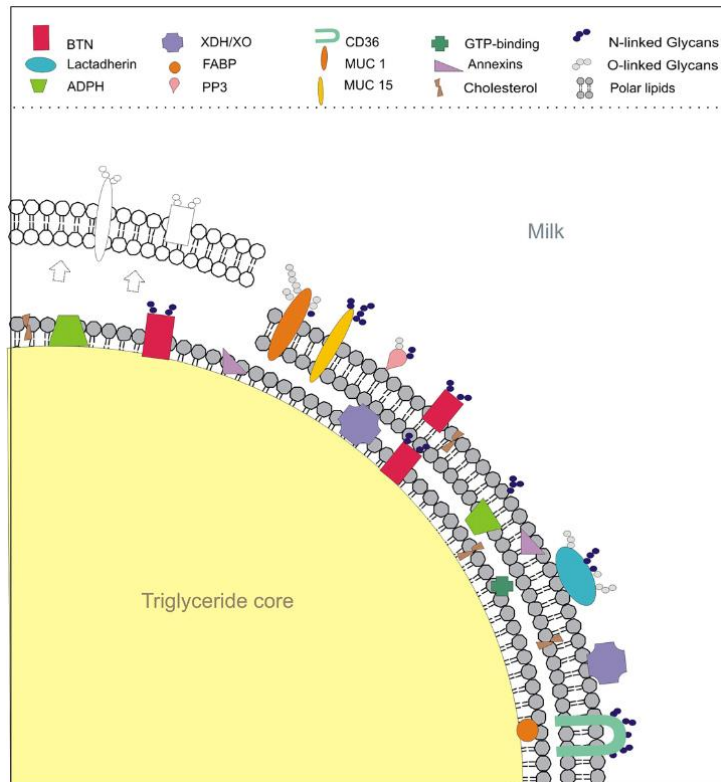


Figure 1. Structure de la MFGM selon Vanderghem et al.⁹. La partie non colorée de la membrane représente un morceau de la bicouche qui se détache du globule gras. Abréviations: ADPH, adipophiline; XDH/XO, xanthine déshydrogénase/oxydase; FABP, protéine de liaison aux acides gras; PP3, protéose-peptone (fraction 3); CD36, cluster de différenciation 36; MUC 1, mucine 1; MUC 15, mucine 15.

La proportion de MFGM au sein d'un lait est majoritairement dépendante du taux de graisse et du diamètre des globules gras qui varie de 0,1 à 20 μm avec une moyenne de 4 μm ². Ces deux paramètres varient en fonction du stade de lactation, de la saison, de la nutrition, de l'état de santé et de la race des vaches utilisées. La MFGM représente 2 à 6 % de la masse totale de globules gras³.

2.1.2. Composition

La composition générale de la MFGM a également été le sujet de nombreuses publications. Celle-ci est fortement dépendante de la méthode d'extraction et des paramètres de production du lait cités dans le point 2.1.1. Elle est cependant majoritairement composée d'un mélange complexe d'environ 50 % de protéines et 50 % de lipides^{3,5,8} qui représentent à eux deux plus de 90 % de la masse sèche². Le reste de la matière sèche est notamment composé de carbohydrates¹³.

2.1.2.1. Protéines

Les protéines représentent 25 à 60 % de la masse sèche². La composition en protéines de la MFGM est très spécifique et les protéines qui la composent ne représentent que 1 à 2%

des protéines du lait. Parmi les protéines majoritaires, on peut citer la xanthine oxydase, la butyrophiline, l'adipophiline ou des acides périodiques de Schiff 6/7 comme la lactadhérine^{14,15}. Elles peuvent être transmembranaires ou non⁸.

Quelques publications se sont focalisées sur les protéines de la MFGM parmi lesquelles figurent celles de Mather¹⁴ et Vanderghem et al.^{9,15}.

2.1.2.2. Lipides

La répartition des lipides de la MFGM est la suivante: 15 à 42,6 % de lipides polaires, 56 à 80 % de lipides neutres et 0,6 à 6,3 % d'acides gras libres^{2,4,8,16}.

Les lipides neutres sont composés de mono-, di- et triglycérides, de cholestérol et d'esters de cholestérols. Le pourcentage de lipides neutres dépend fortement de la méthode d'isolation de la MFGM^{3,12}.

Les lipides polaires sont composés de phospholipides qui peuvent être classés en deux groupes : les glycérophospholipides et les sphingolipides. Environ 65 % des phospholipides du lait se trouvent dans la MFGM¹.

Les glycérophospholipides majeurs sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). La phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS) sont présents en plus faible quantité. Les sphingolipides majeurs sont la sphingomyéline (SM). Les lactosylcéramides et glucosylcéramides suivent ensuite^{1,3,5,11-13,17,18}.

Lipides polaires	Pourcentage des lipides totaux^{2,4,12,17,19-22}
Phosphatidyléthanolamine (PE)	22 - 36,5
Phosphatidylcholine (PC)	24,6 - 42
Sphingomyéline (SM)	17,3 - 22
Phosphatidylinositol (PI)	5 - 11
Phosphatidylsérine (PS)	3 - 7,28

Tableau 1. Composition en lipides polaires principaux de la MFGM selon la littérature.

Les phospholipides de la MFGM se différencient de ceux présents dans le soja, historiquement utilisés pour la formation de liposomes, par leur composition en acides gras. En effet, ils sont majoritairement composés d'acides gras à longues chaînes, saturés, mono- ou di-insaturés comme l'acide palmitique (16:0), stéarique (18:0), tricosylique (23:0), myristique (C14:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2)^{3,23,24}. Cela leur confère une température de transition plus élevée^{25,26}.

2.1.3. Méthodes d'extraction

Une grande partie de l'hétérogénéité dans la composition de la MFGM à travers la littérature est due à sa méthode d'isolation²⁷. Les méthodes d'extraction classiques sont

composées de 5 étapes: la séparation de la crème du reste des composants du lait par centrifugation, le lavage de cette dernière afin d'éliminer les derniers éléments provenant du lait écrémé comme le lactose, la maturation de la crème, la déstabilisation de l'émulsion et la récupération de la membrane^{2,27}. Ce procédé est semblable à celui utilisé pour la production de beurre à l'exception des étapes de lavage. Les deux étapes dont les protocoles varient le plus sont le lavage et la récupération de la membrane.

Une alternative à l'utilisation de crème comme matière première, particulièrement intéressante à l'échelle industrielle, est l'utilisation de babeures. En effet, avec une production mondiale de beurres et ghees de $12,5 \cdot 10^6$ tonnes et de babeures en poudre de $6,6 \cdot 10^5$ tonnes en 2020²⁸, il s'agit d'une ressource en phospholipides particulièrement abondante et relativement bon marché²⁹. En effet, lors du barattage, les éléments de la MFGM solubles en phase aqueuse tels que les phospholipides se concentrent dans le babeurre⁴. La concentration en phospholipides des babeures est jusqu'à 15 fois plus élevée que dans le lait entier³⁰.

2.2. Les babeures

2.2.1. Définition, types et caractéristiques

Le babeurre se définit comme la phase aqueuse relâchée par la masse de beurre lors du processus de barattage de la crème^{11,31}. Il existe plusieurs types de babeures en fonction de la crème utilisée. On distingue le babeurre doux, le babeurre acide et le babeurre de lactosérum. Les deux premiers sont issus de la production de beurre. Le babeurre acide est obtenu à partir de crème acidifiée par des ferments avant le barattage alors que le babeurre doux est obtenu lors de la production de beurre sans acidification préalable de la crème par le procédé NIZO. Le babeurre de lactosérum est, lui, issu du procédé de fabrication du fromage^{6,11}. En effet, le lactosérum résultant du procédé de coagulation de la caséine est centrifugé après récupération du caillé et la crème de lactosérum est ensuite baratée pour former le babeurre de lactosérum. A la différence des deux premiers babeures, il ne contient presque plus de micelles de caséines et a une teneur en lipides et en phospholipides supérieure^{6,32}.

Un quatrième produit classé dans les babeures est le sérum résultant de la production de matière grasse laitière anhydre par centrifugation du beurre. Il a une composition semblable aux babeures classiques avec une proportion de lipides jusqu'à 4,5 % plus élevée et une proportion de lipides polaires également bien plus élevée⁵.

Le tableau 2 reprend les compositions des babeures rencontrées dans la littérature.

Produit	Lipides totaux	Lipides polaires	Protéines	Lactose	Cendres
Babeurre doux	4,6 - 14,5	0,79 ^a - 2,1	25 - 36,5	48,1 - 57,2	5,6 - 8,4
Babeurre acide	22,3	1,15	27,8	43,7	6,2
Babeurre de lactosérum	14,21 ^b - 28,9	1,3 - 2,17 ^b	13,2 - 26,91 ^b	52,1 - 63,4	5,8 - 7,48 ^b
Sérum	23,9	11,5	-	-	-

Tableau 2. Composition des babeurres selon la littérature exprimée en % de matière sèche. Données issues du tableau 1 de Vanderghem et al.¹¹ et mises à jour avec les données de Barry et al.³⁰ (a) et Costa et al.³² (b).

Les babeurres sont principalement utilisés pour leurs propriétés stabilisantes et émulsifiantes que leur procurent les phospholipides et les protéines issues de la MFGM. Ils sont destinés à des secteurs comme l'industrie laitière, boulangère ou d'autres secteurs alimentaires comme pour la fabrication de sauces, chips et chocolats. Dans l'industrie laitière, ils peuvent servir à la fabrication de fromage, de yaourt, de glaces, de laits, beurres et crèmes recombinaées⁶. Une faible proportion de babeurres est également consommée en boissons. Il existe seulement quelques entreprises produisant des fractions riches en phospholipides à partir de babeurres de façon industrielle telle que la coopérative Fonterra (Nouvelle-Zélande)²⁵.

2.2.2. Enrichissement en phospholipides issus de la MFGM

En raison des possibilités de valorisation de plus en plus nombreuses des phospholipides de la MFGM, il s'avère aujourd'hui intéressant de pouvoir les concentrer ou les isoler dans des fractions laitières riches en phospholipides³². De nombreuses méthodes d'enrichissement des babeurres et sérums en composants issus de la MFGM ont déjà fait l'objet de publications mais se basent la plupart du temps sur une ou plusieurs méthode(s) de filtration³¹.

L'ultrafiltration^{18,30,32-34}, la microfiltration^{5,13,18,31} et la diafiltration^{32,35} figurent parmi les méthodes utilisées pour concentrer les phospholipides dans les babeurres. Elles peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Cependant, les micelles de caséines et les phospholipides de la MFGM ont des tailles relativement similaires, ce qui empêche leur bonne séparation par membrane^{3,5,30-32,36}.

Il existe plusieurs procédés permettant d'éliminer les micelles de caséine ou les réduire en peptides de plus petite taille avant les étapes de filtration. Parmi ceux-ci, on peut citer le lavage de la crème avant barattage, la séparation par coagulation et précipitation, la dissociation des micelles par ajout de citrate ou d'éthanol ou l'hydrolyse enzymatique^{5,30,33}. Barry et al. ont démontré que l'hydrolyse permettait un taux de reconversion des phospholipides beaucoup plus élevé que les autres méthodes³⁰.

Une autre solution est l'utilisation de babeurres contenant peu de caséine comme le babeurre de lactosérum qui est plus riche en MFGM et plus pauvre en caséine que les babeurres classiques^{6,33}.

Après ces étapes d'enrichissement par filtration, une extraction des lipides non-polaires au CO₂ supercritique peut permettre d'augmenter la concentration en lipides polaires^{13,32,34}. Afin d'obtenir une fraction très pure, une deuxième extraction avec de l'éthanol comme co-solvant permet d'extraire les lipides polaires de la fraction enrichie³⁴.

2.3. Les liposomes

2.3.1. Définition

Un liposome se définit comme une vésicule formée par une ou plusieurs bicouche(s) de phospholipides enfermant un cœur aqueux³⁷⁻⁴⁰. Les bicouches ont une épaisseur d'environ 4nm qui varie selon les matières premières utilisées⁴¹.

La formation de ces structures est rendue possible par le caractère amphiphile des phospholipides dont la tête hydrophile est orientée vers les phases aqueuses externes et internes au liposome, tandis que les queues hydrophobes se font face au sein des membranes³⁸.

Grâce à ces caractéristiques, des composés hydrophiles peuvent être introduits dans le cœur aqueux du liposome et des composés hydrophobes au sein de la bicouche phospholipidique³⁹.

2.3.2. Structures

Les liposomes sont classés en trois grandes catégories en fonction de leur structure et de leur taille. On distingue d'abord les vésicules multi-lamellaires (MLVs) et les vésicules uni-lamellaires (ULVs). Les premières sont composées de plusieurs bicouches membranaires au contraire des secondes. Parmi les ULVs, il existe trois sous-catégories en fonction de la taille des liposomes, les petites vésicules uni-lamellaires (SUVs), les grandes vésicules uni-lamellaires (LUVs) et les vésicules uni-lamellaires géantes (GUVs). Pour finir, la dernière grande catégorie reprend les vésicules multivésiculaires (MVs) qui sont un cas particulier de LUVs enfermant d'autres ULVs de plus petite taille^{38,39,41,42}.

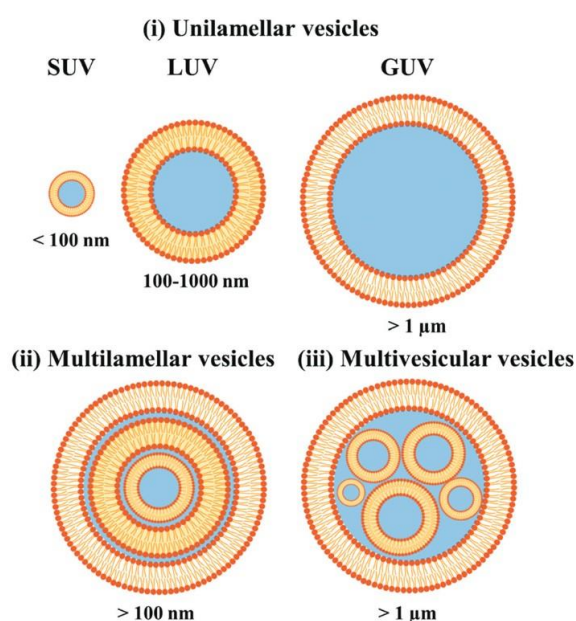


Figure 2. Structure des liposomes, illustration tirée de la publication de Jash et al.⁴¹.

Chaque type de structure possède des propriétés différentes notamment en terme de stabilité, de capacité d'emprisonnement et de relargage de composés^{38,42}.

Tailles des différentes catégories de liposomes selon la littérature^{38,39,41,42}	
Catégorie	Taille (nm)
MLVs	> 100 / > 400
SUVs	< 100 / < 80
LUVs	80/100 – 1000
GUVs	> 1000
MVVs	> 1000

Tableau 3. Tailles des catégories de liposomes selon la littérature.

Il est à noter que le terme « nano liposomes » parfois utilisé dans la littérature fait simplement référence à des liposomes dont la taille se situe généralement sous les 100nm³⁸.

2.3.3. Matières premières

Les phospholipides majoritairement utilisés pour la production de liposomes sont les phospholipides de soja, d'œufs, du lait et la lécithine marine⁴².

Du cholestérol est régulièrement ajouté aux phospholipides lors de la formation des liposomes afin de rapprocher les phospholipides composant les bicouches, de réduire la perméabilité de celle-ci, de la rigidifier et d'empêcher l'agrégation des vésicules. Cela permet donc de modifier la stabilité des liposomes et le relargage des molécules emprisonnées⁴³.

Des composés tels que le chitosan peuvent également être ajoutés autour des liposomes afin de les protéger de l'oxydation et des dégradations dues aux acides et aux enzymes dans le système digestif. Il peuvent également masquer un éventuel goût apporté par d'autres composants du liposome⁴⁴.

2.3.4. Méthodes de production

Les caractéristiques des liposomes telles que leur taille, leur « lamellarité » et leur efficacité d'emprisonnement dépendent fortement de la méthode de production choisie et de l'apport d'énergie de celle-ci³⁸. Il est donc important de choisir un procédé formant des liposomes adaptés à une utilisation spécifique⁴⁰.

Les méthodes de production sont la plupart du temps classées en méthodes conventionnelles et en méthodes innovantes reprenant les procédés les plus récents. Les principaux problèmes posés par les méthodes conventionnelles sont l'utilisation de solvants dont des résidus peuvent demeurer dans les suspensions, la difficulté à transposer ces techniques à l'échelle industrielle et le manque d'uniformité des liposomes produits.

2.3.4.1. Méthodes conventionnelles

2.3.4.1.1. Thin-film hydration

La méthode « *thin-film hydration* » ou méthode par réhydratation est la première méthode de formation des liposomes ayant été mise au point par Bangham et al^{38,45}. Cette technique est composée de trois étapes. Premièrement, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tel que du chloroforme ou un mélange de chloroforme et de méthanol (2:1). Les molécules hydrophobes à incorporer dans les bicouches des liposomes sont également ajoutées à cette étape. Deuxièmement, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à une température de 40 à 60 °C afin de former un film fin de phospholipides sur les parois du ballon. Troisièmement, après évaporation des résidus de solvant sous vide, de l'eau ou un tampon est ajouté et le film est hydraté à une température supérieure à la température de transition moyenne des phospholipides. En effet, au-dessus de cette température, les phospholipides sont en phase liquide cristalline permettant la formation des liposomes. Sous cette température, ils forment un gel dans lequel les queues hydrophobes des phospholipides sont trop serrées pour permettre la formation de liposomes⁴². Le ballon est ensuite agité à la main, vortexé ou soniqué afin de former les liposomes. Les liposomes produits par ce procédé sont de type MLVs et de taille hétérogène. En outre, cette méthode, comme la plupart des méthodes conventionnelles, est difficilement transposable à l'échelle industrielle et les liposomes formés peuvent contenir des résidus de solvants⁴².

2.3.4.1.2. Autres méthodes

Les principales autres méthodes conventionnelles sont la méthode par chauffage, par évaporation en phase inverse, par épuisement de détergent et par injection.

Dans la méthode de production de liposomes par chauffage (*heating method*), les phospholipides sont introduits dans un milieu aqueux afin d'être hydratés. La solution est ensuite chauffée à 60 ou 120°C en présence d'un agent d'hydratation, la plupart du temps du glycérol^{1,38,42,46}.

La méthode d'évaporation en phase inverse (*reverse-phase evaporation method*) est un procédé durant lequel un solvant contenant les lipides nécessaires à la formation des liposomes est ajouté à une phase aqueuse et évaporé de celle-ci par la suite pour former des vésicules³⁸.

La méthode par épuisement de détergent consiste à ajouter un détergent dans un solvant contenant les phospholipides afin de former des micelles. Le solvant est ensuite enlevé et les micelles forment des liposomes^{42,47}.

La méthode d'injection d'éther ou d'éthanol durant laquelle les phospholipides sont dissous dans de l'éther ou de l'éthanol qui est ensuite injecté par gouttes dans une solution aqueuse⁴⁷.

2.3.4.1.3. Procédés secondaires

La plupart des méthodes conventionnelles telles que la méthode *thin-film hydration* produisent des liposomes de type MLVs ou LMVs de tailles assez hétérogènes³⁹. Ce type de liposome n'a que très peu de potentiel d'encapsulation en comparaison au ULVs⁴⁸. Afin d'obtenir des LUVs et des SUVs à partir de MLVs et de réduire leur répartition de taille, il existe quelques techniques couramment utilisées.

La sonication est un procédé durant lequel la suspension contenant les liposomes est sonifiée au moyen d'un bain ou d'une sonde à ultrasons. L'apport d'énergie lié au phénomène de cavitation permet d'obtenir des vésicules uni-lamellaires de plus petite taille (LUVs et SUVs). Le temps de traitement et l'intensité des ultrasons sont des paramètres clés dans la réduction de la taille des liposomes^{42,48}.

Le *freeze-thawing* consiste à passer la suspension de liposomes successivement dans un bain d'azote, puis à température ambiante ou dans un bain d'eau chaude en répétant plusieurs cycles de congélation/décongélation afin de réduire la taille des liposomes³⁸.

L'extrusion permet d'uniformiser la taille des liposomes par passages successifs de la suspension sous pression au travers d'une membrane en polycarbonate dont le diamètre des pores est choisi. Elle doit se faire à une température supérieure à la température de transition des phospholipides. La taille des liposomes sera dépendante de la taille des pores, du nombre de passages et de la pression appliquée^{42,48}. Un *freeze-thawing* est souvent pratiqué avant une extrusion⁴⁷.

2.3.4.2. Méthodes innovantes

2.3.4.2.1. Microfluidisation

Un microfluidiseur est un appareil permettant d'appliquer des forces de cisaillement intenses combinées à un phénomène de cavitation à des fluides soumis à une haute pression⁴². En pratique, le liquide à traiter est mis sous pression dans un circuit de quelques dizaines de microns de diamètre passant par une chambre de collision dont la géométrie est fixée⁴². Pour la formation de liposomes, une chambre en Y séparant le flux en deux avant de le collisionner est généralement utilisée^{1,1,25,40,49} bien que des exemples de formation de liposomes avec une chambre en Z existent également⁵⁰. Ce procédé offre l'avantage de produire des liposomes de type LUVs ou SUVs de petite taille (50 à 200 nm) avec une faible distribution de tailles sans utilisation de solvants et en une seule étape, sans besoin de procédé secondaire de traitement et directement à partir d'une dispersion contenant jusqu'à 20 % de phospholipides^{38,42}. Ce procédé offre également une grande reproductibilité et est facilement applicable à grande échelle⁴².

2.3.4.2.2. Autres méthodes innovantes

Parmi les techniques de pointe de production de liposomes, on retrouve plusieurs méthodes basées sur les fluides supercritiques et plus particulièrement le CO₂ supercritique.

Celui-ci permet de se passer des solvants traditionnellement utilisés dans les méthodes conventionnelles. Il peut être utilisé comme solvant, co-solvant, anti-solvant ou agent dispersant⁴¹. Parmi les techniques utilisées figurent la méthode SAS (*Supercritical Anti-Solvent method*), SCRPE (*Supercritical Reverse Phase Evaporation method*)⁴⁷ ou encore RESS ou Vent-RESS (*Venturi-based Rapid Expansion of Supercritical Solution*)⁵¹.

Outre la microfluidisation et les fluides supercritiques, d'autres méthodes moins répandues ont fait leur apparition telles que la DAC (*Dual Asymmetric Centrifugation*) et l'ultrasonication⁴².

2.3.5. Stabilité

Les liposomes ne sont pas thermodynamiquement stables. Ils ont tendance à s'agréger, fusionner ou précipiter au cours de leur conservation³⁸. Cela peut provoquer un relargage des composés emprisonnés dans la solution. Ces problèmes de stabilité physique sont également influencés par la stabilité chimique des lipides qui les composent. En effet, une dégradation des lipides par hydrolyse ou oxydation peut mener à une réduction de la stabilité physique³⁷ des suspensions.

Le potentiel zêta, influencé par le pH et la force ionique, ainsi que la lumière, l'oxygène dissous, la composition des bicouches et les substances encapsulées sont autant de paramètres qui peuvent influencer la stabilité de la suspension. La stabilité des liposomes est également fortement dépendante du procédé de production utilisé⁴².

Les conditions de stockage idéales seraient donc à l'abri de la lumière, à un pH ne favorisant pas le taux d'hydrolyse (pH 6,5) mais ne diminuant pas non plus les forces de répulsion et sans électrolytes dans le milieu qui diminuent les forces de répulsion entre particules et peuvent agir comme catalyseurs d'oxydation³⁸. Une température de 4°C est également préconisée dans de nombreux cas⁵².

L'ajout d'anti-oxydants au sein des liposomes permet également de ralentir leur dégradation³⁸.

2.3.6. Liposomes formés à partir de la MFGM

Bien qu'ils restent minoritaires²⁵, les phospholipides de la MFGM ont été utilisés à de nombreuses reprises dans des publications pour la formation de liposomes, sous forme purifiée ou bien en fractions enrichies. La composition spécifique de ces phospholipides donne des propriétés aussi spécifiques aux liposomes. En effet, le taux de saturation plus élevé des acides gras des phospholipides de la MFGM procure aux liposomes une plus grande résistance à l'oxydation ainsi qu'à l'hydrolyse et la présence de sphingomyéline stabilise la dispersion et augmente la perméabilité de la membrane. En plus d'augmenter la stabilité lors du stockage de la solution à des températures de 4 à 35°C, la sphingomyéline rend également la dispersion plus stable face à des stress tels que des traitements thermiques^{1,52}.

Les liposomes formés à partir de MFGM sont également plus résistants à la digestion⁵³.

Le tableau 4 présente une liste non-exhaustive de publications sur les liposomes formés à partir de MFGM.

Procédé		Substance emprisonnée	Titre de la publication	Référence
Primaire	Secondaire			
Microfluidisation	/	/	Physical Stability of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soya Phospholipids	52
Microfluidisation	/	/	Comparison of the Structure and Properties of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soy Phospholipids	25
Microfluidisation	/	/	Preparation of Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids Using a Microfluidizer	1
Microfluidisation <i>Thin-film hydration</i> <i>Heating</i>	/	/	The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques	40
Microfluidisation	/	Bêta-carotène, chromate de potassium	Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids	49
Microfluidisation	/	Acide ascorbique	Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids	54
<i>Thin-film hydration</i>	Microfluidisation	/	Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion	53
<i>Thin-film hydration</i>	Extrusion	/	Milk membrane lipid vesicle structures studied with Cryo-TEM	55
<i>Thin-film hydration</i>	Extrusion	/	Characterization of milk and soy phospholipid liposomes and inflammation in 3T3-L1 adipocytes	56
<i>Thin-film hydration</i>	Sonication	Lactoferrine	Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids	57
<i>Thin-film hydration</i>	Sonication	Curcumine	Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin	37

<i>Heating</i>	Homogénéisation sous pression	Hydrolysats de protéines de saumon	Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes.	44
CO ₂ supercritique	/	Vitamine C et E	Synthesis of multivitamin-loaded heat stable liposomes from milk fat globule membrane phospholipids by using a supercritical-CO ₂ based system	58

Tableau 4. Liste de publications sur la production de liposomes à partir de MFGM.

2.3.7. Utilisations dans l'industrie agro-alimentaire

En raison de leur capacité à augmenter la biodisponibilité et la stabilité de composés hydrophiles et hydrophobes³⁸ ainsi que des possibilités de relargage contrôlé⁴² graduel ou instantané, les liposomes offrent de nombreuses possibilités d'applications dans l'industrie alimentaire. Plusieurs revues proposent des listes d'applications abordées dans la littérature parmi lesquelles figurent celles de Liu et al.³⁸, Ajeeshkumar et al.⁴², Subramani et Ganapathyswamy⁵⁹ ou encore Lakkis et al.⁶⁰.

Un premier domaine d'application est celui des antioxydants. L'utilisation de ces composés est grandissante en raison de leurs propriétés techno-fonctionnelles et bénéfiques pour la santé. Ce sont des molécules sensibles dont l'incorporation dans des liposomes permet d'augmenter la stabilité et la biodisponibilité. Les polyphénols dérivés du thé comme la catéchine et l'épigallocatechine gallate ont par exemple été étudiés pour cette application⁴².

D'autres molécules très sensibles régulièrement ajoutées dans les produits alimentaires sont les vitamines. Grâce aux propriétés des liposomes, il est possible de protéger des vitamines hydrophiles et hydrophobes. Les vitamines A, B, C, D et E ont notamment fait l'objet de publications^{38,54,58}.

L'incorporation de colorants tels que les caroténoïdes, la bétanine, la curcumine et l'anthocyanines dans des liposomes permet également d'augmenter leur stabilité ainsi que leur solubilité dans l'eau^{37,42,61}.

Les protéines et enzymes sont également des composés sensibles. Les procédés de production et l'appareil digestif peuvent provoquer leur dégradation. L'utilisation de liposomes pour la protection d'enzymes est par exemple très intéressante dans l'industrie fromagère où l'incorporation de lipases, peptidases et protéases dans des liposomes permet de réduire la durée d'affinage et la quantité d'enzymes utilisées³⁸. Toujours dans le secteur laitier, la production de liposomes de lactoferrine et de bêta-galactosidase ont également fait l'objet de publications³⁸.

Les conservateurs et bactériocines, qui sont des peptides antimicrobiens synthétisés par des bactéries telles que les bactéries lactiques, peuvent aussi être emprisonnés dans des liposomes. Cette inclusion permet d'augmenter leur stabilité face à la protéolyse et de diminuer leurs interactions avec d'autres composants comme les graisses et les protéines, ce qui réduit leur efficacité. Cela permet également de pouvoir les incorporer au début des processus de fabrication sans les dégrader. La bactériocine la plus étudiée dans ce domaine est

la nisine, active notamment contre *Listeria monocytogenes*. Son incursion dans des liposomes permet entre autre de lutter contre les bactéries durant l'affinage des fromages grâce à une libération progressive de la nisine située à la fois dans le cœur aqueux et dans la membrane du liposome³⁹.

Et enfin, ce système physico-chimique est également utile pour protéger les huiles essentielles, les arômes et les acides gras essentiels comme les oméga-3 qui sont des composés sensibles à l'oxydation^{38,39,42}.

3. Objectif et stratégie expérimentale

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer la faisabilité d'une production de liposomes à partir de babeurres industriels, de fractions plus ou moins purifiées de ceux-ci ou de MFGM par microfluidisation.

Afin d'atteindre cet objectif, deux objectifs secondaires majeurs ont été préalablement définis.

Premièrement, les matières premières doivent être extraites et leurs caractéristiques physico-chimiques doivent être déterminées afin de pouvoir mesurer l'impact de celles-ci sur la formation de vésicules.

Deuxièmement, afin de ne pas dépenser de moyens inutiles dans la production de vésicules à l'échelle pilote par microfluidisation, celle-ci doit d'abord être testée en laboratoire à petite échelle via la méthode *thin-film hydration* largement utilisée dans la littérature.

L'objectif final peut alors être atteint par la microfluidisation de matières premières dont les résultats lors des tests en laboratoire sont prometteurs.

La stratégie expérimentale a été construite parallèlement aux objectifs fixés. La MFGM a été extraite et des fractions contenant les lipides totaux et polaires ont ensuite été extraites de la MFGM et de deux babeurres industriels. Ces matières premières ont été caractérisées par leur teneur en protéines, en lipides totaux, polaires et neutres ainsi qu'en acides gras libres. Leurs propriétés interfaciales ont également été analysées au moyen d'isothermes de compression de films monocouches.

La production de liposomes a ensuite été testée à partir de ces matières par la méthode *thin-film hydration* à des concentrations de 1 et 8 mg/mL avant d'être testée sur certaines matières premières par microfluidisation. Cette dernière a été effectuée au moyen de deux microfluidiseurs différents (M110-EH et 110T) afin de mesurer l'impact des paramètres de microfluidisation sur les vésicules formées.

La taille moyenne, la répartition des tailles et le potentiel ζ des vésicules ont ensuite été mesurés afin de pouvoir mesurer l'impact des différentes matières premières et des différents procédés sur la formation de potentiels liposomes. L'analyse de ces données permettra de pouvoir répondre à l'objectif principal de ce travail.

4. Matériel et méthodes

4.1. Matières premières

Les babeurres SM2 et SM3, appelés SM2 et SM3 dans les figures et tableaux de ce travail, ont été fournis par l'entreprise S.A. Corman (Belgique). Ils sont produits par séchage du sérum résultant du barattage de la crème produite lors de la fabrication de matière grasse laitière anhydre (MGLA) à partir de beurre.

La crème utilisée pour l'extraction de la MFGM a été fournie par la ferme Notre Dame de Ligny (Belgique) possédant des vaches de race jersiaise. Elle est obtenue par centrifugation à 2500g du lait entier à la ferme et est utilisée le jour de sa production sans aucun traitement thermique.

Les phospholipides de soja purifiés ont été fournis par Sigma-Aldrich (produit P3644) et contiennent au moins 30 % de L-alpha-phosphatidylcholine.

Les solvants utilisés (chloroforme, méthanol, éther diéthylique, propan-2-ol, n-hexane) sont de grade technique et ont été fournis par VWR Chemicals. Les autres composés sont de grade analytique. L'acide acétique (99 – 100 %), l'acide sulfurique (95 %), l'acide nitrique (65 %) et le peroxyde d'hydrogène (30 %) ont également été fournis par VWR Chemicals. Le NaCl, le Na₂HPO₄, le NaH₂PO₄, le molybdate d'ammonium (VI), le vanadate d'ammonium (V) et l'imidazole ont été fournis par Merck. Le dihydrogénophosphate de potassium a été fourni par UCB. L'azoture de sodium et le rouge Congo ont été fournis par Sigma-Aldrich.

4.2. Extraction de la MFGM et calcul du rendement d'extraction

Une méthode dite classique d'extraction en 5 étapes a été utilisée². Celle-ci est tirée de la publication de Malik et al.²².

La crème est d'abord lavée pour la débarrasser d'un maximum de protéines et de lactose. Pour cela, 1kg de crème est mélangé à 2 L d'un tampon à pH 7,2 composé de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (0,01 M) et de NaCl (0,9 %). Après centrifugation à 4500g et 4 °C durant 10 minutes, la phase aqueuse est éliminée. Une masse de tampon équivalente à la masse de crème résultante de cette première étape est rajoutée et la manipulation est réitérée une seconde fois. L'opération est répétée une troisième fois en remplaçant le tampon par de l'eau distillée à raison de 2,5 fois la masse de crème. Après ajustement de la masse de crème à 1 kg par ajout d'eau distillée, celle-ci est laissée en maturation à 4 °C durant 20 heures. Elle est ensuite barattée à l'aide d'un robot ménager (Kenwood 255).

La phase grasse est mélangée à masse égale avec de l'eau et placée dans un bain marie à 45 °C durant 30 minutes tout comme le sérum. Les deux phases sont ensuite centrifugées à 5000g et 4 °C durant 15 minutes. Les sérums sont collectés, mélangés et lyophilisés. La MFGM est ensuite mise sous vide et conservée à -50 °C.

Le rendement d'extraction de la MFGM est exprimé en grammes de masse sèche de MFGM par 100 g de matière grasse².

4.3. Caractérisation des matières premières

4.3.1. Extraction et quantification des lipides totaux

La méthode de Folch⁶² a été choisie car elle permet un meilleur taux d'extraction des phospholipides et une faible dégradation de ceux-ci en comparaison avec des méthodes d'extraction à chaud comme celle de Röse Gottlieb^{4,21}. Le protocole présenté par Rodríguez-Alcalá et Fontecha²¹ a été adapté à des échantillons de 0,5 g. Ce protocole composé d'une étape d'extraction classique suivie d'un rinçage de la phase eau/méthanol par du chloroforme est particulièrement adapté aux lipides de la MFGM⁴.

L'échantillon est solubilisé dans 15 mL d'un mélange chloroforme:méthanol (2:1) et 2 mL d'eau milli-Q puis le tout est vortexé durant 1 minute et agité à 4 °C pendant 1 heure. Après une étape de centrifugation à 4 °C et 5000 rpm pendant 5 minutes, la phase inférieure contenant majoritairement du chloroforme est récupérée et 10 mL de chloroforme sont ajoutés à la phase supérieure eau/méthanol. Après une deuxième étape d'agitation et de centrifugation, l'opération est renouvelée et les deux phases « chloroforme » sont évaporées avec un évaporateur rotatif (Buchi R-210) à 45° C.

Pour les extractions servant aux tests pilotes sur les microfluidiseurs, la masse d'échantillon est augmentée à 6 g par tube et les volumes de solvants adaptés en conséquence.

Les lipides sont stockés sous vide jusqu'à leur utilisation.

Pour la quantification des lipides totaux matières premières, un triplicat a été réalisé.

4.3.2. Fractionnement et quantification des lipides polaires, neutres et des acides gras libres

Les lipides totaux ont été fractionnés en trois classes de lipides au moyen de colonnes de silice liée à des groupes aminopropyles HF Mega BE-NH₂ (Agilent Technologies) d'un volume de 12 mL chargés par 2 g de sorbant. Ce fractionnement a été réalisé selon le protocole décrit par Malik et al.²².

Les colonnes sont préalablement conditionnées avec deux fois 8 mL de n-hexane. 70 mg de lipides totaux sont déposés en tête de colonne dans 2 mL d'une solution à 35 mg/mL. Une première fraction composée de lipides neutres est ensuite éluée par 18 mL d'un mélange chloroforme:propan-2-ol (2:1). Les deuxièmes et troisièmes fractions sont composées des acides gras libres et des lipides polaires. Elles sont obtenues respectivement par élution de 18 mL d'éther diéthylique contenant 2 % (v/v) d'acide acétique et de méthanol.

Les fractions sont collectées dans des ballons de 50 mL préalablement disposés dans un dessiccateur durant 24h et tarés. Les solvants sont évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif (Buchi R-210) à 45°C. Les éventuels résidus de solvant sont évaporés par un passage

sous un flux d'azote et les ballons sont ensuite placés une nuit dans un dessiccateur sous vide avant pesée.

L'efficacité de la méthode a été validée en analysant les différentes fractions par chromatographie sur couche mince (CCM).

Pour la détermination de la composition lipidique des matières premières, des duplicats ont été réalisés.

Cette méthode a également été utilisée pour la préparation de lipides polaires précédant les tests de formation de liposomes. Dans ce cas, les lipides polaires sont stockés sous vide jusqu'à leur utilisation. Dans le cas des échantillons destinés à la microfluidisation, des colonnes HyperSep NH2 (Thermo Fisher Scientifics) de 60 mL contenant 10 g de sorbant ont été utilisées.

4.3.3. Quantification des phospholipides

La quantification des phospholipides est effectuée via le dosage colorimétrique du phosphore par la méthode de Misson. Le protocole publié par Kuzdal-Savoie⁶³, adapté aux échantillons laitiers a été suivi.

Brièvement, 30 mg de lipides totaux sont solubilisés dans du chloroforme et quantitativement disposés dans des fioles jaugées de 50 mL. Le solvant est évaporé et les fioles sont placées pendant 1h dans un dessiccateur avant pesée pour connaître la prise d'essai exacte.

L'échantillon est ensuite minéralisé. 2 mL d'un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique (1:1) sont ajoutés à l'échantillon et le tout est chauffé jusqu'à disparition du dégagement de vapeurs brunes. 7 gouttes d'acide nitrique sont ajoutées, suivies par 25 gouttes de peroxyde d'hydrogène. La fiole est laissée sur une plaque chauffante pendant 20 minutes puis refroidie à température ambiante et mise au trait avec de l'eau milli-Q.

Des volumes équivalents de cette solution et de réactif vanadomolybdique sont mélangés dans une cuvette. Ce dernier est une solution composée de 20 g/L de molybdate d'ammonium tétrahydraté (VI), 0,47 g/L de vanadate d'ammonium (V) et 13,5 % d'acide nitrique⁶⁴. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance de la solution est mesurée au spectrophotomètre (Hitachi U-2900) à 420 nm.

Le calcul de la concentration en phosphore se fait au moyen d'une droite d'étalonnage réalisée avec du KH_2PO_4 . La concentration en phospholipides correspond à la concentration en phosphore multipliée par un facteur de 25 tenant compte de la masse molaire moyenne des phospholipides⁶⁵.

Ces mesures ont été réalisées en triplicats pour chaque échantillon.

4.3.4. Quantification des protéines

La teneur en azote des matières premières est déterminée sur des échantillons de 200 mg par la méthode de Dumas au moyen d'un Rapid N cube (Elementar Analysensysteme GmbH). La valeur obtenue est multipliée par 6,38 afin d'obtenir la teneur en protéines. Ce facteur est celui utilisé par la norme iso 14891:2002 pour la détermination de la teneur en protéines des produits laitiers⁶⁶.

Cette mesure a été réalisée en duplicat pour chaque matière première.

4.3.5. Caractérisation des propriétés interfaciales

Les isothermes de compression ont été réalisées à l'aide d'une balance à film Liquid-liquid Langmuir trough (KSV NIMA instruments Ltd). Les mesures ont été réalisées à l'interface air/eau. 120 mL d'eau Milli-Q ont été dispersés dans la cuvette prévue à cet effet. Les échantillons de lipides totaux et polaires sont dispersés dans de l'hexane à raison de 1 %. Les échantillons de babeurres et de MFGM bruts ont été dispersés dans de l'eau Milli-Q à raison de 3 % et hydratés durant une nuit avant analyse.

40 à 60 μL de ces solutions sont disposés à la surface de l'eau, le volume est ajusté afin que la surface par mg de matière en début de compression soit la plus proche possible du point A_0 correspondant au début de l'isotherme. La compression est ensuite lancée après 15 minutes de formation du film. Un taux de compression de 40 mm/min et une température de $25 \pm 0,5$ °C ont été appliqués²².

La surface A_0 marquant le passage à un film liquide expansé ainsi que les surfaces et pressions des points de transitions (A_1 , A_2 , π_1 , π_2) sont déterminés graphiquement à partir des variations dans la pente de la droite. L'élasticité est calculée au moyen de la formule suivante: $\text{élasticité} = -A(d\pi/dA)$ ⁶⁷.

Un duplicat a été effectué pour chaque mesure.

4.4. Formation des liposomes par la méthode thin-film hydration

Une masse connue d'échantillon est dissous dans du chloroforme et le volume correspondant à la quantité désirée (10 ou 80 mg)⁵⁷ est transféré dans un ballon de 50 mL. Le chloroforme est évaporé au moyen d'un évaporateur rotatif (Buchi R-210) à 45 °C afin de former un film fin régulier sur les parois du ballon. Ce dernier est placé sous un flux d'azote afin d'évaporer la majorité des résidus de solvant et est ensuite laissé dans un dessiccateur sous vide pendant 24 heures afin de garantir l'absence totale de solvant.

10 mL de tampon imidazole composé de 20 mmol/L d'imidazole, de 50 mmol/L de NaCl et de 0,02 % d'azote de sodium^{1,25,40,52,54} sont ensuite disposés dans le ballon contenant le film qui est immédiatement placé dans un bain marie à agitation à 60 °C⁴⁰. Cette

température a été choisie car elle est supérieure à la température de transition moyenne des lipides présents dans les échantillons. Les ballons sont laissés durant 1h dans ce bain et vortexés toutes les 10 minutes durant 1 heure.

Les échantillons sont conservés à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à analyse. Chaque solution a été réalisée en duplicat.

4.5. Formation des liposomes par microfluidisation

Une dispersion à 1 %¹ est préparée dans le même tampon imidazole que pour la méthode *thin-film hydration*. Le tampon est ajouté à l'échantillon et celui-ci est porté à 60 °C dans un bain marie. Lorsque la température cible est atteinte, l'échantillon est dispersé durant 10 minutes à l'aide d'un Ultra-Turrax (Ultra Turax T25, IKA) à une vitesse de 11.000 tours/min.

Cette solution est ensuite traitée par microfluidisation. Deux microfluidiseurs différents ont été utilisés dans le cadre de ce travail.

Premièrement, le Microfluidizer processor M-110EH (Microfluidics) équipé d'une chambre de type Z de 100 µm de diamètre (H10Z 100 µm ceramic) a été utilisé à une pression de 1500 bar. Afin d'éviter une montée en température trop importante de la suspension qui pourrait entraîner la dégradation des liposomes, des phospholipides mais également de l'appareil, un groupe froid réglé sur 10 °C est raccordé à la chambre de microfluidisation. 5 passages sont effectués et un échantillon est prélevé à la fin de chaque passage.

Deuxièmement, le Microfluidizer 110T (Microfluidics) équipé d'une chambre de type Y a été utilisé à une pression de 350 bar. Comme pour le premier, celui-ci a été refroidi mais au moyen de glace disposée sur les différents circuits du système.

Etant donné les quantités de matière demandées par ces tests et la grande reproductibilité du procédé à pression constante, chaque suspension n'a été produite qu'une fois pour chacun des microfluidiseurs.

4.6. Sonication

La sonication des suspensions produites à partir de 8 mg/mL de matière par la méthode *thin-film hydration* a été effectuée dans un bain à ultrasons (ZETA SONIC) possédant une puissance de 360 W et une fréquence de 40 kHz durant 10 minutes⁵⁷ à 60 °C.

4.7. Caractérisation des liposomes

4.7.1. Taille moyenne des particules et répartition de tailles

La taille moyenne des particules a été analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) au moyen du Delsa Nano C particle analyser (Beckman Coulter). Les mesures ont été effectuées à une température de 25 °C, avec un angle de diffusion de 165 °, un indice de

réfraction de 1,3328 et de l'eau milli-Q comme diluant. Cette mesure a été réalisée en quintuplet pour chaque échantillon.

4.7.2. Potentiel ζ

La mesure du potentiel ζ a été réalisée par diffusion électrophorétique de la lumière (ELS) au moyen du Delsa Nano C particle analyser (Beckman Coulter). Les mesures ont été effectuées à 20 °C avec un angle de diffusion de 15 ° et un champ électrique moyen de -15,5 V/cm. La valeur du potentiel ζ est obtenue à partir des données collectées sur 10 mesures de 400 μ s par l'équation de Smoluchowski. Cette mesure a été réalisée en duplicat pour chaque échantillon.

4.7.3. Microscopie optique

Afin de pouvoir observer l'aspect général des suspensions, deux microscopes optiques ont été utilisés: le Nikon Eclipse E400 et le Nikon Eclipse Ti2. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NIS-Element Viewer.

4.8. Traitement statistique des données

Afin de pouvoir comparer certaines moyennes entre elles et de pouvoir déterminer si elles sont statistiquement différentes, des tests des étendues de Tukey ont été réalisés avec des ANOVA de type AV1. Un niveau de confiance de 95 % a été choisi et ces tests ont été effectués sur le logiciel R (version 4.3.1).

5. Résultats et discussion

5.1. Caractérisation des matières premières

5.1.1. Composition générale

Composition (%)	MFGM	SM2	SM3
Protéines	22,48 ± 0,16	31,57 ± 0,24	47,48 ± 0,04
Lipides	57,97 ± 3,74	14,00 ± 1,21	23,52 ± 1,62

Tableau 5. Composition générale des matières premières. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

La MFGM a été extraite avec un rendement de 1,52 g/100g de matière grasse. Cela est légèrement plus faible que le rendement de 1,7 g/100g de matière grasse obtenu par Vanderghem et al.¹⁵ avec un procédé similaire.

La teneur en protéines de la MFGM extraite est légèrement plus faible que les teneurs les plus faibles recensées dans la littérature. La teneur en lipides est, elle, légèrement plus élevée que celles habituellement rencontrées¹. Selon la littérature, les 20 % restants sont composés de lactose, d'eau et de cendres. Une analyse de la teneur en lactose n'a pas été effectuée mais Malik et al.²² ont fait état d'un taux de lactose de 11 % de la masse sèche en utilisant la même méthode d'extraction.

La teneur en lipides du babeurre SM3 correspond à ce qui est référencé dans la littérature (Tableau 2) pour les sérums de beurre tandis que celle du babeurre SM2 se rapproche plutôt d'un babeurre doux. En ce qui concerne les protéines, aucune valeur n'a pu être trouvée pour les sérums de beurre dans la littérature mais le babeurre SM2 possède également une teneur proche de celle du babeurre doux. Le babeurre SM3 possède, lui, une teneur en protéines plus élevée que celles rencontrées pour tous les babeures de la littérature.

Sur base de cette composition, on pourrait donc assimiler le babeurre SM2 à un babeurre doux et SM3 à un sérum de beurre. Le babeurre SM3 est plus riche en lipides et protéines que le babeurre SM2.

Selon les données fournies par l'entreprise Corman S.A., les pourcentages restants seraient, comme dans le cas de la MFGM, principalement composés de lactose ainsi que de cendres (5 – 8 %) et d'eau (0 – 5 %) dans une moindre mesure. Le babeurre SM2 (45 – 49 %) contiendrait au moins deux fois plus de lactose que le babeurre SM3 (12 – 24 %). Le babeurre SM3 peut donc être considéré comme une version à teneur réduite en lactose du babeurre SM2.

La MFGM extraite possède une teneur en lipides beaucoup plus élevée que les babeures, une teneur en protéines plus faible et une teneur en lactose estimée plus faible. Ce résultat est logique puisque les étapes de lavage de la crème préalables à l'extraction de la MFGM ont pour but d'enlever le lactose et les protéines non membranaires présentes dans la crème²².

5.1.2. Composition lipidique

Les tableaux 6 et 7 présentent la composition en lipides des différentes matières premières.

Composition (%)	MFGM	SM2	SM3
Phospholipides	12,95 ± 0,73	5,61 ± 0,00	10,13 ± 1,02
Lipides neutres	39,41 ± 0,85	5,12 ± 0,09	10,47 ± 0,77
Acides gras libres	4,06 ± 0,24	0,25 ± 0,01	0,61 ± 0,60
Lipides polaires	14,49 ± 0,62	8,64 ± 0,07	12,45 ± 0,09

Tableau 6. Composition lipidique des matières premières. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

Composition des lipides totaux (%)	MFGM	SM2	SM3
Phospholipides	22,34 ± 1,26	40,06 ± 0,00	43,07 ± 4,34
Lipides neutres	67,99 ± 1,47	37,02 ± 0,65	44,51 ± 3,29
Acides gras libres	7,01 ± 0,41	1,72 ± 0,05	2,58 ± 2,53
Lipides polaires	25,00 ± 1,07	61,26 ± 0,6	52,91 ± 0,38

Tableau 7. Composition lipidique des matières premières rapportées aux lipides totaux. Abréviations: SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3..

La composition lipidique de la MFGM extraite est comprise dans les gammes de valeurs rencontrées dans la littérature à l'exception du taux d'acides gras libres qui est plus élevé^{2,4,8,16}. Outre une composition initiale de la crème plus élevée que la moyenne en acides gras libres, cette valeur pourrait également être expliquée par un fort taux d'hydrolyse des triglycérides lors des différentes étapes d'extraction de la MFGM⁶⁸. Le protocole pourrait dans ce cas être modifié pour limiter l'action de ces enzymes, par exemple en réduisant la durée des différentes étapes et en traitant la crème le plus vite possible après sa production. Une désactivation des enzymes pourrait également être envisagée mais toutes ces modifications ne doivent pas influencer le rendement et les caractéristiques de la MFGM extraite.

Les babeurres SM2 et SM3 contiennent, comme indiqué dans la littérature, des teneurs en lipides polaires et en phospholipides bien plus importants que les babeurres classiques (Tableau 2). La teneur obtenue pour le babeurre SM2 est inférieure à celle du babeurre SM3. Ce dernier se rapproche le plus des taux présentés dans le tableau 2. De plus, le taux de lipides polaires et de phospholipides du babeurre SM3 n'est que 2 % inférieur à celui de la MFGM extraite, ce qui en fait une excellente alternative pour la formation de liposomes.

Si l'on considère uniquement les fractions contenant les lipides totaux, alors les babeurres ont une plus haute teneur en lipides polaires et phospholipides que la MFGM qui contient beaucoup plus de lipides neutres.

En conclusion, des différences de composition existent entre les différentes matières premières et leurs fractions respectives. Grâce à celles-ci, il sera possible de lier ou non les caractéristiques des vésicules formées à celles de la matière première utilisée.

Une autre conclusion est également qu'en se référant uniquement à la teneur en phospholipides, la MFGM serait la matière première brute la plus adaptée à la formation de liposomes car elle en contient plus, alors que dans le cas d'une utilisation des lipides totaux, les babeurre seraient plus appropriés. Cependant, cela reste purement théorique et d'autres facteurs comme la composition en phospholipides et les interactions avec les autres composants entrent en compte.

5.1.3. Propriétés interfaciales

Afin de caractériser les propriétés interfaciales des différentes matières premières brutes et de leurs fractions, les isothermes de compression de films monocouches formés à partir de ces matières ont été mesurés au moyen d'une balance à film.

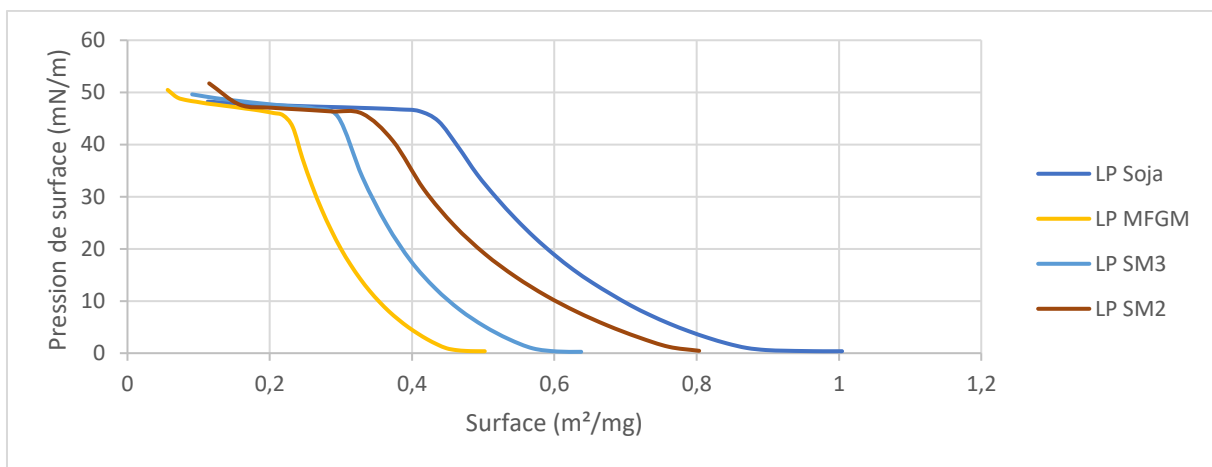


Figure 3. Isothermes de compression des films monocouches des lipides polaires à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : PL Soja, phospholipides de soja; LP MFGM, lipides polaires de la MFGM; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3; LP SM2, lipides polaires du babeurre SM2.

Pour les fractions contenant les lipides polaires et pour les phospholipides de soja, une seule transition est observée. Elle se produit à 45,5 mN/m pour les lipides polaires de la MFGM et du babeurre SM2 et à 46,5 mN/m pour les lipides polaires du babeurre SM3 ainsi que pour les phospholipides de soja. Elle correspond à la transition d'un film liquide expansé à un film liquide condensé^{22,69}. Il n'existe donc aucune différence significative entre les différentes fractions. Ces valeurs correspondent à celles obtenues par Malik et al.²² pour les lipides polaires de la MFGM qui avaient obtenu une transition à 45mN/m en utilisant les mêmes protocoles d'extraction.

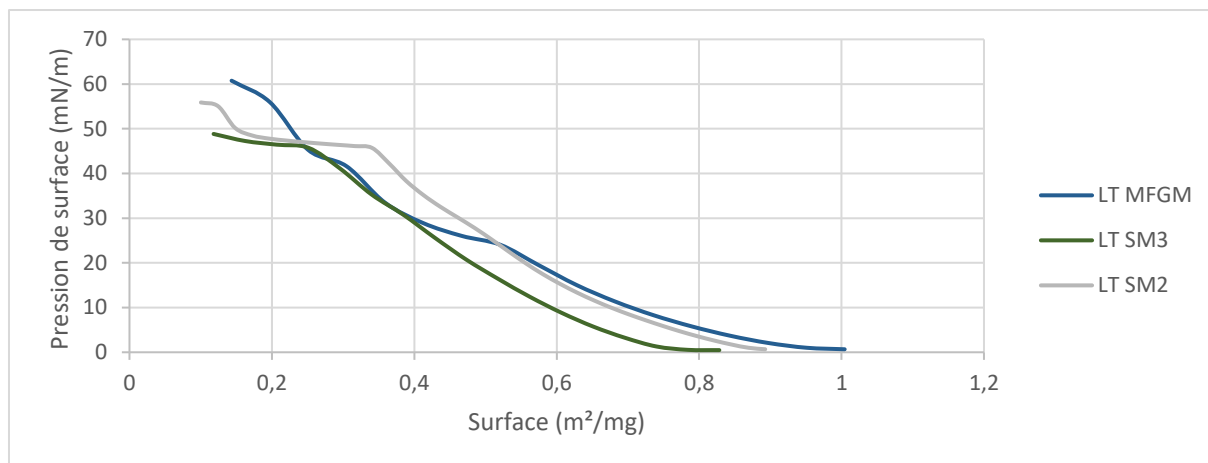


Figure 4. Isothermes de compression des films monocouches des lipides totaux à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : LT MFGM, lipides totaux de la MFGM; LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LT SM2, lipides totaux du babeurre SM2.

Dans le cas des fractions contenant les lipides totaux, on observe toujours bien la transition due aux lipides polaires aux alentours de 46 mN/M pour les deux babeurres. Celle-ci est moins marquée et légèrement inférieure (43,5 mN/m) pour la MFGM. Le fait qu'elle soit moins marquée est certainement dû à la teneur en lipides polaires de seulement 25 % dans la fraction des lipides totaux de cette dernière contre 61,26 et 52,91 % pour les babeurres SM2 et SM3.

C'est certainement pour cette même raison qu'une autre transition à 24 mN/m est clairement visible dans le cas de la MFGM et est moins marquée dans le cas des babeurres à 26 et 29 mN/m. En effet, comme les lipides totaux des babeurres sont composés à plus de 50 % de lipides polaires, il est possible que l'impact des lipides neutres soit moins bien perçu. Dans tous les cas, la deuxième transition observée est due à la présence des lipides neutres et correspond encore une fois aux données obtenues par Malik et al.²² avec un léger décalage puisque une transition avait été observée à 20 mN/m. Dans ce cas, la transition à la pression la plus faible serait celle marquant le passage d'un film liquide expansé à condensé et celle se produisant à la pression la plus élevée marquerait le passage d'un film liquide condensé à un film solide^{22,69}.

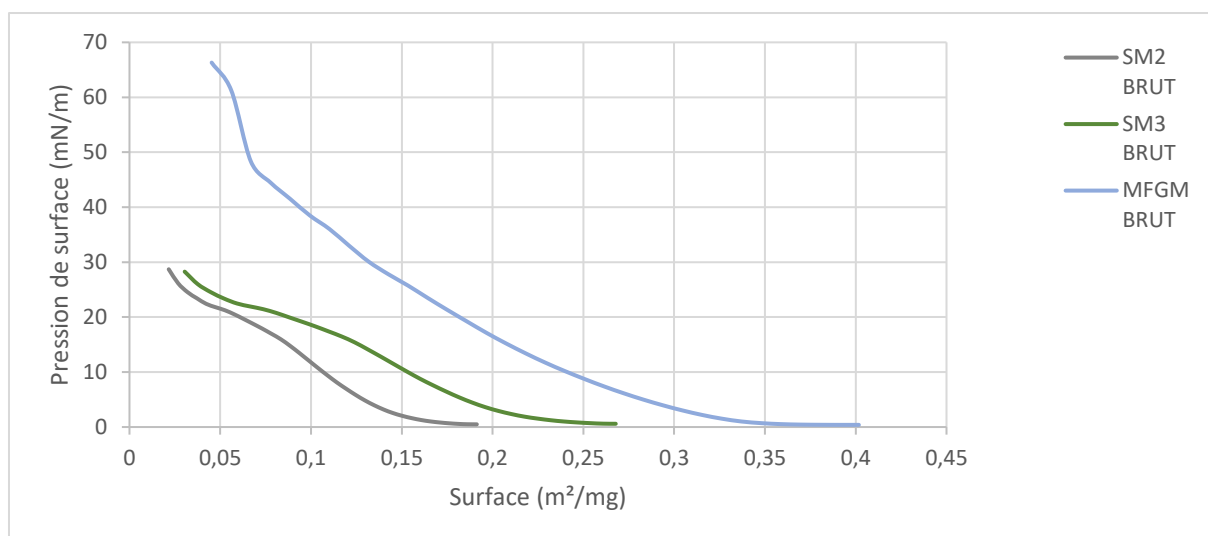


Figure 5. Isothermes de compression des films monocouches des matières premières brutes à $25 \pm 0,5$ °C. Abréviations : SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

Les isothermes obtenus pour les matières premières brutes sont relativement différents de ceux obtenus pour les lipides et sont beaucoup moins étendus avec des valeurs de surface par mg plus faibles, témoignant d'une moins grande concentration en lipides. En outre, la différence entre les babeurres et la MFGM est beaucoup plus marquée pour ceux-ci. La MFGM possède une transition à 47 mN/m et une transition moins marquée à 26 mN/m comme pour les lipides totaux. Cela n'est pas surprenant étant donné qu'elle est composée à 57,97 % de ceux-ci. Danthine et Blecker⁶⁹ ainsi que Malik et al.²² ont fait état d'isothermes similaires.

En revanche, les babeurres SM2 et SM3 possèdent une transition à 16 mN/m. Les diagrammes obtenus pour ces deux matières premières sont les mêmes que ceux obtenus par Malik et al.²² pour des fractions dégraissées de la MFGM. Cela voudrait donc dire que la quantité de lipides présents dans ces babeurres (23 et 52 %) n'est pas suffisante pour influencer significativement le comportement du film face à la compression. L'isotherme résulte donc majoritairement des propriétés des protéines étant donné que le lactose se solubilise dans l'eau. La transition correspond au réarrangement des molécules du film sous l'effet de la compression. Le fait que des pressions plus faibles soient atteintes est expliqué par l'occupation de l'espace plus importante des protéines²².

Points caractéristiques	LP MFGM	LP SM2	LP SM3	PL Soja	LT MFGM	LT SM2	LT SM3	MFGM	SM2	SM3
A0 (m ² /mg)	0,48	0,79	0,62	0,91	0,96	0,88	0,77	0,36	0,19	0,26
A1 (m ² /mg)	0,21	0,33	0,29	0,42	0,52	0,5	0,4	0,15	0,08	0,12
π 1 (mN/m)	45,5	45,5	46,5	46,5	24	26	29	26	16	16
A2 (m ² /mg)	-	-	-	-	0,28	0,34	0,26	0,07	-	-
π 2 (mN/m)	-	-	-	-	43,5	46	46	47	-	-
Elasticité de surface (mN/m)	64	69	70	66	34	54	43	29	10	10

Tableau 8. Points caractéristiques des isothermes de compression et élasticités. Abréviations: LP, lipides polaires; LT, lipides totaux; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; A₀, surface marquant le début de l'isotherme de compression; A₁, surface de la première transition; A₂,

surface de la deuxième transition; π_1 , pression de surface à la première transition; π_2 , pression de surface à la deuxième transition.

L'élasticité des différentes matières premières a également été calculée en réalisant la moyenne de l'élasticité des points mesurés de 20 mN/m à la première transition pour les lipides polaires et totaux, de la première transition à la fin du diagramme pour les babeurres bruts et jusqu'à la deuxième transition pour la MFGM. L'élasticité des lipides polaires est la plus élevée, suivie par celle des lipides totaux et enfin celle des matières premières brutes. Une valeur élevée d'élasticité est significative d'un film possédant une grande cohésion et résistance aux contraintes mécaniques²². Cela confirme que les lipides polaires sont les plus adaptés à la formation et à la stabilisation de systèmes vésiculaires tels que les liposomes.

5.2. Taille moyenne des particules

5.2.1. Méthode thin-film hydration

5.2.1.1. Tests préliminaires

Les protocoles de production de liposomes sont nombreux dans la littérature et sont adaptés à chaque matière première, application et procédé secondaire. Différents protocoles trouvés dans la littérature ont donc été testés avant de trouver une méthode permettant l'obtention de particules dont la taille correspond à celle des liposomes. En effet, la principale difficulté rencontrée lors de ces tests préliminaires est la mauvaise hydratation du film de phospholipides, résultant en des particules de grande taille, dont la répartition de taille était également large et dont les résultats sont peu reproductibles. La figure 6 illustre ce phénomène. L'échantillon utilisé sur celle-ci a été coloré avec du rouge Congo afin de mieux percevoir les différentes particules. Ce dernier est censé colorer la solution aqueuse mais pas les lipides, bien que cela ne soit pas son utilisation optimale. Pour une étude plus approfondie, l'utilisation de rouge Soudan permettant une coloration des lipides serait plus appropriée.

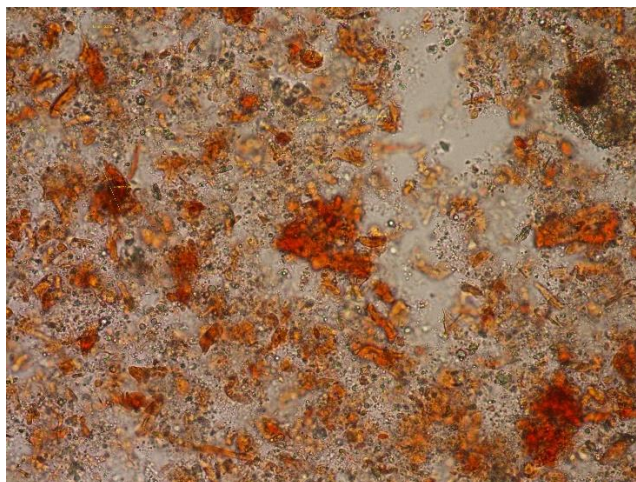


Figure 6. Image d'un échantillon formé à partir de MFGM lors des tests préliminaires et illustrant l'inefficacité du protocole testé. Photo prise par le microscope Eclipse E400 (objectif x20).

Le tableau 9 résume les différentes méthodes testées et la taille moyenne ainsi que l'indice de polydispersité des particules des suspensions formées à partir de celles-ci.

Méthode					Taille moyenne des particules (nm)	Indice de polydispersité
Température (°C)	Durée d'hydratation (heures)	Agitation	Matière première	Concentration (mg/mL)		
20	2	Vortex, 1fois	SM3	20	946,9 ± 184,9	0,380 ± 0,057
20	2	Vortex, 1fois	MFGM	20	1868,2 ± 71,0	0,483 ± 0,063
20	2	Vortex, 1fois	LP SM3	20	11025,1 ± 1217,6	1
20	24	Vortex, 1fois	LP SM3	20	7353,4 ± 276,8	1
20	24	Agitation continue	LP SM3	20	701,5 ± 133,2	0,333 ± 0,047
60	1	Vortex, 1fois	LP SM3	20	1690,6 ± 234,5	0,452 ± 0,068

Tableau 9. Résultats des principaux tests préliminaires de la méthode *thin-film hydration*.
Abréviations : SM3, babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3.

Après avoir testé un protocole de base sur des matières premières brutes, il a été décidé de se focaliser sur une des fractions contenant des lipides polaires d'un babeurre car le potentiel de formation de liposomes était plus élevé pour celles-ci. La fraction issue du babeurre SM3 a été sélectionnée dans ce but.

Ces tests ont montré que l'agitation et la température durant la période d'hydratation sont des facteurs clés dans la préparation de liposomes par la méthode *thin-film hydration*. En effet, pour une même matière première, le passage d'une agitation au vortex pendant 1 minute à une agitation continue a significativement réduit la taille moyenne des particules, la faisant passer sous les 1000 nm. Cela a également permis de réduire la largeur de la répartition des tailles. L'augmentation de la température a eu le même effet. Cela est dû au fait que la formation de liposomes ne peut se faire que si la température est supérieure à la température de transition moyenne des phospholipides. En-dessous de cette température, les lipides se trouvent à l'état de gel qui ne favorise pas la formation d'une membrane continue⁷⁰. La température de travail utilisée dans la plupart des protocoles est située entre 55 et 60 °C afin d'être certain de se situer au-dessus de cette température de transition lorsqu'elle n'est pas précisément connue pour les phospholipides utilisés^{50,70,71}. La température de 60 °C a donc été sélectionnée pour le protocole final, même si les deux phospholipides majeurs de la MFGM, la sphingomyéline et la phosphatidylcholine, ont une température de transition inférieure à 37 °C⁵⁴.

Afin d'optimiser l'agitation lors de l'hydratation par rapport au protocole initialement testé, celle-ci est effectuée dans un bain-marie à agitation et les ballons sont vortexés durant 1 minute toutes les 10 minutes. Afin de réduire la dégradation des lipides dans de telles conditions, le temps d'hydratation est réduit à 1 heure.

Un autre point qui a été modifié dans le protocole final est la concentration et donc la quantité de matière introduite dans les ballons. En effet, tous les tests ont été effectués dans des ballons de 50 mL afin que le film présent dans celui-ci puisse facilement être hydraté au moyen d'une agitation par vortex. Cependant, la concentration de 20 mg/mL utilisée dans les tests ne permettait pas la formation d'un film uniforme dans un ballon de si petite taille. La quantité de matière introduite a donc été diminuée ainsi que la concentration afin de garder un volume de solvant permettant une bonne hydratation du film fin obtenu. Les concentrations de 1 et 8 mg/mL permettent l'obtention d'un film régulier sur les parois du ballon.

Le protocole sélectionné à la suite de ces tests permet donc d'obtenir un film fin qui est ensuite hydraté efficacement à 60 °C grâce à des cycles de vortex. Les tailles de particules résultantes de ce protocole sont toutes situées sous les 500 nm, ce qui correspond aux tailles attendues pour des liposomes bruts de type MLVs formés par la méthode *thin-film hydration*.

5.2.1.2. Validation de la méthode

Afin de valider la méthode choisie à la suite des tests préliminaires, celle-ci a été testée avec des phospholipides de soja contenant au moins 30 % de L-alpha-phosphatidylcholine. Ce type de phospholipides est régulièrement utilisé pour la formation de liposomes et son efficacité pour cette application a été prouvée^{25,70}. Cette démarche a pour but de valider l'efficacité de la méthode avec un matériel de référence dont l'efficacité a été démontrée.

Les liposomes formés à partir des solutions à 1 mg/mL et 8 mg/mL ont des tailles moyennes respectives de $118,6 \pm 1,2$ nm et $226,1 \pm 0,8$ nm. Cela correspond aux gammes de tailles pouvant être obtenues pour des MLVs formés par cette méthode⁴¹.

Les indices de polydispersités liés à ces tailles moyennes sont de $0,308 \pm 0,004$ et $0,286 \pm 0,032$. Ceux-ci indiquent une distribution de taille relativement large³⁷. Cela est normal pour cette méthode qui nécessite un procédé secondaire pour standardiser la taille des vésicules obtenues.

A partir de ces résultats, il est possible d'affirmer que la méthode utilisée permet l'obtention de vésicules dont les tailles correspondent à celles de liposomes.

5.2.1.3. Impact de la concentration

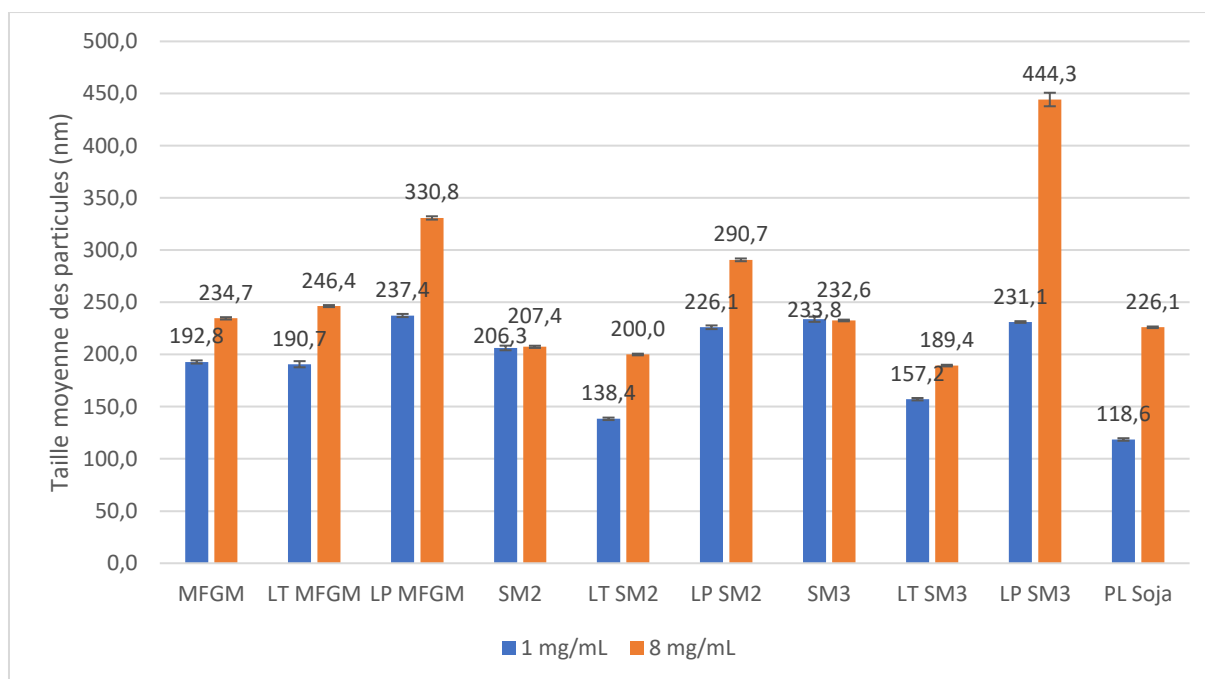


Figure 7. Tailles moyennes des particules obtenues par la méthode *thin-film hydration*. Abréviations : SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides

La taille moyenne des particules est significativement supérieure lorsque la concentration des suspensions augmente pour toutes les matières premières, sauf les babeures brutes SM2 et SM3. Cette augmentation de la taille proportionnelle à la concentration en matière a déjà été démontrée dans la littérature⁷². Elle pourrait être due à l'augmentation de la viscosité de la solution proportionnelle à la concentration en lipides. Cette augmentation de la viscosité provoque une augmentation de la stabilité des vésicules formées face aux étapes d'homogénéisation (le vortex dans ce cas)⁷³. Le fait qu'une différence significative n'existe pas pour les babeures industriels brutes pourrait être lié à leur plus faible proportion en phospholipides. Celle-ci ne diffère pourtant que de 2 % entre la MFGM et le babeurre SM3. Cette hypothèse ne se vérifie donc pas dans le cas de la MFGM.

Il est également constaté que plus la matière première utilisée est concentrée en phospholipides, plus l'écart de taille moyenne est élevé entre les deux concentrations. En effet, les écarts entre les moyennes des lipides polaires sont les plus grands, suivis par ceux des moyennes des lipides totaux puis par les matières premières brutes. Cela confirme que l'augmentation de la concentration en phospholipides provoque une augmentation proportionnelle de la taille des particules pour la méthode *thin-film hydration*.

5.2.1.4. Impact de la matière première

En ce qui concerne les matières premières brutes, les liposomes de plus petite taille sont obtenus à partir de la MFGM pour la concentration 1 mg/mL et à partir du babeurre SM2 pour la concentration 8 mg/mL.

D'un point de vue statistique, si on considère les matières premières brutes, les particules formées à partir du babeurre SM3 sont significativement plus grandes pour la concentration la plus faible tandis que les particules formées à partir du babeurre SM2 sont significativement plus petites que les autres pour les suspensions à 8 mg/mL.

Ce schéma ne se répète pas pour les lipides totaux pour lesquels les particules sont significativement plus grandes pour la MFGM, quelle que soit la concentration. Cela pourrait signifier qu'une grande proportion de lipides neutres mène à des tailles de particules plus grandes.

Si on compare les suspensions formées à partir des lipides polaires et des phospholipides pour une concentration de 1 mg/mL, on constate qu'aucune différence significative n'existe pour les fractions contenant les lipides polaires laitiers au sein d'une même concentration. Cela paraît plutôt logique en raison de la composition en phospholipides qui est assez similaire dans ces échantillons. En revanche, les particules formées à partir des phospholipides de soja sont significativement plus petites. La même observation est effectuée pour les suspensions à 8 mg/mL avec cependant une taille moyenne des particules significativement supérieure pour les lipides polaires du babeurre SM3.

Enfin, en ce qui concerne l'impact de la purification en phospholipides des différentes matières premières, si une même matière première est considérée, il n'existe pas de différence significative entre l'échantillon brut et les lipides totaux pour les suspensions à 8 mg/mL. Par contre, les tailles obtenues pour les lipides polaires sont significativement plus élevées que celles obtenues pour les lipides totaux. Cela est certainement lié à l'augmentation importante de la concentration en phospholipides pour ces échantillons. La même observation est faite pour la MFGM à 1 mg/mL mais pas pour les babeurre pour lesquels la taille moyenne obtenue dans le cas des lipides totaux est significativement inférieure aux échantillons bruts et aux lipides polaires.

En conclusion, globalement, il est constaté que les éléments les plus déterminants pour la taille moyenne des particules sont la concentration en phospholipides ainsi que la composition en lipides totaux et en lipides polaires. Afin d'investiguer en profondeur l'impact de la concentration en phospholipides sur la taille des vésicules formées, la réalisation de suspensions à partir des différentes matières premières à concentrations égales en phospholipides et non en matière totale devrait être envisagée.

5.2.1.5. Impact de la sonication sur la taille moyenne des particules

Selon la littérature, la sonication des suspensions de liposomes après formation par la méthode *thin-film hydration* permet d'obtenir des particules de type ULVs mais également de réduire leur taille ⁴².

La sonication par bain a donc été testée sur les solutions à 8 mg/mL car les tailles moyennes pour cette concentration étaient globalement plus élevées et présentaient donc plus d'intérêt à être réduites. Le tableau 10 présente les taux de réduction des tailles moyennes des particules pour ces échantillons.

Matière première	Taux de réduction de la taille moyenne des particules (%)
MFGM	16,72
Lipides totaux de la MFGM	-10,50
Lipides polaires de la MFGM	1,57
Babeurre SM2	-0,14
Lipides totaux du babeurre SM2	34,63
Lipides polaires du babeurre SM2	7,58
Babeurre SM3	10,04
Lipides totaux du babeurre SM3	-11,09
Lipides polaires du babeurre SM3	1,46
Phospholipides de Soja	1,37

Tableau 10. Taux de réduction de la taille moyenne des particules après sonication des suspensions à 8 mg/mL formées par la méthode *thin-film hydration*. Un taux négatif est significatif d'une augmentation de la taille des particules.

L'impact de la sonication sur la taille des particules est très variable selon l'échantillon considéré. Il est observé que la taille moyenne des particules a augmenté au lieu de diminuer dans le cas des babeurres bruts SM2 et SM3 et des lipides totaux de la MFGM. Elle n'a également eu que très peu d'impact sur les particules formées à partir du babeurre SM2, des phospholipides de soja et des lipides polaires de SM3. Cependant, d'un point de vue statistique, une différence significative entre la taille moyenne avant et après sonication n'existe que pour les échantillons MFGM et LT SM2.

En conclusion, la sonication n'a eu que très peu d'impact sur la taille moyenne des particules mais elle a peut-être tout de même eu un impact sur la structure de celles-ci. Il serait donc nécessaire d'analyser les échantillons en microscopie électronique de type Cryo-TEM par exemple pour le déterminer.

Il est à noter que la sonication n'a pas été effectuée directement après la formation des vésicules comme cela est souvent pratiqué dans la littérature^{70,74}. Cela a pu avoir un impact sur l'efficacité du procédé. De plus, comme pour la méthode *thin-film hydration*, de nombreux procédés existent avec des températures, des durées et des puissances différentes. Dans ce cas, la sonication a été effectuée durant 10 minutes à la température de formation des liposomes⁷⁴ et à une puissance de 360 W et une fréquence de 40 kHz. Ces deux derniers paramètres ont été imposés par le matériel disponible au laboratoire.

5.2.2. Formation de liposomes par microfluidisation

En raison des résultats prometteurs obtenus via la méthode *thin-film hydration* avec les différentes fractions issues des babeurres industriels SM2 et SM3 ainsi que des contraintes liées à la production de MFGM à plus grande échelle, la formation de vésicules par microfluidisation a uniquement été testée sur ces deux premiers.

Des tests ont donc été effectués avec les deux babeurres mais également avec les lipides totaux et polaires du babeurre SM3. Celui-ci a également été choisi en raison des contraintes liées aux méthodes d'extraction et de fractionnement qui, même si elles sont

adaptables à plus grande échelle, nécessitent une quantité importante de solvants. Le babeurre SM3 possédant une teneur en matière grasse plus élevée que le babeurre SM2 a donc été choisi afin de réduire les volumes de solvants nécessaires à l'extraction des lipides totaux.

5.2.2.1. Validation de la méthode

Comme pour la méthode *thin-film hydration*, la méthode de production de liposomes utilisée pour les deux microfluidiseurs a été testée avec les phospholipides de soja utilisés par Thompson et al.^{25,52} afin de comparer les résultats obtenus avec ceux de l'article et de repérer un éventuel impact du matériel sur la taille et les caractéristiques des liposomes formés. En effet, le matériel de dispersion (Ultra-Turrax) ainsi que la géométrie des chambres de microfluidisation et la pression de travail diffèrent. Il n'est également pas précisé dans les articles si un groupe froid ou un autre moyen de contrôle de la température est utilisé durant la microfluidisation.

Le tableau 10 présente les résultats de tailles de particules obtenus par Thompson et al.²⁵ et ceux obtenus avec les deux microfluidiseurs à partir de la même fraction de phospholipides de soja contenant au moins 30 % de L-alpha-phosphatidylcholine. La formation de liposomes avait été démontrée au moyen de la microscopie électronique (*cryo-FESEM* et *negative staining TEM*) par ces mêmes auteurs.

Méthode	Nombre de passages	Tailles des particules (nm)	Indice de polydispersité
Thompson et al. ²⁵	5	81 ± 5	≈ 0,5
Microfluidiseur M-110EH	5	60,1 ± 0,5	0,24 ± 0,007
Microfluidiseur 110T	5	117,7 ± 2,7	0,261 ± 0,035
Microfluidiseur 110T	10	107,3 ± 1,9	0,219 ± 0,021

Tableau 11. Comparaison avec la littérature des tailles moyennes et des répartitions de tailles des particules formées par microfluidisation des phospholipides de soja.

La taille moyenne des particules obtenues à l'aide du microfluidiseur M-110EH est inférieure à celle obtenue par Thompson et al. Outre l'impact de la géométrie de la chambre qui est en Z dans ce modèle et en Y dans le modèle utilisé par Thompson et al., la différence pourrait s'expliquer par la concentration en phospholipides dix fois moins élevée que dans la publication de Thompson et al. (10 %)¹.

La taille moyenne des particules obtenues au moyen du microfluidiseur 110T est, elle, supérieure à celle obtenue par Thompson et al. Cela pourrait s'expliquer par la pression de travail largement inférieure sur ce type de modèle ainsi qu'au diamètre de la chambre. L'augmentation du nombre de passages de 5 à 10 permet de se rapprocher de la valeur obtenue par Thompson et al. mais pas de l'atteindre.

En conclusion, on pourrait donc affirmer que toutes les méthodes testées permettent la formation de particules dont la taille correspond à celles de liposomes. On peut également souligner que le paramètre déterminant majoritairement la taille moyenne des particules est la pression de travail même si la géométrie de la chambre de microfluidisation et la

concentration de la dispersion influencent certainement cette valeur dans une moindre mesure. Dans le cas des phospholipides de soja, la méthode utilisée avec le microfluidiseur M-110EH permet une meilleure réduction de la taille des particules que la méthode de Thompson et al. alors que le microfluidiseur 110T permet une moins bonne réduction de la taille moyenne des particules.

Dans tous les cas, l'indice de polydispersité obtenu est environ deux fois moins élevé, ce qui témoigne d'une distribution de tailles moins large. L'indice obtenu se trouve parmi les plus faibles repris dans la littérature pour les liposomes formés par microfluidisation⁷⁵.

Enfin, il convient tout de même de rappeler que l'obtention de tailles moyennes des particules situées dans la même gamme de valeurs que celles de liposomes ne confirme en rien leur existence même si dans ce cas, la probabilité que des liposomes aient été formés est assez élevée car cette matière première avait permis de créer des liposomes dans des conditions de formation relativement proches.

5.2.2.2. Influence du nombre de passages

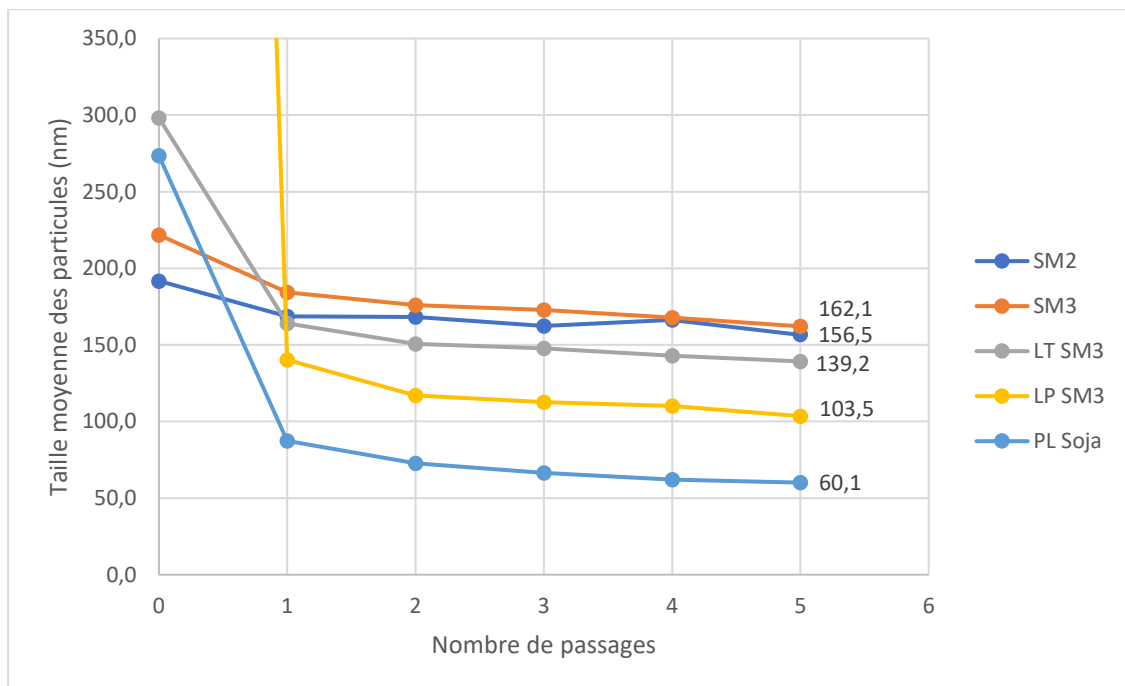


Figure 8. Evolution de la taille moyenne des particules en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur M-110EH. Abréviations : LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3; PL Soja, phospholipides de soja.

Pour toutes les matières premières et les deux microfluidiseurs, la plus grande réduction de la taille moyenne des particules est constatée lors du premier passage. Les autres passages provoquent une réduction beaucoup plus faible de la taille des particules. Il est globalement observé que la réduction de la taille est de plus en plus faible lorsque le nombre de passages augmente jusqu'à devenir progressivement non significative. Ce phénomène est également observable à l'œil nu (figure 9), particulièrement pour les dispersions ne contenant que des lipides polaires. Cela s'explique par une diminution de la dispersion de la lumière

lorsque la taille des particules diminue. Ce phénomène se traduit visuellement par une diminution de l'opacité de la solution. Cela a déjà été constaté dans plusieurs publications dont celle de Takahashi et al.⁵⁰.

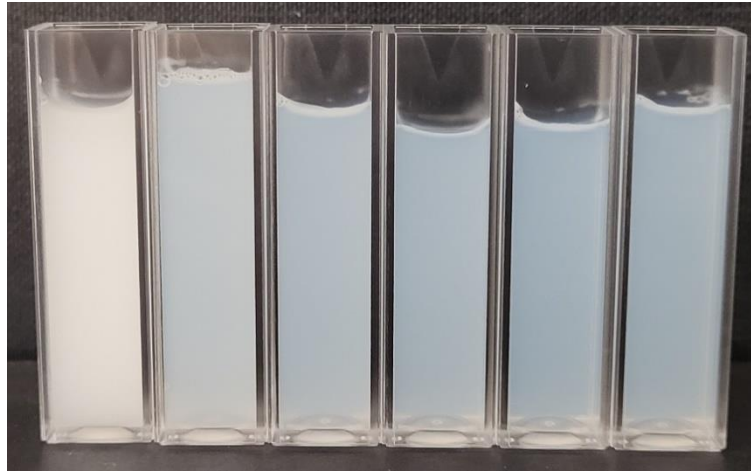


Figure 9. Evolution de l'aspect d'une suspension de lipides polaires du babeurre SM3 en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur M-110EH. La première cuvette en partant de la gauche correspond à 0 passages et la cuvette la plus à droite à 5 passages.

Le même phénomène avait été observé par Thompson et al. avec une diminution plus progressive après le deuxième passage^{1,25,40,76}.

Il est à noter que la fraction des lipides polaires du babeurre SM3 présente une réduction de la taille moyenne des particules beaucoup plus progressive que les autres matières premières dans le cas du microfluidiseur 110T. Cela pourrait être expliqué par la taille des particules initiales beaucoup plus élevée après l'étape de dispersion à l'Ultra-Turrax. Une durée de dispersion plus élevée permettrait de réduire la taille initiale des particules avant microfluidisation⁵⁰. Le fait que ce phénomène n'apparaisse pas avec le microfluidiseur M-110EH pourrait démontrer une moins bonne efficacité du procédé lorsque la pression est plus faible et la taille initiale des particules élevée. Le fait que la réduction de taille reste graduelle même à des tailles plus faibles est certainement dû au refroidissement de la suspension suite à ses passages successifs dans le microfluidiseur qui rend la réduction moins efficace. Cela pourrait se démontrer en utilisant une suspension avec des tailles initiales de particules inférieures à 350 nm à une température inférieure.

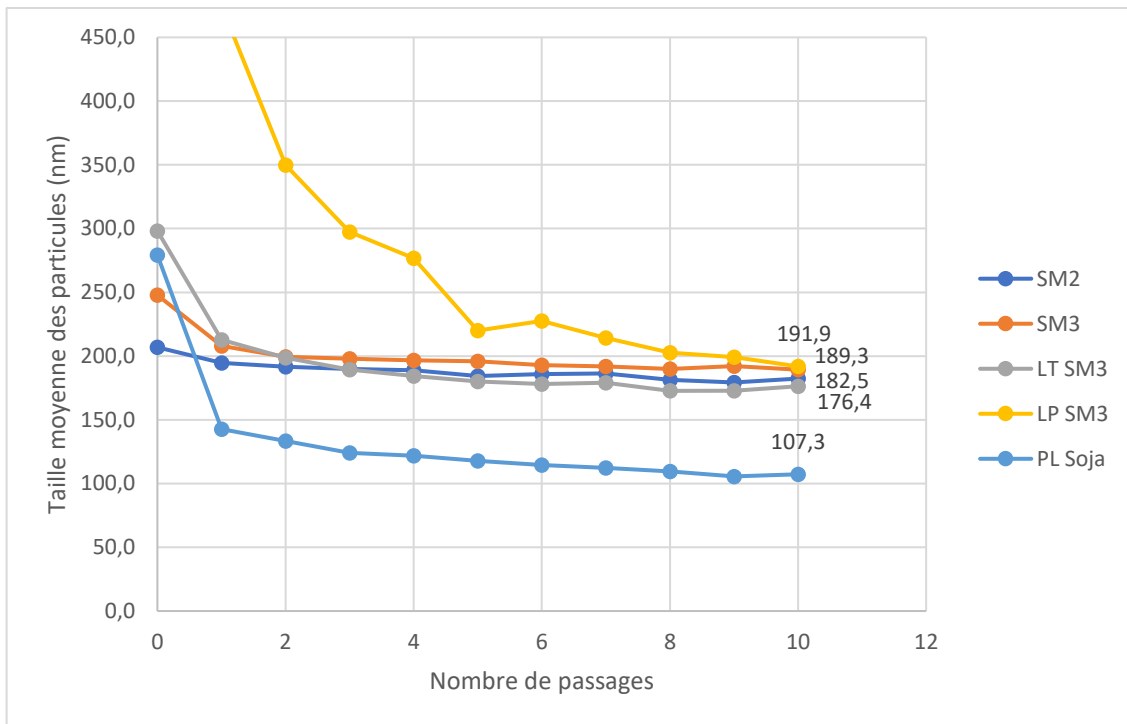


Figure 10. Evolution de la taille moyenne des particules en fonction du nombre de passages dans le microfluidiseur 110T. Abréviations : LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3, PL Soja, phospholipides de soja.

5.2.2.3. Influence de la matière première

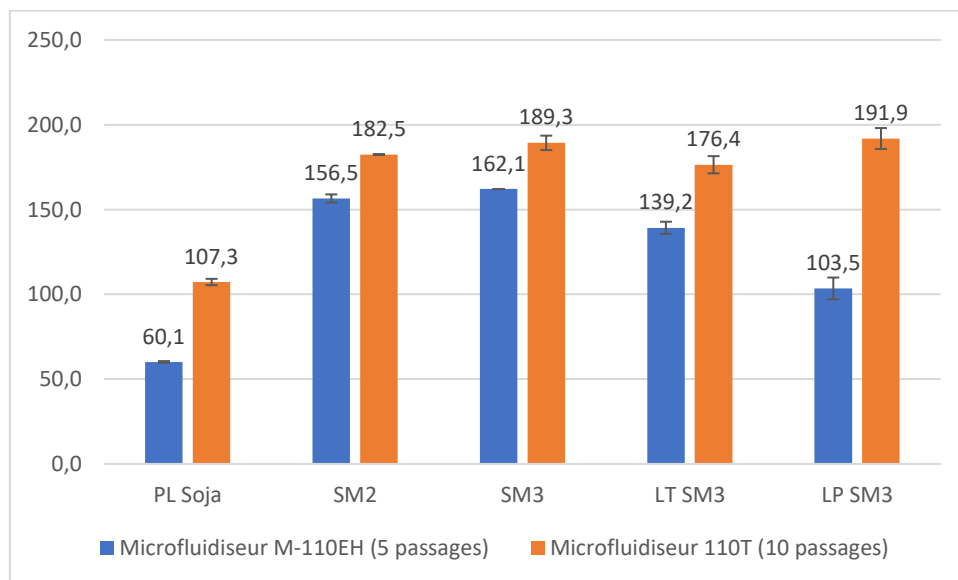


Figure 11. Comparaison des tailles moyennes obtenues pour le microfluidiseur M110-EH et le microfluidiseur 110T après, respectivement, 5 et 10 passages. Abréviations : PL Soja, phospholipides de soja; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3; LT SM3, lipides totaux du babeurre SM3; LP SM3, lipides polaires du babeurre SM3.

Les particules obtenues après 5 et 10 passages avec les matières premières d'origine laitière sont toujours significativement plus grandes que celles obtenues à partir des

phospholipides de soja pour un même microfluidiseur. Thompson et al. avaient également fait cette observation. Cependant, la différence n'était que de 14 nm entre les deux moyennes, ce qui est moins important que les différences obtenues pour toutes les matières premières²⁵.

Les tailles moyennes obtenues pour les babeurres SM2 et SM3 bruts sont proches même si la taille moyenne des particules formées à partir de SM3 est significativement supérieure à celles formées à partir de SM2 dans le cas du microfluidiseur M-110EH. Cette légère différence pourrait être due à la différence entre les tailles moyennes des particules avant microfluidisation. Cette observation avait également été faite pour la méthode *thin-film hydration* bien que les tailles des particules soient toujours plus élevées pour cette dernière. La même hypothèse peut donc être formulée dans ce cas.

Ensuite, en ce qui concerne les suspensions réalisées à partir des fractions de SM3, il est observable que plus la fraction est enrichie en lipides polaires, plus la taille moyenne des particules est faible lorsque la microfluidisation est effectuée sur le microfluidiseur M-110EH. Cela n'est cependant pas le cas pour le microfluidiseur 110T. En effet, la taille moyenne des particules obtenues après 10 passages est plus élevée pour la fraction contenant les lipides polaires que pour les lipides totaux et n'est pas significativement différente de celle de SM3 brut. Cela pourrait être expliqué par une taille des particules initiale plus élevée pour cette fraction ou par le fait qu'une concentration en phospholipides plus élevée est à l'origine de liposomes de plus grande taille mais dans ce cas, cela aurait également dû se produire sur l'autre microfluidiseur. Une théorie pourrait être que, comme les résultats du microfluidiseur M-110EH le montrent, plus la suspension est pure et plus des liposomes de petite taille peuvent être formés, mais que la pression imposée doit être suffisante pour atteindre ces tailles. De plus, une augmentation de la teneur en phospholipides provoque une augmentation de la viscosité de la suspension à cause de la gélification des lipides à une température inférieure à 60 °C⁷⁰ et cela rend la réduction de taille plus compliquée⁵⁰.

5.2.2.4. Comparaison des deux microfluidiseurs utilisés

Il est observable sur la figure 11 que la taille moyenne des particules obtenues via le microfluidiseur M-110EH est significativement inférieure à celle obtenue via le microfluidiseur 110T pour toutes les matières premières et fractions. Comme indiqué dans le point 5.2.2.1., cela peut être expliqué par la pression et par conséquent la quantité d'énergie transmise, beaucoup plus élevée dans le microfluidiseur M-110EH. En effet, la pression de travail de ce dernier est de 1500 bar contre 350 bar pour le microfluidiseur 110T.

En considérant les résultats des deux microfluidiseurs pour toutes les matières premières, il apparaît clairement que seule la suspension contenant les lipides polaires de SM3 permet d'obtenir des particules de taille moyenne similaire à celles obtenues à partir de fractions enrichies en phospholipides. En effet, les tailles moyennes obtenues avec ce genre de fractions se situent toujours aux alentours des 90 à 100 nm à la concentration utilisée (1 %), ce qui est très proche des 103,5 nm obtenus^{1,25,40,49,52}.

5.2.3. Comparaison des résultats obtenus par la méthode thin-film hydration et par microfluidisation

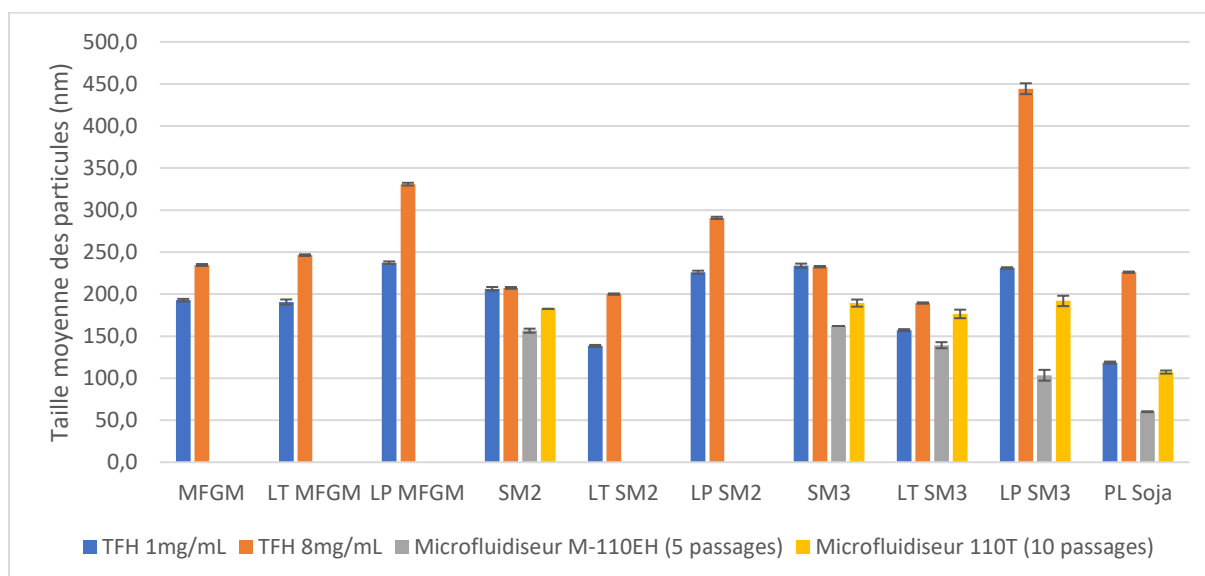


Figure 12. Comparaison des tailles moyennes obtenues pour l'ensemble des méthodes. Abréviations : TFH, méthode thin-film hydration; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

Pour conclure cette discussion sur la taille des particules, il est constaté que les tailles moyennes obtenues par microfluidisation après 5 et 10 passages sont toujours significativement inférieures à celles obtenues pour la méthode *thin-film hydration*, même si la concentration en matière première est plus élevée pour la première technique. Cela s'explique par la quantité d'énergie plus importante apportée par la microfluidisation et par le type de liposomes potentiellement formés. En effet, les ULVs en principe formés par la microfluidisation sont censés être de taille inférieure aux MLVs formés par la méthode *thin-film hydration*.

Il est également constaté que quelle que soit la méthode utilisée, les particules formées à partir des phospholipides de soja sont toujours de taille inférieure.

D'autres différences significatives entre certains échantillons sont observées pour les deux techniques comme, par exemple, une diminution de la taille moyenne des particules lorsqu'elles sont formées à partir des lipides totaux du babeurre SM3 par rapport à la taille obtenue pour ce babeurre brut. Une autre similitude constatée entre la méthode *thin-film hydration* (8mg/mL) et le microfluidiseur 110T est l'augmentation significative de la taille des particules lorsque les lipides polaires du babeurre SM3 sont utilisés en comparaison avec le babeurre brut.

Pour finir, la méthode la plus efficace pour obtenir des particules de faible taille semble être la microfluidisation par le microfluidiseur M110-EH. Le microfluidiseur 110T possède cependant l'avantage de réagir de façon similaire à la méthode *thin-film hydration* face aux changements dans la composition des échantillons. Son utilisation pourrait donc

faciliter la mise au point de vésicules aux caractéristiques spécifiques par la combinaison des deux méthodes.

5.2.4. Indices de polydispersité et répartition de la taille des particules

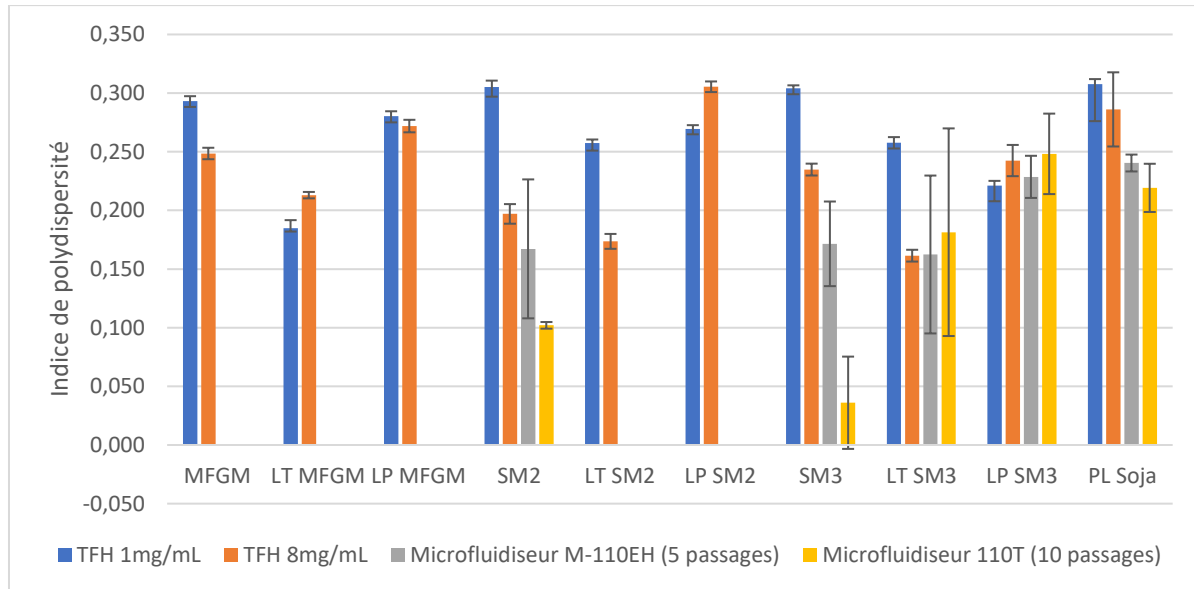


Figure 13. Comparaison des indices de polydispersité obtenus pour l'ensemble des résultats. Abréviations : TFH, méthode *thin-film hydration*; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

Tous les indices de polydispersité se situent sous 0,3 sauf pour les suspensions formées à partir des babeures brutes SM2 et SM3 et des phospholipides de soja pour la méthode *thin-film hydration* à 1 mg/mL ainsi que pour les lipides polaires du babeurre SM2 pour la concentration 8 mg/mL. Tous les autres échantillons sont donc considérés comme ayant une répartition de tailles étroite.

L'indice de polydispersité est significativement plus faible pour les échantillons microfluidisés que pour les échantillons issus de la méthode *thin-film hydration*. Sauf dans le cas des lipides totaux et des lipides polaires du babeurre SM3, pour lesquels certains indices sont non significativement différents entre les deux techniques. Cela signifie donc que dans la majorité des cas, la microfluidisation permet de réduire la largeur de la distribution de la taille des particules par rapport à la méthode *thin-film hydration*. Cette conclusion rejoint celle de Thompson et al.⁴⁰ qui avaient cependant obtenu une valeur de 1, soit la valeur maximum pour la méthode *thin-film hydration*. Le protocole utilisé différait cependant de celui utilisé dans ce travail qui semble donc fournir une répartition de tailles plus étroite.

5.3. Potentiel ζ et stabilité

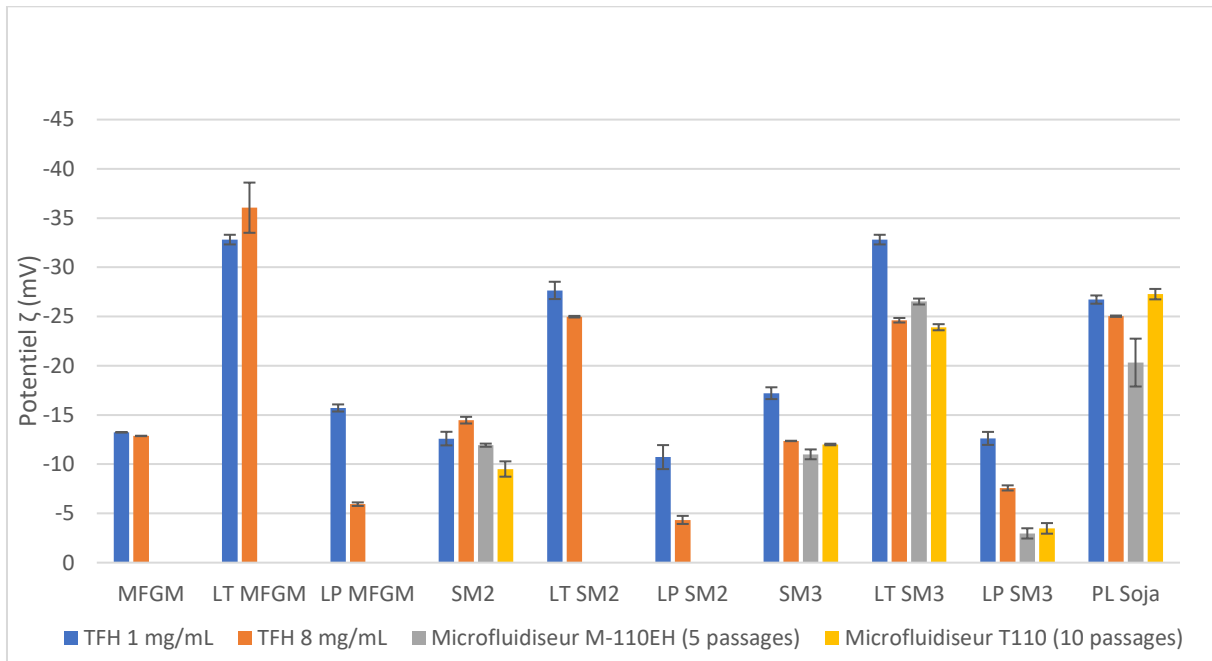


Figure 14. Comparaison des potentiels ζ des suspensions. Abréviations: TFH, méthode thin-film hydration; LT, lipides totaux; LP, lipides polaires; PL, phospholipides; SM2, babeurre SM2; SM3, babeurre SM3.

Pour toutes les matières premières laitières, les potentiels ζ les plus élevés, en valeur absolue, sont atteints dans les solutions formées à partir des fractions contenant les lipides totaux (-23,91 à -36,05 mV). Ce sont d'ailleurs les seules valeurs à se trouver en-dessus des -20 mV.

Les potentiels ζ des fractions contenant les lipides polaires des babeurres et de la MFGM sont particulièrement peu négatifs pour les suspensions issues de la microfluidisation et de la méthode *thin-film hydration* à une concentration de 8mg/mL. Après investigation, il semblerait que des résidus d'acide acétique utilisé lors du fractionnement des lipides totaux dans les colonnes aminopropyles entraînent une diminution du pH et rendent donc le potentiel ζ de ces suspensions moins négatif^{25,52}. Cela impacte moins les suspensions à 1 mg/mL car la quantité de matière première, et donc d'acide acétique, est moins élevée pour un même volume et a moins d'impact sur le pH du tampon. Une amélioration du protocole consisterait donc à ajuster le pH de ces suspensions à 7 avant la formation des liposomes par l'ajout de NaOH. Toutes les valeurs obtenues pour les suspensions formées à partir des fractions contenant les lipides polaires sont dès lors à utiliser avec précaution car le potentiel ζ de ces dernières aurait certainement été plus négatif à pH 7.

Si on compare les matières premières laitières brutes entre elles, il n'existe pas de différence significative au niveau statistique même si l'on constate une valeur légèrement plus négative (-17,21 mV) pour le babeurre SM3 dans le cas de la méthode *thin-film hydration* à 1 mg/mL.

En ce qui concerne les lipides totaux, les potentiels ζ obtenus pour la MFGM sont significativement plus négatifs que ceux des babeurres SM2 et SM3. La différence majeure

entre ces échantillons est le taux de lipides neutres et d'acides gras libres plus élevé et donc le taux de lipides polaires moins élevé pour les lipides de la MFGM.

Il n'existe pas de différence significative pour les potentiels ζ obtenus pour les lipides polaires laitiers. Cependant, les potentiels obtenus pour les phospholipides de soja sont toujours significativement plus négatifs que pour les fractions contenant les lipides polaires des babeurre et de la MFGM. Cela correspond aux données de Kosmerl et al.⁵⁶ qui avaient obtenu un potentiel ζ de -27,71 mV pour les liposomes formés à partir de phospholipides de soja et -15,63 mV pour les liposomes formés à partir d'une fraction riche en phospholipides de la MFGM. Thompson et al. sont arrivés à la même conclusion mais avec des valeurs beaucoup plus négatives de -65 mV pour la fraction riche en lipides de la MFGM et -80 mV pour les lipides de soja.

Cette différence entre les deux sources de phospholipides est due à la composition en phospholipides qui influence la charge à la surface des particules^{1,56}. En effet, la charge négative dans la gamme de pH utilisée est due à la présence des phospholipides anioniques (phosphatidylinositol et phosphatidylsérine) ainsi que des phospholipides zwitterioniques (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline)⁷⁷.

Etant donné que le potentiel ζ est aussi dépendant de la force ionique d'une solution, la comparaison avec des résultats issus de tests réalisés avec des tampons ayant une composition différente ne serait pas vraiment exacte. La comparaison des valeurs obtenues avec celles de Thompson et al.⁵² a donc plus de sens même si ces dernières sont moins proches des valeurs obtenues que celles de Kosmerl et al.⁵⁶. Un tel écart entre les résultats obtenus et ceux de Thompson et al.⁵² est difficilement explicable par une différence de composition en phospholipides pour la MFGM et n'est pas explicable pour les phospholipides de soja car la même matière première a été utilisée. Cependant, Thompson et al. avaient déjà mentionné le fait que les potentiels qu'ils avaient obtenus étaient plus négatifs que ceux présents dans la littérature à l'époque.

Il pourrait tout de même s'avérer intéressant de comparer les résultats avec la valeur obtenue par Kosmerl et al.⁵⁶ pour les phospholipides de la MFGM car les valeurs données pour les phospholipides de soja sont très proches de celles obtenues. On constate que le potentiel ζ donné pour les phospholipides de la MFGM est proche des valeurs observées pour les matières premières brutes et pour les fractions contenant les lipides polaires mais seulement pour la méthode *thin-film hydration* à 1 mg/mL. Ce dernier élément confirme l'influence du pH plus faible sur la valeur obtenue pour les autres méthodes.

Le fait que les valeurs soient plus négatives pour les fractions contenant les lipides totaux que pour les autres peut s'expliquer par une autre hypothèse. En effet, les matières premières brutes contiennent des protéines à l'inverse des fractions lipidiques. Or, la présence de protéines laitières (du lactosérum ou de caséine) à la surface des membranes résulte en un potentiel ζ moins négatif⁷⁸. Il est dès lors logique que la suspension formée avec les lipides totaux ait un potentiel ζ plus négatif. Cela devrait également être le cas pour les lipides polaires mais encore une fois, à pH 7, cela resterait certainement possible. Cette théorie est renforcée par le fait que les potentiels ζ obtenus pour les matières premières brutes sont en réalité très proches de ceux trouvés pour la MFGM brute dans certaines sources⁷⁸.

Ces valeurs de potentiels ζ , faibles en comparaison avec celles trouvées dans certaines sources, ont un effet sur la stabilité. En effet, selon la théorie DLVO, la charge de surface des particules, et donc le potentiel ζ , influence la stabilité d'une suspension. Il est généralement assumé qu'un potentiel ζ inférieur à 30 mV (en valeur absolue) mène à une instabilité de la suspension^{37,79}. Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme à intervenir, la répulsion stérique et les forces d'hydratation participent également à la stabilité de la suspension⁷⁹. Cette dernière peut donc tout de même rester stable avec un potentiel inférieur à 30 mV (en valeur absolue).

Un phénomène d'instabilité couramment rencontré pour les liposomes est l'agrégation. La figure 15 illustre ce phénomène. Celui-ci est réversible par agitation ou chauffage de l'échantillon contrairement à la fusion des liposomes. Les liposomes formés à partir de MFGM sont cependant moins sujets à ces phénomènes que ceux formés à partir de phospholipides de soja^{52,54}.

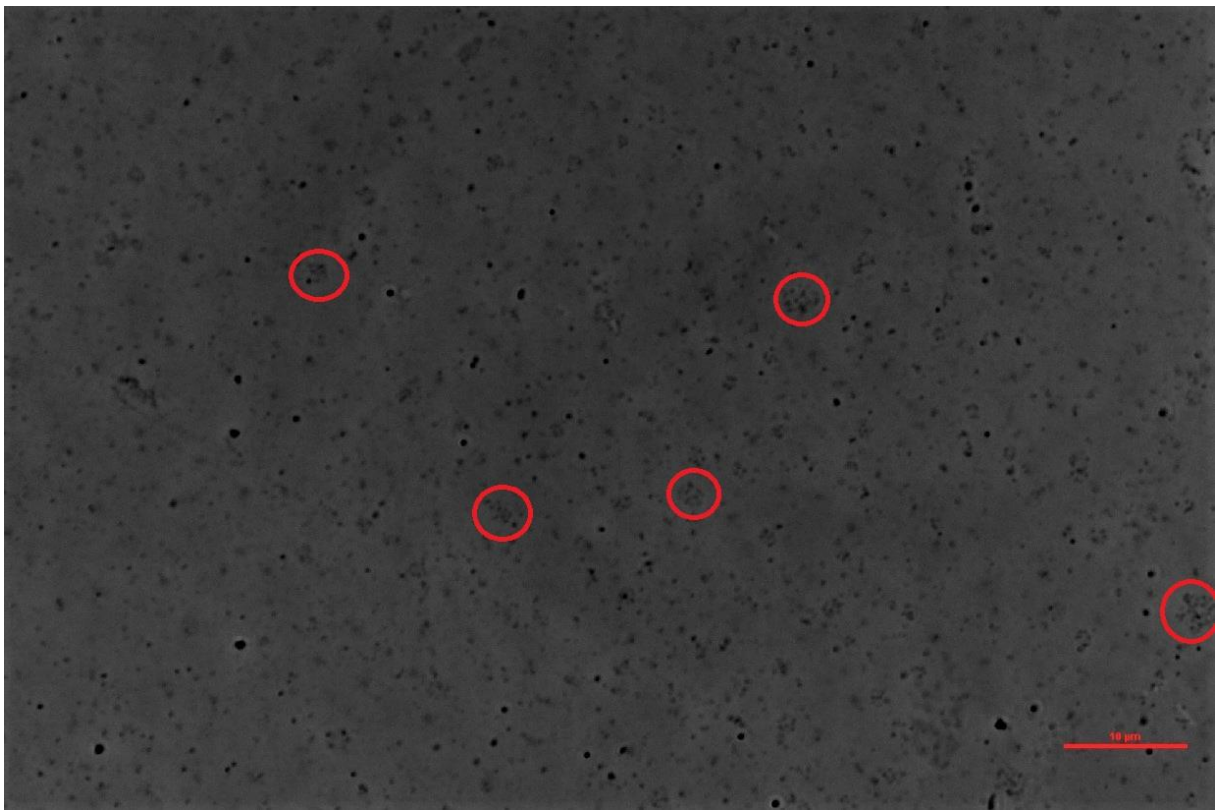


Figure 15. Image de l'échantillon SM2 prise au moyen du microscope Eclipse Ti2 (objectif x100, immersion dans l'huile) illustrant le phénomène d'agrégation des particules.

6. Contribution personnelle

Tout d'abord, l'étudiant s'est informé sur les connaissances actuelles liées au domaine d'étude de ce travail à travers la littérature.

L'étudiant a ensuite mis en place un plan expérimental adapté à la réalisation des objectifs de ce travail et l'a fait évoluer en fonction des besoins, des contraintes matérielles et temporelles ainsi que des résultats collectés.

L'étudiant a sélectionné des méthodes d'analyse des matières premières et des liposomes, ainsi que des méthodes de production de liposomes adaptées aux moyens disponibles parmi celles présentes dans la littérature. Il les a ensuite adaptées aux matières premières utilisées.

Il a caractérisé les matières premières, formé des vésicules par la méthode *thin-film hydration* et la microfluidisation, pour ensuite analyser les caractéristiques physico-chimiques de celles-ci.

Enfin, l'étudiant a traité et interprété les données résultantes de ces analyses.

7. Conclusion et perspectives

Les différents résultats obtenus au cours de ce travail montrent qu'il est possible de former des particules ayant la taille de liposomes à partir de MFGM, de babeurres industriels et des lipides totaux ou polaires de ceux-ci, et cela par la technique *thin-film hydration* et par microfluidisation.

Des particules avec une taille moyenne comprise entre 138,4 et 444,3 nm ont été obtenues par la première méthode et entre 103,5 et 191,9 nm par la seconde méthode. Ces gammes de tailles sont représentatives de ce qui peut être trouvé dans la littérature pour la méthode *thin-film hydration*. Pour la microfluidisation, le meilleur résultat (103,5 nm), comparable avec les tailles moyennes obtenues pour des fractions industrielles enrichies en phospholipides, a été obtenu avec les lipides polaires extraits du babeurre SM3. Bien que légèrement plus grandes, les valeurs obtenues pour les autres fractions ainsi que pour la MFGM et les babeurres bruts pourraient également correspondre à des liposomes formés par microfluidisation^{38,42}. Il apparaît également clairement que la microfluidisation permet d'obtenir des vésicules dont la répartition des tailles moyennes est plus étroite.

Il a été démontré que le procédé, ainsi que la concentration et la composition des lipides utilisés, sont des paramètres clés pour la formation de vésicules par la méthode *thin-film hydration*. Dans le cas de la microfluidisation, l'influence de paramètres tels que la pression, le nombre de passages, la température et le pourcentage de phospholipides dans la matière première a été constatée.

Ensuite, la mesure du potentiel ζ des suspensions formées pourrait indiquer un manque de stabilité physique de celles-ci. En effet, toutes les suspensions formées présentent un potentiel inférieur en valeur absolue à -30 mV, à l'exception de celles formées à partir de la fraction contenant les lipides totaux de la MFGM et du babeurre SM3.

Enfin, un autre point démontré par les résultats de ce travail est l'utilité de la méthode *thin-film hydration* lors des premiers tests réalisés sur une matière première. En effet, son application peut permettre d'éviter l'utilisation de grandes quantités de matière première si la formation de liposomes à partir de celle-ci est impossible. Cependant, les caractéristiques des particules formées par les deux techniques sont différentes et il semblerait difficile d'utiliser la méthode *thin-film hydration* à d'autres fins.

Tous ces résultats prouvent qu'il est possible d'obtenir des particules de taille similaire à la taille de liposomes par la méthode *thin-film hydration* et la microfluidisation à partir de babeurres industriels. Cependant, pour confirmer la nature de ces particules et donc affirmer avec certitude que cette méthode de production est envisageable à partir de matières premières brutes, il est nécessaire de les observer. Cela est possible au moyen de la microscopie électronique dans les gammes de tailles rencontrées. Les microscopies de type TEM, plus particulièrement cryo-TEM et *negative staining TEM*, sont par exemple largement répandues pour cet usage dans la littérature^{1,25,40,52,53,55,61}. Avant d'envisager la suite de ce projet, passer par cette étape semble donc indispensable.

Par la suite, l'impact des différents paramètres de microfluidisation sur la taille des particules devrait être investigué en détail. En effet, au vu du temps imparti pour ce travail, l'impact de

chaque paramètre n'a pas pu être analysé en détail. Les résultats obtenus montrent cependant qu'il pourrait être assez facile de contrôler la taille des liposomes en fonction de la pression appliquée, du nombre de passages et probablement de la température d'entrée de la solution ainsi que de la température de la chambre de microfluidisation. Etudier l'impact de l'ensemble de ces paramètres sur les particules formées serait donc certainement la clé permettant le contrôle de la taille des potentiels liposomes formés. De nombreuses publications l'affirment d'ailleurs pour la formation de liposomes à partir d'autres matières premières.

Un autre point qu'il serait utile d'aborder dans le futur est la stabilité chimique et physique des vésicules formées. Il serait par exemple possible de jouer sur la force ionique et le pH du tampon, ou encore sur l'ajout de composés à la surface des particules pour augmenter la valeur absolue du potentiel ζ et donc la stabilité physique.

Enfin, une fois le procédé de production totalement maîtrisé, l'encapsulation de composés tels que les enzymes et les vitamines pourraient être testée afin d'identifier les applications de ces vésicules dans l'industrie agro-alimentaire.

8. Bibliographie

- (1) Thompson, A. K.; Singh, H. Preparation of Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids Using a Microfluidizer. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89* (2), 410–419. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72105-1).
- (2) Danthine, S.; Blecker, C.; Paquot, M.; Innocente, N.; Deroanne, C. Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Le Lait* **2000**, *80* (2), 209–222. <https://doi.org/10.1051/lait:2000120>.
- (3) Singh, H. The Milk Fat Globule Membrane—A Biophysical System for Food Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, *11* (2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.002>.
- (4) Barry, K. M.; Dinan, T. G.; Kelly, P. M. Preparation and Applications of Milk Polar Lipids/MFGM. In *Dairy Fat Products and Functionality: Fundamental Science and Technology*; Truong, T., Lopez, C., Bhandari, B., Prakash, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 67–90. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41661-4_4.
- (5) Rombaut, R.; Dejonckheere, V.; Dewettinck, K. Microfiltration of Butter Serum Upon Casein Micelle Destabilization. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89* (6), 1915–1925. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72259-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72259-7).
- (6) Sodini, I.; Morin, P.; Olabi, A.; Jiménez-Flores, R. Compositional and Functional Properties of Buttermilk: A Comparison Between Sweet, Sour, and Whey Buttermilk. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89* (2), 525–536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72115-4).
- (7) Le Huërou-Luron, I.; Lemaire, M.; Blat, S. Quels bénéfices santé de la matière grasse laitière et des membranes des globules gras du lait (MFGM) dans les préparations pour nourrissons ? *Cah. Nutr. Diététique* **2019**, *54* (1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2018.10.004>.
- (8) Bodson', P.; Vanderghem', C.; Danthine', S.; Blecker', C.; Paquot, M.; Deroanne, C. La membrane du globule gras du lait (MFGM) : une composition et une structure originale.
- (9) Vanderghem, C.; Francis, F.; Danthine, S.; Deroanne, C.; Paquot, M.; De Pauw, E.; Blecker, C. Study on the Susceptibility of the Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteins to Enzymatic Hydrolysis and Organization of Some of the Proteins. *Int. Dairy J.* **2011**, *21* (5), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.006>.
- (10) Evers, J. M. The Milkfat Globule Membrane—Compositional and Structural Changes Post Secretion by the Mammary Secretory Cell. *Int. Dairy J.* **2004**, *14* (8), 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.005>.
- (11) Vanderghem, C.; Bodson, P.; Danthine, S.; Paquot, M.; Deroanne, C.; Blecker, C. Milk Fat Globule Membrane and Buttermilks: From Composition to Valorization. *BASE* **2010**.
- (12) Dewettinck, K.; Rombaut, R.; Thienpont, N.; Le, T. T.; Messens, K.; Van Camp, J. Nutritional and Technological Aspects of Milk Fat Globule Membrane Material. *Int. Dairy J.* **2008**, *18* (5), 436–457. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>.
- (13) Astaire, J. C.; Ward, R.; German, J. B.; Jiménez-Flores, R. Concentration of Polar MFGM Lipids from Buttermilk by Microfiltration and Supercritical Fluid Extraction. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86* (7), 2297–2307. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73822-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73822-3).
- (14) Mather, I. H. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83* (2), 203–247. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74870-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3).

- (15) Vanderghem, C.; Blecker, C.; Danthine, S.; Deroanne, C.; Haubruge, E.; Guillonéau, F.; De Pauw, E.; Francis, F. Proteome Analysis of the Bovine Milk Fat Globule: Enhancement of Membrane Purification. *Int. Dairy J.* **2008**, *18* (9), 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.003>.
- (16) Fong, B. Y.; Norris, C. S.; MacGibbon, A. K. H. Protein and Lipid Composition of Bovine Milk-Fat-Globule Membrane. *Int. Dairy J.* **2007**, *17* (4), 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.05.004>.
- (17) Bodson, P.; Danthine, S.; Blecker, C.; Lognay, G.; Marlier, M.; Deroanne, C.; Paquot, M. Phospholipid and Sphingolipid Composition of the Milk Fat Globule Membrane (MFGM): Determination by SPE and HPLG-ELSD; 2007.
- (18) Rombaut, R.; Dejonckheere, V.; Dewettinck, K. Filtration of Milk Fat Globule Membrane Fragments from Acid Buttermilk Cheese Whey. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90* (4), 1662–1673. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-587>.
- (19) Fauquant, C.; Briard-Bion, V.; Leconte, N.; Guichardant, M.; Michalski, M.-C. Membrane Phospholipids and Sterols in Microfiltered Milk Fat Globules. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109* (12), 1167–1173. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700119>.
- (21) Rodríguez-Alcalá, L. M.; Fontecha, J. Major Lipid Classes Separation of Buttermilk, and Cows, Goats and Ewes Milk by High Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector Focused on the Phospholipid Fraction. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (18), 3063–3066. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.073>.
- (22) Malik, P.; Danthine, S.; Paul, A.; Dewettinck, K.; Blecker, C. The Interfacial Properties of Various Milk Fat Globule Membrane Components Using Langmuir Isotherms. *Food Biosci.* **2017**, *20*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.008>.
- (23) Truong, T.; Lopez, C.; Bhandari, B.; Prakash, S. *Dairy Fat Products and Functionality: Fundamental Science and Technology*; Springer Nature, 2020.
- (24) Sánchez-Juanes, F.; Alonso, J. M.; Zancada, L.; Hueso, P. Distribution and Fatty Acid Content of Phospholipids from Bovine Milk and Bovine Milk Fat Globule Membranes. *Int. Dairy J.* **2009**, *19* (5), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.006>.
- (25) Thompson, A. K.; Hindmarsh, J. P.; Haisman, D.; Rades, T.; Singh, H. Comparison of the Structure and Properties of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soy Phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (10), 3704–3711. <https://doi.org/10.1021/jf052859b>.
- (26) Reineccius, G. A. Liposomes for Controlled Release in the Food Industry. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1995; Vol. 590, pp 113–131. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590.ch011>.
- (27) Kanno, C.; Kim, D.-H. A Simple Procedure for the Preparation of Bovine Milk Fat Globule Membrane and a Comparison of Its Composition, Enzymatic Activities, and Electrophoretic Properties with Those Prepared by Other Methods. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54* (11), 2845–2854. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870405>.
- (28) FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL> (accessed 2023-06-28).
- (29) Spitsberg, V. L.; Ivanov, L.; Shritz, V. Recovery of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) from Buttermilk: Effect of Ca-Binding Salts. *J. Dairy Res.* **2019**, *86* (3), 374–376. <https://doi.org/10.1017/S002202991900061X>.
- (30) Barry, K. M.; Dinan, T. G.; Kelly, P. M. Selective Enrichment of Dairy Phospholipids in a Buttermilk Substrate through Investigation of Enzymatic Hydrolysis of Milk Proteins in Conjunction with Ultrafiltration. *Int. Dairy J.* **2017**, *68*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.016>.

- (31) Morin, P.; Britten, M.; Jiménez-Flores, R.; Pouliot, Y. Microfiltration of Buttermilk and Washed Cream Buttermilk for Concentration of Milk Fat Globule Membrane Components. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90* (5), 2132–2140. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-832>.
- (32) Costa, M. R.; Elias-Argote, X. E.; Jiménez-Flores, R.; Gigante, M. L. Use of Ultrafiltration and Supercritical Fluid Extraction to Obtain a Whey Buttermilk Powder Enriched in Milk Fat Globule Membrane Phospholipids. *Int. Dairy J.* **2010**, *20* (9), 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.03.006>.
- (33) Konrad, G.; Kleinschmidt, T.; Lorenz, C. Ultrafiltration of Whey Buttermilk to Obtain a Phospholipid Concentrate. *Int. Dairy J.* **2013**, *30* (1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.007>.
- (34) Barry, K. M.; Dinan, T. G.; Kelly, P. M. Pilot Scale Production of a Phospholipid-Enriched Dairy Ingredient by Means of an Optimised Integrated Process Employing Enzymatic Hydrolysis, Ultrafiltration and Super-Critical Fluid Extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *41*, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.004>.
- (35) Holzmüller, W.; Kulozik, U. Isolation of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Material by Coagulation and Diafiltration of Buttermilk. *Int. Dairy J.* **2016**, *63*, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.002>.
- (36) Dalemans, D. Ingrédient Laitier Enrichi En Lipides Polaires et Applications de Celui-Ci. EP1880612A1, January 23, 2008.
- (37) Jin, H.-H.; Lu, Q.; Jiang, J.-G. Curcumin Liposomes Prepared with Milk Fat Globule Membrane Phospholipids and Soybean Lecithin. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99* (3), 1780–1790. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10391>.
- (38) Liu, W.; Ye, A.; Singh, H. Chapter 8 - Progress in Applications of Liposomes in Food Systems. In *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*; Sagis, L. M. C., Ed.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 151–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00025-X>.
- (39) da Silva Malheiros, P.; Daroit, D. J.; Brandelli, A. Food Applications of Liposome-Encapsulated Antimicrobial Peptides. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21* (6), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.003>.
- (40) Thompson, A. K.; Mozafari, M. R.; Singh, H. The Properties of Liposomes Produced from Milk Fat Globule Membrane Material Using Different Techniques. *Le Lait* **2007**, *87* (4–5), 349–360. <https://doi.org/10.1051/lait:2007013>.
- (41) Jash, A.; Ubeyitogullari, A.; H. Rizvi, S. S. Liposomes for Oral Delivery of Protein and Peptide-Based Therapeutics: Challenges, Formulation Strategies, and Advances. *J. Mater. Chem. B* **2021**, *9* (24), 4773–4792. <https://doi.org/10.1039/D1TB00126D>.
- (42) Ajeeshkumar, K. K.; Aneesh, P. A.; Raju, N.; Suseela, M.; Ravishankar, C. N.; Benjakul, S. Advancements in Liposome Technology: Preparation Techniques and Applications in Food, Functional Foods, and Bioactive Delivery: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20* (2), 1280–1306. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725>.
- (43) Briuglia, M.-L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D. A. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5* (3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- (44) Li, Z.; Paulson, A. T.; Gill, T. A. Encapsulation of Bioactive Salmon Protein Hydrolysates with Chitosan-Coated Liposomes. *J. Funct. Foods* **2015**, *19*, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.058>.
- (45) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660–IN10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).

- (46) Mozafari, M. R.; Reed, C. J.; Rostron, C.; Kocum, C.; Piskin, E. Construction of Stable Anionic Liposome-Plasmid Particles Using the Heating Method: A Preliminary Investigation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2002**, *7* (3), 923–927.
- (47) Andra, V. V. S. N. L.; Pammi, S. V. N.; Bhatraju, L. V. K. P.; Ruddaraju, L. K. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *BioNanoScience* **2022**, *12* (1), 274–291. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x>.
- (48) Xiang, B.; Cao, D.-Y. Preparation of Drug Liposomes by Thin-Film Hydration and Homogenization. In *Liposome-Based Drug Delivery Systems*; Lu, W.-L., Qi, X.-R., Eds.; Biomaterial Engineering; Springer: Berlin, Heidelberg, 2021; pp 25–35. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49320-5_2.
- (49) Thompson, A. K.; Couchoud, A.; Singh, H. Comparison of Hydrophobic and Hydrophilic Encapsulation Using Liposomes Prepared from Milk Fat Globule-Derived Phospholipids and Soya Phospholipids. *Dairy Sci. Technol.* **2009**, *89* (1), 99–113. <https://doi.org/10.1051/dst/2008036>.
- (50) Takahashi, M.; Inafuku, K.; Miyagi, T.; Oku, H.; Wada, K.; Imura, T.; Kitamoto, D. Efficient Preparation of Liposomes Encapsulating Food Materials Using Lecithins by a Mechanochemical Method. *J. Oleo Sci.* **2007**, *56* (1), 35–42. <https://doi.org/10.5650/jos.56.35>.
- (51) Jash, A.; Krueger, A.; Rizvi, S. S. H. Venturi-Based Rapid Expansion of Supercritical Solution (Vent-RESS): Synthesis of Liposomes for PH-Triggered Delivery of Hydrophilic and Lipophilic Bioactives. *Green Chem.* **2022**, *24* (13), 5326–5337. <https://doi.org/10.1039/D2GC00877G>.
- (52) Thompson, A. K.; Haisman, D.; Singh, H. Physical Stability of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soya Phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (17), 6390–6397. <https://doi.org/10.1021/jf0605695>.
- (53) Liu, W.; Ye, A.; Liu, C.; Liu, W.; Singh, H. Structure and Integrity of Liposomes Prepared from Milk- or Soybean-Derived Phospholipids during in Vitro Digestion. *Food Res. Int.* **2012**, *48* (2), 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.017>.
- (54) Farhang, B.; Kakuda, Y.; Corredig, M. Encapsulation of Ascorbic Acid in Liposomes Prepared with Milk Fat Globule Membrane-Derived Phospholipids. *Dairy Sci. Technol.* **2012**, *92*. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0072-7>.
- (55) Waninge, R.; Nylander, T.; Paulsson, M.; Bergenstahl, B. Milk Membrane Lipid Vesicle Structures Studied with Cryo-TEM. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2003**, *31* (1), 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00145-0).
- (56) Kosmerl, E.; García-Cano, I.; Rocha-Mendoza, D.; Jiménez-Flores, R. Characterization of Milk and Soy Phospholipid Liposomes and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes. *JDS Commun.* **2021**, *2* (5), 238–242. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0054>.
- (57) Liu, W.; Ye, A.; Liu, W.; Liu, C.; Singh, H. Stability during in Vitro Digestion of Lactoferrin-Loaded Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane-Derived Phospholipids. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96* (4), 2061–2070. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6072>.
- (58) Jash, A.; Ubeyitogullari, A.; H. Rizvi, S. S. Synthesis of Multivitamin-Loaded Heat Stable Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids by Using a Supercritical-CO₂ Based System. *Green Chem.* **2020**, *22* (16), 5345–5356. <https://doi.org/10.1039/D0GC01674H>.
- (59) Subramani, T.; Ganapathyswamy, H. An Overview of Liposomal Nano-Encapsulation Techniques and Its Applications in Food and Nutraceutical. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57* (10), 3545–3555. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04360-2>.

- (60) *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 1st ed.; Lakkis, J. M., Ed.; Wiley, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781118946893>.
- (61) Li, R.; Deng, L.; Cai, Z.; Zhang, S.; Wang, K.; Li, L.; Ding, S.; Zhou, C. Liposomes Coated with Thiolated Chitosan as Drug Carriers of Curcumin. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.136>.
- (62) Eggers, L. F.; Schwudke, D. Liquid Extraction: Folch. In *Encyclopedia of Lipidomics*; Wenk, M. R., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2016; pp 1–6. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_89-1.
- (63) Kuzdal-Savoie. *Tech. Laitière* **22**, 7–10.
- (64) 14:00-17:00. *ISO 6491:1998*. ISO. <https://www.iso.org/standard/12864.html> (accessed 2023-08-10).
- (65) Meng, X.; Ye, Q.; Pan, Q.; Ding, Y.; Wei, M.; Liu, Y.; van de Voort, F. R. Total Phospholipids in Edible Oils by In-Vial Solvent Extraction Coupled with FTIR Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (14), 3101–3107. <https://doi.org/10.1021/jf404880v>.
- (66) *ISO 14891:2002(en), Milk and milk products — Determination of nitrogen content — Routine method using combustion according to the Dumas principle*. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:14891:ed-1:v1:en> (accessed 2023-07-06).
- (67) Fauconnier, M.-L.; Blecker, C.; Groyne, J.; Razafindralambo, H.; Vanzeveren, E.; Marlier, M.; Paquot, M. Characterization of Two Acacia Gums and Their Fractions Using a Langmuir Film Balance. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (7), 2709–2712. <https://doi.org/10.1021/jf990749x>.
- (68) Wiking, L.; Nielsen, J. H.; Båvius, A.-K.; Edvardsson, A.; Svennersten-Sjaunja, K. Impact of Milking Frequencies on the Level of Free Fatty Acids in Milk, Fat Globule Size, and Fatty Acid Composition. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89* (3), 1004–1009. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72166-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72166-X).
- (69) Danthine, S.; Blecker, C. Interactions of Lipases with Milk Fat Globule Membrane Monolayers Using a Langmuir Film Balance. *Int. Dairy J.* **2014**, *35* (1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.013>.
- (70) Varona, S.; Martín, Á.; Cocero, M. J. Liposomal Incorporation of Lavandin Essential Oil by a Thin-Film Hydration Method and by Particles from Gas-Saturated Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (4), 2088–2097. <https://doi.org/10.1021/ie102016r>.
- (71) Vermette, P.; Taylor, S.; Dunstan, D.; Meagher, L. Control over PEGylated-Liposome Aggregation by NeutrAvidin–Biotin Interactions Investigated by Photon Correlation Spectroscopy. *Langmuir* **2002**, *18* (2), 505–511. <https://doi.org/10.1021/la0109967>.
- (72) Marie, N. K.; Habeeb, A. D. Preparation and Evaluation of Salbutamol Liposomal Suspension Using Chloroform Film Method.
- (73) Porfire, A.; Tomuta, I.; Muntean, D.; Luca, L.; Licarete, E.; Alupe, M. C.; Achim, M.; Vlase, L.; Banciu, M. Optimizing Long-Circulating Liposomes for Delivery of Simvastatin to C26 Colon Carcinoma Cells. *J. Liposome Res.* **2015**, *25* (4), 261–269. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.987787>.
- (74) Umbarkar, M.; Thakare, S.; Surushe, T.; Giri, A.; Chopade, V. Formulation and Evaluation of Liposome by Thin Film Hydration Method. *J. Drug Deliv. Ther.* **2021**, *11* (1), 72–76. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i1.4677>.
- (75) Zeisig, R.; Caemmerer, B. Liposomes in the Food Industry; Vilstrup, P., Ed.; Leatherhead Publishing: Surrey, 2001; pp 101–119.
- (76) Thompson, A. K. Structure and Properties of Liposomes Prepared from Milk Phospholipids. **2005**.
- (77) Jash, A.; Rizvi, S. S. H. Heat-Stable Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids for PH-Triggered Delivery of Hydrophilic and Lipophilic Bioactives.

- Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2022**, 79, 103030.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103030>.
- (78) Lu, N.; Wang, J.; Chen, Z.; Zhang, X.; Chen, C.; Wang, S. The Effect of Adding Phospholipids before Homogenization on the Properties of Milk Fat Globules. *LWT* **2021**, 146, 111659. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111659>.
- (79) Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Benoit, J.-P. Physico-Chemical Stability of Colloidal Lipid Particles. *Biomaterials* **2003**, 24 (23), 4283–4300. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4).