



COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE  
GEMBLoux AGRO-BIO TECH

# **CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROPRIETES TENSIOACTIVES ET MEMBRANAIRES D'ESTERS DERIVES DE LA GLYCINE BETAINE**

NSIMBA ZAKANDA Francis

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences  
agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Dr. DELEU Magali et Prof. MVUMBI LELO Georges

2012

**Copyright.** *Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc en violation de la dite loi.*

NSIMBA ZAKANDA Francis (2012). Contribution à l'étude des propriétés tensioactives et membranaires d'esters dérivés de la glycine bétaïne. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. 179 p., 10 tabl., 45 fig.

**Résumé :** L'objectif de cette recherche doctorale est de contribuer à l'étude de propriétés tensioactives et membranaires d'esters dérivés de la glycine bétaïne. Dans ce contexte, des esters de la glycine bétaïne (des chlorures d'alkylbétaïne :  $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) ont été obtenus en utilisant une nouvelle méthodologie de synthèse. La glycine bétaïne (activée par le chlorure de thionyle) et les alcools gras primaires ont été utilisés comme matières premières de base pour la synthèse par voie chimique des  $C_nBC$ . Quelques paramètres d'optimisation de la synthèse ont été étudiés, tels que la nature du solvant organique, la température, le rapport molaire de réactants et la concentration de ces derniers dans le milieu réactionnel. Ensuite, les propriétés tensioactives et membranaires des  $C_nBC$  ont été caractérisées en utilisant quelques techniques instrumentales telles que la Balance à film de Langmuir, la Calorimétrie de Titration Isotherme, la Spectrométrie de fluorescence et les mesures du potentiel zêta et de la taille des particules.

Le chlorure d'hexadécylbétaïne ( $C_{16}BC$ ) a été synthétisé avec un meilleur rendement dans les conditions suivantes : absence de catalyseur/base, un solvant de polarité moyenne (le méthyl-2-butanol-2), une température de 45°C, un rapport molaire dichlorure de bétaïne/1-hexadécanol de 3/1 et une concentration en réactants de 0,132 mol/L. Le chlorure de décylbétaïne ( $C_{10}BC$ ), le chlorure de dodécylbétaïne ( $C_{12}BC$ ) et le chlorure de tétradécylbétaïne ( $C_{14}BC$ ) ont été obtenus en utilisant les conditions optimales de synthèse de  $C_{16}BC$ .

Concernant l'organisation interfaciale des  $C_nBC$ , le  $C_{10}BC$  et le  $C_{12}BC$  n'ont pas formé de monocouches insolubles à l'interface air-eau à 20°C comparativement à leurs homologues, le  $C_{14}BC$  et le  $C_{16}BC$ . L'étude de la monocouche de  $C_{16}BC$  dans les conditions variées de la sous-phase aqueuse a montré que le pH et les anions monovalents ( $OH^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ) n'ont pas influencé le comportement de la monocouche comparativement à celle dans l'eau avec le  $Cl^-$  comme contre-ion tandis que la température au-delà de 25°C, les anions divalents ( $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ) ainsi que la force ionique du sulfate de sodium ( $Na_2SO_4$ ) l'ont influencé en ce qui concerne l'aire d'occupation des molécules à l'interface.

Les interactions entre les  $C_nBC$  et les membranes modèles ont montré que dans l'eau, les  $C_nBC$ , indépendamment de la longueur de la chaîne alkyle, ont fortement pénétré dans les monocouches formées de lipides chargés négativement (dipalmitoylphosphatidylsérine et acide dipalmitoylphosphatidique) tandis que leur pénétration a été moyenne et faible dans les monocouches formées de lipides avec tête polaire petite (dipalmitoylphosphatidyléthanolamine et cholestérol, CHOL) et de lipide avec tête polaire volumineuse (palmitoyloleoylphosphatidylcholine, POPC), respectivement. Dans le tampon salin, l'adsorption de  $C_{16}BC$  à l'interface air-eau et sur les surfaces des monocouches lipidiques a été instantanée, et dans tous les cas, son pouvoir pénétrant a été au dessus de la pression présumée des membranes biologiques. Le  $C_{16}BC$  a formé des mélanges miscibles et stables avec le POPC et la sphingomyéline tandis qu'un comportement presque idéal a été observé pour ses mélanges avec le CHOL. Une affinité du  $C_{16}BC$  pour la membrane bicouche contenant le CHOL a été également observée. L'adsorption des  $C_nBC$  sur les surfaces des bicouches a été fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Le  $C_{10}BC$ , le  $C_{14}BC$  et le  $C_{16}BC$  n'ont pas significativement perturbé les membranes même à des concentrations élevées en TA comparativement au  $C_{12}BC$  qui les a fortement perturbées sans pour autant les solubiliser. Dans tous les cas, des particules de charge positive et de taille supérieure à celle des membranes bicouches préparées ont été formées en présence de quantités élevées des  $C_nBC$ .

NSIMBA ZAKANDA Francis (2012). Contribution to the study of surface-active and membrane properties of esters derived from Glycine betaine. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech. 179 p., 10 tabl., 45 fig.

**Abstract:** The objective of this doctoral research is to contribute to the study of surface active and membrane properties of esters derived from glycine betaine. In this context, esters of glycine betaine (alkylbétainate chlorides:  $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) were obtained using a new synthetic methodology. Glycine betaine (activated by thionyl chloride) and the primary fatty alcohols were used as basic raw materials for the chemical synthesis of  $C_nBC$ . Some parameters to optimize the synthesis were studied, such as the nature of the organic solvent, the temperature, the molar ratio of reactants and the concentration of the latter in the reaction medium. Next, the surface active and membrane properties of  $C_nBC$  were characterized using several instrumental techniques such as Langmuir film balance, isothermal titration calorimetry, fluorescence spectrometry and zeta potential and particle size measurements.

Hexadécylbétainate chloride ( $C_{16}BC$ ) was synthesized with better performance under the following conditions: absence of a catalyst/base, a solvent of medium polarity (2-methyl-2-butanol), a temperature of 45°C, a molar ratio of betainyl chloride/1-hexadecanol of 3/1 and a concentration of reactants of 0.132 mol/L. Decylbetainate chloride ( $C_{10}BC$ ) dodecylbetainate chloride ( $C_{12}BC$ ) and tetradecylbetainate chloride ( $C_{14}BC$ ) were obtained using the optimal conditions for the synthesis of  $C_{16}BC$ .

Concerning the interfacial organization of  $C_nBC$ ,  $C_{10}BC$  and  $C_{12}BC$  did not form insoluble monolayers at the air-water at 20°C compared to their counterparts,  $C_{14}BC$  and  $C_{16}BC$ . The study of the monolayer of  $C_{16}BC$  in various conditions of the aqueous subphase showed that the pH and monovalent anions ( $OH^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ) did not influence the behavior of the monolayer compared to that in water with  $Cl^-$  as counterion while the temperature beyond 25°C, the divalent anions ( $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ) and the ionic strength of sodium sulfate ( $Na_2SO_4$ ) affected it in term of interfacial area occupation of the molecules.

Interactions between  $C_nBC$  and model membranes have shown that in water,  $C_nBC$ , regardless of the length of the alkyl chain, have highly penetrated into the negatively charged lipid monolayers (dipalmitoylphosphatidylserine and dipalmitoylphosphatidic acid), whereas their penetration was average and low into monolayers formed by lipids with small polar head (dipalmitoylphosphatidylethanolamine and cholesterol, CHOL) and lipid with large polar head (palmitoyloleoylphosphatidylcholine, POPC), respectively. In salted buffer, the adsorption of  $C_{16}BC$  at the air-water interface and onto the surfaces of the lipid monolayers was instantaneous, and in all cases, the penetrating power was above the presumed pressure of biological membranes.  $C_{16}BC$  formed miscible and stable mixtures with POPC and sphingomyelin while an almost ideal behavior was observed for its mixtures with CHOL. An affinity of  $C_{16}BC$  for the membrane bilayer containing CHOL was also observed. The adsorption of  $C_nBC$  onto the surfaces of bilayers was alkyl chain-dependent.  $C_{10}BC$ ,  $C_{14}BC$  and  $C_{16}BC$  did not significantly perturb membranes even at high surfactant concentrations compared to  $C_{12}BC$  that has highly perturbed membranes without solubilizing them. In all cases, particles of positive charge and larger than those of membrane bilayers prepared were formed in the presence of high amounts of  $C_nBC$ .

## **Dédicaces**

*A mon défunt père NSIMBA ZAKANDA François*

*A ma mère KIYOKI LUBANZU Henriette*

*A mon épouse NSIMBA DILANDUA Bébé*

*A nos enfants MAWETE ZAKANDA Franklin, LEMA ZAKANDA Firmin, NDIMBANI ZAKANDA Franceline et DILANDUA ZAKANDA Francette.*

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de thèse, il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté aide et conseils pour sa réalisation. Je remercie en particulier :

La Coopération Technique Belge (CTB) pour m'avoir accordé la bourse de doctorat.

Monsieur le Professeur PAQUOT Michel (chef de l'Unité de Chimie Biologique Industrielle et membre permanent de mon comité de thèse) pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Sa disponibilité, ses critiques et ses conseils (d'attaquer et non de défendre) m'ont beaucoup aidé dans l'avancement de mes travaux de recherche ;

Madame le Docteur DELEU Magali (chercheur qualifié FNRS à l'Unité de Chimie Biologique Industrielle et promoteur de cette thèse). J'aimerais bien lui exprimer ma profonde reconnaissance pour son enthousiasme, sa disponibilité. Sa rigueur et son apport scientifiques lors de nos nombreuses discussions, parfois houleuses, m'ont permis d'acquérir des connaissances dans le domaine de la physico-chimie des interfaces et de réaliser des recherches ciblées ;

Monsieur le Professeur MVUMBI LELO Georges (de la Faculté de Médecine de l'Université de Kinshasa/R.D. Congo et co-promoteur de cette thèse) pour ses conseils et ses encouragements ;

Messieurs les Professeurs WATHELET Jean-Paul, WATHELET Bernard et BLECKER Christophe, membres de mon comité de thèse, qui m'ont accompagné et m'ont soutenu tant soit peu tout au long de ce parcours ;

Mesdames le Professeur BOUQUILLON Sandrine (Université de Reims/France) et le Docteur LINS Laurence (Centre de Biophysique moléculaire/Gembloux Agro-Bio Tech/Université de Liège) pour avoir accepté d'être rapporteuses de cette thèse et pour les remarques et critiques constructives qu'elles ont émises dans leurs rapports. Je remercie cette dernière également pour sa contribution scientifique pour les travaux de recherche réalisés ensemble.

Tous mes remerciements s'adressent également aux membres du personnel (chercheurs et techniciens) des Unités de Chimie Biologique Industrielle, de Chimie Générale et Organique et de Technologie des Industries Agroalimentaires, nombreux pour les citer nommément, qui m'ont permis de réaliser ce travail dans une ambiance excellente.

Je pense aussi à ma collègue de promotion, COMBO Agnan Marie Michel, pour des années passées ensemble pour l'honneur de la science. Je lui souhaite une fin heureuse de ses travaux dans les prochains mois.

## LEXIQUE

<b>A</b>	molecular area
<b>Å</b>	Ångström
<b>A<sub>0</sub></b>	limiting area
<b>A<sub>12</sub></b>	mean molecular area
<b>A<sub>c</sub></b>	molecular area at the collapse
<b>AG1-X8</b>	analytical grade anion exchange resin
<b>ADN</b>	Acide desoxyribonucléique
<b>ADHN</b>	apparent dynamic hydration number
<b>ARC</b>	Action de Recherche Concertée
<b>BFL</b>	Balance à Film de Langmuir
<b>BHMT</b>	Bétaïne homocystéine méthyltransférase
<b>Br<sup>-</sup></b>	anion bromure
<b>BrCH<sub>2</sub>COBr</b>	bromure de bromoacétyle
<b>BTC</b>	Belgium Technical Cooperation
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>C<sub>s</sub><sup>-1</sup></b>	compressibility modulus
<b>C<sup>sat</sup></b>	concentration de saturation
<b>C<sup>sol</sup></b>	concentration de solubilisation
<b>CAPB</b>	cocamidopropylbétaïne
<b>C<sub>10</sub>BC</b>	chlorure de décylbétaïne
<b>C<sub>12</sub>BC</b>	chlorure de dodécylbétaïne
<b>C<sub>14</sub>BC</b>	chlorure de tétradécylbétaïne
<b>C<sub>16</sub>BC</b>	chlorure d'hexadécylbétaïne
<b>C<sub>14</sub>TAB</b>	tetradécyltriméthylammonium bromide
<b>C<sub>16</sub>TAB</b>	hexadécyltriméthylammonium bromide
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	chlorure de méthylène
<b>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N</b>	triéthylamine
<b>C<sub>12</sub>Be</b>	dodécylbétaïne
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	deuteriométhanol
<b>CESIO</b>	European Committee of Organic Surfactants and their Intermediates
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	trichlorométhane
<b>CH<sub>3</sub>I</b>	iodure de méthyle
<b>CHOL</b>	cholesterol
<b>Cl<sup>-</sup></b>	anion chlorure
<b>ClCH<sub>2</sub>COCl</b>	chlorure de chloroacétyle
<b>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	anion perchlorate
<b>cm</b>	centimètre
<b>CMC</b>	concentration micellaire critique
<b>CME</b>	cocomonoéthanolamide
<b>C<sub>n</sub>B<sup>+</sup></b>	cation alkylbétaïne
<b>C<sub>n</sub>BC</b>	chlorure d'alkylbétaïne
<b>C<sub>n</sub>TAB</b>	alkyltriméthylammonium bromide
<b>CPC</b>	cetylpyridinium chloride
<b>COCl<sub>2</sub></b>	chlorure d'oxalyle
<b>COSY</b>	correlation spectroscopy
<b>Cu(OAc)<sub>2</sub></b>	acétate de cuivre
<b>DIC</b>	diisopropylcarbodiimide
<b>DLS</b>	Dynamic Light Scattering

<b>DMF</b>	dimethylsulfoxide
<b>DMAP</b>	diméthylaminopyridine
<b>DMPC</b>	dimyristoylphosphatidylcholine
<b>DMPE</b>	dimyristoylphosphatidylethanolamine
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxide
<b>DPPA</b>	dipalmitoylphosphatidic acid
<b>DPPE</b>	dipalmitoylphosphatidylethanolamine
<b>DPPS</b>	dipalmitoylphosphatidylserine
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>DPX</b>	p-xylene-bis-pyridinium bromide
<b>e.g.</b>	par exemple
<b>ELSD</b>	Evaporating Light Scattering Detector
<b>FNRS</b>	Fonds National de la Recherche Scientifique
<b>g</b>	gramme ou accélération de la pesanteur
<b>G</b>	énergie libre du mélange ou gaseous state
<b>G<sup>M</sup></b>	énergie totale du mélange
<b>h</b>	heure
<b>H</b>	enthalpie ou hydrogène
<b>H<sub>2</sub></b>	hydrogène moléculaire
<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>HCl</b>	acide chlorhydrique
<b>HLB</b>	hydrophilic lipophilic balance
<b>HMBC</b>	heteronuclear multiple-bond correlation
<b>H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub></b>	hydrazine
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatography
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	anion monohydrogenophosphate
<b>HPTS</b>	8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic
<b>HSQC</b>	heteronuclear single-quantum correlation
<b>i.e</b>	id est (c'est-à-dire)
<b>IR</b>	infra red
<b>ITC</b>	Isothermal Titration Calorimetry
<b>K</b>	constante d'affinité
<b>°K</b>	degré Kelvin
<b>KBr</b>	bromure de potassium
<b>L</b>	litre
<b>LC</b>	liquid-condensed state
<b>LC<sub>50</sub></b>	lethal concentration
<b>LE</b>	liquid-expanded state
<b>LUV</b>	Large unilamellar vesicle
<b>MeOH</b>	méthanol
<b>mg</b>	milligramme
<b>MHz</b>	mégahertz (10 <sup>6</sup> Hz)
<b>min</b>	minute
<b>mL</b>	millilitre
<b>mM</b>	millimolaire
<b>mN</b>	millinewton
<b>MS</b>	mass spectrometry
<b>MsCl</b>	methanesulfonyl chloride
<b>MLV</b>	multilamellar vesicle
<b>mV</b>	millivolt

<b>MΩ</b>	mégohm ( $10^6$ ohms)
<b>2M2B</b>	2-methyl-2-butanol
<b>NaCl</b>	chlorure de sodium
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	phosphate de sodium dibasique
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	phosphate de sodium monobasique
<b>NaN<sub>3</sub></b>	azoture de sodium
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	sulfate de sodium
<b>NMR</b>	nuclear magnetic resonance
<b>NNLS</b>	Non-negative least squares
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	anion nitrate
<b>OH<sup>-</sup></b>	anion hydroxyde
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline
<b>PCl<sub>3</sub></b>	trichlorure de phosphore
<b>PCl<sub>5</sub></b>	pentachlorure de phosphore
<b>pH</b>	potentiel d'hydrogène
<b>P.I.</b>	Polydispersity Index
<b>pKa</b>	constante d'acidité
<b>POCl<sub>3</sub></b>	trichlorure de phosphoryle
<b>POPG</b>	palmitoyloleoylphosphatidylglycerol
<b>POPC</b>	palmitoyloleoylphosphatidylcholine
<b>PSC</b>	palmitoyloleoylphosphatidylcholine/sphingomyelin/cholesterol
<b>Pt</b>	platine
<b>Pyr</b>	pyridine
<b>R</b>	constante universelle des gaz parfaits
<b>RCOCl</b>	chlorure d'alkyle
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>rpm</b>	révolution par minute
<b>S</b>	entropie
<b>SDS</b>	dodécyl sulfate de sodium
<b>SLES</b>	lauroyléthylsulfate de sodium
<b>SM</b>	sphingomyelin
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	anion sulfate
<b>SOCl<sub>2</sub></b>	chlorure de thionyle
<b>TA</b>	tensioactif
<b>T° amb</b>	température ambiante
<b>TEA</b>	triéthylamine
<b>THF</b>	tetrahydrofurane
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>v</b>	volume
<b>z</b>	charge
<b>Δ</b>	delta (variation)
<b>λ</b>	longueur d'onde
<b>Π</b>	surface pressure
<b>Π<sub>c</sub></b>	surface pressure at the collapse
<b>Π<sub>e</sub></b>	exclusion pressure
<b>%</b>	pourcent
<b>ζ</b>	zeta potential

# TABLE DES MATIERES

<b>I. Introduction générale et objectifs.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Résumé de la bibliographie.....</b>	<b>8</b>
<b>Publication I : Les dérivés tensioactifs de la glycine bétaïne : méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation.....</b>	<b>8</b>
Résumé.....	10
1. Introduction.....	12
2. Méthodes de synthèse par voie chimique des dérivés tensioactifs de la glycine bétaïne.....	15
2.1. Synthèse des alkylbétaïnes.....	15
2.2. Synthèse des alkylbétaïnates.....	16
2.2.1. Activation des acides organiques.....	16
2.2.2. Activation des alcools.....	17
2.3. Synthèse de bétaïnite d'amidon.....	18
2.4. Synthèse de N-bétaïnite de chitosan.....	19
2.5. Synthèse de N-bétaïnylamino-3-dialkyloylglycérol.....	20
2.6. Synthèse de dodécyl bétaïnite dimère ou gemini.....	21
2.7. Synthèse d'amphiphiles bipolaires avec une tête de glycine bétaïne.....	21
3. Potentialités des dérivés tensioactifs de la glycine bétaïne.....	22
3.1. Potentialités des alkylbétaïnes et des alkylamido bétaïnes.....	22
3.2. Potentialités des bétaïnates.....	25
3.3. Potentialités des tensioactifs geminis.....	25
3.4. Potentialités des amphiphiles bipolaires (bolaamphiphiles, bolaformes).....	26
4. Conclusion.....	26
5. Bibliographie.....	28
<b>III. Synthèse et étude des propriétés interfaciales d'esters tensioactifs dérivés de la glycine bétaïne (les chlorures d'alkylbétaïnite).....</b>	<b>32</b>
<b>Publication II: Alkylbetainate chloride: Synthesis and behavior of monolayers at the air-water interface.....</b>	<b>32</b>
Objectif et stratégie expérimentale.....	33
Principaux résultats.....	34
Abstract.....	36
1. Introduction.....	37
2. Materials and methods.....	39
2.1. Materials.....	39
2.2. Methods.....	39
2.2.1. Synthesis of betainyl chloride.....	39
2.2.2. Synthesis of hexadecylbetainate chloride (C <sub>16</sub> BC).....	39
2.2.3. Chemical characterization.....	40
2.2.4. Π-A isotherm.....	41
3. Results and discussion.....	41

3.1. Synthesis.....	41
3.2. Chemical characterization.....	43
3.3. Interfacial properties of cationic alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) at the air–water interface.....	46
3.4. Influence of experimental conditions on the interfacial behavior of the $C_{16}BC$ monolayer.....	49
3.4.1. Influence of pH.....	49
3.4.2. Influence of temperature.....	51
3.4.3. Influence of anions.....	52
3.4.4. Influence of ionic strength.....	50
4. Conclusion.....	55
5. References.....	57

#### **IV. Pénétration des chlorures d'alkylbétainate dans les monocouches lipidiques formées à l'interface air-eau.....62**

**Publication III :** Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers at the air-water interface.....62

Objectif et stratégie expérimentale.....	63
Principaux résultats.....	64
Abstract.....	66
1. Introduction.....	67
2. Materials and methods.....	69
2.1. Materials.....	69
2.2. Penetration experiments.....	69
3. Results.....	70
3.1. Alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) adsorption at the air-water interface.....	70
3.2. Hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) penetration into lipid monolayers: Effect of different lipid polar heads.....	71
3.3. Alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) interaction with lipid monolayers: Effect of the betainate alkyl-chain length.....	73
4. Discussion.....	74
5. Conclusion.....	76
6. References.....	78

#### **V. Etude des interactions entre le chlorure d'hexadecylbétainate ( $C_{16}BC$ ) et les lipides.82**

**Publication IV:** Interaction of hexadecylbetainate chloride with biological relevant lipids...82

Objectif et stratégie expérimentale.....	83
Principaux résultats.....	84
Abstract.....	86
1. Introduction.....	87
2. Experimental.....	88
2.1. Materials.....	88
2.2. Methods.....	89
2.2.1. Preparation of lipid vesicles.....	89
2.2.2. Isothermal Titration Calorimetry.....	90

2.2.3.	Determination of the binding thermodynamic parameters of the binding of C <sub>16</sub> BC to the lipid bilayers.....	90
2.2.4.	Size measurements of lipid vesicles.....	91
2.2.5.	Langmuir trough technique.....	91
2.2.6.	Molecular modeling of C <sub>16</sub> BC/lipid interaction.....	92
3.	Results.....	92
3.1.	Thermodynamic analysis of the binding of C <sub>16</sub> BC to lipid vesicles.....	92
3.2.	C <sub>16</sub> BC penetration into pure lipid monolayers.....	96
3.3.	Interfacial properties of spread C <sub>16</sub> BC/lipid monolayers upon compression.....	98
3.4.	Molecular modeling.....	104
4.	General discussion and conclusion.....	106
5.	References.....	110

## **VI. Effet d'adsorption de quantites croissantes des chlorures d'alkylbétainate sur l'intégrité des vésicules lipidiques.....115**

**Publication V** : Integrity of lipid vesicles in presence of alkylbetainate chloride surfactants : Spectrofluorimetric, Isothermal Titration Calorimetry and Zeta potential studies..... 115

Objectif et stratégie expérimentale.....	116	
Principaux résultats.....	117	
Abstract.....	119	
1.	Introduction.....	120
2.	Materials and methods.....	121
2.1.	Materials.....	121
2.2.	Methods.....	122
2.2.1.	Preparation of lipid vesicles containing the complex HPTS-DPX.....	122
2.2.2.	Leakage experiments.....	122
2.2.3.	Isothermal Titration Calorimetry.....	123
2.2.4.	Size and zeta (ζ)-potential measurements of lipid vesicles.....	123
3.	Results.....	124
3.1.	Leakage of lipid vesicles.....	124
3.2.	ITC experiments.....	125
3.2.1.	Critical micellar concentration.....	125
3.2.2.	Membrane destabilization studies.....	128
3.3.	Sizes and zeta potential of lipid vesicles.....	131
4.	Discussion.....	134
5.	Conclusion.....	139
6.	References.....	141

## **VII. Discussion générale.....148**

## **VIII. Conclusion générale et perspectives.....159**

## **IX. Références bibliographiques.....166**

## **Productions scientifiques.....179**

## **I. Introduction générale et objectifs**

Le présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la transformation de la glycine bêtaïne en vue de lui conférer des propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes pour les domaines utilisant des agents tensioactifs.

La glycine bêtaïne (N,N,N-triméthylglycine, GB) (Figure 1), appelée aussi bêtaïne, est constituée par un ammonium quaternaire lié à une fonction acide carboxylique. Elle a été trouvée dans les tissus des plantes de la famille de *Chenopodiaceae*, *Compositae* et *Poaceae*, poussant dans leur habitat naturel dans des conditions salines (Lather *et al.*, 1996). Celle commercialement disponible est issue de sous-produits de l'industrie de la betterave à sucre (Lever *et al.*, 2010), la principale source de la GB. En effet, la GB est considérée comme polluant principal de la mélasse (Yamada *et al.*, 2009 ; Cibis *et al.*, 2011) où elle est présente à une concentration d'environ 7% (w/w) (Giacobello *et al.*, 2000 ; Hayes *et al.*, 2003 ; Catusse *et al.* ; 2008). Celle-ci peut donc constituer une ressource importante en bêtaïne.

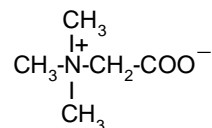


Figure 1. Structure de la glycine bêtaïne (GB)

Entre 2009 et 2010, la production mondiale du sucre est estimée à 160 millions de tonnes, avec environ 13,96 millions de tonnes pour l'Union Européenne (EU) ([http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/2010/table\\_en/2010enfinal2.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/2010/table_en/2010enfinal2.pdf)). Approximativement 1/5 de la production mondiale du sucre provient des betteraves sucrières (Manderscheid, 2010). L'industrie de transformation de cette denrée consacre une attention croissante aux problèmes de l'environnement liés à la consommation d'énergie et à la production de grandes quantités de déchets, telles que la pulpe et la mélasse (Alkaya *et al.*, 2011, Vaccari *et al.*, 2005). Cette dernière est constituée d'eau, de saccharose (47-50%), de protéines, de vitamines, d'acides aminés... (Roukas, 1998) et est utilisée pour la production industrielle de l'éthanol, d'acides aminés, de la levure de boulangerie, comme additif dans l'industrie de l'alimentation animale, comme fertilisant...(Ergum *et al.*, 2000; Togrul *et al.*, 2004 ; Sopade *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009).

L'industrie de l'alcool utilise la mélasse pour produire du bioéthanol. Un total de 74 milliards de litres du bioéthanol, dont 3,7 milliards de litres pour l'UE, a été produit dans le monde en

2009 (<http://www.biofuels-platform.ch/infos/eu-bioethanol.php>). L'alcool obtenu est extrait du bouillon de fermentation, généralement par distillation. Cette opération laisse un sous produit connu sous le nom de vinasse dont la quantité peut être jusqu'à 10 fois supérieure à celle du bioéthanol produit et contient jusqu'à 4% de bétaine. La vinasse est extrêmement acide (pH = 4-5) et a une forte teneur en matières organiques dont la fermentation est responsable des odeurs désagréables. Elle pose ainsi des problèmes environnementaux considérables (Garcia *et al.*, 1997 ; Jiménez *et al.*, 2005 ; Morin Couallier *et al.*, 2006 ; Escudero *et al.*, 2011). Sa valorisation pour la production de la GB est une façon de limiter son impact sur l'environnement.

La GB protège les végétaux, les poissons, les volailles contre le stress osmotique, le taux élevé de sel et la température (Flowers *et al.*, 2007 ; Farooq *et al.*, 2008 ; Patade *et al.*, 2008). Chez les humains, la GB peut être facilement absorbée par l'apport alimentaire ou est endogène et est alors synthétisée par l'organisme par le catabolisme de la choline dans le foie. Elle est accumulée par les cellules endothéliales artérielles en réponse aux changements osmotiques (Petronini *et al.*, 2000 ; Alfieri *et al.*, 2002 ; Alfieri *et al.*, 2004). Sa concentration circulante est beaucoup plus faible que celle contenue dans les tissus. Son excrétion urinaire est normalement minimale (5%) comparativement à la concentration résorbée (Lever *et al.*, 1994 ; Lever *et al.*, 2004). La perte de la GB peut être pathogène et provoque une augmentation de l'homocystéine (Lever *et al.*, 2007), un acide aminé sulfuré non protéique et responsable de nombreux risques pathogènes. Son métabolisme a suscité un intérêt considérable ces dernières années. Cela découle de l'observation que l'augmentation de la concentration plasmatique de l'homocystéine chez les humains est corrélée avec un risque accru de maladies vasculaires coronaires, cérébrales et périphériques (Slow *et al.*, 2004). En médecine humaine, la GB intervient dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies, notamment les maladies rénales, cardio-vasculaires, hépatiques, cancéreuses,... (Lin *et al.*, 1997 ; Schwab *et al.*, 2002 ; Hayes *et al.*, 2003 ; Dalmeijer *et al.*, 2008 ; Luo *et al.*, 2009). Elle constitue une source importante de groupes méthyle requis pour la formation de la méthionine et de S-adénosylméthionine. La figure 2 montre une des voies du métabolisme de l'homocystéine dans le foie, qui requiert la GB et catalysée par la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT)(Goddijn-Wessel *et al.*, 1996 ; Lu *et al.*, 2002).

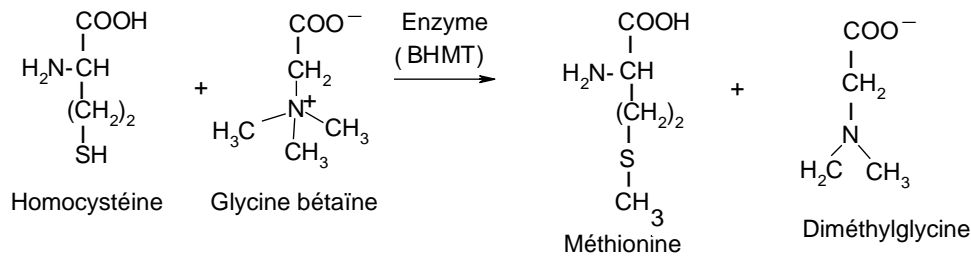


Figure 2. Transformation de l'homocystéine en méthionine en présence de la glycine bêtaïne catalysée par la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) dans le foie.

Quelques études relatives à l'activité antibactérienne d'analogues de la GB existent dans la littérature (Quéau *et al.*, 2003 ; Cosquer *et al.*, 2004). Un effet d'inhibition puissante (allant de bactériostatique à létale) de dérivés benzyles de la GB (Figure 3) contre les bactéries de plusieurs souches appartenant à des groupes taxonomiques différents (*Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*...) a été observé. L'importation de ces dérivés dans des cellules bactériennes apparaît strictement dépendante de la présence des transporteurs membranaires puissants de la GB (Cosquer *et al.*, 2004).

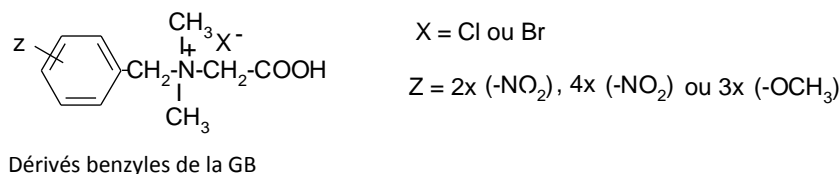


Figure 3. Quelques analogues de la glycine bêtaïne possédant une activité bactériostatique ou bactéricide (Quéau *et al.*, 2003 ; Cosquer *et al.*, 2004).

La GB est également utilisée comme hydratant dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Caqueret *et al.*, 2008 ; Lever *et al.*, 2010 ; Cibus *et al.*, 2011). Elle est non-toxique, très soluble dans l'eau et augmente la tension superficielle de cette dernière (Söderlund *et al.*, 2002). Sa nature polaire et zwitterionique en fait un candidat de choix pour composer la tête hydrophile de différents types d'agents tensioactifs.

Les tensioactifs (TA) constituent une classe importante de produits chimiques, non seulement parce qu'ils sont communément utilisés mais aussi parce qu'ils ont une grande variété d'applications dans les ménages, l'industrie et l'agriculture (Karsa *et al.*, 1999 ; CESIO, 2001 ; Ehrenberg, 2002). Les utilisateurs finaux les rencontrent dans les détergents, les cosmétiques et les aliments. L'application de préparations pharmaceutiques ou cosmétiques

contenant des TA traditionnels ont montré des réactions secondaires (irritation de l'œil ou de la peau). C'est le cas pour l'un des TA les plus utilisés, le dodécylsulfate de sodium (SDS) (Barany *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2006 ; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007). Certains TA contenus dans les eaux usées et rejetés dans l'environnement ont montré une forte toxicité vis-à-vis de nombreux organismes aquatiques (Lal *et al.*, 1991 ; Lewis *et al.*, 1983 ; Wang *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2002 ; Sibila *et al.*, 2008) et une biodégradation faible et lente (Miller *et al.*, 1989 ; Croker *et al.*, 1995 ; Gonzalez-Mazo *et al.*, 1997).

Les TA obtenus directement à partir de matières premières renouvelables pouvant être d'origine végétale ou animale sont présents en faible quantité dans les matières premières et leur extraction nécessite la mise en œuvre de processus plus coûteux que ceux utilisés pour la fabrication de TA synthétiques équivalents. Leur faible présence sur le marché est principalement liée à leur coût de production élevé (Holmberg, 2001).

En raison de l'augmentation des préoccupations environnementales et toxicologiques à l'heure actuelle, il y a un besoin industriel important pour les TA de haute performance possédant des propriétés biodégradables et biocompatibles (Macian *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 2002 ; Benvegnu *et al.*, 2008). Une approche stratégique est de développer de nouvelles fonctionnalités pour ces molécules, combinant par exemple l'activité de surface, la haute capacité de solubilisation et la viscoélasticité, ou possédant des activités biologiques (Kern *et al.*, 1994 ; Dam *et al.*, 1996 ; Vollenbroich *et al.*, 1997 ; Kracht *et al.*, 1999).

Les TA zwitterioniques dérivés de la glycine bêtaïne, les alkylbêtaïnes (e.g. cocamidopropylbêtaïne), sont déjà utilisés dans les cosmétiques (David *et al.*, 1991 ; Storer *et al.*, 2006). Les alkylbêtaïnes sont considérées comme douces pour la peau et les muqueuses et ont également été jugées efficaces pour réduire l'irritation potentielle d'alkyl sulfates, d'alkyl ether sulfates et de savons (Ernst *et al.*, 1982 ; Tegeler *et al.*, 1995 ; de la Maza *et al.*, 1997). Les esters, les thioesters et les amides cationiques TA dérivés de la glycine bêtaïne sont encore en étude et produits à l'échelle du laboratoire. Les premiers, les alkylbêtaïnes, présentent un profil de stabilité particulier, étant plus stables en milieu acide et labiles en milieu alcalin. Leur extrême dépendance vis-à-vis du pH les rend intéressants comme TA clivables (Holmberg, 1996). Leurs propriétés physico-chimiques telles que la tension de surface, la concentration micellaire critique, les pouvoirs moussant et dispersant, la biodégradation ainsi que leurs propriétés biologiques ont fait l'objet d'études antérieures

(Rozycka-Roszal *et al.*, 1988 ; Thompson *et al.*, 1992 ; Lundberg *et al.*, 2004 ; Mohlin *et al.*, 2006 ; Itoh *et al.*, 2009). Les alkylbétaines possèdent des propriétés de surface intéressantes comparativement à leurs analogues alkyltriméthylammonium. L'hémolyse, le processus par lequel les érythrocytes (globules rouges) se désintègrent, est une méthode pratique pour étudier les interactions entre les composés TA et les membranes biologiques (Lundberg *et al.*, 2004a). Il a été indiqué que les alkylbétaines interagissent avec les membranes biologiques réelles et modèles (Kuczera *et al.*, 1985 et Kuczera *et al.*, 1988 cités par Rozycka-Roszak et Fisticaro, 1993). Le chlorure d'oleyl bétaine ( $C_{16}BC$ ) a présenté une activité hémolytique élevée même à basse concentration (0,1 M) tandis qu'à cette même concentration, le dodécyl bétaine ( $C_{12}BC$ ) a été considérablement moins hémolytique que le chlorure de tétradécyl triméthylammonium, un TA stable qui a une concentration micellaire critique similaire à celle du  $C_{12}BC$  (Lundberg *et al.*, 2004a).

Néanmoins, les études sur l'organisation interfaciale des alkylbétaines ainsi que celles concernant leurs interactions avec des biomembranes sont rares, voire inexistantes. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif général de cette thèse qui est de contribuer à l'étude des propriétés tensioactives et membranaires des alkylbétaines.

Après une synthèse bibliographique présentant les méthodes classiques de synthèse et les voies de valorisation générales des tensioactifs dérivés de la glycine bétaine, le volet expérimental s'est intéressé plus particulièrement à l'étude des chlorures d'alkylbétaines ( $C_nBC$ ).

Une première étape importante de ce volet a consisté à produire de manière optimisée des  $C_nBC$  de longueur de chaîne paire comprise entre 10 et 16 atomes de carbones en utilisant des réactifs plus respectueux de l'environnement que ceux utilisés dans les études antérieures.

Après celle-ci, une étude approfondie des films monomoléculaires des  $C_nBC$  et de l'influence de différentes conditions expérimentales sur le comportement du  $C_{16}BC$  à l'interface air-eau a été entreprise.

Ensuite, leurs activités membranaires ont été évaluées.

Dans un premier temps, le pouvoir de pénétration des  $C_nBC$  dans des modèles membranaires simplifiés constitués de monocouches lipidiques a été analysé. L'influence de la nature lipidique et de la longueur de la chaîne de  $C_nBC$  a été investiguée.

Dans un deuxième temps, une caractérisation qualitative et quantitative des interactions existant entre les molécules de  $C_{16}BC$  et celles des lipides ont été effectuées. A la fois des monocouches et des vésicules lipidiques composées de lipides représentatifs de la membrane plasmique de mammifères de même que des conditions expérimentales proches des conditions physiologiques ont été utilisées afin d'approcher les conditions réelles des systèmes vivants.

Un dernier chapitre s'est intéressé à l'étude du pouvoir de perméabilité et/ou de solubilisation des  $C_nBC$  en utilisant des vésicules lipidiques comme modèle membranaire. L'effet de la longueur de la chaîne des  $C_nBC$  ainsi que celui de la nature des lipides composant les membranes modèles ont été examinés.

Une discussion générale de l'ensemble des résultats est ensuite présentée de manière à dégager les voies de valorisation potentielles des  $C_nBC$ .

Une conclusion générale ainsi que des perspectives pour des recherches futures sont exposées à la fin de cette thèse.

## **II. Résumé de la bibliographie**

**Les principaux résultats ont été publiés dans cet article :**

Publication I

Nsimba Zakanda F., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2010). Les dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne : méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 14(4), 737-748.

## **Les dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne : Méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation**

Francis Nsimba Zakanda<sup>a,b</sup>, Michel Paquot<sup>a</sup>, Lelo Georges Mvumbi Lelo<sup>b</sup>, Magali Deleu<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 2 Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Service de Biochimie, Département des Sciences de Base, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa B.P.127 Kinshasa XI, R.D. Congo

\*Corresponding author:

E-mail: magali.deleu@ulg.ac.be

Tél. 081622232, Fax : 081622231

*Les commentaires complémentaires à l'article original ont été mis en italique*

## Résumé

Le terme « bétaine » est utilisé pour désigner la glycine bétaine, mais également ses dérivés et un composé organique portant un azote quaternaire. La glycine bétaine est un petit composé amphotérique, très polaire qui agit comme osmoprotecteur chez les végétaux et agent protecteur du foie, du cœur et des vaisseaux chez l'homme. En vue d'exploiter ses nombreux effets, des chercheurs ont synthétisé des dérivés tensioactifs dont les alkylbétaines, les alkylamidobétaines, les bétainates (esters de la glycine bétaine monomères, dimères et bipolaires) et les bétainamides (amides de la glycine bétaine). Les alkylbétaines et les alkylamidobétaines sont produites à l'échelle industrielle et sont utilisées comme tensioactifs amphotères dans les cosmétiques. Elles sont moins irritantes comparativement au dodécylsulfate de sodium (SDS). Les bétainates et les bétainamides sont produites à l'échelle du laboratoire. Les bétainates monomères sont plus biodégradables que les esters courants tandis que les bétainates dimères et bipolaires présentent respectivement des activités tensioactives et membranaires plus intéressantes comparativement à leurs analogues monomères. Seule la voie chimique est jusqu'à présent utilisée pour leur synthèse.

**Mots-clés** : concentration micellaire critique, dérivés de la glycine bétaine, glycine bétaine, potentialités, propriétés amphiphiles, synthèse chimique, tensioactifs bolaforme et gemini, tensiométrie

## **Abstract**

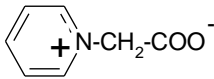
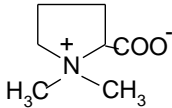
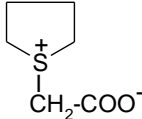
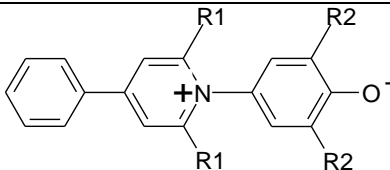
The term "betaine" is used to design the glycine betaine, but also its derivatives and an organic compound carrying a quaternary nitrogen. Glycine betaine is an amphoteric small compound, very polar that acts as osmoprotectant in plants and protective agent of the liver, of the heart and of the vessels in human. In order to exploit its numerous effects, researchers synthesized surfactant derivatives including alkylbetaines, alkylamidobetaines, betainates (esters of glycine betaine monomers, geminis and bolaforms) and betainamides (amides of glycine betaine). Alkylbetaines and alkylamidobetaines are produced on the industrial scale and are used as amphoteric surfactants in cosmetics. They are less irritating compared to sodium dodecylsulfate (SDS). Betainates and betainamides are produced on laboratory the scale. Betainates monomers are more biodegradable than the current esters while betainates geminis and bolaforms present respectively surface and membrane activities more interesting compared to their analogous monomers. Only the chemical way is used until now for their synthesis.

**Keywords** : amphiphiles properties, bolaforme and gemini surfactants, chemical synthesis, critical micellar concentration, glycine betaine, glycine betaine derivatives, potentialities, tensiometry

## 1. Introduction

Dans la littérature, le terme « bêtaïne » est souvent utilisé pour désigner la glycine bêtaïne ou les dérivés de la glycine bêtaïne utilisés comme tensioactifs dans les cosmétiques (Lever *et al.*, 2007 ; Likes *et al.*, 2007). Ce terme est aussi utilisé comme suffixe pour désigner un acide organique (très souvent un acide aminé) dont l'atome électronégatif (très souvent l'azote) porte une charge positive (Wood *et al.*, 2002) ou encore un composé possédant une fonction quelconque (acide, alcool, etc.) et un azote quaternaire (Wydro *et al.*, 2005). Le **tableau 1** présente les structures de quelques bêtaïnes.

**Tableau 1.** Structures de quelques bêtaïnes – Structures of some betaines

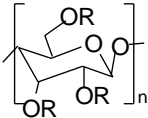
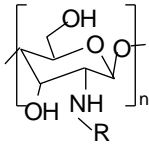
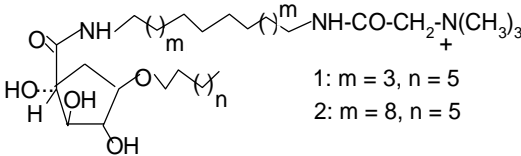
Noms	Formules chimiques	Auteurs
Glycine bêtaïne	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Peddie <i>et al.</i> , 1998
Triéthylglycine bêtaïne	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-COO}^- \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2 \end{array}$	Peddie <i>et al.</i> , 1998
Alanine bêtaïne	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-N}^+\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Peddie <i>et al.</i> , 1998
Alkyl sulfobêtaïne	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">n = 12,14,16</p>	Glosh <i>et al.</i> , 2000 ; Wydro <i>et al.</i> , 2005
Pyridinium bêtaïne		Peddie <i>et al.</i> , 1998
Proline bêtaïne		Storer <i>et al.</i> , 2006
Thiolanium bêtaïne		Peddie <i>et al.</i> , 1998
Phényl-3-pyridinium-N-phénolate bêtaïne substitué		Vodolaskaya <i>et al.</i> , 2003

La glycine bêtaïne (N,N,N-triméthylglycine), appelée parfois bêtaïne, est présente dans plusieurs plantes (betterave, blé, épinards), animaux et micro-organismes (*Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas dénitrifiants*) (Huang *et al.*, 2008). Elle joue un rôle important dans la résistance au stress osmotique chez les bactéries, les algues, les plantes et les mammifères (Wood *et al.*, 2002). Dans l'organisme humain, elle provient de l'alimentation et aussi du métabolisme de la choline. La glycine bêtaïne est utilisée dans le traitement de l'homocystéinurie et de l'homocystéinémie, une élévation de la concentration de l'homocystéine dans les urines et dans le plasma respectivement (Yagisawa *et al.*, 2006 ; Atkinson *et al.*, 2009). L'administration de la bêtaïne a montré des effets protecteurs contre les déficiences du système cardiovasculaire (Stepnova *et al.*, 2007) ; vis-à-vis de l'accumulation d'espèces d'oxygène réactives et de la peroxydation de lipides (Banu *et al.*, 2009). En biotechnologie, la bêtaïne et la choline ont été largement utilisées comme donneurs du groupe méthyle pour la fermentation industrielle de la vitamine B<sub>12</sub> par les *Pseudomonas dénitrifiants* (Li *et al.*, 2008).

La glycine bêtaïne est très soluble dans l'eau et augmente sa tension superficielle (Söderlund *et al.*, 2002). Pour exploiter ses propriétés bénéfiques citées ci-dessus, de nombreux auteurs ont synthétisé des dérivés de la glycine bêtaïne par substitution d'un radical méthyle, par un radical alkyle à longue chaîne (Hines *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2005), par un radical alkylamidopropyle (Tegeler *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1997), par estérification de son groupement carboxylique par des alcools gras ou des polysaccharides (Auzély-Velty *et al.*, 2003 ; Granö *et al.*, 2000) ou encore par amidation du groupement carboxylique avec le chitosan (Holappa *et al.*, 2006 ; Korjamo *et al.*, 2008) ou le 3-amino-1,2-propanediol (Floch *et al.*, 1998). Le **tableau 2** montre quelques dérivés de la glycine bêtaïne.

Une des voies de synthèse vise à construire des molécules tensioactives à base de glycine bêtaïne. Celles-ci permettent de répondre aux exigences de plus en plus strictes en termes de qualité environnementale (Noiret *et al.*, 2002) et de développer des caractéristiques fonctionnelles bien précises, deux critères recherchés par l'industrie des tensioactifs.

**Tableau 2.** Quelques dérivés de la glycine bêtaïne – Some glycine betaine derivatives

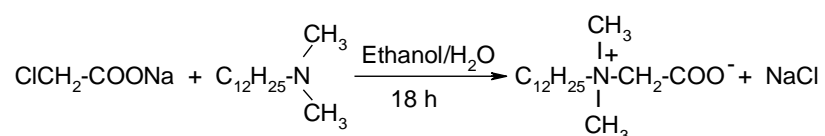
Noms	Structures	Auteurs
Alkylbétaines	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>(n = 8, 10,12,14,16)</p>	Li <i>et al.</i> , 2005
DiméthylDodécylamidobétaïne	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{CONH}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Hall-manning <i>et al.</i> , 1998 ; Tegeler <i>et al.</i> , 1995
Cocoamidopropylbétaïne	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\    \quad   \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Tegeler <i>et al.</i> , 1995
N-(3-Alkoxy-2-Hydroxypropyl)-N,N-diméthylglycine	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>(n=8-16)</p>	Guan <i>et al.</i> , 1997
Alkylbétainates (esters)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\   \quad    \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}_n\text{H}_{2n+1} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>(n=2<sup>(1)</sup>, 10,12,14)</p>	Lundberg <i>et al.</i> , 2004 ; Tehrani-Bagha <i>et al.</i> , 2007a
Bétaïinate d'amidon <sup>1</sup>	 $\text{R} = \text{H} \text{ ou } (\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CO}^-$	Granö <i>et al.</i> , 2000 ; Auzély-Velty <i>et al.</i> , 2003
N-bétaïinate de chitosan <sup>1</sup>	 $\text{R} = (\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CO}^-$	Holapa <i>et al.</i> , 2006 ; Mourya <i>et al.</i> , 2008
N-bétaïnylamino-3-dialkyloylglycerol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R} \\   \\ \text{CH}-\text{O}-\text{COR} \\   \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3 \\    \\ \text{O} \end{array} + \text{Cl}^-$ <p>(R = 12,14,16)</p>	Floch <i>et al.</i> , 1998
Dodécyl bêtaïinate dimère (gemini)	$\begin{array}{c} \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \\   \\ (\text{CH}_2)_2 \\   \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{ Br}^- \end{array}$	Tehrani-Bagha <i>et al.</i> , 2007a
Amphiphiles bipolaires (bolaamphiphiles) avec une tête de glycine bêtaïne	 <p>1: m = 3, n = 5 2: m = 8, n = 5</p>	Berchel <i>et al.</i> , 2008

<sup>(1)</sup>Ces dérivés de la bêtaïne ne sont pas tensioactifs.

## 2. Méthodes de synthèse par voie chimique des dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne

### 2.1. Synthèse des alkylbêtaïnes

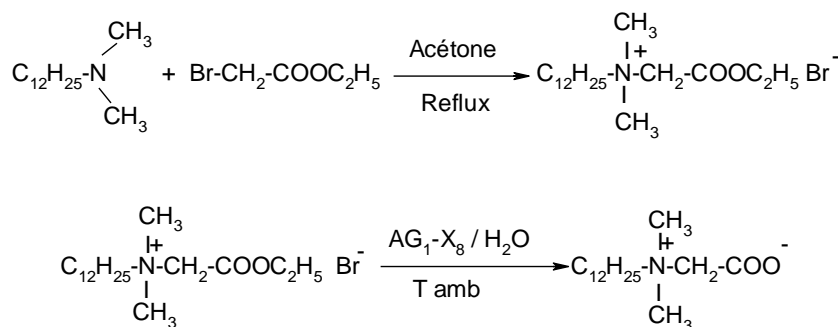
Le chlorure de dodécylbêtaïne ( $C_{12}Be$ ) a été synthétisé et purifié par différentes méthodes. Une des méthodes consiste à faire réagir le chloroacétate de sodium avec la N,N-diméthyl-N-dodécylamine (rapport molaire 1:1) (**Figure 1**) dans une solution aqueuse d'éthanol à reflux pendant 18 h. Le mélange est alors refroidi et séché. Le solide résultant est dissous dans de l'isopropanol, filtré pour enlever les solides inorganiques et séché. Le résidu est recristallisé d'abord dans de l'acétone et ensuite dans de l'acétate d'éthyle. La recristallisation est répétée jusqu'à ce qu'une pureté suffisante soit atteinte (Hines *et al.*, 1997).



**Figure 1.** Synthèse de dodécylbêtaïne à partir du chloroacétate de sodium et de la N,N-diméthylamine-N-dodécylamine. Les conditions opératoires sont plus amplement décrites dans le texte. Dodecylbetaine synthesis. The experimental methods are more detailed in the text (Hines *et al.*, 1997)

Une autre méthode de synthèse de la dodécylbêtaïne (**Figure 2**) a été utilisée par Delgado *et al.* (2006). Dans la première étape, une amine tertiaire, la N,N-diméthyl-N-dodécylamine réagit avec le bromo-2-éthanoate d'éthyle à reflux avec de l'acétone pendant 12 h. Après évaporation de l'acétone, le produit brut de réaction est récupéré par extraction liquide-liquide en présence d'éther éthylique et d'eau purifiée, afin que les réactifs qui n'ont pas réagi restent dans la phase organique et que le sel d'ammonium quaternaire, le produit de la réaction, aille dans la phase aqueuse. Dans la deuxième étape, le sel d'ammonium quaternaire est traité dans sa propre phase aqueuse avec une résine basique échangeuse d'ion, AG1-X8. Bien que la méthode originale indique que la réaction peut avoir lieu dans le méthanol, l'éthanol, ou l'isopropanol, la présence de l'alcool conduit à des réactions parallèles de transestérification. Il en résulte de plus petits rendements de la réaction et la production d'autres sous-produits. La résine employée permet l'échange de l'anion bromure du produit intermédiaire avec un groupe hydroxyle de la résine pour la formation du produit final. La résine est ajoutée pour rendre le milieu basique et la réaction se poursuit jusqu'à l'hydrolyse totale de l'ester formé pouvant être vérifié par HPLC-MS. Quand le rendement de la réaction atteint 99,9 %, la résine est

filtrée et l'eau est évaporée. L'évaporation de l'eau est assez difficile parce que les alkylbétaines sont des agents moussants. Par conséquent, un volume de toluène est ajouté pour former un azéotrope avec l'eau, empêchant ainsi la formation de la mousse. De plus, il sert à sécher les produits qui sont très hygroscopiques. Quand les produits sont complètement séchés, ils sont dissous dans de l'acétone bouillant et sont cristallisés par refroidissement. Finalement, les solides sont filtrés et séchés sous vide et atmosphère humide.



**Figure 2.** Synthèse de dodécylbétaine à partir du bromoacétate d'éthyle et de la N,N-diméthylamine-N-dodécylamine. Les conditions opératoires sont plus amplement décrites dans le texte. *Dodecylbetaine synthesis. The experimental methods are more detailed in the text* (Delgado *et al.*, 2006)

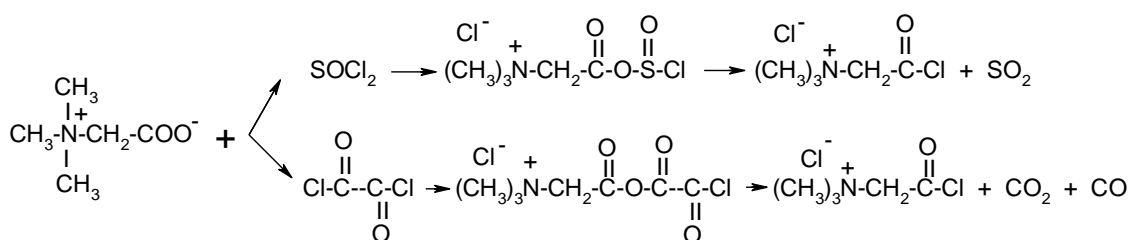
## 2.2. Synthèse des alkylbétainates

La glycine bétaine peut être directement utilisée comme réactif chimique pour former des esters avec des alcools gras. Cependant, à cause de sa faible réactivité, elle est communément utilisée sous une forme activée, le chlorure d'acyle (Auzély-Velty *et al.*, 2003). Les alkylbétainates ou esters de la glycine bétaine avec des alcools gras sont synthétisés en deux étapes. Avant l'acylation, la première étape consiste en l'activation du composant carboxyle ou du composant carbonyle.

### 2.2.1. Activation des acides organiques

Les acides organiques ou composants carboxyles peuvent être activés sous forme d'halogénures d'acyle (chlorure d'acyle, bromure d'acyle ou fluorure d'acyle), acyl azides, acylimidazoles, anhydride, esters, etc. Un agent d'acylation intermédiaire est formé, isolé et ensuite soumis à l'alcoolyse. Les réactifs chlorés sont le plus fréquemment utilisés pour activer la glycine bétaine.

Le chlorure de thionyle ( $\text{SOCl}_2$ ), le chlorure d'oxalyle [ $(\text{COCl})_2$ ], le trichlorure de phosphore ( $\text{PCl}_3$ ), le pentachlorure de phosphore ( $\text{PCl}_5$ ) l'oxychlorure de phosphore ( $\text{POCl}_3$ ) sont généralement utilisés pour produire les chlorures d'acyle à partir d'un acide carboxylique ou d'un composé portant une fonction carboxylate comme la glycine bêtaïne en présence d'un solvant organique comme le dichlorométhane et à reflux pour faciliter le dégagement de HCl. Un des inconvénients majeurs des réactifs chlorés est la production de HCl (Montalbetti *et al.*, 2005). La **figure 3** montre la formation du chlorure de bêtaïnyle à l'aide des réactifs chlorés les plus utilisés, le chlorure de thionyle et le chlorure d'oxalyle.

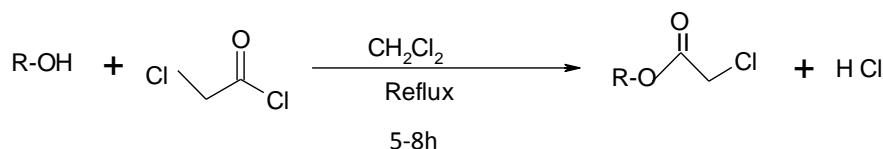


**Figure 3.** Mécanisme de formation du chlorure de bêtaïnyle utilisant le chlorure de thionyle ou le chlorure d'oxalyle. *Mechanism for betainyl chloride formation using thionyl chloride or oxalyl chloride.*

L'alkylbêtaïnate est formé en faisant réagir le chlorure de bêtaïnyle avec un alcool gras primaire. Une base supplémentaire (pyridine, diméthylaminopyridine, triéthylamine, N-bromosuccinimide) est habituellement exigée comme réactif nucléophile et/ou pour piéger l'HCl formé. Les couplages sont habituellement exécutés dans les solvants secs et inertes (acétone, 1,4-dioxane, pyridine, diméthylsulfoxyde) (Granö *et al.*, 2000).

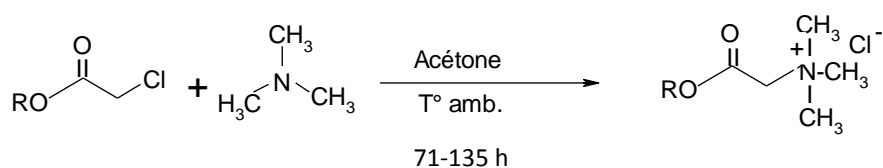
### 2.2.2. Activation des alcools

La première étape consiste à activer un alcool ou un composant carbonyle en halogénure d'alcoyle qui sera ensuite soumis à une aminolyse dans la deuxième étape. Les réactifs chlorés et bromés sont les plus utilisés pour activer les alcools. Notons que cette procédure fait intervenir la triméthylamine comme réactif d'aminolyse, plutôt que la glycine bêtaïne. Les réactifs les plus utilisés pour produire les halogénures d'alcoyles à partir des alcools gras primaires sont le chlorure de chloroacétyle ( $\text{ClCH}_2\text{COCl}$ ) (Lundberg *et al.*, 2004 ; Mohlin *et al.*, 2006) et le bromure de bromoacétyle ( $\text{BrCH}_2\text{COBr}$ ) (Tehrani-Bagha *et al.*, 2007a). La **figure 4** illustre la formation de chloroacétate d'alkyle à l'aide de chlorure de chloroacétyle.



**Figure 4.** Formation de chloroacétate d'alkyle utilisant le chlorure de chloroacétyle. *Alkyl chloroacetate formation using chloroacetyl chloride* (Mohlin *et al.*, 2006)

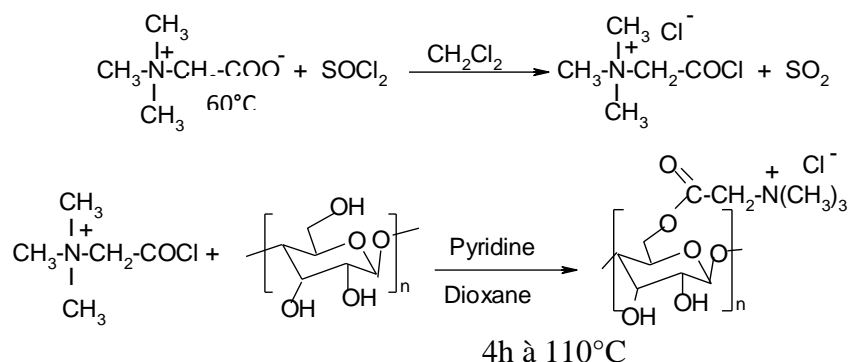
L'alkylbétainate est formé dans une deuxième étape par la réaction d'aminolyse consistant en la réaction du chloroacétate d'alkyle avec la triméthylamine en milieu organique (acétone, 1,4-dioxane) (**Figure 5**).



**Figure 5.** Formation de l'alkyl bétainate à partir de chloroacétate d'alkyle avec la triméthylamine. *Alkyl betainate formation from Alkyl chloroacetate with trimethylamine*. (Lundberg *et al.*, 2004 ; Mohlin *et al.*, 2006)

### 2.3. Synthèse de bétainate d'amidon

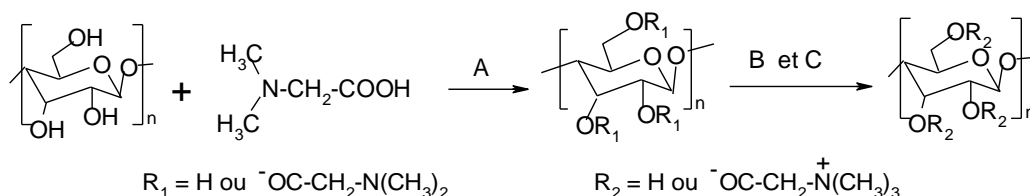
Granö *et al.* (2000) ont synthétisé le bétainate d'amidon en deux étapes (**Figure 6**). La première étape a consisté en la synthèse de chlorure de bétainyle à partir de la glycine bétaine et de chlorure de thionyle dans le dichlorométhane. Dans la deuxième étape, l'amidon a réagi avec le chlorure de bétainyle en présence de 1,4-dioxane comme solvant et de la pyridine comme réactif nucléophile et catalyseur.



**Figure 6.** Synthèse de chlorure de bétainate d'amidon. *Synthesis of starch betainate chloride* (Granö *et al.*, 2000)

Auzély-Velty *et al.* (2003) ont également synthétisé le chlorure de bétainate d'amidon en deux étapes (**Figure 7**). La première étape a consisté en la synthèse de poly (N,N-diméthyl glycyll)

ester d'amidon à partir de N,N-diméthyl glycine et de l'amidon dans le diméthylsulfoxy sec (DMSO), le diisopropylcarbodiimide (DIC) et la diméthylaminopyridine (DMAP). La deuxième étape a consisté en la quaternisation des esteramines du dérivé de l'amidon à partir de poly (N,N-diméthyl glycy) ester d'amidon et de l'iodure de méthyle dans le diméthyle sulfoxy sec à température ambiante.

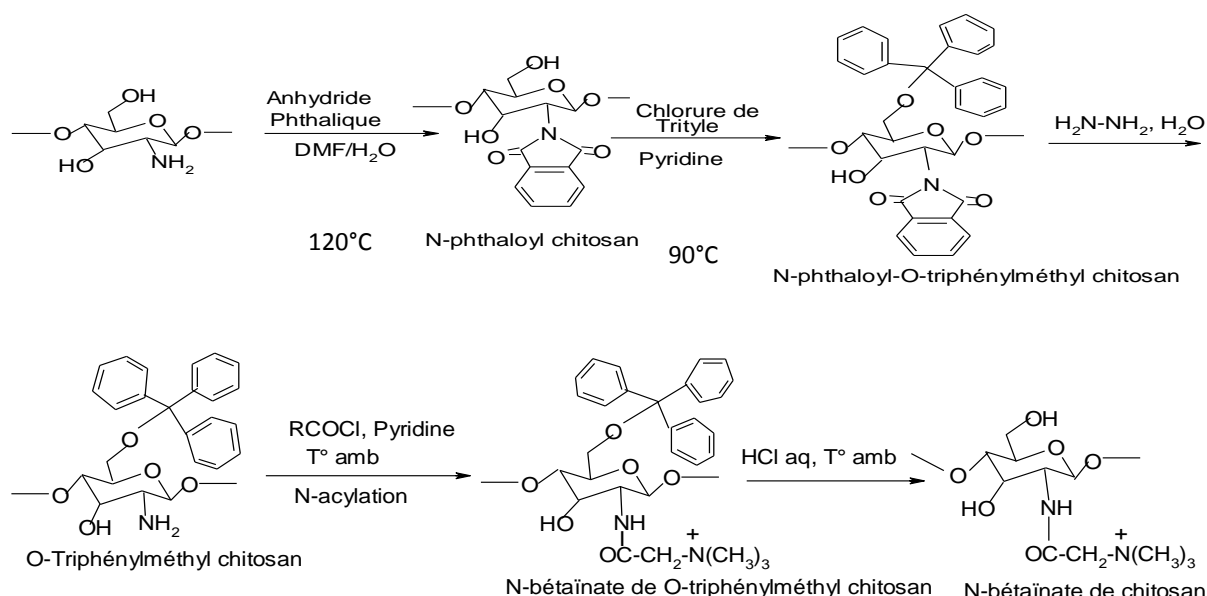


**Figure 7.** Autre voie de synthèse de chlorure de bétainate d'amidon. *Other route of starch betainate chloride synthesis (Auzély-Velty et al., 2003)*

(A) DIC, DMAP, DMSO, T° amb, 12h ; (B) CH<sub>3</sub>I, DMSO, T° amb, 5h ; (C) Ultrafiltration

#### 2.4. Synthèse de N-bétainate de chitosan

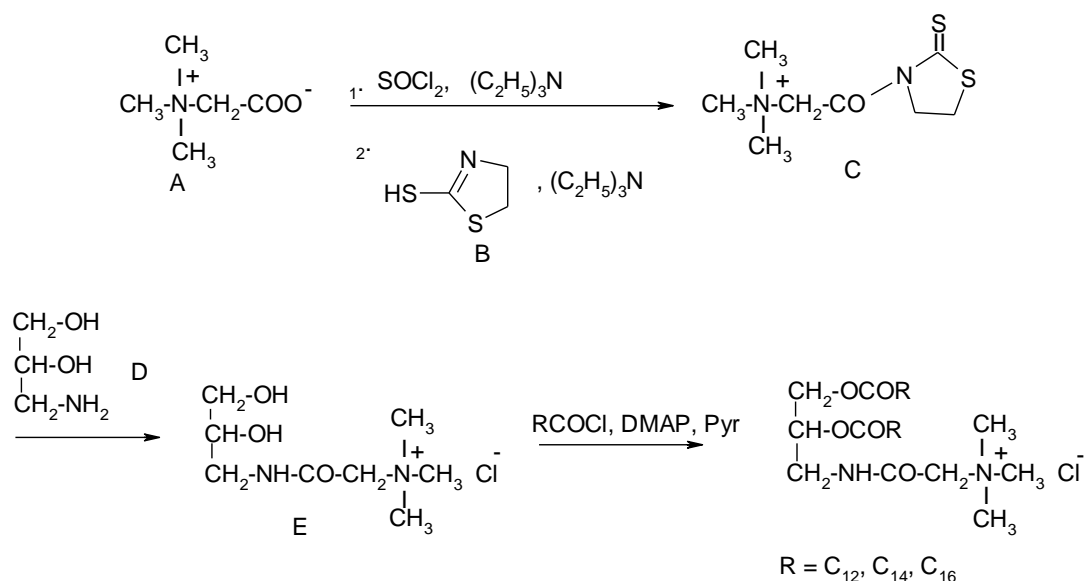
L'acylation de chitosan peut être accomplie régiosélectivement au niveau du groupe aminé en protégeant le groupe hydroxyle primaire avec une molécule de triphénylméthyle. Cette approche a été utilisée pour préparer le N-chloroacyl 6-O-triphénylméthyl chitosan qui peut, en outre, être substitué ou quaternisé avec les amines comme la pyridine, l'imidazole, la triéthylamine, la tributylamine, le chlorure de N-chlorobétainyle (Mourya et al., 2008). La **figure 8** montre les cinq étapes de synthèse du N-bétainate de chitosan.



**Figure 8.** Synthèse de N-bétainate de Chitosan. *Synthesis of Chitosan N-betainate (Mourya et al., 2008)*

## 2.5. Synthèse de N-bétaïnylamino-3-dialkyloylglycérol

La **figure 9** résume les étapes de synthèse de N-bétaïnylamino-3-dialkyloylglycérol (Floch *et al.*, 1998). En effet, la glycine bétaïne (GB)(A) est convertie en un dérivé électrophile réactif en présence du chlorure de thionyle dans la triéthylamine comme solvant. Ce dérivé est traité avec le 2-thiazoline-2-thiol (B) dans le même solvant pour produire le N-bétaïnyl thiazolidine-2-thione (C). Le 3-amino-1,2-propanediol (D) est quantitativement N-acylé par le réactif C pour former le diol cationique (E) dans des conditions douces. Les amphiphiles cationiques cibles GB 12,14 et 16 sont obtenus dans une quatrième étape en utilisant les chlorures de dodécanoyle, de tétradécanoyle et d'hexadécanoyle respectivement en présence de 4-diméthylaminopyridine et de pyridine.

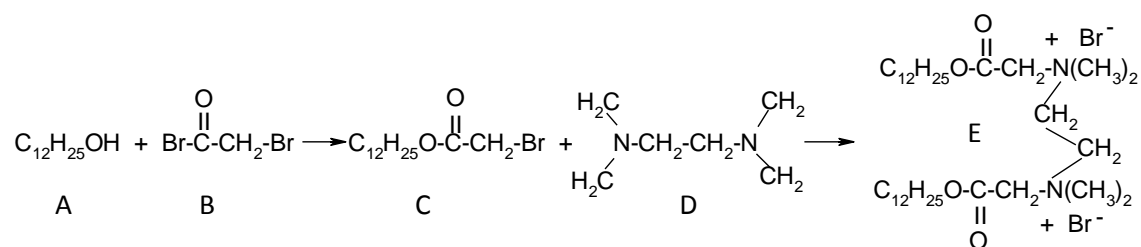


**Figure 9.** Synthèse de N-bétaïnylamino-3-dialkyloylglycérol. *Synthesis of N-betainylamino-3-dialkylglycerol* (Floch *et al.*, 1998). Les réactifs et intermédiaires numérotés de A à E sont respectivement: Glycine bétaïne(A), 2-thiazoline-2-thiol (B), N-acyl thiazolidine-2-thione (C), 3-amino-1,2-propanediol (D) et Chlorure de N-bétaïne de 3-amino-1,2-propanediol (E).

## 2.6. Synthèse de dodécyll bétaïne dimère ou gemini

Les tensioactifs geminis sont une nouvelle génération de tensioactifs composés de deux molécules de tensioactifs monomériques liées entre elles par un groupe espaceur au niveau de leur tête hydrophile. Ils possèdent donc deux groupes hydrophiles et deux groupes hydrophobes (Tehrani-Bagha *et al.*, 2007b). La structure d'une telle molécule est généralement notée m.s.m où m représente la queue ( $\text{C}_m\text{H}_{m+1}$ ) et s la longueur du groupe espaceur. Ce dernier peut être hydrophile ou hydrophobe, flexible ou rigide (Paria, 2008). En général, les deux têtes aussi bien que les deux queues ont la même structure chimique et la

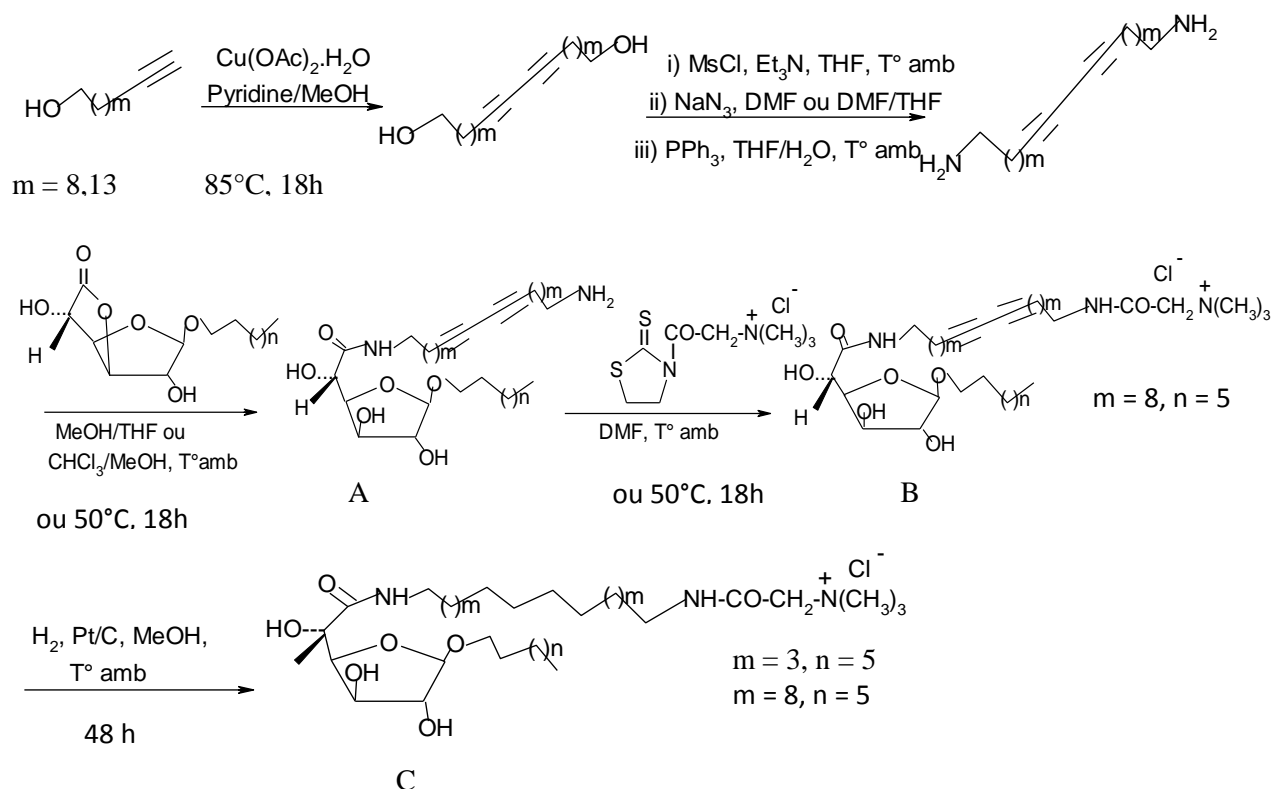
même longueur. Les amphiphiles hétérogéminis, qui sont moins courants, sont des molécules avec des têtes polaires anioniques, cationiques ou non-ioniques différentes et des queues différentes, c'est-à-dire une structure du type n.s.m (Fischer *et al.*, 2008). La **figure 10** montre la voie de synthèse de dodécylbétainate dimère avec un groupe espaceur de deux méthylènes. Dans la première étape, une solution de bromure de bromoacétyle (B) dans le dichlorométhane est ajoutée à une solution de 1-dodécanol (A) dans le même solvant. Le mélange réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante pour former le dodécylbromoacétate (C). Dans la deuxième étape, le composé (C) réagit avec la N,N,N',N'-tetraméthyl-1,2-éthanediamine (D) dans l'acétone sous agitation à reflux pendant 20 h pour produire le dodécylbétainate dimère (E).



**Figure 10.** Voie de synthèse de dodécyl bétainate dimère avec un groupe espaceur de deux méthylènes. *Synthesis route for dodecyl betainate gemini with a two-methylene spacer (s = 2)* (Tehrani-Bagha *et al.*, 2007a).

## 2.7. Synthèse d'amphiphiles bipolaires avec une tête de glycine bétaine

Les amphiphiles bipolaires, appelés bolaamphiphiles ou encore bolaformes, sont une classe particulière de molécules tensioactives constituant la membrane cellulaire des archéobactéries méthanogènes et thermoacidophiles. Ces amphiphiles bipolaires sont caractérisés par la présence de deux groupes hydrophiles terminaux reliés par un groupe espaceur hydrophobe possédant une ou deux chaînes alkyles. La **figure 11** montre la voie de synthèse des bolaamphiphiles asymétriques avec une tête de glycine bétaine. Les alcools acétyléniques sont couplés à l'acétate de cuivre en milieu organique. Les diols formés sont convertis en diamines correspondants qui ont ensuite réagi avec le β-D-glucofurono-6,3-lactone pour former les glucuronamides (A). Ces derniers sont acylés avec la N-bétainyl thiazolidine-2-thione pour former les bolaamphiphiles asymétriques insaturés (B) et saturés (C).



**Figure 11.** Voie de synthèse de séries de molécules amphiphiles bipolaires ayant une tête de glycine bêtaïne. *Synthesis route of bipolar amphiphilic molecular series with one glycine betaine head group moiety* (Berchel *et al.*, 2008)

### 3. Potentialités des dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne

#### 3.1. Potentialités des alkylbêtaïnes et des alkylamido bêtaïnes

La chimie des tensioactifs cationiques s'est attelée depuis dix ans au remplacement des produits issus de la pétrochimie par des produits issus de la biomasse car ils sont moins polluants et plus biodégradables (Auzély-Velty *et al.*, 2003). Aujourd'hui, l'usage de produits cosmétiques, tels que les démaquillants, les shampoings, les bains moussants, fait partie de nos habitudes de vie. Les détergents représentent les produits les plus importants. Une formule actuelle peut contenir classiquement un tensioactif anionique (par exemple, l'alkyl ether sulfate), un non-ionique (par exemple, l'alkyl polyglucoside) aussi bien qu'un amphotérique (par exemple, la cocamidopropylbêtaïne) (Tegeler *et al.*, 1995).

Les tensioactifs amphotériques dont les dérivés de bêtaïne font partie ont de bonnes propriétés moussantes et un haut pouvoir détergent, surtout en présence de tensioactifs anioniques. En outre, ils développent aussi de bonnes fonctions tensioactives sur une large gamme de pH et sont moins irritants pour la peau et les yeux, comparativement aux autres tensioactifs. Ces

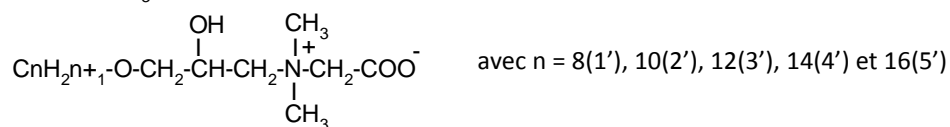
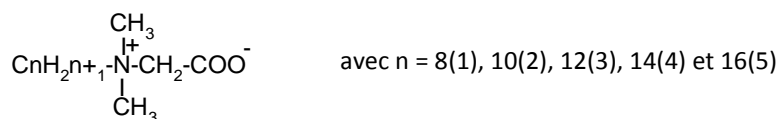
caractéristiques conviennent très bien pour les produits de nettoyage de la maison, de lavage facial et les shampoings (Koike *et al.*, 2007).

Les alkylbétaines (décylbétaine, dodécylbétaine et tétradécylbétaine) et les alkylamidobétaines (cocamidopropylbétaine, cocamidobétaine) sont des tensioactifs dérivés de la bétaine les plus utilisés dans les produits commerciaux. La cocamidopropylbétaine (CAPB) est l'un des trois composants majeurs dans les shampoings à côté du lauroyléthylsulfate de sodium (SLES) et du cocomonoéthanolamide (CME) (Im *et al.*, 2008). En tant que groupe particulier de tensioactifs amphotériques, les alkylbétaines sont utilisées comme additifs de conditionnement des shampoings et présentent un niveau d'irritation très bas comparativement au lauryl sulfate de sodium (Ward *et al.*, 1998), des effets adoucissants et antistatiques sur les cheveux (Koike *et al.*, 2007). Les tensioactifs amphotériques (et les bétaines, en particulier) suppriment l'effet anti-moussant causé par les gouttelettes d'huile. Ainsi, ils sont utilisés comme amplificateurs de la mousse dans les formulations de shampoings commerciaux (Basheva *et al.*, 2000).

Le pouvoir moussant des tensioactifs est amélioré avec la longueur de la chaîne alkyle, lequel est corroboré par le fait que la tension de surface décroît avec l'accroissement du nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle du tensioactif. La concentration micellaire critique (CMC) des alkylbétaines décroît également avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Le **tableau 3** compare les valeurs des CMC des alkylbétaines avec leurs homologues dans lesquels le groupe hydroxypropyle a été incorporé. L'effet du nombre de carbone sur les propriétés de surface est évident et les faibles tensions de surface sont observées lorsque le nombre de carbone du groupe alkyle hydrophobe est augmenté. Le groupe hydroxypropyle est favorable à l'amélioration des propriétés de surface.

**Tableau 3.** Comparaison des valeurs de la CMC des alkylbétaines (1-5) avec leurs homologues incorporant le groupe hydroxypropyle (1'-5') *Comparison of the values of the CMC of the alkylbetaines (1-5) with their counterparts incorporating the hydroxypropyle group (1'-5')* (Guan *et al.*, 1997).

	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'
CMC (mM)	170	25	18	7,0	1,8	0,68	0,18	0,082	0,018	0,012



### **3.2. Potentialités des bétaines**

Les esters de bétaine tensioactifs sont des candidats intéressants en tant qu'agent de formulation pour plusieurs applications pharmaceutiques (Lundberg *et al.*, 2004). Ils sont beaucoup moins étudiés que les alkylbétaines (Mohlin *et al.*, 2006).

Le bétainate d'amidon comme additif de fin d'humidification (mouillabilité) a été étudié dans la fabrication du papier. Les tests de papetiers ont montré que le bétainate d'amidon augmente considérablement la résistance des feuilles de papier (Granö *et al.*, 2000).

L'activité antimicrobienne des dérivés de chitosan a été étudiée. Les N-bétaines de chitosan avec des degrés de substitution de 0,05 à 0,9 du groupe amino du chitosan avec la glycine bétaine ne sont pas actifs vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* en milieu neutre (pH 7,2). Par contre, avec un degré de substitution moindre et en milieu acide (pH 5,5), cette activité antimicrobienne a été observée (Holappa *et al.*, 2006).

Des dérivés particuliers comportant un diacylglycérol lié à la fonction carboxyle de la bétaine par une liaison amide ont été démontrés utiles pour la transfection de gènes dans des cellules hépatocytes (Gilot *et al.*, 2002).

### **3.3. Potentialités des tensioactifs geminis**

Les tensioactifs geminis sont une classe relativement nouvelle de molécules tensioactives, ce qui explique le peu de littérature disponible à ce sujet. Cependant, ils présentent un intérêt en raison de leurs propriétés tensioactives remarquables et de leur capacité à former des structures supramoléculaires intéressantes aussi bien en solution qu'à l'interface solide-solution aqueuse. Comme les tensioactifs conventionnels, les tensioactifs geminis peuvent être utilisés dans les produits de consommation comme les produits de nettoyage, les produits cosmétiques et les produits pharmaceutiques (Zhou *et al.*, 2009) avec réduction de la consommation des produits chimiques (Sakai *et al.*, 2009). En outre, leur solubilité et leur stabilité excellentes dans des solutions d'électrolytes concentrées ainsi que leur remarquable résistance à l'oxydation et à la dégradation thermique (Paria, 2008) doivent être relevées. Comparativement à leurs équivalents monomériques, les tensioactifs geminis montrent une plus haute activité de surface, une concentration micellaire critique (CMC) 10 à 100 fois inférieure, une haute capacité de solubilisation et une meilleure tolérance aux ions mono et divalents (Tehrani-Bagha *et al.*, 2007b ; Paria, 2008). Les propriétés des tensioactifs geminis sont largement influencées par la longueur du groupe espaceur (Paria, 2008).

### **3.4. Potentialités des amphiphiles bipolaires (bolaamphiphiles, bolaformes)**

Les amphiphiles bipolaires ont la capacité d'adopter des conformations supramoléculaires variées comme des vésicules, des lamelles, des disques, des tubules ainsi que des fibrilles (Berchel et *al.*, 2008). Ceci permet leur application comme modèles de membranes biologiques et comme microréacteurs (Chen et *al.*, 2009). Ils forment des monocouches lipidiques très denses et moins perméables que les bicouches membranaires classiques (Gliozzi et *al.*, 2002). Leur capacité à stabiliser des membranes a été appliquée pour stabiliser des vésicules servant de système de distribution des médicaments. En outre, leur aptitude à former des nanotubes creux permet d'envisager leur application dans le domaine de l'encapsulation médicale et industrielle (Meister et *al.*, 2007). Certains bolaamphiphiles (comme les diester-dicarboxyliques formés de deux têtes d'acide phthalique et du 1,2-éthanediol, du 1,4-butène-2-diol ou du 1,4-butanediol comme groupes espaceurs) peuvent former, dans un mélange eau-méthanol, des structures hélicoïdales semblables à celles observées dans les protéines. Ces structures jouent un rôle crucial dans le processus d'auto-assemblage moléculaire et définissent la morphologie des agrégats comme la texture tubulaire (Mosae Selvakumar et *al.*, 2009).

L'utilisation des bolaformes de bétaine en tant qu'agent tensioactif, antibactérien et/ou antifongique dans le domaine de la cosmétique et de la détergence a également été envisagée (Estrine et *al.*, 2004).

## **4. Conclusion**

La glycine bétaine présente un intérêt tant pour les animaux, les végétaux que les micro-organismes. Elle a des effets protecteurs sur de nombreux organes humains comme le foie, le cœur, les vaisseaux. Ses dérivés alkyles trouvent des applications dans le secteur de l'industrie cosmétique. Ils sont utilisés comme tensioactifs amphotères. Les dérivés esters et amides de la glycine bétaine dimères (geminis) et bipolaires (bolaformes) constituent de nouvelles classes de tensioactifs qui sont sujets à de nombreuses études actuellement. Les activités de surface des dérivés dimères et les activités membranaires des bolaformes sont plus intéressantes que celles des dérivés monomères correspondants. Les dérivés esters et amides monomères, dimères et bipolaires qui sont encore étudiés à l'échelle du laboratoire montrent des applications prometteuses en cosmétologie, en imprimerie et dans les domaines pharmaceutique et médical. Un autre avantage des dérivés de la glycine bétaine est sans doute la diversité de structures. Cependant, ces dérivés tensioactifs de la glycine bétaine sont

obtenus par voie chimique. La voie biotechnologique exploitant les capacités de synthèse à l'aide d'enzymes est à explorer du fait qu'elle peut fournir des produits plus respectueux de l'environnement, bien que leur coût de production soit élevé.

## 5. Bibliographie

Atkinson W., Slow S., Elmslie J., Lever M., Chambers S.T., George P.M. (2009). Dietary and supplementary betaine: effects on betaine and homocysteine concentrations in males. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **16**, 1-7.

Auzély-Velty R., Rinaudo M., 2003. Synthesis of starch derivatives with labile cationic groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, **31**, 123-129.

Banu M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. (2009). Proline and glycine betaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 146-156.

Basheva E.S., Ganchev D., Denkov N.D., Kasuga K., Satoh N. and Tsujii K. (2000). Role of betaine as foam booster in the presence of silicone oil drops. *Langmuir*, **16**, 1000-1013.

Berchel M., Lemiègre L., Trépout S., Lambert O., Jeftic J., Benvegnu T. (2008). Synthesis of unsymmetrical saturated or diacetylenic cationic bolaamphiphiles. *Tetrahedron Letters*, **49**, 7419-7422.

Chen Y., Liu Y., Guo R. (2009). Aggregation behavior of amino acid-derive bolaamphiphile and conventional surfactant mixed system. *Journal of Colloid and Interface Science*, **336**, 766-772.

Delgado C., Merchán M.D., Velázquez M.M., Anaya J. (2006). Effect of surfactant structure on the adsorption of carboxybetaines at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **280**, 17-22.

Estrine B., Ernenwen C., Bresin A., Wintrebert A., Plusquellec D., Benvegnu T. (2004). Nouvelle famille de composition à base de polyglycosides d'alkyle et de composés dérivés de la glycine bétaine ; utilisation comme agent tensioactif. Brevet FR n°04 04741 du 4 mai (ARD, ENSCR) ; WO 2005 121294.

Fischer P., Wu H. (2008). Morphological transitions in dilute solutions of sugar-based zwitterionic dimer betaine surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **326**, 103-108.

Floch V., Legros N., Loisel S., Guillaume C., Guilbot J., Benvegnu T., Ferrieres V., Plusquellec D., Ferec C. (1998). New biocompatible cationic amphiphiles derivative from glycine betaine: a novel family of efficient nonviral gene transfer agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **251**, 360-365.

Gilot D., Miramon M.L., Benvegnu T., Ferrieres V., Loreal O., Guguen-Guillouzo C., Plusquellec D., Loyer P. (2002). Cationic lipids derived from glycine betaine promote efficient and nontoxic gene transfection in cultured hepatocytes. *The Journal of Gene Medicine*, **4**, 415-427.

Gliozzi A., Relini A., Chong P.L. (2002). Structure and permeability properties of biomimetic membranes of bolaform archaeal tetraether lipids. *Journal of Membrane Science*, **206**, 131-147.

Ghosh K.K., Pandey A., Roy S. (2000). Micellar kinetics of hydrolysis of hydroxamic acids in zwitterionic sulfobetaine surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **163**, 293-300.

Granö H., Yli-Kauhaluoma J., Suortti T., Käki J, Nurmi K. (2000). Preparation of starch betainate: a novel cationic starch derivative. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 277-283.

Guan J.Q., Li X.Y., Tung C.H. (1997). Novel zwitterionic surfactants: synthesis and surface active properties of N-(3-alkoxy-2-hydroxypropyl)-N,N-dimethyl glycine betaines. *Chinese Chemical Letters*, **8**, 499-502.

Hall-Manning T.J., Holland G.H., Rennie G., Revell P., Hines J., Barratt M.D. and Basketter D.A. (1998). Skin irritation potential of mixed surfactant systems. *Food and Chemical Toxicology*, **36**, 233-238.

Hines J.D., Fragneto G., Thomas R.K., Garrett P.R., Rennie G.K., and Rennie A.R. (1997). Neutron reflection from mixtures of sodium dodecyl sulfate and dodecyl betaine adsorbed at the hydrophobic solid/aqueous interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **189**, 259-267.

Holappa J., Hjalmarsson M., Masson M., Ögmundur Runarsson, Asplund T., Soininen P., Nevalainen T., Järvinen T. (2006). Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. *Carbohydrate Polymers*, **65**, 114-118.

Im S.H., Jeong Y.H., Ryoo J.J. (2008). Simultaneous analysis of anionic, amphoteric, nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS. *Analytica Chimica Acta*, **619**, 129-136.

Koike R., Kitagawa F., Otsuka K. (2007). Simultaneous determination of amphoteric surfactants in detergents by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, **1139**, 136-142.

Korjamo T., Holappa J., Taimisto S., Savolainen J., Järvinen T., Mönkkönen J. (2008). Effect of N-betainate and N-piperazine derivatives of chitosan on the paracellular transport of mannitol in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **35**, 226-234.

Lever M., Atkinson W., George P.M., Chambers S.T. (2007). An abnormal urinary excretion of glycine betaine may persist for years. *Clinical Biochemistry*, **40**, 798-801.

Li K.T., Liu D.H., Li Y.L., Chu J., Wang Y.H., Ying-Ping Zhuang Y.P., Zhang S.L. (2008). Improved large-scale production of vitamin B12 by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding. *Bioresource Technology*, **99**, 8516-8520.

Li Y., Xu G., Luan Y., Yuan S., Zhang Z. (2005). Studies on the interaction between tetradecyl dimethyl betaine and sodium carboxymethyl cellulose by DPD simulations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **257-258**, 385-390.

Likes R., Madl R.L., Zeisel S.H., Craig S.A.S. (2007). The betaine and choline content of a whole wheat flour compared to other mill streams. *Journal of Cereal Science*, **46**, 93-95.

Lundberg D., Ljusberg-Wahren H., Norlin A., Holmberg K. (2004). Studies on dodecyl betainate in combination with its degradation products or with phosphatidyl choline-phase behavior and hemolytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, **278**, 478-487.

Meister A., Blume A. (2007). Self-assembly of bipolar amphiphiles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **12**, 138-147.

Mohlin K., Karlsson P., Holmberg K. (2006). Use of cleavable surfactants for alkyl ketene dimmer (AKD) dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **274**, 200-210.

Montalbetti C.A.G.N., Falque V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **61**, 10827-10852.

Mosae Selvakumar P., Suresh E., Subramanian P.S. (2009). Hydrogen bonded helices: synthesis, crystal structure and self-assembled microtubes. *Journal of Molecular Structure*, **919**, 72-78.

Mourya V.K., Inamdar N.N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, **68**, 1013-1051.

Noiret N., Benvegno T., Plusquellec D. (2002). Tensioactifs à base de substances renouvelables. *Actualité Chimique*, **258-259**, 70-75.

Paria S. (2008). Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science*, **138**, 24-58.

Peddie B.A., Wong-She J., Randall K., Lever M., Chambers S.T. (1998). Osmoprotective properties and accumulation of betaine analogues by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, **160**, 25-30.

Sakai K., Kaji M., Takamatsu Y., Tsuchiya K., Torigoe K., Tsubone K., Yoshimura T., Kunio Esumi K., Sakai, H. Abe M. (2009). Fluorocarbon-hydrocarbon gemini surfactant mixtures in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and engineering Aspects*, **333**, 26-31.

Söderlund T., Zhu K., Jutila A., Paavo K.J. Kinnunen P.K.J. (2002). Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, **26**, 75-83.

Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A. (2007). New approach to the quaternization of chitosan and its amphiphilic derivatives. *European Polymer Journal*, **43**, 2414-2421.

Storer M.K., McEntyre C.J., Lever M. (2006). Separation of cationic aracyl derivatives of betaines and related compounds. *Journal of Chromatography A*, **1104**, 263-271.

Tegeler A., Ruess W., Gmahl E. (1995). Determination of amphoteric surfactants in cosmetic cleansing products by high-performance liquid chromatography on a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A*, **715**, 195-198.

Tehrani-Bagha A.R., Oskarsson H., van Ginkel C.G., Holmberg K. (2007a). Cationic ester-containing gemini surfactants: chemical hydrolysis and biodegradation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **312**, 444-452.

Tehrani-Bagha A.R., Bahrami HMovassagh B., Arami M., SAMirshahi S.H., Menger F.M. (2007b). Dynamic adsorption of gemini and conventional cationic surfactants onto polyacrylonitrile. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **307**, 121-127.

Vodolazkaya N.A., Mchedlov-Petrosyan N.O., Heckenkemper G., Reichardt C. (2003). A new solvatochromic/acid-base indicator for surfactant micellar media: hydrophilic 3-pyridyl substituted pyridinium N-phenolate betaine dye. *Journal of Molecular Liquids*, **107**, 221-234.

Ward R.K., Hubbard A.W., Sulley H., Garle M.J. and Clothier R.H. (1998). Human keratinocyte cultures in an *in vitro* approach for the assessment of surfactant-induced irritation. *Toxicology in Vitro*, **12**, 163-173.

Wood K.V., Bonham C.C., Miles D., Rothwell A.P., Peel G., Wood B.C., Rhodes D. (2002). Characterization of betaines using electrospray MS/MS. *Phytochemistry*, **59**, 759-765.

Wydro P., Paluch M. (2005). A study of the interaction of dodecyl sulfobetaine with cationic and anionic surfactant in mixed micelles and monolayers at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **286**, 387-391.

Yagisawa M., Doi Y., Uenohara T., Toda M., Shigematsu N., Nakata R. (2006). Betaine supplementation suppresses plasma homocysteine level elevation induced by folate deficiency in rats. *Nutrition Research*, **26**, 266-270.

Zhou Q., Somasundaran P. (2009). Synergistic of mixtures of cationic gemini and nonionic sugar-based surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, **331**, 288-294.

### **III. Synthèse et étude des propriétés interfaciales d'esters tensioactifs dérivés de la glycine bétaine (les chlorures d'alkylbétainate)**

**Les principaux résultats ont été publiés dans cet article :**

Publication II

Nsimba Zakanda F., Laurent P., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2011). Alkylbetainate chloride: Synthesis and behavior of monolayers at the air-water interface. *Thin Solid Films*, 520, 344-350.

## Objectif et stratégie expérimentale

L'objectif de ce premier volet était d'obtenir des chlorures d'alkylbétaines ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) (non disponibles sur le marché) en vue d'étudier les propriétés de leur film monomoléculaire et leur organisation interfaciale. Ainsi, une nouvelle méthodologie pour la synthèse chimique de  $C_nBC$  a été mise en oeuvre en utilisant des réactifs plus respectueux de l'environnement (la bétaine, le chlorure de thionyle et les alcools gras) que ceux utilisés précédemment (le chlorure de chloroacétyle, la triméthylamine et les alcools gras). Le chlorure d'hexadécylbétaine ( $C_{16}BC$ ) a été premièrement synthétisé et ses conditions de synthèse ont été optimisées. Les autres membres de la série homologue, le chlorure de décylbétaine ( $C_{10}BC$ ), le chlorure de dodécylbétaine ( $C_{12}BC$ ) et le chlorure de tétradécylbétaine ( $C_{14}BC$ ), ont été synthétisés en utilisant les conditions optimales de la synthèse de  $C_{16}BC$ . Les différents produits ont été purifiés et contrôlés par HPLC et caractérisés par spectroscopie infra-rouge, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire.

Ensuite, les propriétés de surface des  $C_nBC$  ont été caractérisées au moyen de l'étude de leurs isothermes de compression de pression de surface ( $\Pi$ ) en fonction de l'aire moléculaire ( $A$ ) à l'interface air-eau. La Balance à Film de Langmuir a été utilisée à cette fin. L'influence des conditions de la sous-phase aqueuse incluant le pH, la température, la présence de sels de sodium (contenant différents anions monovalents et divalents) et la force ionique sur les propriétés des films monomoléculaires (aire moléculaire, compressibilité, stabilité) de  $C_{16}BC$  à l'interface air-eau a été investiguée.

Les paramètres physico-chimiques étudiés sont :

- $A_0$  : aire moléculaire à laquelle les molécules passent de la phase gazeuse à l'état liquide expansé
- $A_c$  : aire moléculaire au 'collapse'
- $\Pi_c$  : pression de surface au 'collapse'
- $C_s^{-1}$  : module de compressibilité (l'inverse de l'élasticité de la monocouche)

## **Principaux résultats**

Les conditions optimales de synthèse de C<sub>16</sub>BC ont été déterminées et correspondent à une absence de catalyseur/base, un solvant de polarité moyenne (le méthyl-2-butanol-2), un rapport molaire dichlorure de bétaïne/1-hexadecanol de 3/1, une température de 45°C et une concentration en réactants de 0,132 mol/L.

Le C<sub>10</sub>BC et le C<sub>12</sub>BC n'ont pas été en mesure de former des monocouches insolubles à l'interface air-eau à 20°C tandis que le C<sub>14</sub>BC et le C<sub>16</sub>BC ont formé des monocouches insolubles dans les conditions de l'étude.

La monocouche de C<sub>16</sub>BC n'a pas été influencée par le pH, les anions monovalents du sel de sodium comparativement à celle formée dans l'eau (comme sous-phase). Par contre, elle est légèrement influencée en termes d'occupation de l'interface par la température, les anions divalents et la force ionique. Globalement, les conditions expérimentales ont un faible effet sur les monocouches de C<sub>16</sub>BC en terme stabilité.

## **Alkylbetainate chlorides: synthesis and behaviour of monolayers at the air-water interface**

Francis Nsimba Zakanda<sup>a,b</sup>, Pascal Laurent<sup>a</sup>, Michel Paquot<sup>a</sup>, Georges Mvumbi Lelo<sup>b</sup>, Magali Deleu<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 2 Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Service de Biochimie, Département des Sciences de Base, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa B.P.127 Kinshasa XI, R.D. Congo

\*Corresponding author

Phone : (32) 81 62 22 32

Fax : (32) 81 62 22 31

E-mail : Magali.Deleu@ulg.ac.be

*Les commentaires complémentaires à l'article original ont été mis en italique*

## **Abstract**

In this study, cationic alkylbetainate chloride surfactants ( $C_nBC$ ,  $n=10-16$ ) are synthesized using more environment-friendly reagents (glycine betaine, thionyl chloride and primary alcohols) than in previous works (chloroacetyl chloride, trimethylamine and primary alcohols). The interfacial behavior of the  $C_nBC$  monolayers is studied onto aqueous subphases at 20 °C using the Langmuir trough technique. Different experimental conditions including pH, temperature, sodium salts and  $Na_2SO_4$  ionic strength are investigated.

The results obtained have shown that the  $C_nBC$  with a hydrocarbon chain length  $\geq 14$  are able to form insoluble monolayers. The  $C_{16}BC$  monolayer stability checked by the compression–expansion cycles has shown a superimposition of isotherms in the whole liquid-condensed region and an irreversible rearrangement of the molecules at high compression. The  $C_{16}BC$  monolayer is not influenced by the pH and the presence of monovalent anions but it is influenced by the temperature, the divalent anions and the ionic strength. It has exhibited a great stability whatever the experimental conditions.

## 1. Introduction

Surfactants are continuously being created in order to obtain materials with specific physicochemical properties for targeted applications (Samakande *et al.*, 2008). Among them, cationic surfactants have shown their commercial potential as bacteriostatic agents (Rosen, 1989). They play an important role as sanitizing and antiseptic agents as well as components in cosmetic formulations as surfactants and antibacterial agents and are also used as cationic softeners, lubricants, retarding agents and antistatic agents in numerous sectors (Mata *et al.*, 2005).

Quaternary ammonium surfactants are widely employed in pharmaceutical and cosmetic industries and in many applications where they come into contact with the skin. They are important ingredients that are frequently formulated into hair care products to modify the properties of hair surface (Wang *et al.*, 1987). Furthermore, these surfactants have been included in liposomes in order to obtain cationic liposomes which have the ability to transfer DNA into cells through fusion with the cell membranes (de la Maza *et al.*, 1995) or to form spontaneously complexes with DNA and RNA (Ran *et al.*, 2009).

As a consequence of their widespread use and strong resistance to biodegradation, chemical surfactants like quaternary ammonium ones may persist in wastewater treatment systems at relatively high concentrations (Pettersson *et al.*, 2000; Majewska-Nowak *et al.*, 2005). They can cause a disturbance of the ecological equilibrium, due to toxic impacts on aquatic organisms (Heinig *et al.*, 1996). In order to meet legislative requirements and to discharge harmless effluents into the river, cleavable surfactants are of increasing interest today because of their higher biodegradability (Chou *et al.*, 2008).

In this context, glycine betaine (N,N,N-trimethylglycine) also called betaine is an interesting candidate for the production of surfactants with a low environmental impact. It is present in various plants, animals and microorganisms and plays an important role in osmotic stress resistance in these organisms (Huang *et al.*, 2008). This molecule is a human nutrient and is used in the treatment of various diseases such as homocystinuria and homocystenemia (Schwab *et al.*, 2006; Yagisawa *et al.*, 2006), cardiovascular diseases, depression and other mental disorders, seizures and arthritis (Stepnova *et al.*, 2007). Furthermore, betaine

supplementation decreased the hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in adult male rats (Kim *et al.*, 2002).

Previous works have synthesized the alkylbetainates using chloroacetyl chloride [ $\text{ClCH}_2\text{COCl}$  with  $\text{LC}_{50}=660$  ppm (Rusch *et al.*, 2009)], trimethylamine (TEA) and primary alcohols as reagents. CAC and TEA are respectively toxic and harmful by inhalation (Öberg *et al.*, 2010). Wastewater containing TEA causes environmental pollution problems and adverse effects on aquatic ecology. In addition, TEA is malodorous, can endanger human health and has been considered to be a possible

Carcinogen (Belin *et al.*, 1983; Aimin *et al.*, 1999). Data concerning critical micelle concentration (CMC), foaming and dispersing properties of the alkylbetainates exist in the literature (Rozycka-Roszak *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1992; Lundberg *et al.*, 2004; Mohlin *et al.*, 2006; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2009). Their low CMC and their high foaming and dispersing powers demonstrate their high potential as formulating agents. Recently, a review of synthesis methods and potentialities of application of glycine betaine based surfactants has been published (Nsimba zakanda *et al.*, 2010).

Data concerning the interfacial organization at the air–water interface of the alkylbetainates are not available. From a fundamental point of view, these data provide information on the molecular packing and on the intermolecular forces operating at the interface.

The objective of the present paper is twofold. First, the synthesis of the alkylbetainate chlorides ( $\text{C}_n\text{BC}$ ,  $n=10\text{--}16$ ) is performed using more environment-friendly reagents than in previous works (glycine betaine, thionyl chloride [with  $\text{LC}_{50}=1277$  ppm (Rusch *et al.*, 2009)] and primary alcohols). The major factors affecting the esterification degree (the effect of basic catalysts, the nature of the solvent, the acid chloride/alcohol molar ratio, the temperature and the initial reactant concentration) are examined for the optimization of the hexadecylbetainate chloride ( $\text{C}_{16}\text{BC}$ ) synthesis. Decylbetainate chloride ( $\text{C}_{10}\text{BC}$ ), dodecylbetainate chloride ( $\text{C}_{12}\text{BC}$ ) and tetradecylbetainate chloride ( $\text{C}_{14}\text{BC}$ ) are synthesized using the optimum conditions obtained for the synthesis of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$ . Second, surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherms of the  $\text{C}_n\text{BC}$  are studied at the air–water interface by using the Langmuir trough technique. The influence of the environmental conditions (pH, temperature, anion types and ionic strength) on the monolayer interfacial properties of  $\text{C}_{16}\text{BC}$ , exhibiting the best foaming properties (Itoh *et al.*, 2009), is investigated. The study gives insights about the key

parameters to take into account for the formulation of the alkylbetainate-based preparations for instance for cosmetic and pharmaceutical purposes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The following compounds are commercially available. Glycine betaine (99% purity), thionyl chloride, 1-decanol, 1-dodecanol, 1-tetradecanol and 1-hexadecanol are purchased from Aldrich. All the reagents and solvents used are of the highest grade and are used as received. Ultra pure water with a resistivity of 18.2 M $\Omega$ .cm is used in all the experiments.

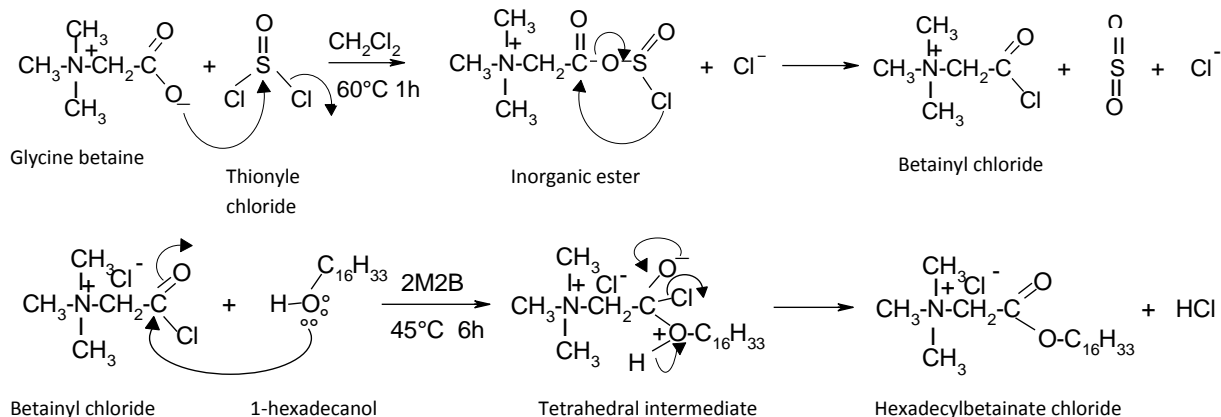
### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Synthesis of betainyl chloride

The first step of C<sub>16</sub>BC synthesis is the preparation of the betainyl chloride. Betainyl chloride is prepared according to the method described in the literature (Granö *et al.*, 2000). Anhydrous betaine (20.0 g, 0.171 mol) is suspended in 30 mL of dichloromethane in a three-necked round bottomed flask. Thionyl chloride (30 mL, 0.411 mol) is added dropwise under constant stirring during a period of 60 min. The reaction has proceeded at 60 °C in a water bath, until the emission of sulfur dioxide has ceased. Both thionyl chloride and solvent in excess are then removed by evaporation under reduced pressure. The product is washed four times with 100 mL of n-hexane with subsequent removal of the solvent by decantation. The crude product is dried in vacuum to afford 28.6 g of white powder.

#### 2.2.2. Synthesis of hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC)

Betainyl chloride, 1-hexadecanol and solvent (1,4-dioxan, acetonitrile, 2-methyl-2-butanol (2M2B), dichloromethane or n-hexan) are mixed at 200 rpm. The reaction mixture is heated up to different temperatures (25, 35, 45, 55 or 65 °C) in a water bath and stirred for 7.5 h at the most. Different catalysts (None, dimethylaminopyridine, pyridine or triethylamine), reactant concentrations and betainyl chloride/1-hexadecanol molar ratios are tested. The reaction mixture is allowed to cool to room temperature before the solvent is decanted. The crude product is purified by preparative HPLC (acetonitrile/water 10:90 v/v, 20 mL/min and 30 °C) to give C<sub>16</sub>BC. Scheme 1 shows the reaction routes for the synthesis of betainyl chloride and C<sub>16</sub>BC and proposed the mechanisms of reactions.



**Scheme 1.** Synthesis routes of betainyl chloride and hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) with the optimal parameters.

*The mechanisms of reaction involved in the synthesis of hexadecylbetainate chloride from glycine betaine via betainyl chloride with 1-hexadecanol (Scheme 1) are as followed:*

*In the first reaction, the nucleophilic attack of the oxygen of glycine betaine's carboxylate group on the sulfur atom of thionyl chloride lead to the formation of the inorganic ester and the chloride ion. The attack of the chloride atom of the inorganic ester on the carbonyl group of the same molecule forms the betainyl chloride and the sulfur dioxide. In the second reaction, the nucleophilic attack of 1-hexadecanol's hydroxyl group on the carbonyl group of betainyl chloride lead to the formation of the tetrahedral intermediate. Elimination of the chloride ion and deprotonation of this intermediate produce the hexadecylbetainate chloride and the hydrochloric acid (McMurry, 2000).*

### 2.2.3. Chemical characterization

The structure of the final product is confirmed by infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The IR spectra are recorded with a Bruker IFS 25 instrument as KBr pellets. Mass spectra were acquired on a High Capacity Ion Trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source. Best results were obtained in positive mode with capillary, nebulizer pressure, drying gas flow, and drying gas temperature set to 66.0 nA, 40.0 psi (nitrogen), 9.0 L min<sup>-1</sup> (nitrogen) and 365°C, respectively. The scan range was adjusted tom/z 50–3000 and the target mass set tom/z 500. MS data were recorded and processed using

Bruker Daltonics data analysis software, version 3.0. NMR spectra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY, HSQC and HMBC) are recorded in deuteriomethanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) at 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) with a Varian instrument and are reported in ppm from internal tetramethylsilane on the  $\delta$  scale. Data are reported as follows: chemical shift [multiplicity: singlet (s), triplet (t), quintuplet (quint), multiplet (m)].

#### 2.2.4. $\Pi$ -A isotherm

The  $\Pi$ -A isotherms are recorded by means of an automated Langmuir trough (KSV Minitrough, width: 75 mm, area: 24,225 mm<sup>2</sup>, KSV Instruments, Helsinki, Finland) enclosed in a plexiglass box to reduce film contamination and equipped with a platinum plate attached to a Wilhelmy type balance. A symmetric compression is achieved with two moving barriers at a constant rate of 10 mm/min. Before each experiment, the trough is cleaned with 2-propanol and rinsed thoroughly with ultra pure water. The cleanliness of the system is confirmed by checking the surface pressure over the surface compression of the pure subphase. The temperature of the subphase is maintained at the desired value by circulating water through the base of the trough. The spreading solution is prepared in chloroform/methanol (2:1 v/v) and is dispensed as tiny droplets to produce a uniform monolayer. The compression is started 15 min after spreading the amphiphile solution to allow complete evaporation of the solvent and to reach equilibrium with the desired experimental temperature. The reproducibility of the  $\Pi$ -A isotherms is checked by repeated recordings and the relative standard deviation in surface pressure and area is found to be  $\leq 3\%$ .

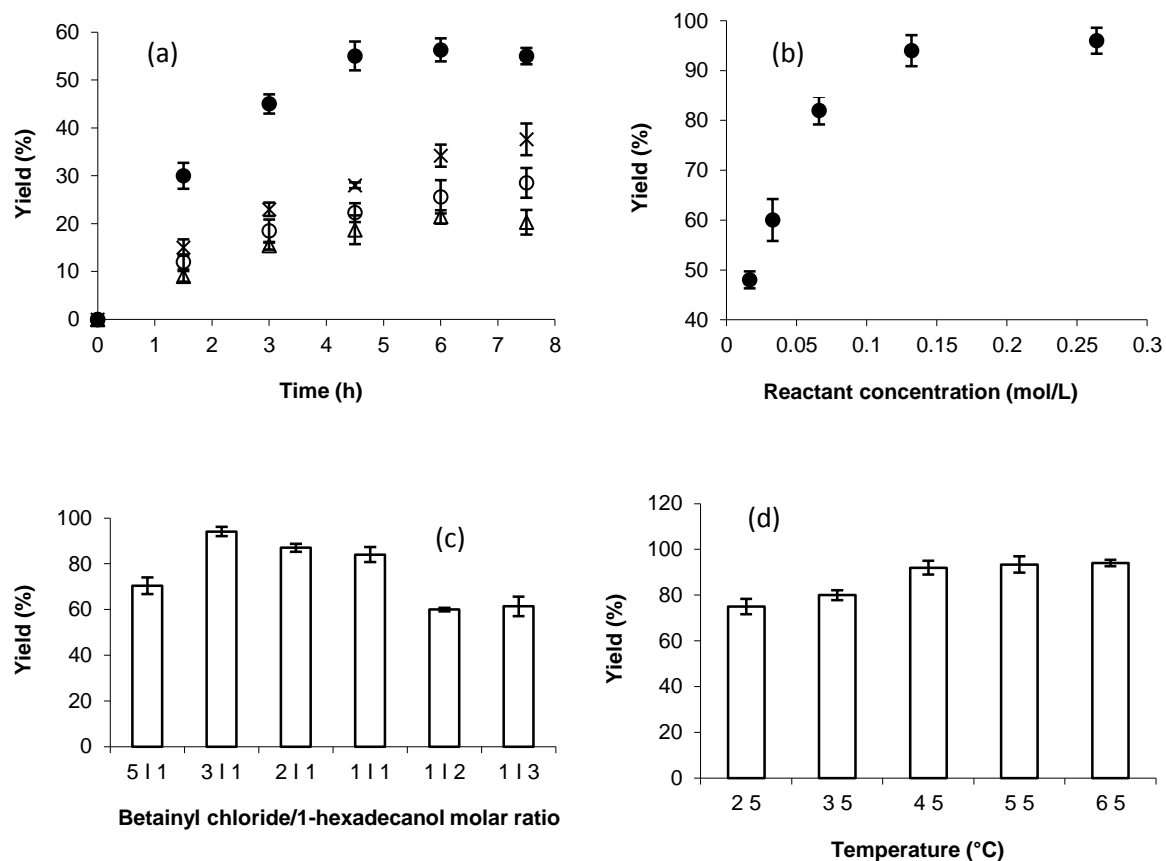
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis

Glycine betaine has a very low reactivity for direct esterification with alcohol. It is commonly used in an activated form and then subjected to alcoholysis (Auzély-Velty et al., 2003). Organic acids or carboxyl components can be activated as acyl halides, acyl azides, acylimidazole, anhydride, etc. Chlorinated reagents [ $\text{SOCl}_2$ ,  $(\text{COCl})_2$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$  or  $\text{POCl}_3$ ] are most frequently used to form acyl chlorides in an organic medium (Montalbetti et al., 2005). In most cases, thionyl chloride ( $\text{SOCl}_2$ ) is the reagent of choice, for practical reasons because this reagent does not give other by-products than gas. The principal product of the

reaction of glycine betaine with  $\text{SOCl}_2$  is betainyl chloride. The latter, very electrophilic, is very reactive than glycine betaine and is suitable to be subjected to alcoholysis.

Esterification of alcohols (primary and secondary) with acyl chlorides is complete and exhausts the limiting reagent (which can be either the alcohol or acid derivative). It is very fast, even at room temperature and is often the preferred method for the preparation of organic esters ([http://gwenaelm.free.fr/Physique/Physchim/capes/Doc/Julien\\_Lalande/O5.pdf](http://gwenaelm.free.fr/Physique/Physchim/capes/Doc/Julien_Lalande/O5.pdf)). This reaction is often performed in the presence of catalytic amount of one of the following bases (pyridine, dimethylaminopyridine, triethylamine, or N-bromosuccinimide) to accelerate the reaction or/and to trap the HCl formed (Granö *et al.*, 2000; Stagé *et al.*, 2002; Nakatsuji *et al.*, 2007; Razei *et al.*, 2007). In this work, hexadecylbetainate chloride is synthesized from glycine betaine via betainyl chloride with 1-hexadecanol. The second step of the reaction (Scheme 1) is optimized. The use or not of basic catalyst, the initial reactant concentration, the betainyl chloride/1-hexadecanol molar ratio, the nature of the organic solvent and the temperature are investigated. The combination of no basic catalyst (Figure 1a), an initial concentration of reactants of 0.132 mol/L (corresponding to 45.19 mg/mL) (Figure 1b), a 3:1 betainyl chloride/1-hexadecanol molar ratio (Figure 1c), a temperature of 45 °C (Figure 1d), the 2-methyl-2-butanol as organic solvent (data no shown) and a reaction time of 6 h has given the highest yield ( $94\pm 3\%$ ) of hexadecylbetainate chloride. Previous works have shown that acyl chlorides have high reactivity (Dieter, 1999; Auzély-Velty *et al.*, 2003) and cationic esters are more stable in acidic medium (Auzély-Velty *et al.*, 2003; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007). The second step of the reaction (Scheme 1) produced a strong acid (HCl) which stabilized the final product and could play a role of acid catalyst. Other works have also shown that a high yield of ester (e.g., Octyl acetate) has been obtained with strong acid (sulfuric acid, p-toluenesulfonic acid) as catalyst (Ganeshpure *et al.*, 2008; Marchetti *et al.*, 2008). The other alkylbetainate chlorides (decylbetainate chloride ( $\text{C}_{10}\text{BC}$ ), dodecylbetainate chloride ( $\text{C}_{12}\text{BC}$ ) and tetradecylbetainate chloride ( $\text{C}_{14}\text{BC}$ )) are synthesized using the optimized conditions for the synthesis of  $\text{C}_{16}\text{BC}$ .

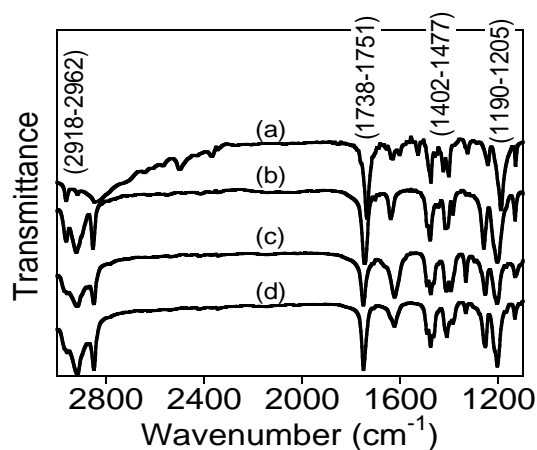


**Figure 1.** Yield of hexadecylbetainate produced from betainyl chloride and 1-hexadecanol (a) Effect of basic catalysts at 0.066 mol/L – (●) No catalyst; (×) dimethylaminopyridine; (○) pyridine; (Δ) triethylamine; (b) Effect of reactant concentration (betainyl chloride and 1-hexadecanol at amolar ratio of 1:1); (c) Effect of molar ratio betainyl chloride to 1-hexadecanol; (d) Effect of temperature. When not specified, the reaction conditions are: betainyl chloride/1-hexadecanol molar ratio 1:1, concentration of reactants: 0.066 mol/L, solvent: 2-methyl-2-butanol, temperature: 45 °C, reaction time: 6 h and magnetic stirring: 200 rpm.

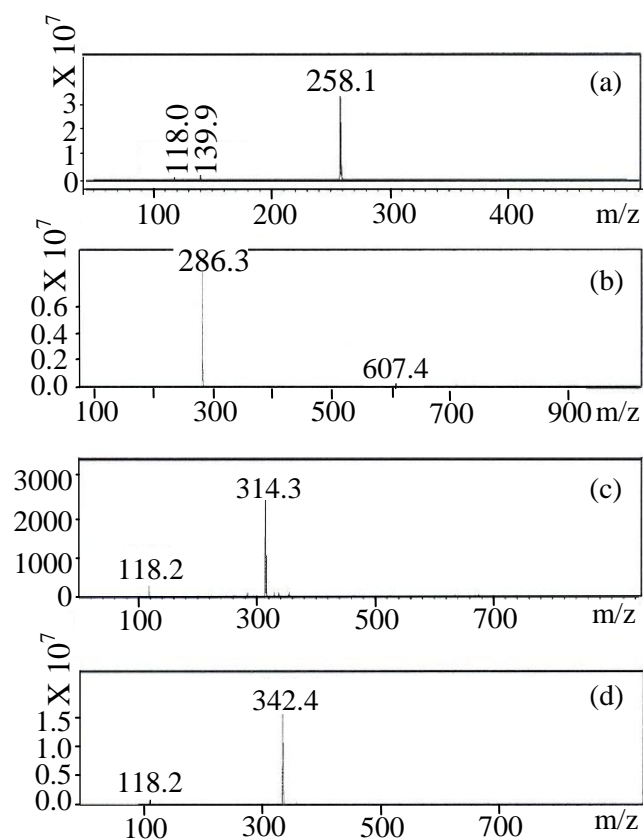
### 3.2. Chemical characterization

The high purity ( $\geq 97\%$ ) of  $C_nBC$  is checked by analytical HPLC ELSD and confirmed by NMR (data not shown). The chemical characterization is done by Infrared, Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance. A typical spectrum of betainyl chloride has displayed bands at 2958  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1739  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 675  $\text{cm}^{-1}$  (C-Cl). IR spectra of the synthesized  $C_nBC$  have displayed bands at 2918–2962  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, stretching), 1738–1751  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, stretching), 1402–1477  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, bending), 1190–1205  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, stretching) (Figure 2). Mass spectra have displayed the signals of the parent ions at  $m/z = 258.1$  ( $C_{10}BC$ ), 286.3 ( $C_{12}BC$ ), 314.3 ( $C_{14}BC$ ) and 342.4 ( $C_{16}BC$ ) (Figure 3). For illustration, only NMR data and spectra of  $C_{16}BC$  are given. Numbers 1 and 2 in the data refer to

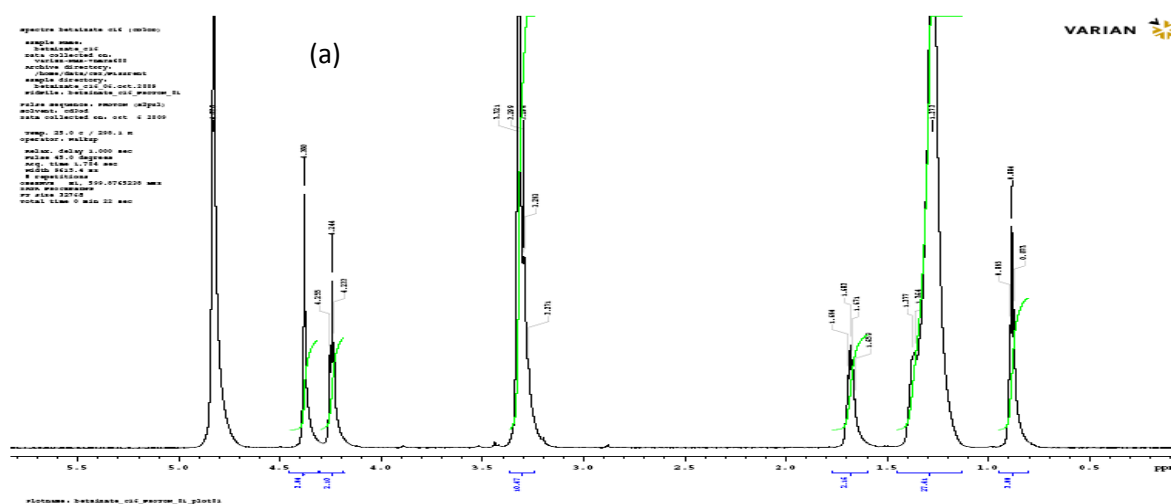
hydrogens and carbons of  $C_{16}BC$  coming from glycine betaine, while those from 1' to 16' refer to protons and carbons from 1-hexadecanol (see insert in Figure 4b):  $^1H$  NMR:  $\delta$  4.37 (s,  $CH_2$ -2), 4.25 (t, 6.6,  $CH_2$ -1'), 3.32 (s,  $^+NCH_3$ ), 1.69 (quint, 6.6,  $CH_2$ -2'), 1.38 (m,  $CH_2$ -3'), 1.31 (m,  $CH_2$ -15'), 1.28 (m,  $CH_2$ -4' to  $CH_2$ -13'), 1.27 (m,  $CH_2$ -14'), 0.89 (t, 6.6,  $CH_3$ -16').  $^{13}C$  NMR:  $\delta$  164.6 (C-1), 66.2 (C-1'), 62.8 (C-2), 53.1 ( $^+NCH_3$ ), 31.6 (C-14'), 29.3 (\*2), 29.2 (\*2), 29.0, 28.9 (C-4' to C-13'), 28.0 (C-2'), 25.4 (C-3'), 22.3 (C-15'), 13.0 (C-16').



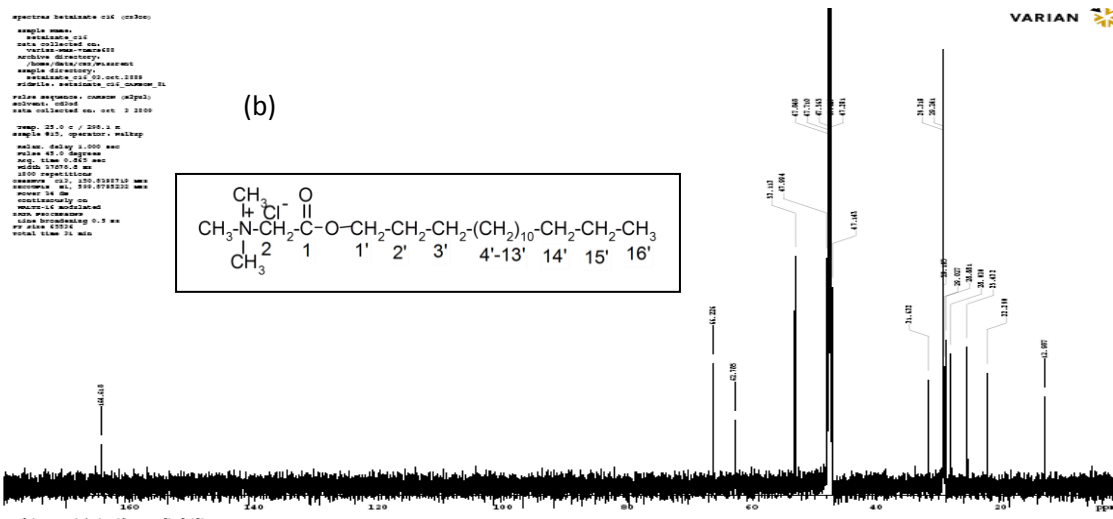
**Figure 2.** Infrared spectra of alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ): (a) Decylbetainate chloride ( $C_{10}BC$ ), (b) dodecylbetainate chloride ( $C_{12}BC$ ), (c) tetradecylbetainate chloride ( $C_{14}BC$ ) and (d) hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ )



**Figure 3.** Positive-ion ElectroSpray Ionization mass spectra of alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ): (a) Decylbetainate chloride ( $C_{10}BC$ ), (b) dodecylbetainate chloride ( $C_{12}BC$ ), (c) tetradecylbetainate chloride ( $C_{14}BC$ ) and (d) hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ).



*PULSE SEQUENCE, Relax. delay 1.000 sec, Pulse 45.0 degrees, Acq. time 1.704 sec, Width 9615.4 Hz 8 repetitions, OBSERVE H1, 599.8765238 DATA PROCESSING, FT size 32768 Total time 1 minute, Solvent: CD3OD, Temp. 25.0°C / 298.1°K, Operator: Walkup, VNMRS-600 "Varian\_WS"*



PULSE SEQUENCE, Relax. delay 1.000 sec, Pulse 45.0 degrees, Acq. time 0.865 sec Width 37878.8 Hz, 5000 repetitions, OBSERVE C13, 150.8390719, DECOUPLE H1, 599.8795232 Power 34 dB, continuously on, WALTZ-16 modulated, DATA PROCESSING, Line broadening 0.5 Hz FT size 65536, Total time 2.6 hours, Solvent: CDOD, Temp. 25.0°C / 298.1°K, VNMRS-600 "Varian\_WS"

Figure 4. NMR spectra of hexadecylbetainate (C<sub>16</sub>BC): proton (a) and carbon (b)

### 3.3. Interfacial properties of cationic alkylbetainate chlorides (C<sub>n</sub>BC) at the air–water interface

Π–A isotherms of pure C<sub>n</sub>BC are established at the air–water interface of a Langmuir trough to get insight into their interfacial organization. Four characteristic parameters are determined: the limiting area (A<sub>0</sub>) (i.e., the extrapolation of the Π–A curve to Π=0 mN/m corresponding to the theoretical area at which molecules leave the gaseous (G) state and adopt a liquid-expanded (LE) state (Eeman *et al.*, 2006), the area (A<sub>c</sub>) and the surface pressure (Π<sub>c</sub>) at the collapse of the monolayer as well as the two-dimensional compressibility modulus (C<sub>s</sub><sup>-1</sup>). C<sub>s</sub><sup>-1</sup> is calculated from Π–A data according to the following Equation 1:

$$C_s^{-1} = -A \cdot (\partial\Pi/\partial A) \quad \text{Equation 1}$$

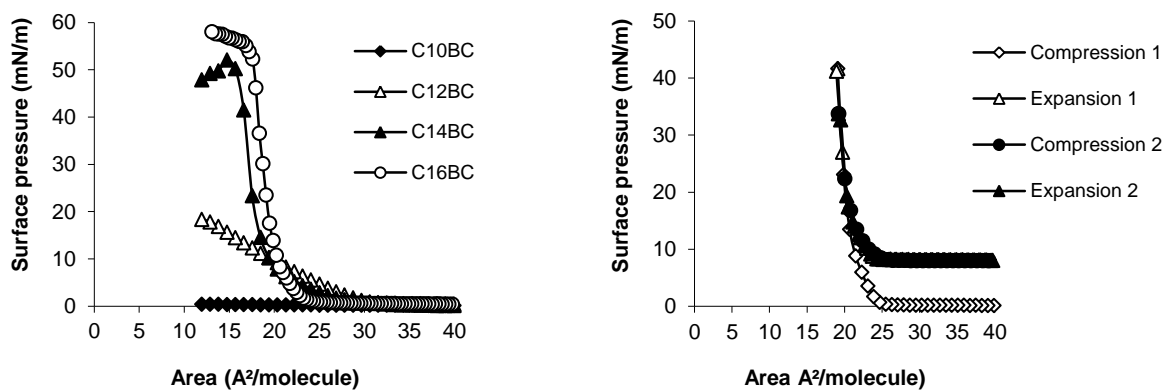
Where A is the area per molecule at the indicated surface pressure and Π is the corresponding surface pressure. This parameter is useful to characterize the phase state of the monolayer and to more clearly detect the phase transitions (He *et al.*, 2002). The value of C<sub>s</sub><sup>-1</sup> is approximately between 10–50 mN/m for a LE phase, 50–100 mN/m for an intermediate liquid (I), 100–250 mN/m for a liquid-condensed (LC) phase and 1000–2000 mN/m for a solid-condensed (S) monolayers (Davies *et al.*, 1963; Peltonen *et al.*, 2001). The compressibility modulus is the inverse of the monolayer elasticity, i.e. a low compressibility modulus

signifies a high interfacial elasticity (Spelios *et al.*, 2007), and consequently, a low monolayer stability.

Figure 5a shows the  $\Pi$ -A isotherms of spread  $C_n$ BC monolayers on a water subphase at 20 °C.  $C_{10}$ BC monolayer exhibits only a G phase and  $\Pi$  does not exceed 0.5 mN/m.  $C_{12}$ BC monolayer shows a G phase and a LE phase confirmed by the  $C_s^{-1}$  values (inset in Figure 5a). It is an indication of a certain degree of cooperative interaction between the molecules at the interface.  $\Pi$  starts deviating from zero at  $A_0 \sim 30 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ . At high compression, A and  $\Pi$  reach  $13.8 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and 16.9 mN/m, respectively (Table 1). Small monolayer areas and low surface pressures reached upon interface compression have been considered as characteristic of soluble monolayers at the air-water interface (Chou *et al.*, 2008). In our experimental conditions,  $C_{10}$ BC and  $C_{12}$ BC cannot form insoluble monolayers because the hydrophobicity of their alkyl chains is not high enough to prevent the progressive dissolving of the monolayer components into the subphase upon the interface compression as in the case of dodecyltrimethylammonium and sodium dodecyl sulfate monolayer at the air-water interface at 20 °C (McConlongue *et al.*, 1998). According to the shape of the isotherm and to the  $C_s^{-1}$  values (Figure 4a and inset),  $C_{14}$ BC and  $C_{16}$ BC monolayers present a G phase, a LE phase, a LC phase and a collapse point with increasing of  $\Pi$ . It points out that  $C_n$ BC with hydrocarbon chain  $\geq 14$  are able to form an insoluble monolayer at an air-water interface in spite of their high hydrophilic lipophilic balance value (HLB = 24.3) (Boen, 1998; Guo *et al.*, 2006) classifying them as water soluble surfactants.  $A_0$  are  $28.1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  for  $C_{14}$ BC and  $23.3 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  for  $C_{16}$ BC.  $A_c$  and  $\Pi_c$  of  $C_{14}$ BC are  $16.6 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and 41.5 mN/m while those of  $C_{16}$ BC are  $17.6 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and 52.3 mN/m (Table 1).  $C_{14}$ BC and  $C_{16}$ BC can thus adopt a tight packing at the interface. The small difference of interfacial occupation at low compression between  $C_{14}$ BC and  $C_{16}$ BC could be due to a better structuration of the molecules with a higher hydrocarbon chains due to van der Waals interaction increase. In the condensed state, the length of the hydrocarbon chain has no influence on the interfacial occupation suggesting that the chain is vertically oriented at the interface.  $\Pi_c$  increases with the hydrocarbon chain due to the increase of the van der Waals attractions. Comparatively to other ammonium containing surfactants like alkyltrimethylammonium bromides  $C_{14}$ TAB and  $C_{16}$ TAB,  $C_n$ BC occupy an area twice smaller.  $C_{14}$ TAB and  $C_{16}$ TAB at the air-water interface at 23 °C have a  $A_c$  of 47 and 43  $\text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $a\Pi_c$  of 35 and 32 mN/m, respectively (Bergeron, 1997). This is probably due to the difference of polarity between their head groups. The head groups of the  $C_n$ BC and the  $C_n$ TAB both contain a quaternary

trimethylammonium group but the formers bear an additional carboxylate moiety. They are thus more polar and are probably more deeply immersed in the water subphase than the head groups of the  $C_n$ TAB. The  $C_{16}$ BC monolayer exhibits a shape similar to the one of a nonionic surfactant (Nidome *et al.*, 2000) in spite of the positive charge in their polar head groups. The isotherm is approximately linear (vertical) characterized by a steep slope with the occurrence of a superliquid phase between 18.7 and 17.8  $\text{\AA}^2/\text{molecule}$  corresponding to  $\Pi=30.0$  and 46.0 mN/m with a maximum of  $C_s^{-1}$  equal to 464.4 mN/m at  $A=18.3$   $\text{\AA}^2/\text{molecule}$  and  $\Pi=36.6$  mN/m. It suggests that the positive head is deeply immersed in the water subphase. The repulsive interactions between the  $C_{16}$ BC polar heads are thus screened by water solvation resulting in the increase of the van der Waals forces between hydrophobic chains, leading consequently to a high  $\Pi_c$ .

To get further information about the solubility of the monolayer forming components in water, compression–expansion cycles of the  $C_{14}$ BC monolayer (data not shown) and  $C_{16}$ BC monolayer are performed (Figure 5b). The isotherms of the compression and expansion of the  $C_{16}$ BC monolayer are superimposed in the whole LC region confirming that no  $C_{16}$ BC molecule leaves the interface. Interestingly, the plateau previously observed at  $\sim 0$  mN/m still existed after expansion but has shifted to  $\sim 8$  mN/m. An irreversible ordered arrangement of surfactant molecules during the initial compression can be at the origin of this phenomenon. It was observed by Mallouri *et al.* (2008) with the monolayer of surface-active metal organic complexes. Upon expansion intermolecular attraction forces between the arranged molecules are still present and irreversible, resulting in a plateau with an increased surface pressure. The result obtained from compression–expansion cycles proves that the  $C_{16}$ BC molecules are remained at the interface upon compression indicating a high stability of the  $C_{16}$ BC monolayer. As  $C_{16}$ BC has been shown to develop the best performance as foaming agent (Itoh *et al.*, 2009), an in-depth interfacial analysis of this compound is performed. The influence of the environmental conditions (pH, temperature, anion type and ionic strength) on its monolayer interfacial properties is investigated.



**Figure 5.** (a) Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherm of alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ); Inset: compressibility modulus ( $C_s^{-1}$ ) as a function of  $\Pi$ ; (b) Compression–expansion cycles of hexadecylbetainate chloride deposited onto an aqueous subphase (pH 5.7) at 20 °C.

**Table 1.** Molecular area at take-off ( $A_0$ ) and surface pressure ( $\Pi_c$ ) at the collapse for the alkylbetainate chloride ( $C_nBC$ ) monolayers on aqueous subphase (pH 5.7) at 20°C

Parameters	$C_{10}BC$	$C_{12}BC$	$C_{14}BC$	$C_{16}BC$
$A_0$ ( $A^2$ :molecule)	-	30.3	28.1	23.3
$A_c$ ( $A^2$ /molecule)	-	13.8	16.6	17.6
$\Pi_c$ (mN/m)	-	16.9	41.5	52.3

The relative standard deviation in  $A$  and  $\Pi$  was  $\leq 3\%$ .

### 3.4. Influence of experimental conditions on the interfacial behavior of the $C_{16}BC$ monolayer

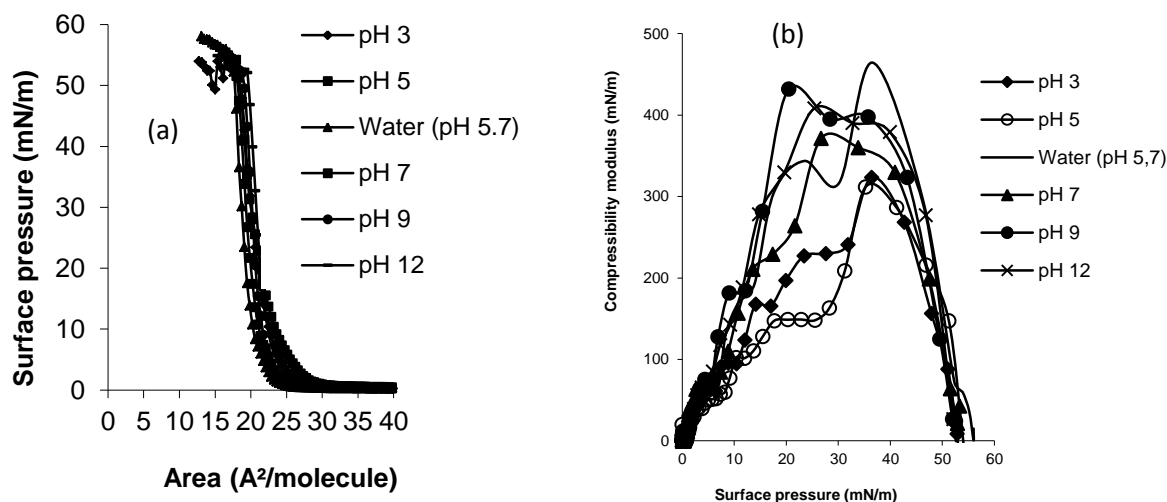
The structure and the stability of surfactant monolayers is known to be sensitive to the subphase pH particularly for ionic surfactants (Dhanabalan *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 2008) and temperature. Anions influence a wide range of interfacial phenomena including surface properties of salt solutions, colloid stability and adsorption of cationic surfactant at the air–water interface (Turshatov *et al.*, 2008).

#### 3.4.1. Influence of pH

Figure 6a shows the  $\Pi$ – $A$  isotherms of the  $C_{16}BC$  monolayers on water subphases with different pH values. The global shape is not greatly affected by the pH of the subphase. At pH below 7, the shape of the isotherms is slightly more tilted than at higher pH. Some small differences are observed for the characteristic parameters in Table 2a.  $A_0$  increases slightly

but significantly with the addition of HCl in the subphase. The addition of NaOH has no significant effect on  $A_0$ .  $A_c$  and  $\Pi_c$  are not significantly or very slightly influenced by the addition of chloride or hydroxide anions. The  $C_s^{-1}$  values obtained between 20 and 30 mN/m (Figure 6b) show that the  $C_{16}BC$  monolayer is less ordered at  $pH < 7$  and more ordered at  $pH > 7$  than in pure water. In other words, in presence of anions, the monolayer is more ordered with the hydroxide than with the chloride. For one specific anion, the order increases with its concentration in the medium. Although the charge of the quaternary ammonium cation is permanent and independent of the pH of the solution, the presence of anions like  $Cl^-$  and  $OH^-$  has a small but significant influence on the  $C_{16}BC$  interfacial organization and more particularly on its compressibility. Initial  $Cl^-$  ions in the subphase are in competition with water molecules. Additional  $Cl^-$  appear to dehydrate the  $C_{16}BC$  head groups by substitution of water molecules by  $Cl^-$ , inducing a steric effect in the interfacial film. This behavior was already observed for dodecylphosphocholine in the presence of  $Cl^-$  ions (Aroti *et al.*, 2007).

In water subphase ( $pH 5.7$ ), the addition of  $OH^-$  ions (low concentration) leads to their neutralization by protons forming water molecules. As the concentration of  $OH^-$  ions increases, the subphase is neutralized and initial  $Cl^-$  in competition with  $OH^-$  are progressively replaced by the latter which interact with  $C_{16}BC$  head groups. The final behavior of the monolayer is governed by the type of the counterion which is present in excess in the solution. The  $OH^-$  ions are highly hydrated in water (Abdel-Rahem *et al.*, 2005) and may interact strongly with the  $C_{16}BC$  head groups similar to that of 1,2-diacyl-3-trimethylammonium-propane which was found to be a strong water adsorber (Jendrasiak *et al.*, 2004). More hydrated ions seem to influence positively the order of  $C_{16}BC$  molecules at the interface.



**Figure 6.** Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherm of hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) monolayers deposited onto an aqueous subphase of different pH (a) and compressibility modulus ( $C_s^{-1}$ ) as a function of  $\Pi$  for the corresponding subphase conditions (b).

**Table 2.** Molecular area at take-off ( $A_0$ ), molecular area ( $A_c$ ) and surface pressure ( $\Pi_c$ ) at the collapse for the hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) monolayer on aqueous subphase with various pH (a) and with various temperatures (b).

(a)						
Parameters	Water	pH (with HCl or NaOH)				
	20°C	3	5	7	9	12
$A_0$ ( $A^2$ :molecule)	23.3	26.1	28.1	23.9	24.2	25.8
$A_c$ ( $A^2$ :molecule)	17.6	18.4	17.9	18.0	18.8	19.5
$\Pi_c$ (mN/m)	52.3	51.1	54.2	51.5	51.9	52.1

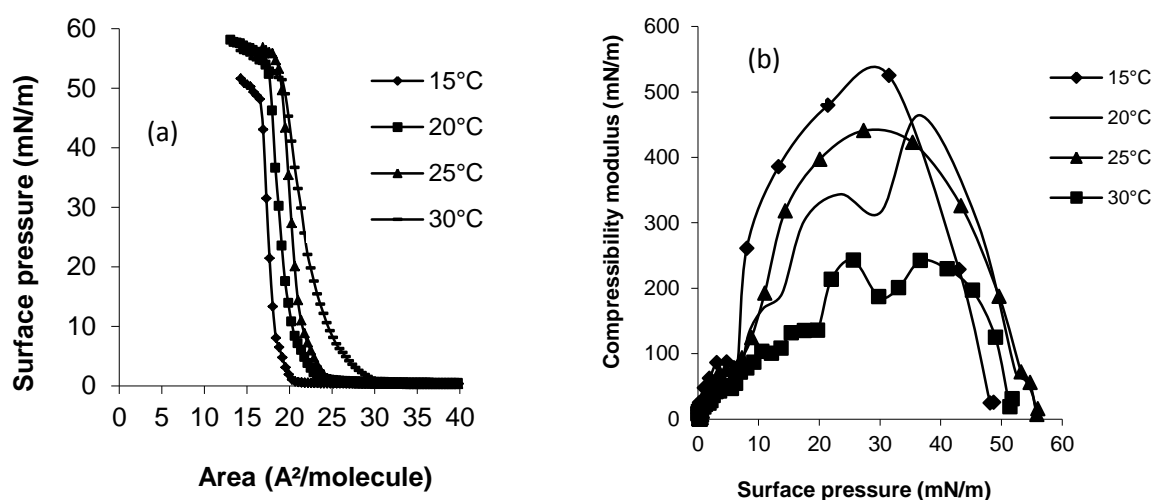
  

(b)				
Parameters	Temperature (°C)			
	15	20	25	30
$A_0$ ( $A^2$ :molecule)	20.2	23.3	24.0	29.5
$A_c$ ( $A^2$ :molecule)	16.5	17.6	18.7	19.1
$\Pi_c$ (mN/m)	48.2	52.3	53.3	51.4

### 3.4.2. Influence of temperature

Figure 7a shows the  $\Pi$ – $A$  isotherms of the  $C_{16}BC$  monolayer at different temperatures. The shape of the isotherms is not globally influenced by the temperature. The different states described for Figure 5a are observed whatever the temperature between 15 and 30 °C.

General interfacial organization of  $C_{16}BC$  molecules is thus not considerably modified by the heat input. However, significant differences are observed for the characteristic parameters (Table 2b).  $A_0$  increases from 15 to 30 °C and  $A_c$  increases with raising temperature up to 25 °C. The Brownian motion contributes to a higher surface occupied by the molecule up to 25 °C as would be expected from the increased thermal agitation of the molecules in the surface film (Rosen *et al.*, 1982). Above 25°C, a partial desorption of the molecules from the monolayer or a molecule aggregation into “surface micelles” at the interface can occur as discussed by Knauf and coworkers for alkyltrimethylammonium bromides (Knauf *et al.*, 2010) and for alkylaminomethyl rutin (He *et al.*, 2010).  $\Pi_c$  shows a maximum at 25°C reflecting a maximal stability of the film to the compression at this temperature. The sharp decrease of the  $C_s^{-1}$  values above 25 °C confirms this result (Figure 7b). Above this temperature, the interactions between the monolayer-forming components are strongly reduced due to high thermal agitation.



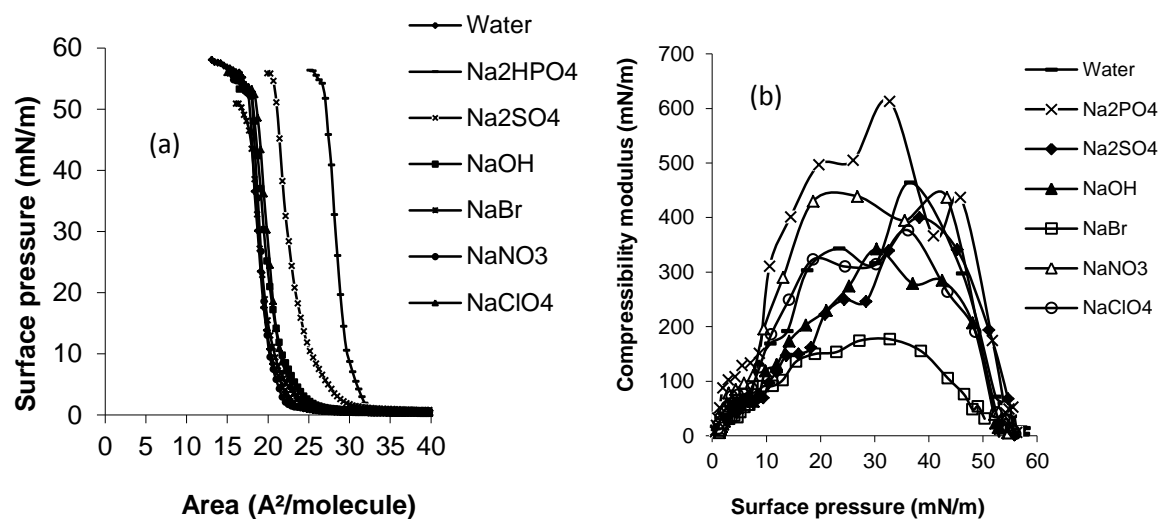
**Figure 7.** Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherm of hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) monolayers deposited onto an aqueous subphase of different temperatures (a), Compressibility modulus ( $C_s^{-1}$ ) as a function of  $\Pi$  for the corresponding subphase conditions (b).

### 3.4.3. Influence of anions

The influence of anion types on  $C_{16}BC$  monolayer isotherms is investigated using different sodium salts. All the monolayer isotherms have exhibited the three phases (G, LE and LC) (Figure 8a). Nevertheless, the characteristic parameters of the isotherms are in some cases different suggesting different types of interaction between the  $C_{16}BC$  head groups and the additional anions in competition with chloride anions in the subphase. Two different trends

are observable. Divalent anions ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) shift the isotherm to the right resulting in a higher  $A_0$  and  $A_c$  (Table 3a) while monovalent anions ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) do not influence the isotherms in comparison with the one recorded on pure water (Table 2a). This trend was also observed previously for monovalent anions in the case of viologen dication (1,1'-dioctadecyl-4,4'-bipyridilium) (Giner *et al.*, 2007).  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  give rise to a steric effect by penetrating within the interface between the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  head groups. Indeed, these anions have a high number of tightly bound water molecules, also called the apparent dynamic hydration number (ADHN) compared to the monovalent anions (Kiriukhim *et al.*, 2002). The ADHN is 1.83 for  $\text{SO}_4^{2-}$  and 3.95 for  $\text{HPO}_4^{2-}$ . This can explain the difference observed in the expansion of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  monolayer in the presence of these two anions. The ADHN is zero for  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{ClO}_4^-$  while it is 2.8 for  $\text{OH}^-$  which has the smallest ionic radius among the monovalent anions investigated (Li *et al.*, 2006).  $\Pi_c$  is not influenced by the presence of the monovalent and divalent anions in the subphase, except for  $\text{Br}^-$  (Table 2c). The interactions involved at this high compression state are thus not affected by them. It indicates that the stability of the monolayer at high compression is mainly governed by interactions between the hydrocarbon chains. The lower  $\Pi_c$  value for  $\text{Br}^-$  can be due to the formation of a structure other than a monolayer. Significant differences between the  $C_s^{-1}$  values are noticed for investigated anions (Figure 8b). At 30 mN/m, the  $C_s^{-1}$  of the monolayer in the presence of different anions can be classified as follows:  $\text{HPO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- \approx \text{Cl}^-$  (water)  $\approx \text{OH}^- \approx \text{SO}_4^{2-} > \text{Br}^-$ . According to the Hofmeister anion series ordered as follows:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  (Leontidis, 2002), anions on the left of  $\text{Cl}^-$ , which represents a borderline case, are water-structure-makers and reduce the solubility of macromolecules by inducing their crystallization while those on the right of  $\text{Cl}^-$  are water-structure-breakers and increase the solubility of macromolecules. They are respectively called kosmotrope and chaotrope. The result obtained in the present study show that  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{NO}_3^-$  have increased the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  monolayer  $C_s^{-1}$ .  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{OH}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  have slightly influenced the monolayer  $C_s^{-1}$  while  $\text{Br}^-$  has decreased it. According to Aroti *et al.* (Aroti *et al.*, 2007),  $\text{Br}^-$  and  $\text{NO}_3^-$  are considered as hydrophilic and kosmotropic ions. This consideration corroborates the result obtained in this work for  $\text{NO}_3^-$ , which has a stabilizing effect on  $\text{C}_{16}\text{BC}$  monolayer. The result obtained with  $\text{Br}^-$  ions is not obvious and may be due to dehydration of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  molecules with a decrease of the monolayer stability.  $\text{ClO}_4^-$  ions are hydrophobic ions and do not compete with hydrophilic  $\text{Cl}^-$ . The kind of interaction, the ionic radius, the ADHN and the hydrophobicity of the anion may explain the behavior of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  monolayer in the presence of the investigated anions. To further understand the effect

of divalent anions on the interfacial behavior of  $C_{16}BC$  monolayer, different  $Na_2SO_4$  concentrations are investigated in the following section.



**Figure 8.** Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherm of hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) monolayers deposited onto an aqueous subphase of different sodium salts (a) and compressibility modulus ( $C_s^{-1}$ ) as a function of  $\Pi$  for the corresponding subphase conditions (b).

**Table 3.** Molecular area at take-off ( $A_0$ ), molecular area ( $A_c$ ) and surface pressure ( $\Pi_c$ ) at the collapse for the hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) monolayer on aqueous subphase with various anions (a) and with various  $Na_2SO_4$  ionic strengths (b).

(a)						
Parameters	Anion (sodium salts, 2 mM)					
	$HPO_4^{2-}$	$SO_4^{2-}$	$OH^-$	$Br^-$	$NO_3^-$	$ClO_4^-$
$A_0$ (A <sup>2</sup> :molecule)	32.3	31.3	25.9	24.5	25.5	24.3
$A_c$ (A <sup>2</sup> :molecule)	26.6	20.7	17.9	17.7	18.0	18.4
$\Pi_c$ (mN/m)	54.2	54.6	52.3	46.5	52.1	52.4

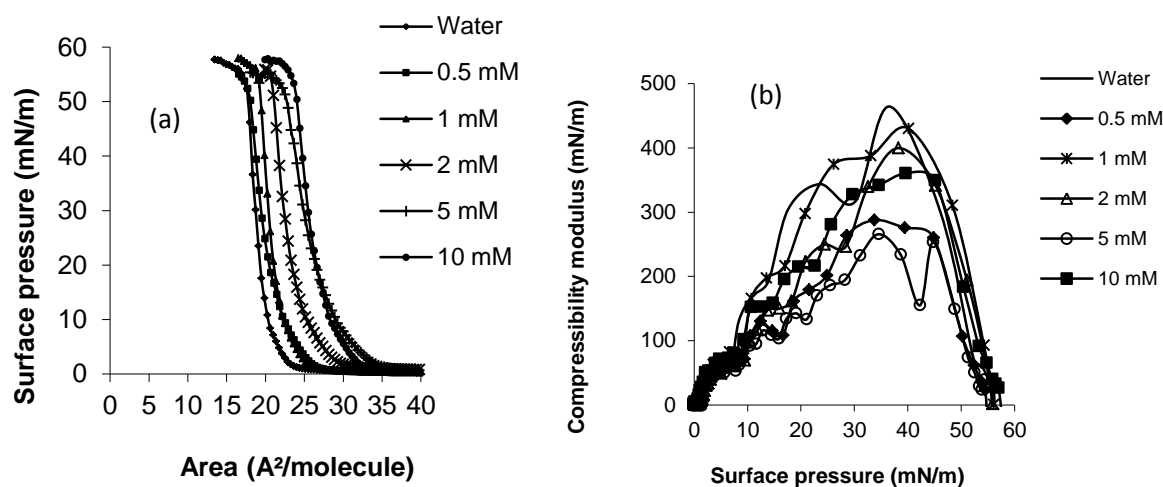
  

(b)					
Parameters	Ionic strength ( $Na_2SO_4$ , mM)				
	0.5	1	2	5	10
$A_0$ (A <sup>2</sup> :molecule)	26.2	26.5	31.3	34.5	32.5
$A_c$ (A <sup>2</sup> :molecule)	18.0	19.1	20.7	22.5	23.6
$\Pi_c$ (mN/m)	51.7	53.4	54.6	51.3	53.3

#### 3.4.4. Influence of ionic strength

To investigate the influence of the subphase ionic strength on  $C_{16}BC$  monolayer,  $\Pi$ – $A$  isotherms of  $C_{16}BC$  for five  $Na_2SO_4$  concentrations (0.5, 1, 2, 5 and 10 mM) is considered (Figure 9a). As it can be seen, the general trend of the isotherm of  $C_{16}BC$  in pure water is retained in the presence of different  $Na_2SO_4$  concentrations. Some differences are observed for the characteristic parameters (Table 3b). An expansion of  $A_0$  and  $A_c$  is generally observed

as the concentration of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  increases.  $\Pi_c$  is not greatly affected. According to the  $C_s^{-1}$  values between 20 and 35 mN/m, the films are in a LC state which condenses more from 0.5 to 1 mM, decreases from 1 to 5 mM and then increases again at 10 mM (Figure 9b). The expansion of the monolayer observed can be a result of  $\text{SO}_4^{2-}$  anions penetrating between the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  head groups. The cationic component undergoes a large change in area per head group upon oppositely charged polyion adsorption as the polyelectrolyte concentration in the subphase strongly influences the conformation of an adsorbed layer (Truzzolillo *et al.*, 2008). A similar behavior has been observed for monolayers of cationic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (Klebanau *et al.*, 2005). Further increase of  $\text{SO}_4^{2-}$  results in the formation of a less ordered monolayer. It can arise from the repelling of  $\text{SO}_4^{2-}$  from the air–water interface as they prefer bulk solvation (Vrbka *et al.*, 2004). Another possible mechanism is that the larger space of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  head groups due to  $\text{SO}_4^{2-}$  hydration (Zemb *et al.*, 2004) reduces  $\text{C}_{16}\text{BC}$  chain–chain interactions which decrease the monolayer  $C_s^{-1}$ . The more condensed state observed at 10 mM than at 2 and 5 mM may be due to the screening of the  $\text{C}_{16}\text{BC}$  head group charges after the saturation of the bulk water.



**Figure 9.** Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherm of hexadecylbetainate chloride ( $\text{C}_{16}\text{BC}$ ) monolayers deposited onto an aqueous subphase of different  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  salt concentrations (a) and compressibility modulus ( $C_s^{-1}$ ) as a function of  $\Pi$  for the corresponding subphase conditions (b).

#### 4. Conclusion

Synthesis of the cationic alkylbetainate chlorides ( $\text{C}_n\text{BC}$ ,  $n=10\text{--}16$ ) has been accomplished using more environment-friendly reagents (glycine betaine, thionyl chloride and primary alcohols) than in previous works (chloroacetyl chloride, trimethylamine and primary alcohols). The combination of no basic catalyst, an initial reactant concentration of 0.132

mol/L, a 3:1 betainyl chloride/1-hexadecanol molar ratio, a temperature of 45 °C, the 2-methyl-2-butanol as organic solvent and a reaction time of 6 h has given the highest yield (94±3%) of hexadecylbetainate chloride.

The  $\Pi$ -A isotherms of spread cationic alkylbetainate chloride ( $C_nBC$ ) monolayers on the water subphase at 20 °C have shown that the  $C_{10}BC$  and  $C_{12}BC$  are not able to form insoluble monolayers because of the weak hydrophobicity of their alkyl chains. The  $C_{14}BC$  and  $C_{16}BC$  monolayers have shown the characteristics of insoluble monolayers. However, at high compression, an irreversible rearrangement or interaction of the molecules within the  $C_{16}BC$  monolayer has occurred preventing its complete relaxation. This result is in correlation with that obtained by Itoh *et al.* (2009) for the foaming powers of the alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) in aqueous solutions.  $C_{10}BC$  and  $C_{12}BC$  have almost no foaming powers while  $C_{14}BC$  and  $C_{16}BC$  are interesting foaming agents with the latter being the most efficient.

The influence of different factors (pH, temperature, sodium salts concentration of monovalent and divalent anions belonging to the Hofmeister series and  $Na_2SO_4$  ionic strength) on the  $C_{16}BC$  monolayer interfacial properties has been studied. The interfacial organization of the  $C_{16}BC$  monolayer is not greatly influenced by the pH and the monovalent anions but is influenced by the temperature, the divalent anions and the ionic strength mainly in term of interfacial area occupation. The whole results suggest that the  $C_nBC$  molecules interact mainly via the van der Waals forces at the air–water interface and that the polar heads are deeply immersed into the water subphase. This accounts for the poor influence of the experimental conditions on the molecule organization at the air-water interface. These surface-active agents issued from the green chemistry can be thus useful for the formulation of products with a wide range of applications. Similarly to the conventional quaternary ammonium surfactants, they could be used in the cosmetic industry as hair conditioner or in the pharmaceutical field as DNA delivery agent for example. Additional works are, however, required to better define the fields of application for these alkylbetainate surfactants.

### **Acknowledgments**

Nsimba Zakanda Francis thanks the Belgium Technical Cooperation (BTC) and l'Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège for financial support. Magali Deleu thanks the Belgian National Foundation for Scientific Research (FNRS) for her position as Research Associate.

## 5. References

- Abdel-Rahem R., Gradzielski M., Hoffmann H. (2005). A novel viscoelastic system from a cationic surfactant and a hydrophobic counterion. *Journal of Colloid and Interface Science*, **288**, 570-582.
- Aimin H., Cao L.X., Jie C., Spiess F.J., Steven L.S., Timothy N.O., Steve O.H., James D.F. (1999). Photocatalytic degradation of triethylamine on titanium oxide thin films. *Journal of Catalysis*, **188**, 40-47.
- Aroti A., Leontidis E., Dubois M., Zemb T., Brezesinski G. (2007). Monolayers, bilayers and micelles of zwitterionic lipids as model for the study of specific anion effects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **303**, 144-158.
- Auzély-Velty A., Rinaudo M. (2003). Synthesis of starch derivatives with labile cationic groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, **31**, 123-129.
- Belin L., Wass U., Audunsson G., Mathiasson I. (1983). Amines: possible causative agents in the development of bronchial hyperreactivity in workers manufacturing polyurethanes from isocyanates. *British Journal of Industrial Medicine*, **40**, 251-257.
- Bergeron V. (1997). Disjoining Pressures and Film Stability of Alkyltrimethylammonium Bromide Foam Films. *Langmuir*, **13**, 3474-3482.
- Boen Ho O. (1998). Electrokinetic Studies on Emulsions Stabilized by Ionic Surfactants: The Electroacoustophoretic Behavior and Estimation of Davies' HLB Increments. *Journal of Colloid and Interface Science*, **198**, 249-260.
- Bowen J., Manickam M., Evans S.D., Critchley K., Kendall K., Preece J.A. (2008). The pH-dependent adhesion of nanoparticles to self-assembled monolayers on gold. *Thin Solid Films*, **516**, 2987-2999.
- Chou T.H., Lin Y.S., Li W.T., Chang C.H. (2008). Phase behavior and morphology of equimolar mixed cationic-anionic surfactant monolayers at the air/water interface: Isotherm and Brewster angle microscopy analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, **321**, 384-392.
- Davies J.T., Rideal E.K. (1963). *Interfacial Phenomena*. Academic Press, New York.
- de la Maza A., Parra J.L. (1995). Solubilization of unilamellar liposomes caused by quaternary ammonium surfactants. *Journal of Controlled Release*, **37**, 33-42.
- Dhanabalan A., Prasanth Kumar N., Major S., Talwar S.S. (1998). Variation of monolayer behaviour and molecular packing in zinc arachidate LB films with subphase pH. *Thin Solid Films*, **327-329**, 787-791.
- Dieter R.K. (1999). Reaction of acyl chlorides with organometallic reagents: A banquet table of metals for ketone synthesis. *Tetrahedron*, **55**, 4177-42336.

Eeman M., Berquant A., Dufrêne Y.F., Paquot M., Dufour S., Deleu M. (2006). Penetration of Surfactin into Phospholipid Monolayers: Nanoscale Interfacial Organization. *Langmuir*, **22**, 11337-11345.

Ganeshpure P.A., George G., Das J. (2008). Brønsted acidic ionic liquids derived from alkylamines as catalysts and mediums for Fischer esterification: Study of structure–activity relationship. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **279**, 182-186.

Giner I., Pera G., Lafuente C., López M.C., Cea P. (2007). Influence of the Hofmeister series of anions on the molecular organization of positively ionized monolayers of a viologen derivative. *Journal of Colloid and Interface Science*, **315**, 588-596.

Granö H., Yli-Kauhaluoma J., Suortti T., Käki J., Nurmi K. (2000). Preparation of starch betainate: a novel cationic starch derivative. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 277-283.

Guo X., Rong Z., Ying X. (2006). Calculation of hydrophile–lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method. *Journal of Colloid and Interface Science*, **298**, 441-450.

Heinig K., Vogt C., Werner G. (1996). Separation of ionic and neutral surfactants by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **745**, 281-292.

Huang J., Rozwadowski K., Bhinu V.S., Schäfer U., Hannoufa A. (2008). Manipulation of sinapine, choline and betaine accumulation in Arabidopsis seed: Towards improving the nutritional value of the meal and enhancing the seedling performance under environmental stresses in oilseed crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 647-654.

He F., Li R.-X., Wu D.-C. (2010). Monolayers of mixture of alkylaminomethyl rutin and lecithin at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **349**, 215-223.

He P.S., Fang K., Zou G., Peltonen J.P.K., Rosenholm J.B. (2002). Elasticity of Langmuir monolayer detected by dynamic oscillation method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **201**, 265-273.

Itoh Y., Akasaka R. (2009). Comparison of Surface-active properties of (Alkyloxycarbonylmethyl)trimethylammonium chlorides and Alkyltrimethylammonium chlorides. *Journal of Surfactants and Detergents*, **12**, 101-107.

Jendrasiak G.L., Smith R.L. (2004). The interaction of water with the phospholipid head group and its relationship to the lipid electrical conductivity. *Chemistry and Physics of Lipids*, **131**, 183-195.

Kim S.K., Kim Y.C. (2002). Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 545-549.

Kiriukhin M.Y., Collins K.D. (2002). Dynamic hydration numbers for biologically important ions. *Biophysical Chemistry*, **99**, 155-168.

Klebanau A., Kliabanova N., Ortega F., Monroy F., Rubio R.G., Starov V. (2005). Equilibrium Behavior and Dilational Rheology of Polyelectrolyte/Insoluble Surfactant Adsorption Films: Didodecyldimethylammonium Bromide and Sodium Poly(styrenesulfonate). *The Journal of Physics and Chemistry B*, **109**, 18316-18323.

Knauf A., Meister A., Kerth A., Blume A. (2010). Interaction of alkyltrimethylammonium bromides with DMPC-d54 and DMPG-d54 monolayers studied by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS). *Journal of Colloid and Interface Science*, **342**, 243-252.

Leontidis E. (2002). Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of mesoporous solids of mesoporous solids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **7**, 81-91.

Li R., Jiang Z., Yang H., Guan Y. (2006). Effects of ions in natural water on the <sup>17</sup>O NMR chemical shift of water and their relationship to water cluster. *Journal of Molecular Liquids*, **126**, 14-18.

Lundberg D., Ljusberg-Wahren H., Norlin A., Holmberg K. (2004). Studies on dodecyl betainate in combination with its degradation products or with phosphatidyl choline-phase behavior and hemolytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, **278**, 478-487.

Majewska-Nowak K., Kowalska I., Kabsch-Korbutowicz M. (2005). Ultrafiltration of SDS solutions using polymeric membranes. *Desalination*, **184**, 415-422.

Mallouri R., Keramidas A.D., Brezesinski G., Leontidis E. (2008). Monolayer properties of surface-active metalorganic complexes with a tunable headgroup. *Journal of Colloid and Interface Science*, **317**, 544-555.

Marchetti J.M., Errazu A.F. (2008). Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. *Biomass and Bioenergy*, **32**, 892-895.

Mata J., Varade D., Bahadur P. (2005). Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochimica Acta*, **428**, 147-155.

McConlogue C.W., Malamud D., Vanderlick T.K. (1998). Interaction of DPPC monolayers with soluble surfactants: electrostatic effects of membrane perturbants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1372**, 124-134.

McMurry J. (2000). *Chimie organique: Les grands principes, Cours et exercices corrigés*. Dunod, Paris, pp. 319-336.

Mohlin K., Karlsson P., Holmberg K. (2006). Use of cleavable surfactants for alkyl ketene dimer (AKD) dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **274**, 200-210.

Montalbetti C.A.G.N., Falque V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **61**, 10827-10852.

Nakatsuji H., Morimoto M., Misaki T., Tanabe Y. (2007). Mild, powerful, and robust methods for esterification, amide formation, and thioesterification between acid chlorides and alcohols, amines, thiols, respectively. *Tetrahedron*, **63**, 12071-12080.

Niidome Y., Ayukawa H., Yamada S. (2000). Effects of aliphatic tails on monolayer structures of hemicyanine dyes at the air/water interface as studied by in situ SHG measurements and surface pressure-area isotherms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **132**, 75-80.

Nsimba Zakanda F., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2010). Les dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne : Méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **14**, 737-748.

Öberg M., Palmén N., Johanson G. (2010). Discrepancy among acute guideline levels for emergency response. *Journal of Hazardous Materials*, **184**, 439-447.

Peltonen L., Hirvonen J., Yliruusi J. (2001). The effect of temperature on sorbitan surfactant monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **239**, 134-138.

Pettersson A., Adamsson M., Dave G. (2000). Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere*, **41**, 1611-1620.

Ran G., Zhang Y., Song Q., Wang Y., Cao D. (2009). The adsorption behavior of cationic surfactant onto human hair fibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **68**, 106-110.

Rezaei Z., Khabnadideh S., Zarshenas M.M., Jafari M.R. (2007). Esterification of tertiary alcohols in steroids under different conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **276**, 57-61.

Rosen J.M. (1989). *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley-Interscience, New York.

Rosen J.M., Cohen A.W., Dahanayake M., Hua X.-Y. (1982). Relationship of structure to properties in surfactants. 10. Surface and thermodynamic properties of 2-dodecyloxypoly(ethenoxyethanol)s,  $C_{12}H_{25}(OC_2H_4)_xOH$ , in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, **86**, 541-545.

Rozycka-Rozzak B., Przeszalski S., Witek S. (1988). Calorimetric studies of the micellization of some amphiphilic betaine ester derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science*, **125**, 80-85.

Rusch G.M., Bast C.B., Cavender F.L. (2009). Establishing a point of departure for risk assessment using acute inhalation toxicology data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **54**, 247-255.

Samakande A., Chaghi R., Derrien G., Charnay C., Hartmann P.C. (2008). Aqueous behaviour of cationic surfactants containing a cleavable group. *Journal of Colloid and Interface Science*, **320**, 315-320.

Satgé C., Verneuil B., Branland P., Granet R., Krausz P., Rozier J., Petit C. (2002). Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, **49**, 373-376.

Schwab U., Törrönen A., Meririnne E., Saarinen M., Alfthan G., Aro A., Uusitupa M. (2006). Orally Administered Betaine Has an Acute and Dose-Dependent Effect on Serum Betaine and Plasma Homocysteine Concentrations in Healthy Humans. *Journal of Nutrition*, **136**, 34-38.

Spelios M., Nedd S., Matsunaga N., Savva M. (2007). Effect of spacer attachment sites and pH-sensitive headgroup expansion on cationic lipid-mediated gene delivery of three novel myristoyl derivatives. *Biophysical Chemistry*, **129**, 137-147.

Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A. (2007). New approach to the quaternization of chitosan and its amphiphilic derivatives. *European Polymer Journal*, **43**, 2414-2421.

Tehrani-Bagha A.R., Oskarsson H., van Ginkel C.G., Holmberg K. (2007). Cationic ester-containing gemini surfactants: Chemical hydrolysis and biodegradation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **312**, 444-452.

Thompson R.A., Allenmark S. (1992). Factors influencing the micellar catalyzed hydrolysis of long-chain alkyl betainates. *Journal of Colloid and Interface Science*, **148**, 241-246.

Truzzolillo D., Bordi F., Cametti C., Sennato S. (2008). Phenomenological surface characterization of cationic-lipid monolayers in the presence of oppositely charged polyanions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **319**, 51-61.

Turshatov A.A., Zaitsev S.Yu., Sazonov S.K., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Möbius D. (2008). Anion effects on monolayers of a new amphiphilic styryl-pyridinium dye at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **329**, 18-23.

Vrbka L., Mucha M., Minofar B., Jungwirth P., Brown E.C., Tobias D.J. (2004). Propensity of soft ions for the air/water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **9**, 67-73.

Wang C.Y., Huang L. (1987). pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **84**, 7851-7855.

Yagisawa M., Doi Y., Uenohara T., Toda M., Shigematsu N., Nakata R. (2006). *Nutr. Res.*, **26**, 266-.

Zemb T., Belloni L., Dubois M., Aroti A., Leontidis E. (2004). Can we use area per surfactant as a quantitative test model of specific ion effects? *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **9**, 74-80.

## **IV. Pénétration des chlorures d'alkylbétainate dans les monocouches lipidiques formées à l'interface air-eau**

Les principaux résultats ont été publiés dans cet article :

Publication III

Nsimba Zakanda F., Nott K., Paquot M., Mvumbi Ielo G., Deleu M. (2011). Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86, 176-180.

**Titre: Pénétration des chlorures d'alkylbétainate dans les monocouches lipidiques formées à l'interface air-eau.**

### **Objectif et stratégie expérimentale**

Après avoir caractérisé les propriétés de surface des  $C_nBC$  à l'interface air-eau, leurs propriétés membranaires ont été étudiées.

L'insertion d'un peptide ou d'un surfactant dans une membrane biologique peut être divisée en plusieurs étapes (Seelig, 1997). La première consiste en l'adsorption du tensioactif à l'interface lipidique et la seconde correspond à la pénétration proprement dite, ces deux premières étapes pouvant être couplées et difficilement dissociables dans le temps. La troisième étape correspond à un réarrangement des molécules au sein de la bicouche, celui-ci pouvant être une réorganisation mutuelle des molécules au sein d'un seul feuillet et/ou un flip-flop de la molécule du feuillet externe vers le feuillet interne.

L'objectif de ce volet était d'étudier de manière globale le phénomène d'interaction et d'évaluer la possibilité de pénétration des  $C_nBC$  dans les membranes biologiques. Des modèles simplifiés de membrane biologique ont été utilisés. Ils consistent en des monocouches lipidiques représentant la moitié d'une membrane biologique. Elles sont constituées des principaux lipides des membranes plasmiques des eucaryotes utilisés de manière séparée (le 1,2-dipalmitoylphosphatidylsérine, DPPS ; l'acide 1,2-dipalmitoylphosphatidique, DPPA ; le 1,2-dipalmitoylphosphatidyléthanolamine, DPPE ; le 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine, POPC et le cholestérol, CHOL) et ont été formées à l'interface air-eau à différentes pressions de surface initiales ( $\Pi_i$  : 5, 10, 20 et 30 mN/m) à l'aide de la Balance à Film de Langmuir. Les  $C_nBC$  ont été injectés (séparément) dans la sous-phase aqueuse. Le suivi de la pression de surface en fonction du temps a permis de caractériser leur adsorption et pénétration dans les monocouches pré-formées.

Les paramètres physico-chimiques étudiés sont :

- $\Delta\Pi$  : variation de la pression de surface ( $\Pi - \Pi_i$ )
- $\Pi_e$  : pression d'exclusion ( $\Pi$  au-delà de laquelle le  $C_nBC$  ne peut plus pénétrer dans la monocouche)

## Principaux résultats

Les  $C_nBC$  ont pénétré dans toutes les monocouches lipidiques formées à l'interface air-eau à toutes les pressions de surface initiales étudiées. La pénétration a été plus importante dans les monocouches lipidiques formées de lipides portant des têtes polaires chargées négativement (DPPS et DPPA). Dans ce cas, la pénétration est indépendante de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des  $C_nBC$ . Elle a été moins importante dans les monocouches lipidiques formées de lipides portant des têtes polaires de petite taille (DPPE et CHOL) et faible dans celle formée de lipides portant une tête polaire volumineuse (POPC). L'insertion est, dans ces deux derniers cas, dépendante de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des  $C_nBC$ . Dans tous les cas, la pression d'exclusion de  $C_{16}BC$  est supérieure à celle présumée des membranes biologiques (30-35 mN/m), et laisse donc supposer que  $C_{16}BC$  est capable d'interagir avec les membranes biologiques *in vivo*.

# **Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers at the air-water interface**

Francis Nsimba Zakanda<sup>a,c\*</sup>, Katherine Nott<sup>a,b</sup>, Michel Paquot<sup>a</sup>, Georges Mvumbi Lelo<sup>c</sup>,  
Magali Deleu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 2  
Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Unité de Chimie générale et organique, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, 2  
Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>c</sup> Service de Biochimie, Département des Sciences de Base, Faculté de Médecine, Université  
de Kinshasa B.P.127 Kinshasa XI, R.D. Congo

\*Corresponding author

Phone : (32) 81 62 22 32

Fax : (32) 81 62 22 31

E-mail : nsimbazak@yahoo.fr, fnsimbazakanda@student.ulg.ac.be, fnsimba@unikin.cd

*Les commentaires complémentaires à l'article original ont été mis en italique*

## Abstract

In this paper, the penetration behavior of the alkylbetainate chloride surfactants ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) into lipid monolayers of dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), palmitoyoleoylphosphatidylcholine (POPC) and cholesterol (CHOL) is investigated using the Langmuir trough technique. The penetration of  $C_nBC$  is followed by measurement of the surface pressure increase ( $\Delta\pi$ ) at a constant surface area after the injection of  $C_nBC$  into the aqueous phase, underneath the lipid monolayer previously spread at the air–water interface at 25°C and at different initial surface pressures ( $\pi_i$ ). The influence of both the lipid head group and the surfactant hydrocarbon chain length on the effectiveness of  $C_nBC$  penetration into these monolayers is discussed. The results have shown that  $C_nBC$  adsorb at the air-water interface giving evidence of their surface-active properties. The adsorption kinetics of  $C_{16}BC$  into different lipid monolayers are lipid head charge and lipid head volume-dependent. The magnitude of the surface pressure increase ( $\Delta\pi$ ) arises in the following order: DPPA > DPPS >> CHOL  $\approx$  DPPE > POPC.  $C_nBC$  penetration into negatively-charged (DPPS and DPPA) monolayers does not seem to depend on surfactant alkyl-chain length compared to uncharged (CHOL) and zwitterionic (DPPE and POPC) monolayers for which  $\Delta\pi$  increases with a larger alkyl-chain length. Electrostatic interactions are mainly involved in the affinity of  $C_nBC$  with monolayers but the hydrophobic effect plays also a role.

**Keywords:** Glycine betaine-based ester, Cationic surfactant, Lipid monolayer, Penetration, Surface pressure increase, Langmuir trough.

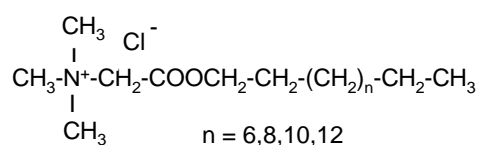
## 1. Introduction

Glycine betaine (N,N,N-trimethylglycine) also called betaine is present in various plants, animals and microorganisms (Huang *et al.*, 2008). It is an important naturally occurring compound that functions as compatible solutes or osmoprotectants (Wood *et al.*, 2002). Recently, a review of the synthesis methods and the potential applications of glycine betaine derivatives has been published (Nsimba zakanda *et al.*, 2010). Several surfactants including esters (alkylbetainates) are based on this molecule (Rozycka-Roszak *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1992; Lundberg *et al.*, 2004; Mohlin *et al.*, 2006; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2009). These compounds are generally referred to as “mild to the skin” (Förster *et al.*, 2000; Wydro, 2007) and are used as additives to other surfactants to improve their dermatological properties (e.g., betaines decrease the skin irritation of anionic compounds). From the point of view of practical applications, studies of the surface properties of alkylbetainates and their interaction with lipid membranes are of great importance.

Phospholipids and sterols are biological amphiphiles that are the building blocks of cell membranes. Because of the extremely complex nature of *in vivo* systems, lipid monolayers, bilayers, and liposomes are often used as models to investigate their biological counterparts (Brockman, 1999). Monolayer represents half of a lipid bilayer membrane (Blume, 1979; Möhwald, 1990). It provides a simple model for evaluating membrane insertion of amphipathic compounds into the outer leaflet of a biological membrane (Brochman, 1999; Maget-Dana, 1999). Parameters such as the nature and the packing of the molecules spread to form the monolayer, the composition of the subphase (pH, ionic strength) and temperature can be varied in a controlled way and without limitation. Lipid monolayers are very useful to characterize drug-lipid or lipid-lipid interactions at a molecular level using the Langmuir trough technique (Eeman *et al.*, 2010). The amphiphile is dissolved in the aqueous subphase and its interaction with the monolayer is monitored. These studies are interesting from the biological and biophysical standpoints as well as in industrial applications such as the formulation of pharmaceutical and cosmetic products (van de Pas *et al.*, 1994; Vollhardt *et al.*, 2000).

The behavior of the alkylbetainate chloride ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) (Scheme 1) monolayers at the air-water interface at 20°C has been previously investigated (Nsimba Zakanda *et al.*, 2011). However, no information is available with regard to their penetration into lipid membranes.

For this reason, the aim of this work is to study, using the Langmuir technique, the interaction of an homologous series of C<sub>n</sub>BC with lipid monolayers spread on water at constant area and temperature. The chosen lipids have various polar head groups [dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) and cholesterol (CHOL)]. Their structures and intrinsic pKas are shown in Table 1. The influence of both the lipid head group and the surfactant hydrocarbon chain length on the effectiveness of C<sub>n</sub>BC penetration into these monolayers is discussed.



**Scheme 1.** Chemical structure of the alkylbetainate chlorides (C<sub>n</sub>BC)

**Table 1.** Structures and intrinsic pKas of the lipids studied (Tsui *et al.*, 1986; Cevc, 1993; Lasic, 1993; Moncelli *et al.*, 1994; Inoue et Nibu, 1999).

Lipid	Intrinsic pKa			2D Structure
	Phosphate	Carboxyl	Amine	
1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidylserine (DPPS)	2.1-2.2	2.1-4	9.7-9.9	
1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidic acid (DPPA)	pKa <sub>1</sub> : 3.5-4.0 pKa <sub>2</sub> : 9.0-9.5	-	-	
1,2-dipalmitoyl-sn-phosphatidylethanolamine (DPPE)	1.4-2.5	-	9.0-9.7	
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-phosphatidylcholine (POPC)	1.4-2.0	-	10.5-11.5	
Cholesterol (CHOL)	-	-	-	

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) were synthesized in two steps according to the method described in the literature (Granö *et al.*, 200). Briefly, betainyl chloride was formed by adding thionyl chloride drop wise under constant stirring to a suspension of glycine betaine in dichloromethane at 60°C. The reaction proceeded in a water bath, until the emission of sulfur dioxide ceased. The resulting product was washed with n-hexane. Primary alcohols ( $C_{10}$  to  $C_{16}$ ) were acylated by the obtained betainyl chloride to produce alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ). Structures were confirmed by Infrared Spectroscopy and Mass Spectrometry. A typical IR spectrum of betainyl chloride displayed bands at 2960, 2870  $cm^{-1}$  (C-H stretching), 2925, 2850  $cm^{-1}$  (C-H stretching), 1800  $cm^{-1}$  (C=O stretching), 675  $cm^{-1}$  (C-Cl stretching). IR spectra of  $C_nBC$  displayed bands at 2918–2962  $cm^{-1}$  (C-H, stretching), 1738–1751  $cm^{-1}$  (C=O, stretching), 1402–1477  $cm^{-1}$  (C-H, bending), 1190–1205  $cm^{-1}$  (C-O, stretching). Electrospray ionization mass spectra displayed the signals of the  $[M]^+$  ions at  $m/z = 258.1$  ( $C_{10}BC$ ), 286.3 ( $C_{12}BC$ ), 314.3 ( $C_{14}BC$ ) and 342.4 ( $C_{16}BC$ ). Dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC) and cholesterol (CHOL) were purchased from Advanti (99% purity). The solvents (chloroform and methanol) of analytical grade were obtained from Fluka. Reagents and solvents were used as received.

### 2.2. Penetration experiments

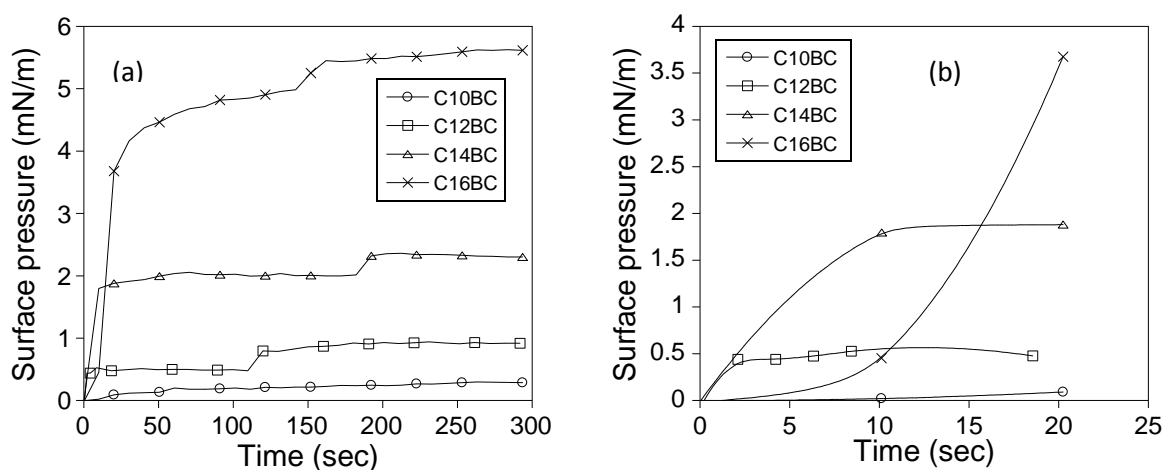
The experiments are conducted with an automated Langmuir system (KSV minitrough, KSV instruments Ltd., Helsinki, Finland) in which the mini-trough is filled with ~ 91 ml of milli-Q water. In a first set of experiments, each  $C_nBC$  is dissolved in water to obtain a concentration of 1.5 mM and is injected (without lipid monolayer) into the water subphase using a Hamilton syringe. The  $C_nBC$  final concentration in the subphase is 1.15  $\mu M$ . It is assumed that alkylbetainate chlorides exist mainly as monomers within the water subphase) as this concentration is well below their measured CMC (Rozycka-Roszak *et al.*, 1988; Itoh *et al.*, 2009). For the second set of experiments, the lipid monolayer (DPPS, DPPA, DPPE, POPC or CHOL) is prepared by carefully spreading droplets of the lipid solution (dissolved in chloroform/methanol 2:1 v/v) to obtain the desired initial surface pressure ( $\Pi_i$ ). When the monolayer surface pressure is stabilized at a  $\Pi_i$  value,  $C_nBC$  is injected into the subphase to the same final concentration (1.15  $\mu M$ ). The surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) induced by the

$C_nBC$  adsorption at the interface (without and with lipid monolayer) is measured with a Wilhelmy plate. The surface pressure is recorded until a plateau is reached, usually within 1 h. During the measurements the subphase is continuously gently stirred with a magnetic bar. The system is enclosed in a Plexiglas box in order to minimize water evaporation and to avoid contaminations. The subphase temperature is maintained constant at  $25 \pm 0.5^\circ C$  by circulating water through the base plate on which the mini-trough is mounted.

### 3. Results

#### 3.1. Alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) adsorption at the air-water interface

Figure 1a-b illustrate the time course for the adsorption of  $C_nBC$  (at a concentration of  $1.15 \mu M$  in the subphase) to the air-water interface. An increase in the surface pressure is detectable instantaneously, attaining a first plateau. After a time between 50 and 200 sec, a second fast and small increase in surface pressure is observed reaching a second plateau (Figure 1a). The pressure increase is indicative of  $C_nBC$  surface activities. As the alkyl chain length increases the final surface pressure increases.  $C_{16}BC$  shows a maximal surface pressure much higher than the three others. At equilibrium, the  $C_nBC$  monolayers exhibit surface pressures of 0.4, 0.9, 2.2 and 5.7 mN/m for  $C_{10}BC$ ,  $C_{12}BC$ ,  $C_{14}BC$  and  $C_{16}BC$ , respectively. Figure 1b shows that the adsorption rate during the early stage is influenced by the alkyl-chain hydrophobic character. It is high and asymptotical for  $C_{12}BC$  and  $C_{14}BC$ , low and linear for  $C_{10}BC$  and low and sigmoidal for  $C_{16}BC$  during the early stage of adsorption.



**Figure 1.** Kinetics (a) and enlargement of the early stage (b) of the adsorption of alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) at the air-water interface.  $C_nBC$  are injected at a concentration of  $1.15 \mu M$  into the water subphase at  $25^\circ C$ .

### **3.2.Hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) penetration into lipid monolayers: Effect of different lipid polar heads**

*C<sub>n</sub>BC bear the same head group but differ by the length of their alkyl chain. The later can make the difference in their penetration into lipid monolayers. C<sub>16</sub>BC, the more hydrophobic and stable compound of the homologous series (Nsimba Zakanda et al., 2011), is shosen as the reprehensive of the group to study the adsorption of cationic C<sub>n</sub>BC into monolayers of different lipid polar heads.*

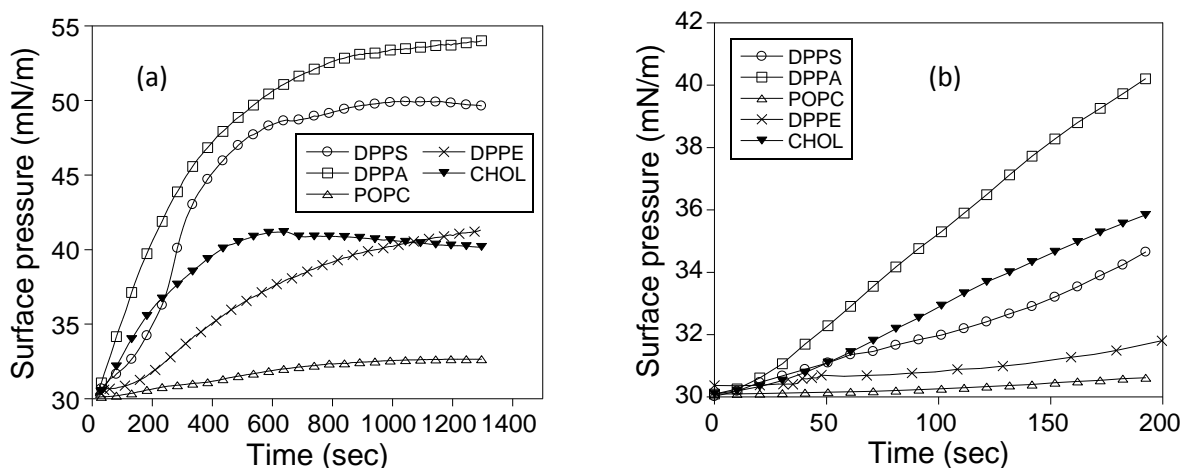
In water (pH 5.7), the head group of DPPS has two negative charges and one positive charge, the one of DPPA has one negative charge, the ones of DPPE and POPC have one positive charge and one negative charge while the one of CHOL is uncharged.

The interaction of C<sub>16</sub>BC with lipids is analyzed by measuring the surfactant-induced surface pressure increase on lipid monolayers preformed at the air-water interface at 30 mN/m. At such a surface pressure the properties of a lipid monolayer (the packing of molecules) correspond to those of most of natural or artificial lipid bilayers (Marsh, 1996). This surface pressure can thus be suggested to be relevant for biological purposes (Demel *et al.*, 1975; Preetha *et al.*, 2006).

The C<sub>16</sub>BC (at a concentration of 1.15 μM) is injected into the water subphase under the preformed lipid monolayers maintained at a constant area. Addition of C<sub>16</sub>BC in the subphase underneath all the lipid monolayers induces a significant increase of surface pressure, whatever the nature of the lipid (Figure 2a). It indicates that the alkylbetainate is able to adsorb and penetrate into the lipid monolayer. This penetration is nevertheless very low into the zwitterionic POPC monolayer.

The penetration rate of C<sub>16</sub>BC into the lipid monolayer (first region of the kinetic plots) is influenced by the charge and the steric hindrance of the lipid head group. It decreases in the following order according to the slope of the linear part of the curve: DPPA > CHOL > DPPS > DPPE > POPC (Figure 2b).

Surface pressure profile versus time after C<sub>16</sub>BC injection is asymptotical for DPPA and CHOL, sigmoidal for DPPS and DPPE and almost linear for POPC (Figure 2a). The maximal surface pressure increase reached at the plateau follows the order: DPPA > DPPS > DPPE ≈ CHOL > POPC.



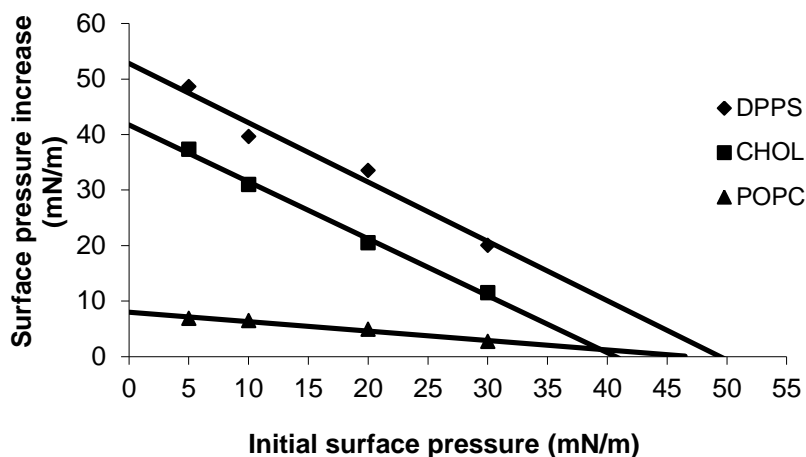
**Figure 2.** Kinetics (a) and enlargement of the early stage (b) of the hexadecylbetaine chloride (C<sub>16</sub>BC) adsorption into different lipid monolayers initially compressed at 30 mN/m. The concentration of C<sub>16</sub>BC in the water subphase (pH 5.7) is 1.15  $\mu$ M, and the subphase temperature is 25  $^{\circ}$ C. The time of injection correspond to t=0.

To investigate whether the C<sub>16</sub>BC, the most surface-active C<sub>n</sub>BC in this study (Figure 1) is able to interact with membranes with physiological lipid packing densities, lipid monolayers formed by anionic DPPS, uncharged CHOL and zwitterionic POPC are chosen to examine the role of the polar head charge on the interaction of C<sub>16</sub>BC with lipids. The penetrating ability of C<sub>16</sub>BC into lipid monolayers is investigated at four initial surface pressures (5, 10, 20 and 30 mN/m).

The limiting surface pressure or exclusion pressure (Gillotte *et al.*, 1999; Eeman *et al.*, 2006) is determined by extrapolating the regression of the plot to the x axis (Figure 3). The limiting surface pressure is defined as the maximum initial surface pressure above which the penetration of C<sub>16</sub>BC into the monolayer no longer occurs. This parameter is a measure of the membrane-penetrating power of the surfactant (van Klompenburg *et al.*, 1998).

The maximum surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) is plotted as a function of the initial surface pressure ( $\Pi_i$ ). In all cases,  $\Delta\Pi$  decreases linearly with increasing  $\Pi_i$  (Figure 3). C<sub>16</sub>BC penetrates much more readily into DPPS and CHOL monolayers than into POPC monolayer under similar surface pressures. The exclusion surface pressures obtained are 49.8, 40.7 and 47.1 mN/m for DPPS, CHOL and POPC monolayers, respectively. Moreover, the ordinates at the origin for DPPS and CHOL linear regression are much higher than the surface pressure increase obtained after the C<sub>16</sub>BC adsorption in the absence of lipid monolayer. DPPS and

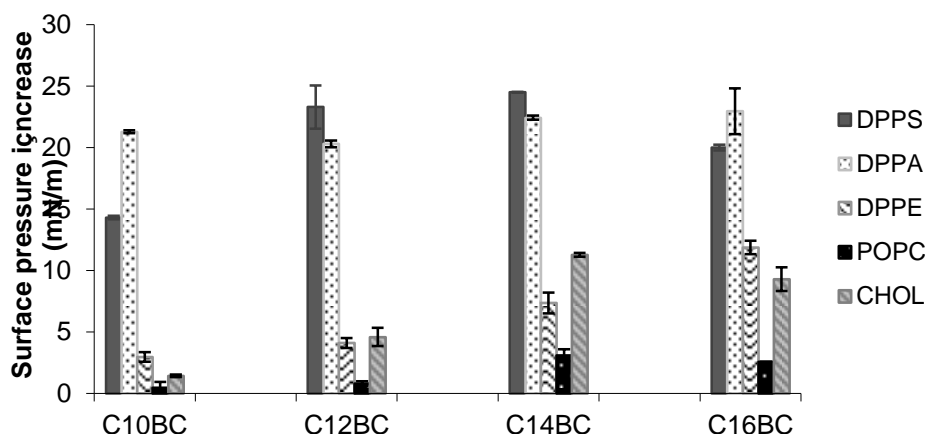
CHOL seem thus to exert an attractive effect on  $C_{16}BC$  adsorption while the penetration of  $C_{16}BC$  into POPC monolayer is only governed by  $C_{16}BC$  interfacial properties.



**Figure 3.** Ability of hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ) to penetrate into lipid monolayers with different polar heads. Maximal surface pressure increase as a function of the initial surface pressure ( $\Pi_i$ ) of the monolayer. The concentration of  $C_{16}BC$  in the water subphase (pH 5.7) is  $1.15 \mu\text{M}$ , and the subphase temperature is  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3. Alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) interaction with lipid monolayers: Effect of the betainate alkyl-chain length

Pure lipid monolayers of DPPS, DPPA, DPPE, POPC and CHOL at an initial surface pressure of  $30 \text{ mN/m}$  are formed to study the effect of the alkyl-chain length on the  $C_nBC$  adsorption and penetration process. The maximal surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) for each system is shown at Figure 4. The  $C_nBC$  insertion into negatively-charged DPPS and DPPA monolayers is almost not alkyl chain length-dependent except for  $C_{10}BC$  which is less inserted into DPPS monolayers. However, for zwitterionic DPPE and POPC and uncharged CHOL monolayers, the insertion of  $C_nBC$  tends to increase with the alkyl chain-length (Figure 4).



**Figure 4.** Surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) induced by the insertion of  $C_nBC$  (final concentration in the subphase of  $1.15 \mu M$ ) into lipid monolayers with different polar heads at initial surface pressure of  $30 mN/m$  on water (pH 5.7) at  $25^\circ C$ .

#### 4. Discussion

Alkylbetainate chloride surfactants ( $C_nBC$ ,  $n=10-16$ ) are water-soluble surfactants in accordance with their HLB values ( $> 22$ ) according to the Davies system which ranks surfactants by their effective polarity and is not limited to non-ionic surfactants such as the Griffin index (Boen, 1998). The interfacial behaviour of  $C_nBC$  ( $n = 10-16$ ) monolayers at the air-water interface at  $20^\circ C$  has been investigated in our previous work (Nsimba Zakanda *et al.*, 2011). The results have shown that the  $C_nBC$  with an hydrocarbon chain length  $\geq 14$  are able to form stable monolayers at an air-water interface.

In the present work, the adsorption kinetics at an air-water interface and the ability of alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ) to penetrate into lipid monolayers with different polar heads are studied.

$C_nBC$  adsorb at the air-water interface giving evidence of their surface-active properties. The increase of surface pressure after the first equilibrium suggests rearrangement of the surfactant monomers at the interface from an undefined orientation of the alkyl-chains at the water surface to an upright orientation of the molecules when additional molecules reach the surface. The maximal surface pressure induced by the adsorption increases with the alkyl-chain length of the surfactants. This is due to the increase of hydrophobic interactions between the alkyl-chains at the air-water interface allowing a higher interfacial concentration

to be reached as commonly observed for other surfactants (Razafindralambo *et al.*, 2004). The rate of adsorption at the early stage increases as the alkyl chain-length increases from C<sub>10</sub>BC to C<sub>14</sub>BC and decreases for C<sub>16</sub>BC. This suggests that the adsorption energetic barrier induced by the molecular film at the air-water interface is higher for C<sub>16</sub>BC than for C<sub>12</sub>BC and C<sub>14</sub>BC. The longer the hydrophobic alkyl chain of non-adsorbed molecules, the higher the energy they need to pass the hydrophilic regions (Razafindralambo *et al.*, 2004).

The exclusion pressure values (Figure 3) higher than the estimated lateral pressure for biological membranes suggest that C<sub>16</sub>BC is able to insert into lipid bilayer *in vivo*. However, insertion of C<sub>16</sub>BC into a lipid monolayer is greatly dependent on the polar head and the structure of the lipid. According to the maximum surface pressure increase induced by C<sub>16</sub>BC insertion observed in Figure 2a and Figure 3, the affinity of C<sub>16</sub>BC is greater for negatively-charged lipids like DPPS and DPPA. It suggests the existence of electrostatic interactions between the positive charge of C<sub>16</sub>BC and the negative charges of the lipids. Among the negatively-charged lipids, DPPA is slightly more favorable for the insertion of C<sub>16</sub>BC. The existence of charge-charge repulsion between neighboring DPPA head groups (Langner *et al.*, 1999; Minones Jr *et al.*, 2002) can increase the effective head group size making them more accessible for the insertion of cationic C<sub>16</sub>BC as suggested by Gambinossi *et al.* for the tetracycline (Gambinossi *et al.*, 2004). This can also explain the higher rate of penetration observed for DPPA (Figure 2b).

The affinity of C<sub>16</sub>BC is also higher for monolayers composed by lipids with a low steric hindrance head group like CHOL and DPPE in comparison to POPC monolayer (Figure 2 and Figure 3). A compensation of the head–tail size mismatch is likely to play a major role in determining the level of C<sub>16</sub>BC insertion into CHOL monolayer. Indeed, the sterol rings of CHOL can fit nicely in the C<sub>n</sub>BC alkyl-chain region and its hydroxyl group helps to anchor it at the C<sub>n</sub>BC head–alkyl-chain interface. CHOL can be thought as an intercalator in the C<sub>n</sub>BC monolayer, functioning as a spacer to compensate the head–tail size mismatch and increase the packing density of the alkyl-chain region (Figure 2, Figure 3 and Figure 4) as it was suggested by Ishitsuka *et al.* (2006) for POPC. The bulky methyl groups and the positive charge of POPC head group may prevent C<sub>16</sub>BC molecules to insert into POPC monolayer to a greater extent.

The favored insertion of C<sub>16</sub>BC into the zwitterionic DPPE monolayer in comparison with the zwitterionic POPC is unexpected since it is known that the packing of DPPE is higher than that of POPC due to the formation of hydrogen bonds between the DPPE neighbor molecules. DPPE molecules leading to a lower hydration degree and to a much lower area per lipid for PE (Hac-Wydro *et al.*, 2007; Bouchet *et al.*, 2009). In addition, POPC is in an expanded state even at 30 mN/m (van Klompenburg *et al.*, 1998) and corresponds thus to an elastic monolayer more susceptible to be penetrated by an amphiphatic compound. The fact that DPPE has strong tendency to be organized in structures with a high intrinsic negative surface curvature when constrained within a monolayer, lowers the lateral pressure in the interface (de Kruijff, 1997). This can create insertion sites for amphiphatic components (Speelmans *et al.*, 1997). On the other hand, the steric hindrance is less important for C<sub>n</sub>BC molecules to insert into DPPE monolayer than into POPC monolayer with bulky methyl groups in the head groups as in C<sub>16</sub>BC molecules. Bouchet *et al.* (2010) have found the same result for the insertion of Arginine into DMPE and DMPC monolayers. The higher magnitude of  $\Delta\Pi$  with the increase of C<sub>n</sub>BC alkyl chain-length in the case of neutral lipid monolayers indicates that hydrophobic interactions are also involved in the insertion of C<sub>n</sub>BC into a lipid monolayer.

## 5. Conclusion

Alkylbetainate chlorides (C<sub>n</sub>BC, n=10-16) are able to adsorb at the air-water interface. Insertion of C<sub>n</sub>BC into lipid monolayers is greatly dependent on the nature of the lipid. The monolayers formed from negatively charged lipids are more favorable to the penetration of alkylbetainate chlorides than those from uncharged and the zwitterionic lipids. The penetration of C<sub>n</sub>BC is almost alkyl-chain length-independent into the monolayers formed from the negatively-charged DPPS and DPPA lipids for a surfactant's alkyl-chain length  $\geq 12$ . In the case of monolayers formed from neutral lipids, however, the value of  $\Delta\Pi$  increases as the surfactant's alkyl-chain length increases. The surface pressure change is strongly affected by the monolayer forming lipid type and is in the order of DPPA > DPPS  $\gg$  CHOL  $\approx$  DPPE > POPC. The penetration ability of C<sub>16</sub>BC into DPPS, CHOL and POPC is above the threshold lateral pressure of native biological membranes. These results indicate that apart from the net charge of the monolayer's surface, the size of the head group of the lipid forming the monolayer is another important factor that must be considered in the penetration process of C<sub>n</sub>BC into lipid monolayers. Electrostatic interactions are mainly involved in the affinity of C<sub>n</sub>BC with lipid monolayers but the hydrophobic effect play also a role.

**Acknowledgement**

The research was funded through the ARC grant “Superzym”, financed by the French Community of Belgium. Nsimba Zakanda Francis thanks the Belgium Technical Cooperation (BTC) for financial support. Doctor Magali Deleu thanks the Belgian National Foundation for Scientific Research (FNRS) for her position as Research Associate.

## 6. References

- Blume A. (1979). A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **557**, 32-44.
- Boen Ho O. (1998). Electrokinetic Studies on Emulsions Stabilized by Ionic Surfactants: The Electroacoustophoretic Behavior and Estimation of Davies' HLB Increments. *Journal of Colloid and Interface Science*, **198**, 249-260.
- Bouchet A.M., Frías M.A., Lairion F., Martini F., Almaleck H., Gordillo G., E.A. Disalvo E.A. (2009). Structural and dynamical surface properties of phosphatidylethanolamine containing membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**, 918-925.
- Bouchet A., Lairion F., Disalvo E.A. (2010). Role of guanidinium group in the insertion of l-arginine in DMPE and DMPC lipid interphases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**, 616-623.
- Brockman H. (1999). Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 438-443.
- Cevc G. (1993). Phospholipids handbook, Marcel Dekker, Inc, New York.
- de Kruijff B. (1997). Lipids beyond the bilayer. *Nature*, **386**, 129-130.
- de Matos Alves Pinto L., Valeria Pinheiro Malheiros S., Carlos Senges Lino A., de Paula E., Angelica Perillo M. (2006). Hydroxyzine, promethazine and thioridazine interaction with phospholipid monomolecular layers at the air–water interface. *Biophysical Chemistry*, **119**, 247-255.
- Demel R.A., Geurts van Kessel W.S.M., Zwaal R.F.A., Roelofsen B., van Deenen L.L.M. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **406**, 97-107.
- Eeman M., Berquand A., Dufrene Y.F., Paquot M., Dufour S., Deleu M. (2006). Penetration of Surfactin into Phospholipid Monolayers: Nanoscale Interfacial Organization. *Langmuir*, **22**, 11337-11345.
- Eeman M., Deleu M. (2010). Des membranes biologiques aux modèles membranaires biomimétiques. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **14**, 719-736.
- Förster Th., Issberner U., Hensen H. (2000). Lipid/surfactant compounds as a new tool to optimize skin-care properties of personal-cleansing products. *Journal of Surfactants and Detergents*, **3**, 345-352.
- Gambinossi F., Mecheri B., Nocentini M., Puggelli M., Caminati G. (2004). Effect of the phospholipid head group in antibiotic-phospholipid association at water–air interface. *Biophysical Chemistry*, **110**, 101-117.

Gillotte K.L., Zaiou M., Lund-Katz S., Anantharamaiah G.M., Holvoet P., Dhoest A., Palgunachari M.N., Segrest J.P., Weisgraber K.H., Rothblat G.H., Phillips M.C. (1999). Apolipoprotein-mediated Plasma Membrane Microsolubilization: Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 2021-2028.

Granö H., Yli-Kauhaluoma J., Suortti T., Käki J., Nurmi K. (2000). Preparation of starch betainate: a novel cationic starch derivative. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 277-283.

Hac-Wydro K., Kapusta J., Jagoda A., Wydro P., Dynarowicz-Łatka P. (2007). The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic: A Langmuir monolayer study. *Chemistry and Physics of Lipids*, **150**, 125-135.

Huang J., Rozwadowski K., Bhinu V.S., Schäfer U., Hannoufa A. (2008). Manipulation of sinapine, choline and betaine accumulation in Arabidopsis seed: Towards improving the nutritional value of the meal and enhancing the seedling performance under environmental stresses in oilseed crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 647-654.

Inoue T., Nibu Y. (1999). Phase behavior of hydrated lipid bilayer composed of binary mixture of phospholipids with different head groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, **100**, 139-150.

Ishitsuka Y., Pham D.S., Waring A.J., Lehrer R.I., Lee K.Y.C. (2006). Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: Effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 1450-1460.

Itoh Y., Akasaka R. (2009). Comparison of Surface-active properties of (Alkyloxycarbonylmethyl)trimethylammonium chlorides and Alkyltrimethylammonium chlorides. *Journal of Surfactants and Detergents*, **12**, 101-107.

Langner M., Kubica K. (1999). The electrostatics of lipid surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids*, **101**, 3-35.

Lasic D.D. (1993). *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier, Amsterdam.

Lundberg D., Ljusberg-Wahren H., Norlin A., Holmberg K. (2004). Studies on dodecyl betainate in combination with its degradation products or with phosphatidyl choline—phase behavior and hemolytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, **278**, 478-487.

Maget-Dana R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**, 109-140.

Marsh D. (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1286**, 183–223.

Miñones Jr. J., Rodríguez Patino J.M., Miñones J., Dynarowicz-Latka P., Carrera C. (2002). Structural and topographical characteristics of dipalmitoyl phosphatidic acid in Langmuir monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **249**, 388-397.

Mohlin K., Karlsson P., Holmberg K. (2006). Use of cleavable surfactants for alkyl ketene dimer (AKD) dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **274**, 200-210.

Möhwald H. (1990). Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air-water interface. *Annual Review of Physical Chemistry*, **41**, 441-476.

Moncelli M.R., Becucci L., Guidelli R. (1994). The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes *Biophysical Journal*, **66**, 1969-1980.

Nsimba Zakanda F., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2010). Les dérivés tensioactifs de la glycine bêtaïne : Méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **14**, 737-748.

Nsimba Zakanda F., Laurent P., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2011) Alkylbetainate chlorides : Synthesis and behavior of monolayers at the air-water interface. *Thin Solid Films*, **520**, 344-350.

Razafindralambo H., Thonart P., Paquot M. (2004). Dynamic and equilibrium surface tensions of surfactin aqueous solutions. *Journal of Surfactants and Detergents*, **7**, 41-46.

Preetha A., Huilgol N., Banerjee R. (2006). Comparison of paclitaxel penetration in normal and cancerous cervical model monolayer membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **53**, 179-186.

Rozycka-Roszak B., Przystalski S., Witek S. (1988). Calorimetric studies of the micellization of some amphiphilic betaine ester derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science*, **125**, 80-85.

Speelmans G., Staffhorst R.W.H.M., de Kruijff B. (1997). The Anionic Phospholipid-Mediated Membrane Interaction of the Anti-Cancer Drug Doxorubicin Is Enhanced by Phosphatidylethanolamine Compared to Other Zwitterionic Phospholipids. *Biochemistry*, **36**, 8657-8662.

Tehrani-Bagha A.R., Oskarsson H., van Ginkel C.G., Holmberg K. (2007a). Cationic ester-containing gemini surfactants: chemical hydrolysis and biodegradation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **312**, 444-452.

Thompson R.A., Allenmark S. (1992). Factors influencing the micellar catalyzed hydrolysis of long-chain alkyl betainates. *Journal of Colloid and Interface Science*, **148**, 241-246.

Tsui F.C., Ojcius D.M., Hubbell W.L. (1986). The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophysical Journal*, **49**, 459-468.

van de Pas J.C., Olsthoorn Th.M., Schelpers F.J., de Vries C.H., Buytenhek C.J. (1994). Colloidal effects of anchored polymers in lamellar liquid-crystalline dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **85**, 221-236.

van Klompenburg W., Paetzel M., de Jong J.M., Dalbey R.E., Demel R.A., von Heijne G., de Kruijff B. (1998). Phosphatidylethanolamine mediates insertion of the catalytic domain of leader peptidase in membranes. *FEBS Lettes*, **431**, 75-79.

Vollhardt D., Fainerman V.B. (2000). Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, **86**, 103-151.

Wood K.V., Bonham C.C., Miles D., Rothwell A.P., Peel G., Wood B.C., Rhodes D. (2002). Characterization of betaines using electrospray MS/MS. *Phytochemistry*, **59**, 759-765.

Wydro P. (2007). The influence of the size of the hydrophilic group on the miscibility of zwitterionic and nonionic surfactants in mixed monolayers and micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **316**, 107-113.

## **V. Etude des interactions entre le chlorure d'hexadecylbétainate (C<sub>16</sub>BC) et les lipides**

Les principaux résultats ont été publiés dans cet article :

Publication IV

Nsimba Zakanda F., Lins L., Nott K., Paquot M., Mvumbi Ielo G., Deleu M. (2012). Interaction of hexadecylbetainate chloride with biological relevant lipids. *Langmuir*, **DOI:** 10.1021/la2040328.

## Titre: **Etude des interactions entre le chlorure d'hexadecylbétainate (C<sub>16</sub>BC) et les lipides**

### **Objectif et stratégie expérimentale**

Dans ce volet, l'interaction de C<sub>16</sub>BC avec les membranes biologiques modèles a été étudiée au moyen des monocouches lipidiques et des bicouches lipidiques sous forme vésiculaire. Des lipides représentatifs de la membrane plasmique de mammifère ont été utilisés (le 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine, POPC ; la sphingomyéline, SM et le cholestérol, CHOL). Les techniques de calorimétrie de titration isotherme (ITC) et de la Balance à film de Langmuir ont été exploitées afin d'obtenir les paramètres physico-chimiques caractéristiques de cette interaction.

Une fois arrivées à l'interface, les molécules de C<sub>16</sub>BC peuvent se réarranger afin d'optimiser leurs interactions avec les lipides constituant les membranes modèles (monocouches et bicouches). L'interaction entre le C<sub>16</sub>BC et les différents lipides a été caractérisée en appliquant une analyse thermodynamique simple aux isothermes de compression des monocouches binaires C<sub>16</sub>BC/lipide à l'interface air/eau et en exploitant les chaleurs de réaction dégagées pendant le titrage de la solution de C<sub>16</sub>BC par des suspensions de vésicules. Des conditions proches des conditions physiologiques (tampon, pH) ont été utilisées en ce qui concerne la phase aqueuse. Des assemblages binaires des molécules simples de C<sub>16</sub>BC et de chaque lipide (POPC, SM et CHOL) ont été étudiés par modélisation moléculaire, ce qui a permis de visualiser les arrangements entre une molécule de C<sub>16</sub>BC et celle de chaque lipide étudié.

Les paramètres physico-chimiques étudiés sont :

- K : constante d'affinité
- $\Delta H$ : variation d'enthalpie
- $\Delta S$ : variation d'entropie
- $\Delta G$ : variation d'énergie libre du mélange
- $\Delta G^M$ : variation d'énergie totale du mélange
- $A_{12}$ : aire moléculaire moyenne
- $\Delta \Pi$  :  $\Pi - \Pi_i$
- $\Pi_e$  : pression d'exclusion

## **Principaux résultats**

C<sub>16</sub>BC a montré une plus forte affinité pour les interfaces lipidiques. L'adsorption de C<sub>16</sub>BC dans les bicouches de POPC, SM et SM/CHOL a été spontanée, exothermique et principalement gouvernée par l'entropie. Les interactions polaires entre le C<sub>16</sub>BC et les lipides deviennent effectives à l'intérieur du film lipidique. La présence du CHOL est favorable à l'interaction, probablement à cause de sa complémentarité structurale avec le C<sub>16</sub>BC (cônique et cônique inversée, respectivement). La pénétration de C<sub>16</sub>BC a été instantanée dans les monocouches de POPC, SM et CHOL comparativement à celle dans l'eau (voir point IV) et les pressions d'exclusion ont été de 35,8, 48,9 et 45,7 pour les monocouches de POPC, SM et CHOL, respectivement. C<sub>16</sub>BC a formé des monocouches mixtes thermodynamiquement stables avec POPC, SM et CHOL, les deuxièmes étant plus stables que les deux autres.

## **Interaction of hexadecylbetainate chloride with biological relevant lipids**

Francis Nsimba Zakanda<sup>a,d</sup>, Laurence Lins<sup>b</sup>, Katherine Nott<sup>a,c</sup>, Michel Paquot<sup>a</sup>, Georges Mvumbi Lelo<sup>d</sup> and Magali Deleu<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech-Université de Liège,  
Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Gembloux Agro-Bio Tech-Université de  
Liège, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>c</sup>Unité de Chimie Générale et Organique, Gembloux Agro-Bio Tech-Université de Liège,  
Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>d</sup> Service de Biochimie, Département des Sciences de Base, Faculté de Médecine, Université  
de Kinshasa B.P.127 Kinshasa XI, R.D. Congo

\*Corresponding author

Phone : (32) 81 62 22 32

Fax : (32) 81 62 22 31

E-mail : Magali.Deleu@ulg.ac.be

## Abstract

The present work investigates the interaction of hexadecylbetainate chloride ( $C_{16}BC$ ), a glycine betaine-based ester with palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), sphingomyelin (SM) and cholesterol (CHOL), three biological relevant lipids present in the outer leaflet of the mammalian plasma membrane. The binding affinity and the mixing behavior between the lipids and  $C_{16}BC$  are discussed based on experimental (isothermal titration calorimetry (ITC), Langmuir film balance), and molecular modeling studies.

The results show that the interaction between  $C_{16}BC$  and each lipid is thermodynamically favorable and does not affect the integrity of the lipid vesicles. The primary adsorption of  $C_{16}BC$  into the lipid film is mainly governed by a hydrophobic effect. Once  $C_{16}BC$  is inserted in the lipid film, the polar component of the interaction energy between  $C_{16}BC$  and the lipid becomes predominant. Presence of CHOL increases the affinity of  $C_{16}BC$  for membrane. This result can be explained by the optimal matching between  $C_{16}BC$  and CHOL within the film rather by a change of membrane fluidity due to the presence of CHOL. The interaction between  $C_{16}BC$  and SM is also favorable and gives rise to highly stable monolayers probably due to hydrogen bonds between their hydrophilic groups. The interaction of  $C_{16}BC$  with POPC is less favorable but does not destabilize the mixed monolayer from a thermodynamic point of view. Interestingly, for all the monolayers investigated, the exclusion surface pressures are above the presumed lateral pressure of the plasma membranes suggesting that  $C_{16}BC$  would be able to penetrate into mammalian plasma membranes *in vivo*. These results may serve as a useful basis in understanding the interaction of  $C_{16}BC$  with real membranes.

Keywords: Cationic surfactant, glycine betaine-based ester, membrane model, bilayer, penetration, isothermal titration calorimetry, Langmuir monolayer, computational approach

## 1. Introduction

Glycine betaine (N,N,N-trimethylglycine) also called betaine is present in various plants, animals and microorganisms. Recently, a review of the synthesis methods and potential applications of glycine betaine derivatives has been published (Nsimba Zakanda *et al.*, 2010). Betaine can be used to form the hydrophilic part of green surfactants and several surfactants including esters (alkylbetainates chlorides – C<sub>n</sub>BC) are based on this molecule (Thompson and Allenmark, 1992; de la Maza and Parra, 1995; Joung *et al.*, 2001; Lundberg *et al.*, 2004; Wydro, 2007). These compounds are generally referred to as “mild to the skin” (Mohlin *et al.*, 2006) and are used to improve the dermatological properties of other surfactants (e.g., alkylbetaines decrease the skin irritation of anionic compounds). From the point of view of practical applications, the study of the surface properties of these compounds is of great importance. In our previous paper (Nsimba Zakanda *et al.*, 2011a), it was found that hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) forms a stable monolayer at the air-water interface under all the experimental conditions tested (pH, temperatures, ionic strengths, presence of sodium salts of monovalent or divalent anions).

Surfactants used in personal care products can cause side-effects such as cell membrane damage. Basic studies of surfactant interaction with membranes are thus of great relevance for application purposes, but also for fundamental purposes as membrane-perturbing surfactants are commonly used to lyse cells to study their contents as well as to solubilize their membrane proteins (Nararrete and Serrano, 1983). Considerable research is currently carried out on surfactant-lipid combinations which can be used as drug delivery systems for poorly soluble therapeutic agents (Knauf *et al.*, 2010). Since C<sub>n</sub>BC are a novel class of green surface-active agents potentially useful for the formulation of a wide range of products (Nsimba Zakanda *et al.*, 2010), in particular for the cosmetic and pharmaceutical fields, a basic physico-chemical study of their interaction with mammalian plasma membrane is required. Due to the complexity of biological membranes, interactions with major lipid components have been examined individually as a first approach. Bilayers and monolayers of palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), sphingomyelin (SM) and cholesterol (CHOL) have been chosen as simple models. These lipids are representative of the three main types of lipids composing the outer leaflet of the mammalian plasma membrane: phospholipids, shingolipids and CHOL (Koval and Pagano, 1991).

In a recent paper (Nsimba Zakanda et al., 2011a), we have suggested that primary interaction between C<sub>n</sub>BC and lipid monolayers is mainly governed by electrostatic forces. Hydrophobic effect can also play a role when electrostatic interactions cannot occur (in the case of uncharged lipids).

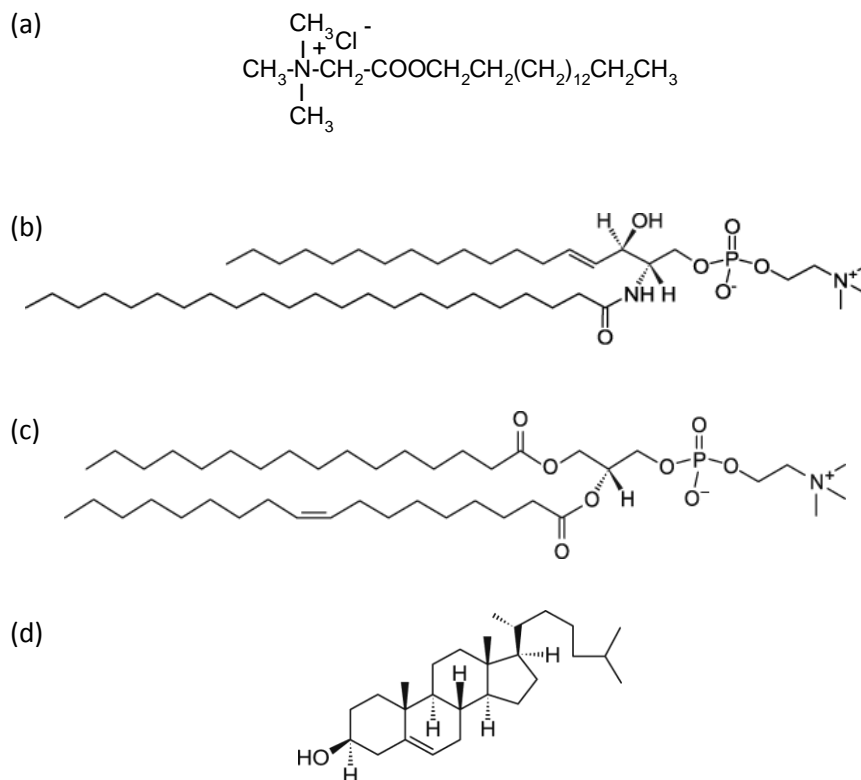
In the current work, the interaction of hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) with three types of lipids (POPC, SM, CHOL) in conditions similar to biological ones (pH and ionic strength) is thoroughly examined. The isothermal titration calorimetry (ITC) technique, which measures the heat flow associated with the binding between two entities (Nielsen et al., 2005; Andersen et al., 2008), is used to obtain information about the thermodynamics of C<sub>16</sub>BC binding to liposomes. Single lipid monolayer models are then used to analyze, by a simple thermodynamic approach, the mixing behavior (miscibility and stability) and the molecular interaction between each lipid and C<sub>16</sub>BC. A computational analysis is also performed in order to gain further insight into the interaction at the molecular level. The results will provide some basic information about the interaction of C<sub>16</sub>BC surfactant with each of the major components of the mammalian cell membrane individually or with membrane domains that might be highly enriched in a single component.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) (Figure 1) was synthesized in our laboratory (Nsimba Zakanda et al., 2011b). Briefly, betainyl chloride was formed by adding thionyl chloride dropwise to a stirred solution of glycine betaine which was then mixed for ~ 2 hours. C<sub>16</sub>BC was obtained by the acylation of 1-hexadecanol by betainyl chloride. The molecule's structure was confirmed by Infrared Spectroscopy (IR) and Mass Spectrometry (MS). A typical IR spectrum of betainyl chloride displays bands at 2960, 2870 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub>, C-H stretching), 2925, 2850 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>, C-H stretching), 1800 cm<sup>-1</sup> (C=O stretching), 675 cm<sup>-1</sup> (C-Cl stretching). IR spectra of C<sub>16</sub>BC displays bands at 2959 cm<sup>-1</sup> (C-H, stretching), 1751 cm<sup>-1</sup> (C=O stretching), 1478 cm<sup>-1</sup> (C-H bending), 1206 cm<sup>-1</sup> (C-O, stretching). Electrospray ionisation mass spectrum gives the signal of the [M]<sup>+</sup> ion at m/z = 342.4. SM, POPC and CHOL (Figure 1) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) (99% purity). The subphase used in this work was a phosphate-buffered saline (PBS) consisting of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaCl 20/20/150 mM adjusted to pH 7.4 with NaOH. The solvents (chloroform and methanol) of

analytical grade were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Reagents and solvents were used as received.



**Figure 1.** Chemical structure of (a) the hexadecylbetainate chloride ( $\text{C}_{16}\text{BC}$ ) and of the three model lipids selected: (b) Sphingomyelin (SM), (c) palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC), and (d) cholesterol (CHOL)

## 2.2.Methods

### 2.2.1. Preparation of lipid vesicles

Large unilamellar vesicles (LUVs) were used in our experiments to study the interaction of  $\text{C}_{16}\text{BC}$  with lipid bilayers. The vesicles were prepared using the lipid hydration technique. As CHOL is unable to form bilayers (de Oliveira *et al.*, 2005) and stable LUVs, the interaction of  $\text{C}_{16}\text{BC}$  with this lipid was studied thanks to vesicles prepared with a mixture of SM/CHOL (50:50 mol%). Pure POPC, SM or SM/CHOL was dissolved in chloroform/methanol (2:1 v/v), and introduced into a 10 mL round-bottom flask. A thin lipid film was obtained by removing the solvents under vacuum with a rotary evaporator. The organic solvent traces were removed by placing the flasks in a dessiccator under vacuum for 16 hours. The dried thin lipid film obtained was hydrated with PBS buffer for 1 h at 30°C for POPC and 60°C for SM and SM/CHOL, and shaken at 10 min intervals. Spontaneously formed multilamellar vesicles (MLVs) were freeze-thawed five times with liquid nitrogen and warm water (30 or

60°C). The dispersion was finally extruded fifteen times through 100-nm polycarbonate filters using a Lipex Biomembranes (Vancouver, BC) extruder to obtain LUVs.

### 2.2.2. Isothermal Titration Calorimetry

ITC measurements were performed by using a VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA). All solutions were thoroughly degassed before use by stirring under vacuum or by ultrasonication. The sample cell (1.4565 mL) was loaded with PBS buffer pH 7.4 (blank) or C<sub>16</sub>BC solution (30 µM) and the reference cell was filled with the PBS buffer. Titration was carried out at 25°C using a 300 µL syringe filled with LUV suspension prepared in PBS pH 7.4. The solution in the sample cell was stirred at 305 rpm during the experiments. A titration experiment consisted of consecutive injections of 5 µL LUV suspension. Each injection took 10 s and a delay of 200 s was applied between each successive injection to allow steady state to be attained. The effective heats were determined by subtracting the values obtained for the blanks from the observed heats. Data were processed using the software provided by the manufacturer (ORIGIN 7 – Originlab, Northampton, USA).

### 2.2.3. Determination of the binding thermodynamic parameters of the binding of C<sub>16</sub>BC to the lipid bilayers

The ITC data were treated with the cumulative model described by Heerklotz and Seelig (2000) and by Razafindralambo *et al.* (2009) according to the following equation:

$$\sum_{k=1}^i \delta h_k = \Delta H_D^{w \rightarrow b} V_{cell} C_D^0 \frac{K C_L^0}{1 + K C_L^0} \quad \text{Equation 1.}$$

where  $\delta h_k$  is the heat produced following each injection (corresponds to the area of each peak on the heat flow = f(time) plot),  $\Delta H_D^{w \rightarrow b}$  is the molar enthalpy change corresponding to the transfer of C<sub>16</sub>BC from the aqueous phase (w) to the bilayer membrane (b),  $V_{cell}$  is the volume of the calorimeter sample cell (1.4565 ml),  $C_D^0$  and  $C_L^0$  are the concentrations of C<sub>16</sub>BC and of lipid in the calorimeter sample cell, respectively, and K is the binding constant. K and  $\Delta H_D^{w \rightarrow b}$  can be evaluated simultaneously by a fit of the measured cumulative heat as a function of  $C_L^0$ .

The corresponding free energy  $\Delta G_D^{w \rightarrow b}$  and the reaction entropy  $\Delta S_D^{w \rightarrow b}$  were then calculated by the standard equations:

$$\Delta G_D^{w \rightarrow b} = -RT \ln(K C_w) = \Delta H_D^{w \rightarrow b} - T \Delta S_D^{w \rightarrow b} \quad \text{Equation 2}$$

with  $R = 8.31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  and  $C_w = 55.5 \text{ M}$  (Heerklotz and Seelig, 2000).

#### 2.2.4. Size measurements of lipid vesicles

Size of lipid vesicles prior to and after ITC experiments consisting of titration of  $C_{16}BC$  solution ( $30 \mu\text{M}$ ) by lipid vesicles were determined at  $25^\circ\text{C}$  by the dynamic light scattering technique (Delsa Nano C-Beckmann Coulter - 30 mW He-Ne laser,  $\lambda = 658 \text{ nm}$ ). Fluctuation of light scattering was measured at an angle of 160 degrees. The Non-negative least square (NNLS) method included in the software of the instrument was used to calculate the hydrodynamic diameter of the particles. Each value reported is the average of at least three independent measurements.

#### 2.2.5. Langmuir trough technique

Penetration experiments of  $C_{16}BC$  into a lipid monolayer were performed at constant area ( $120 \text{ cm}^2$ ) using an automated LB system (KSV Minitrough, KSV Instruments, Helsinki, Finland). A platinum Wilhelmy plate was used to measure the surface pressure. The PBS subphase temperature was maintained constant at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  by circulating water through the base plate on which the trough is mounted. The system was enclosed in a Plexiglas box in order to minimize water evaporation and to avoid trace pollution.  $C_{16}BC$  stock solutions were prepared in PBS. Lipid monolayers were prepared at defined initial surface pressures ( $\Pi_i = 5, 10, 20$  and  $30 \text{ mN/m}$ ) by carefully spreading pure lipid solutions (SM, POPC or CHOL) prepared in chloroform/methanol (2:1, v/v) onto the PBS subphase (volume  $\sim 89 \text{ mL}$ ). After waiting for stabilization of  $\Pi_i$ ,  $C_{16}BC$  was injected into the subphase to a final concentration of  $1.18 \mu\text{M}$ . It is assumed that  $C_{16}BC$  molecules exist mainly as monomers within the subphase as this concentration is well below the  $C_{16}BC$ 's measured critical micellar concentration ( $34 \pm 3 \mu\text{M}$ ) (data not shown). During the measurements the subphase is continuously gently stirred with a magnetic bar. The difference between  $\Delta\Pi$  of two independent sets of measurements was less than  $0.5 \text{ mN/m}$ .

Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) compression isotherms were recorded using the same LB system.  $C_{16}BC$  and lipids (SM, POPC and CHOL) were dissolved in chloroform/methanol (2:1, v/v). Pure solutions as well as binary mixtures ( $C_{16}BC$ /SM,  $C_{16}BC$ /POPC and  $C_{16}BC$ /CHOL with a defined composition) were prepared to a final concentration of  $1500 \mu\text{M}$ . A volume of  $20\text{-}30 \mu\text{L}$  was spread on the PBS subphase at  $25^\circ\text{C}$ .

After waiting for 15 min to allow for solvent evaporation and spreading of the molecules, the monolayer was compressed by two barriers approaching symmetrically at a rate of 10 mm/min. The surface pressure was measured during the entire compression. The variation coefficient of at least two independent experiments did not exceed 5%.

#### 2.2.6. Molecular modeling of C<sub>16</sub>BC/lipid interaction

The organization and mode of interaction of the C<sub>16</sub>BC and the lipids were studied in C<sub>16</sub>BC/POPC, C<sub>16</sub>BC/SM and C<sub>16</sub>BC/CHOL 1/1 molar complexes.

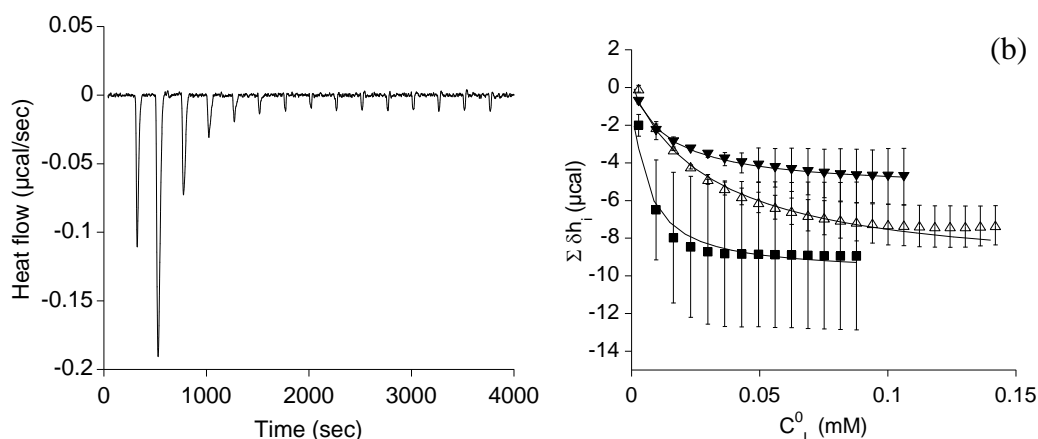
The modeling approach (called hypermatrix), published more than 15 years ago (Brasseur *et al.*, 1987) and upgraded (Lins *et al.*, 1999), is a “static” approach in the sense that the structure of the molecules is rigid. This method allows to calculate the interaction between a molecule (pharmacological drug, peptide, lipid analog,...) and lipids. Both molecules are first oriented at the lipid/water interface using TAMMO procedure (Brasseur, 1990). This allows taking implicitly the hydrophobicity of the medium into account. Then, the molecule of interest (here C<sub>16</sub>BC) is fixed at the interface and the molecule of lipid (POPC, SM or CHOL) is moved toward C<sub>16</sub>BC, taking the position of the interface into account. By rotations and translations, more than 100.000 positions are tested, and the corresponding interaction energy is calculated for each position. The energy is the sum of the electrostatic, Van der Waals and hydrophobic contributions. The position corresponding to the lowest energy state of the complex is retained. It should be noted that the calculations are not made in a free space, since the molecules are oriented at the interface (and so the variation of the dielectric constant is notably taken into account) and due to the fact that we calculate the hydrophobic energy using an empirical equation which has been validated by comparison to experiment (Lins and Brasseur, 1995). This approach implicitly takes the medium into account. This method has been used for studying the interaction of numerous molecules with lipids (Razafindralambo *et al.*, 2009; Razafindralambo *et al.*, 2011) All calculations were performed on a Linux station bi-xeon quad core, using Z-ultim software.

### 3. Results

#### 3.1. Thermodynamic analysis of the binding of C<sub>16</sub>BC to lipid bilayers

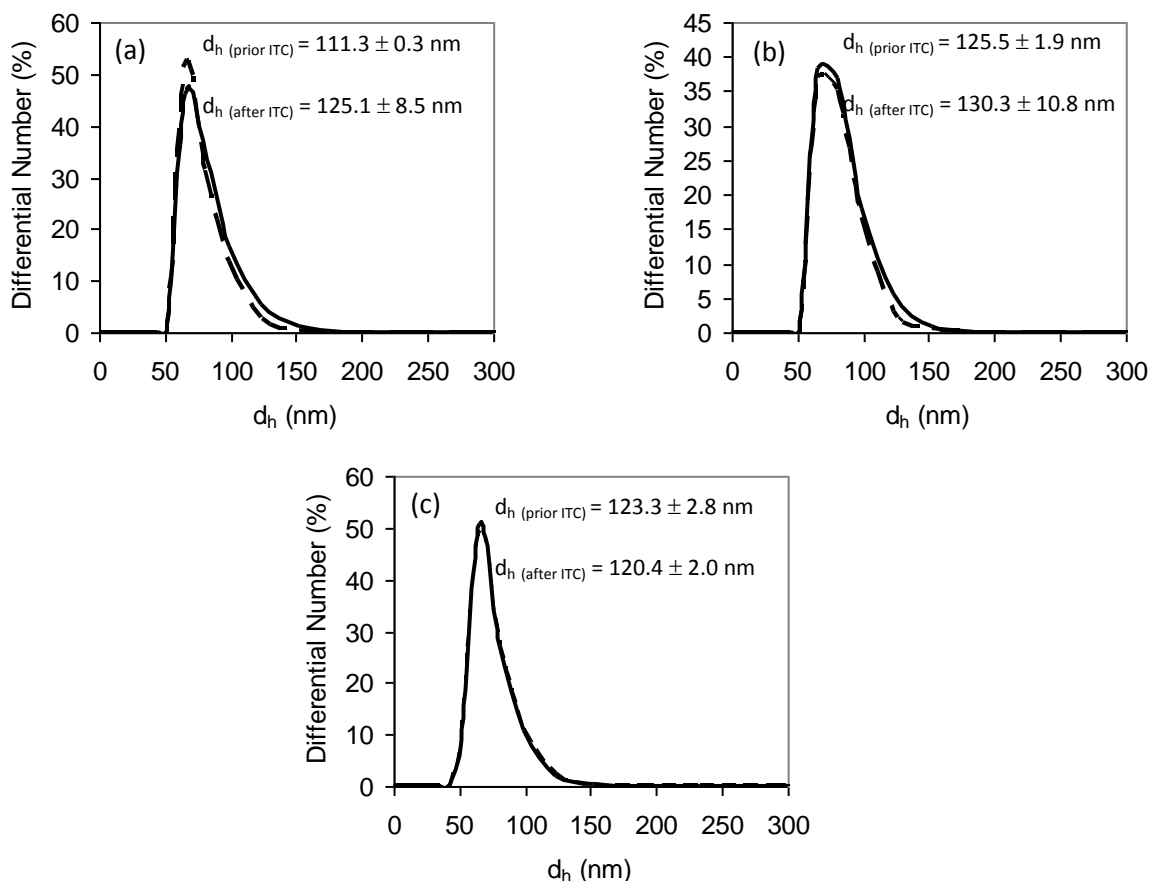
A typical isothermal titration of a C<sub>16</sub>BC aqueous solution with a LUV suspension is shown in Figure 2a. The binding of C<sub>16</sub>BC to the lipid bilayer is exothermic. The area of the peak

decreases gradually with the successive LUV injections and becomes small and constant once free  $C_{16}BC$  molecules are no longer available. The residual heat flows observed in the raw data correspond to the heat associated with the vesicle dilution in the sample cell (Santos *et al.*, 2007). Integration of the heat flow peaks in Figure 2a gives the heats of reaction,  $\delta h_i$ . Figure 2b shows the cumulative heats ( $\sum \delta h_i$ ) as a function of the lipid concentration ( $C_L^0$ ) in the cell for the three lipids selected.



**Figure 2.** (a) Typical raw data of an ITC experiment. The peaks are related to the successive injections of  $5\mu\text{l}$  of SM/CHOL LUV suspension at  $1000\mu\text{M}$  into a  $30\mu\text{M}$  solution of  $C_{16}BC$  at  $25^\circ\text{C}$ . (b) The cumulative heats of binding ( $\sum \delta h_i$ ) as a function of the lipid concentration in the cell ( $C_L^0$ ). (■) SM/CHOL, ( $\Delta$ ) SM, ( $\blacktriangledown$ ) POPC. The solid line represents the best fit using the Eq 1. The buffer used was PBS at pH 7.4. Error bars are based on reproducibility over at least two independent measurements.

The integrity of the lipid vesicles after  $C_{16}BC$  binding was checked by particle size measurements before and after ITC experiments. The mean hydrodynamic diameter of the vesicles and the size distribution are not greatly affected by the presence of  $C_{16}BC$  at  $30\mu\text{M}$  (Figure 3). The macroscopic structure of the vesicles is thus not modified by their interaction with  $C_{16}BC$ . No population of small particles is observed suggesting that no mixed micelles are formed at this concentration of  $C_{16}BC$ .



**Figure 3.** Particle size distribution prior to (full line) and after (dashed line) ITC experiments (a) POPC, (b) SM, (c) SM/CHOL. Inset: value of the mean hydrodynamic diameter ( $d_h$ ) (average of three independent measurements).

Fitting of the data of Figure 2b according to Eq. 1 and 2 gives the thermodynamic parameters listed in Table 1. It was assumed as for cetylpyridinium chloride (CPC), another positively charged ammonium detergent of similar size to  $C_{16}BC$ ,<sup>25</sup> that the  $C_{16}BC$  flip-flop rate from the external to the internal sheet of the bilayer is fast enough to consider, in Equation 1, the total and not only half of the lipid concentration.

**Table 1.** Thermodynamic parameters for the binding of  $C_{16}BC$  to LUV with different compositions at 25°C.

Bilayer composition	$K$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$\Delta H_D^{w \rightarrow b}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$T \Delta S_D^{w \rightarrow b}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta G_D^{w \rightarrow b}$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
POPC	$35.3 \pm 2.3$	$-0.72 \pm 0.19$	$35.17 \pm 2.52$	$-35.90 \pm 2.34$
SM	$41.6 \pm 11.0$	$-0.88 \pm 0.18$	$35.32 \pm 0.92$	$-36.20 \pm 0.73$
SM/CHOL	$195.2 \pm 13.6$	$-0.93 \pm 0.41$	$39.20 \pm 0.58$	$-40.13 \pm 0.17$

Regardless the composition of the vesicle, the binding reactions are spontaneous ( $\Delta G_D^{w \rightarrow b} < 0$ ), exothermic ( $\Delta H_D^{w \rightarrow b} < 0$ ), and generate a large positive change of the system entropy ( $\Delta S_D^{w \rightarrow b} > 0$ ) suggesting that the global binding is mainly entropy-driven. Tsao and Tseng (2001) have also concluded for CPC that its insertion into bilayers is driven by an entropy gain. Marcotte *et al.* (2005) have suggested that this entropy gain is related to the hydrophobic effect, i.e. a release of water molecules from the hydration layer of the lipid membrane and the dehydration of the  $C_{16}B^+$  ion upon binding (Haq *et al.*, 1997; Sinn *et al.*, 2004; Bouchemal *et al.*, 2009).

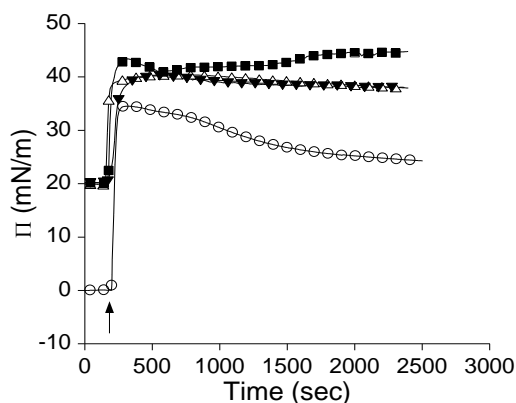
The binding constant,  $K$ , is not significantly different for the pure POPC or SM vesicles. For the SM/CHOL,  $K$  is much higher than for the pure POPC or SM vesicles. This indicates that  $C_{16}BC$  has a higher affinity for the SM/CHOL bilayer and that CHOL favors the binding of  $C_{16}BC$  to lipid vesicles. It is an opposite behaviour to the one reported for CPC for which CHOL-containing membranes restrict its insertion (Bouchemal *et al.*, 2009). The favorable insertion of  $C_{16}BC$  into SM/CHOL system could be accompanied by a higher release of water molecules which could explain the larger entropy gain ( $\Delta S_D^{w \rightarrow b}$ ) observed in this case.

At 25°C, the binary mixture SM/CHOL (50:50) is in a liquid-ordered state (Goñi *et al.*, 2008; Goñi and Alonso, 2009) which is an intermediate situation between the solid-ordered and the liquid-disordered phases formed by SM and POPC respectively. A uniform lateral distribution of SM and CHOL without domain coexistence has been suggested (Almeida, 2009). Hence, the fluidity of the membrane does not appear to be a critical parameter for  $C_{16}BC$  insertion, which is in contradiction with the general belief that a fluid phase is required for the incorporation of biomolecules into bilayers. We suggest that distinct interactions of  $C_{16}BC$  with the individual lipids could be at the origin of the different affinities observed rather than a change of membrane fluidity.

To further investigate our assumption, interaction of  $C_{16}BC$  with pure lipid monolayers of single lipid was explored using the Langmuir trough technique.

### 3.2. C<sub>16</sub>BC penetration into pure lipid monolayers

The ability of C<sub>16</sub>BC to interact with each lipid is studied by measuring the C<sub>16</sub>BC-induced surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) after the injection of C<sub>16</sub>BC beneath the pure lipid monolayers performed at different initial surface pressures ( $\Pi_i$ ) (5, 10, 20 and 30 mN/m).



**Figure 4.** Typical adsorption kinetic of hexadecylbetainate chloride (C<sub>16</sub>BC) at a clean air-water interface (○) or into lipid monolayers spread at 20 mN/m: (■) CHOL, (Δ) SM, (▼) POPC. The arrow indicates the moment at which injection occurred. C<sub>16</sub>BC is injected at a final concentration of 1.18  $\mu$ M into the subphase (PBS pH 7.4; 25°C).

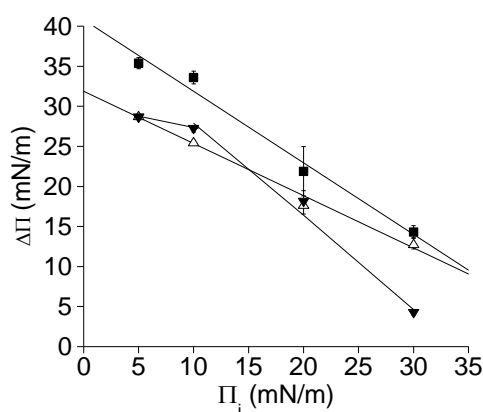
The adsorption of C<sub>16</sub>BC at a clean air-water interface is instantaneous.  $\Pi$  attains a maximal value ( $\sim 34.5$  mN/m) and progressively decreases to reach an equilibrium ( $\sim 24.0$  mN/m) after 2000 sec (Figure 4). The adsorption of C<sub>16</sub>BC into the lipid interfaces is also instantaneous. The  $\Delta\Pi$  observed gives evidence of penetration of C<sub>16</sub>BC into the lipid monolayer as explained by Marsh (1996) and reported for other surfactants (Maget-Dana, 1999; Deleu et al., 2008). The first step of the kinetics is similar for all the lipids investigated.  $\Pi$  attains a maximal value and progressively decreases to reach the equilibrium for the SM and POPC monolayers. However, in the case of CHOL,  $\Pi$  decreases abruptly after its step increase and then progressively rises again to reach equilibrium after  $\sim 40$  min. After its initial adsorption at the CHOL interface, a multi-step molecular reorganization of the monolayer components likely occurs within the monolayer in order to optimize the interface arrangement.

Figure 5 shows the  $\Delta\Pi$  induced by C<sub>16</sub>BC adsorption into the lipid monolayer as a function of  $\Pi_i$ .  $\Delta\Pi$  globally decreases with  $\Pi_i$  as it is generally observed for surfactants (Deleu et al., 2008). In the case of SM and CHOL, a first order decrease is observed while two parts can be

distinguished for the POPC curve. In this latter case,  $\Delta\Pi$  decreases slightly with  $\Pi_i$  below 10 mN/m, while it decreases more steeply above 10 mN/m.

By extrapolating the curve of  $\Delta\Pi$  versus  $\Pi_i$  to the X-axis, the exclusion surface pressure of penetration ( $\Pi_e$ ) can be determined. It corresponds to the initial surface pressure above which the surfactant can no longer penetrate the monolayer. It reflects the penetration power of a surfactant. The  $\Pi_e$  are 34.2, 45.7 and 48.9 mN/m for POPC, CHOL and SM, respectively. They are above the presumed lateral pressure of the biological membranes which is estimated to be around 30 mN/m (Marsh, 1996). Molecules with  $\Pi_e$  higher than 30 mN/m are considered as potentially efficient for interaction and insertion into lipid membranes *in vivo* (Demel et al., 1975)

Moreover, the ordinates at the origin of the linear regression for the three systems investigated (30.2, 40.8 and 31.9 mN/m for POPC, CHOL and SM respectively) are much higher than the equilibrium  $\Delta\Pi$  ( $\sim 24.0$  mN/m - Fig. 4) obtained after the adsorption of  $C_{16}BC$  at the air-water (PBS, pH 7.4) interface in the absence of lipid monolayer. In PBS buffer, all the lipids tested exert thus a positive effect on  $C_{16}BC$  adsorption. In a pure water medium, it was the case for CHOL but not for POPC (Nsimba Zakanda et al., 2011b).



**Figure 5.** Surface pressure increase ( $\Delta\Pi$ ) caused by the penetration of  $C_{16}BC$  into pure monolayers of (■) CHOL, (Δ) SM, (▼) POPC as a function of their initial surface pressure ( $\Pi_i$ ).  $C_{16}BC$  is injected beneath the lipid monolayer at a final concentration of  $1.18 \mu\text{M}$  in the PBS subphase at pH 7.4 and  $25^\circ\text{C}$ . Error bars are smaller than symbols in some cases. The solid line represents the linear fitting of the data ( $R^2 = 0.98$  and  $0.99$  for CHOL and SM respectively). For POPC, the linear fitting has been done for  $\Pi_i \geq 10$  mN/m and  $R^2 = 0.98$ ).

### 3.3. Interfacial properties of spread C<sub>16</sub>BC/lipid monolayers upon compression

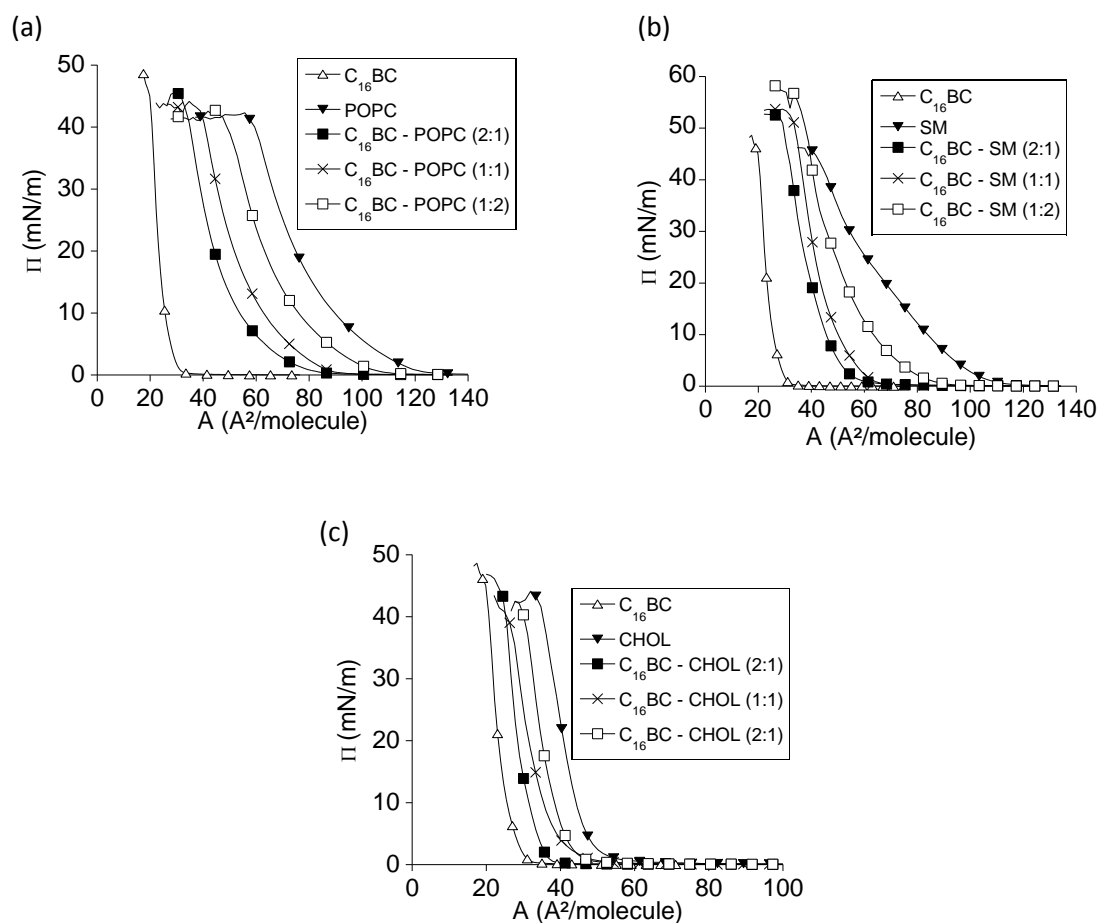
Binary mixtures of C<sub>16</sub>BC and each characteristic lipid chosen were spread at the air-water (PBS pH 7.4) interface at 25°C and the compression isotherms of the mixed monolayers were studied. A thermodynamic analysis is performed in order to characterize the interaction between this surfactant and the lipids.

Figure 6a-c illustrates the  $\Pi$ -A isotherms for pure monolayers of C<sub>16</sub>BC, POPC, SM and CHOL, as well as for the binary mixtures of C<sub>16</sub>BC with the three lipids in different proportions. The shape of the compression isotherm recorded for C<sub>16</sub>BC is typical of a condensed monolayer (Figure 6a). The molecular area ( $A_c$ ) and the surface pressure ( $\Pi_c$ ) at the collapse are  $19.4 \pm 0.4 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $46.2 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ , respectively.  $A_c$  is higher and  $\Pi_c$  lower with the PBS subphase than with the pure water subphase used in our previous study ( $17.3 \pm 0.3 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $52.3 \pm 0.6 \text{ mN/m}$ ) (Nsimba Zakanda et al., 2011b). This is the result of the interaction between the positive head groups of C<sub>16</sub>BC molecules and the subphase hydrophilic anions ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{Cl}^-$ ) which expands and slightly destabilizes the C<sub>16</sub>BC monolayer (Boury et al., 2001).

The compression isotherm recorded for POPC (Figure 6a) is characteristic of a liquid expanded monolayer with no discontinuities suggestive of phase changes, in accordance with the literature (Matti et al., 2001). The collapse parameters are  $A_c = 58.5 \pm 0.9 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $\Pi_c = 40.8 \pm 1.7 \text{ mN/m}$ . The isotherm recorded for SM is also typical of liquid expanded monolayers until  $\sim 25 \text{ mN/m}$  at which a slight increase in slope is observed suggesting a more condensed state for the monolayer (Figure 6b and Supporting Information). The shape is similar to those of the isotherms previously obtained (Georgiev et al., 2010). The  $A_c$  is  $43.1 \pm 1.5 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $\Pi_c$  is  $43.7 \pm 2.1 \text{ mN/m}$ . The shape of the compression isotherm for CHOL (Figure 6c) indicates that this sterol forms a highly condensed monolayer at the air-water interface. An area of  $40.6 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  at  $20 \text{ mN/m}$  is in agreement with the literature (Kodama et al., 2004; Kanintronkul et al., 2005; Eeman et al., 2009). The collapse parameters observed are  $A_c = 34.1 \pm 0.8 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  and  $\Pi_c = 43.2 \pm 0.1 \text{ mN/m}$ .

The compression isotherms for mixed systems (C<sub>16</sub>BC/POPC, C<sub>16</sub>BC/SM and C<sub>16</sub>BC/CHOL) lie between those of the pure components. Increase of the C<sub>16</sub>BC concentration shifts the

isotherms towards the curve of pure  $C_{16}BC$ . The shape of the mixed isotherms is not significantly influenced by the proportion of  $C_{16}BC$ . Their  $\Pi_c$  values are between those of the pure components with the exception of the mixed  $C_{16}BC/SM$  monolayers for which  $\Pi_c$  is much higher for all the proportions studied.



**Figure 6.** Surface pressure ( $\Pi$ )–molecular area ( $A$ ) isotherms for  $C_{16}BC$  and lipid mixtures spread onto PBS subphase pH 7.4 at 25°C:  $C_{16}BC/POPC$  (a),  $C_{16}BC/SM$  (b) and  $C_{16}BC/CHOL$  (c).

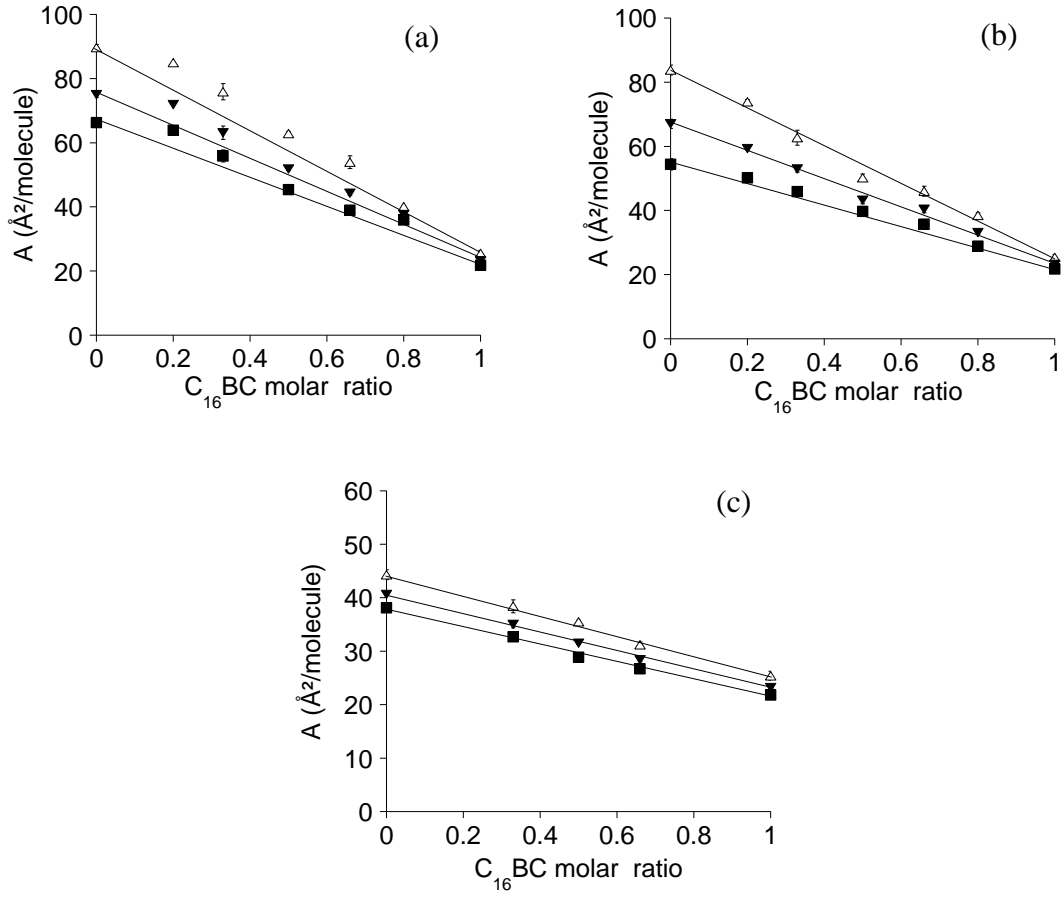
A simple thermodynamic analysis of compression isotherm data can give further information about the miscibility and the interaction between the components in the mixed monolayers. The plots of the mean molecular area ( $A$ ) of the mixed monolayer as a function of the  $C_{16}BC$  molar ratio are shown in Figure 7 for three  $\Pi$  (10, 20 and 30 mN/m). If the components of the monolayer are completely immiscible or ideally miscible, the molecular area is a linear function of the composition and follows the additivity rule given by Equation 3. A deviation

from ideal behavior suggests the existence of interaction between the molecules and a partial miscibility (Georgiev *et al.*, 2010).

$$A_{12} = A_1X_1 + A_2X_2 \quad \text{Equation 3}$$

where  $A_{12}$  is the mean molecular area for ideal mixing of the two components at a given  $\Pi$ ,  $A_1$  and  $A_2$  are the molecular areas of the respective components in their pure monolayers at the same  $\Pi$  and  $X_1$  and  $X_2$  are the molar ratios of components 1 and 2 in the mixed monolayers.

A small positive deviation from ideal behavior is observed for most of the  $C_{16}BC/POPC$  monolayers at  $\Pi \leq 20$  mN/m. In the case of SM, a negative deviation of  $A$  is observed for  $C_{16}BC$  molar ratio of 0.5 at 10 and 20 mN/m while no or small positive deviations are noted at 30 mN/m. For these monolayers, interaction occurs between the components whereas an ideal behavior is observed for the  $C_{16}BC/CHOL$  for the whole range of compositions and  $\Pi$  investigated. The mean molecular areas of  $C_{16}BC$  and  $CHOL$  are not influenced by the presence of the other. In other words, it indicates that no interaction exists between the components. In such a case, there are two possibilities for their distribution within the monolayer: either the two components are completely immiscible or they are completely miscible.



**Figure 7.** Mean molecular area ( $A$ ) versus composition plot for the mixtures of  $C_{16}BC$  with POPC (a), SM (b) and CHOL (c) at different  $\Pi$  ( $\Delta$ ) 10 mN/m, ( $\blacktriangledown$ ) 20 mN/m and ( $\blacksquare$ ) 30 mN/m at 25°C. Straight lines correspond to the ideal mixing behavior (Equation 3). In some cases, the error bars are smaller than the symbols.

A more quantitative thermodynamic analysis of the mixtures can be obtained by calculating the excess free energy of mixing  $\Delta G^{ex}$  (Equation 4) and the total free energy of mixing ( $\Delta G^M$ ) (Equation 5) (Goodrich, 1956).

$$\Delta G^{ex} = \int_0^{\Pi} (A_{12} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\Pi \quad \text{Equation 4}$$

$$\Delta G^M = \Delta G^{ex} + \Delta G^{id} \quad \text{Equation 5}$$

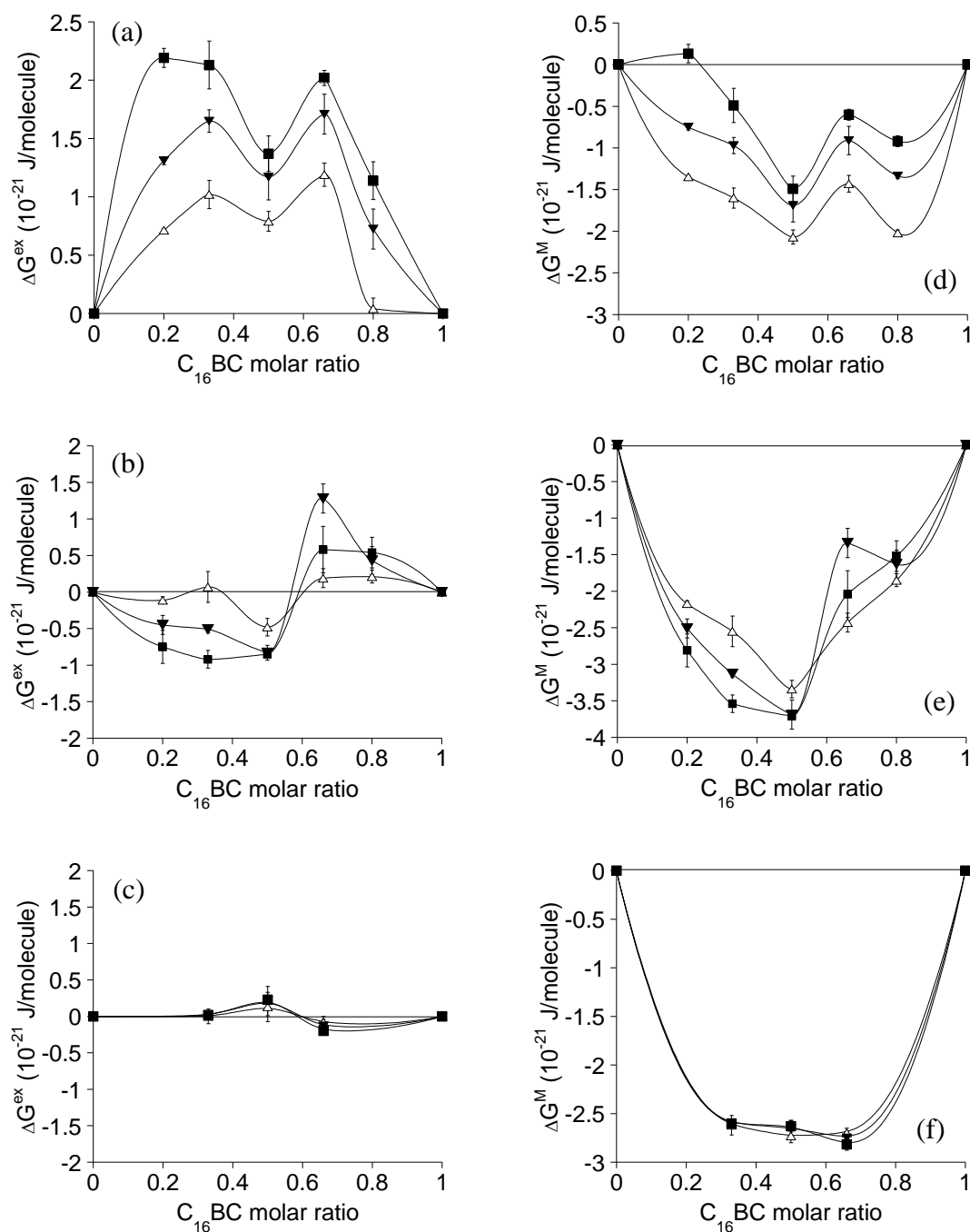
where  $\Delta G^{id}$  is the free energy for ideal mixing and is defined by equation 6.

$$\Delta G^{id} = RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2) \quad \text{Equation 6}$$

where  $R$  is the universal gas constant and  $T$ , the absolute temperature.

$\Delta G^{\text{ex}}$  provides information about the possible interaction between the monolayer forming components (Maget-Dana, 1999). Negative values of  $\Delta G^{\text{ex}}$  indicate that the interactions between the components in the mixed monolayers are more attractive or less repulsive compared to those occurring in their respective pure monolayers. Positive values of  $\Delta G^{\text{ex}}$  suggest that the interactions are less attractive or more repulsive than those existing in the one-component monolayers (Eeman *et al.*, 2005; Haç-Wydro *et al.*, 2005; Wydro and Paluch, 2009).  $\Delta G^{\text{M}}$  gives information about the thermodynamic stability of the mixed monolayers. A negative value indicates that the system is stable (Maget-Dana, 1999).

$\Delta G^{\text{ex}}$  and  $\Delta G^{\text{M}}$  as a function of the C<sub>16</sub>BC molar ratio plots are shown in Figure 8a-f. Globally, their absolute values are lower than those observed for similar systems such as dialkyldimethylammonium bromides-sterol (Haç-Wydro *et al.*, 2005). Nevertheless, they are statistically different from ideal mixing and provide some further insight into the different affinities between C<sub>16</sub>BC and the three bilayer components. The positive values of  $\Delta G^{\text{ex}}$  obtained for most of C<sub>16</sub>BC/POPC mixed monolayers (Figure 8a) indicate repulsive interaction between the monolayer forming components. This suggests that, at least one component forms two-dimensional aggregates at the interface (Maget-dana, 1999; Eeman *et al.*, 2005). C<sub>16</sub>BC/SM mixed monolayers show nil or negative  $\Delta G^{\text{ex}}$  at C<sub>16</sub>BC molar ratio  $\leq 0.5$  (Figure 8b). This suggests that attractive interaction exists within the mixed monolayers between C<sub>16</sub>BC and SM molecules. However, positive deviations, that can be related to repulsive interactions, are observed at C<sub>16</sub>BC molar ratio = 0.66 and 0.8. No deviation is observed for the C<sub>16</sub>BC/CHOL pairs (Figure 8c) confirming the ideal behaviour of these mixtures.



**Figure 8.** Excess free energy of mixing ( $\Delta G^{\text{ex}}$ ) and total free energy of mixing ( $\Delta G^{\text{M}}$ ) versus  $C_{16}\text{BC}$  molar ratio for the mixtures of  $C_{16}\text{BC}$  with POPC (a, d), SM (b, e) and CHOL (c, f) at different  $\Pi$  ( $\Delta$ ) 10 mN/m, ( $\blacktriangledown$ ) 20 mN/m and ( $\blacksquare$ ) 30 mN/m and at 25°C. Error bars are smaller than symbols in some cases.

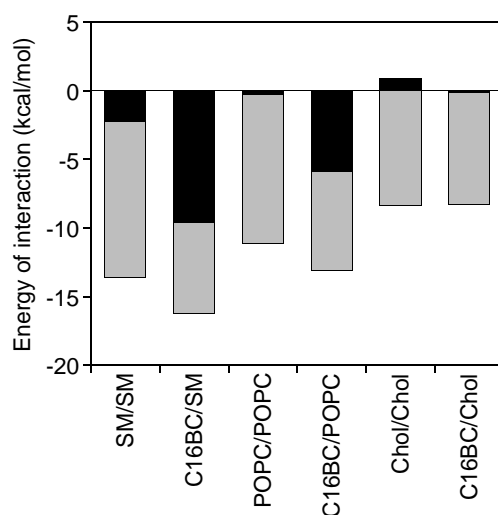
The values of  $\Delta G^{\text{M}}$  in Figure 8d-f are negative for most of the  $C_{16}\text{BC}/\text{POPC}$ , all the  $C_{16}\text{BC}/\text{SM}$  and all the  $C_{16}\text{BC}/\text{CHOL}$  mixed monolayers implying that the mixing behaviour of  $C_{16}\text{BC}$  and each lipid is thermodynamically favorable within the whole range of composition and  $\Pi$  investigated. At a given  $\Pi$ ,  $\Delta G^{\text{M}}$  is more negative for  $C_{16}\text{BC}/\text{SM}$  and

$C_{16}BC/CHOL$  systems than for  $C_{16}BC/POPC$ . The mixed monolayers formed with SM and CHOL are more stable than those with POPC. For the  $C_{16}BC/POPC$  mixed monolayers,  $\Delta G^M$  increases as  $\Pi$  increases, suggesting that the mixed monolayers become less stable at higher  $\Pi$ . At  $\Pi = 30$  mN/m,  $C_{16}BC/POPC$  (1:1) mixed monolayer is the most stable monolayer (Figure 8d). For the mixed  $C_{16}BC/SM$  monolayers, at a  $C_{16}BC$  molar ratio  $\leq 0.5$ , the stability of the mixed  $C_{16}BC/SM$  monolayers increases with  $\Pi$  while at  $C_{16}BC$  molar ratio = 0.66, the stability decreases with increasing  $\Pi$  (Figure 8e). The stability of  $C_{16}BC/CHOL$  is not influenced by  $\Pi$  (Figure 8f).

### 3.4. Molecular modeling

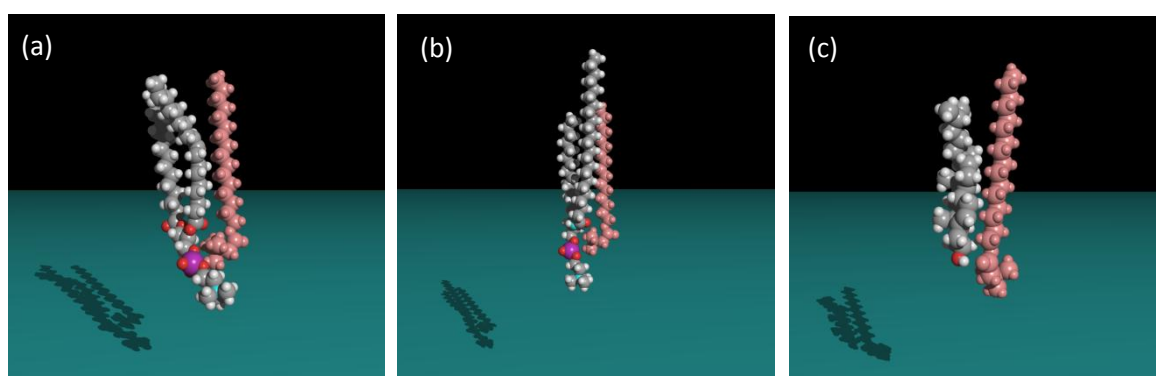
The Hypermatrix method used for the molecular modeling is a “static” approach in the sense that the structure of the molecules is rigid (Lins *et al.*, 1999). Issues that might be sensitive to the way in which the chains are folded within the bilayer cannot thus be explored but this approach is particularly useful for investigating the nature of the interaction of drugs and other molecules with specific parts of the membrane and for estimating how the molecular area is affected by the interactions in the vicinity of the hydrophobic/hydrophilic interface.

The calculation of the interaction energy between one molecule of SM or POPC and one molecule of  $C_{16}BC$  (Figure 9) shows that these associations lower the total energy, as compared to pure lipids.



**Figure 9.** Total energy of interaction between the pure lipid molecules and between each lipid and  $C_{16}BC$ . Black and grey bars correspond to the polar and the hydrophobic contributions, respectively.

The most favorable interaction is obtained with SM which is in accordance with the  $\Delta G^M$  values at  $C_{16}BC$  molar ratio = 0.5. For SM and POPC, the polar contribution increases markedly when they interact with  $C_{16}BC$  while the energy is mainly of hydrophobic origin for pure lipid self-assembly. In both cases, the  $PO_4^-$  of the lipid is close to the quaternary ammonium of  $C_{16}BC$  (Figure 10a and b) and can then interact electrostatically. Moreover, the ester moiety of  $C_{16}BC$  is located at the level of the amide and the hydroxyl groups of SM (Figure 10b). Formation of H bonds between these groups can also contribute to the polar component of the interaction energy.



**Figure 10.** Molecular assembly of  $C_{16}BC$  (in pink) with (a) POPC, (b) SM and (c) CHOL at an hydrophobic/hydrophilic interface.

In the case of CHOL, the interaction energies with  $C_{16}BC$  or with itself are similar. Furthermore, the total calculated interfacial area occupied by both molecules in the assembly ( $94 \text{ \AA}^2$ ) is equal to the addition of the individual molecular areas ( $54 \text{ \AA}^2$  for CHOL and  $39 \text{ \AA}^2$  for  $C_{16}BC$ ) in accordance with our experimental results (Figure 6c). The assembly of  $C_{16}BC$  and CHOL does not appear to disturb their self arrangement at the interface. Their fitting shown in Figure 10c can be considered as ideal. The OH group of CHOL is at the level of the  $C_{16}BC$  ester bond, slightly decreasing the polar energy as compared to pure CHOL assembly and the sterol rings are parallel to  $C_{16}BC$  alkyl chain, generating a large hydrophobic contribution to the interaction energy, as for pure CHOL.

#### 4. General discussion and conclusion

The negative binding free energies ( $\Delta G_D^{w \rightarrow b}$  – Table 1) of C<sub>16</sub>BC for the lipid systems investigated indicate that the transfer of C<sub>16</sub>BC from the aqueous phase into lipid bilayers is thermodynamically favorable. C<sub>16</sub>BC surfactant (at a concentration near its CMC) is able to bind to lipid vesicles without compromising their integrity (Figure 3). The increase of the surface pressure after the injection of C<sub>16</sub>BC beneath the lipid monolayers also gives evidence of C<sub>16</sub>BC penetration into all the lipid films investigated. Moreover, the exclusion pressure of C<sub>16</sub>BC for the three lipids is above the presumed surface pressure of biological membranes, suggesting that C<sub>16</sub>BC could be able to insert into *in vivo* mammalian plasma membranes containing high concentration of these three lipids.

Bilayer binding constant (K –Table 1) and monolayer equilibrium  $\Delta\Pi$  (Figure 4) values clearly show that the insertion of C<sub>16</sub>BC is more important for the CHOL-containing films than for SM or POPC films. However, one could expect penetration to be favored into POPC as this lipid forms liquid-disordered lamellar phase (Goñi and Alonso, 2008) and monolayers less packed than those of CHOL or SM at a given surface pressure (Shaikh et al., 2001; Sun and Sui, 2002). Our measurements indicate otherwise. It means that membrane fluidity is not the key feature to explain distinct C<sub>16</sub>BC insertion between SM/CHOL and, SM and POPC.

Higher affinity of hexadecylphosphocholine, another quaternary ammonium surfactant with a 16 carbon atoms chain, for CHOL rather than POPC has also been previously reported (rakotomanga et al., 2004). This may be due to the fact that the CHOL sterol rings can fit nicely into the C<sub>16</sub>BC alkyl-chain region and that its hydroxyl group helps to anchor the CHOL molecule at the C<sub>16</sub>BC head–alkyl-chain interface as shown by the molecular modeling of their assembly (Figure 10c). This suggests an ideal miscibility, i.e. a uniform distribution, of C<sub>16</sub>BC and CHOL, and corroborates the ideal behavior observed for the mixed C<sub>16</sub>BC/CHOL monolayers (Figure 7). However, the kinetic of their optimal mutual organization is slow as shown by the long stabilizing time of  $\Delta\Pi$  observed in monolayer systems (Figure 4). The very small value of  $\Delta G_{ex}$  for C<sub>16</sub>BC-CHOL monolayers seems to be inconsistent with the large  $\Delta S_D^{w \rightarrow b}$  observed for the C<sub>16</sub>BC-CHOL-SM bilayer. However, both parameters do not reflect the same phenomenon. In the bilayer experiments there is an adsorption and insertion stage while in the monolayer experiments, both molecules are spread

simultaneously at the interface and no adsorption phenomenon occurs. The  $\Delta S_D^{w \rightarrow b}$  value calculated from bilayer results takes into consideration the global interaction phenomenon comprising the adsorption, the insertion and the rearrangement of both components due to their strictly speaking interaction while the  $\Delta G^{\text{ex}}$  calculated from monolayer data is restricted to the last step.

POPC has a larger head group than CHOL and cannot pack tightly due to head-tail mismatch, causing its tail group to be tilted even at high surface pressures. Moreover, the presence of a cis double bond in the hydrocarbon chain of POPC prevents their close packing and increases the intermolecular distance in the monolayer (Ishitsuka et al., 2006) as reflected in the area per molecule in the one-component monolayer (Figure 6). The steric hindrance of the POPC molecule is high and insertion of C<sub>16</sub>BC molecules between POPC molecules is less favorable. Similar results have been obtained for the interaction between stearic acid and DOPC (Haç-Wydro et al., 2009).

SM possesses a trans double bond located at the C<sub>4</sub>–C<sub>5</sub> of its sphingosine backbone (Figure 1b), and shows a tighter packing than POPC in its monolayer ( $A_c$  values from Figure 6) (Kupiainen et al., 2005; Subbaiah et al., 2009). Hydrogen bonds between the amide or the hydroxyl of the acyl chain of SM and the carbonyl group of C<sub>16</sub>BC can be formed, favoring the polar interaction between the molecules. Moreover, they can promote the van der Waals interactions between the alkyl chains of C<sub>16</sub>BC and of SM (Slotte, 1999). These interactions stabilize the monolayer as shown by their negative  $\Delta G^{\text{M}}$  (Figure 8e) and the much higher  $\Pi_c$  for the mixed systems compared to the pure ones (Figure 6b). However, with a C<sub>16</sub>BC molar ratio  $> 0.5$ ,  $\Delta G^{\text{ex}}$  (Figure 8b) becomes positive and the interactions are thus more repulsive. Hydrogen bonds between the hydrophilic groups can explain the more favorable C<sub>16</sub>BC interaction with the SM monolayer rather than with the POPC as highlighted by the computer modeling calculation and as reflected by the  $\Pi_c$  determined. In bilayers, this difference is not significant. A higher flip-flop rate of C<sub>16</sub>BC from the outer to the inner leaflet of the POPC bilayer could compensate this effect.

In general conclusion, this study has shown that the interaction between C<sub>16</sub>BC and lipids is not governed by the membrane fluidity and that the forces involved can have an origin other than purely electrostatic, confirming the hypothesis developed in our previous paper (Nsimba

Zakanda et al., 2011b). The primary insertion of C<sub>16</sub>BC into lipid vesicles is mainly governed by a hydrophobic effect. Subsequently, a convenient geometrical arrangement between the lipid and C<sub>16</sub>BC involving polar interaction is favorable for their association. A best arrangement between surfactin, a lipopeptide, and dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE) molecules has also been shown to be at the origin of the stabilizing effect of surfactin towards DPPE monolayer (Bouffieux et al., 2007). The optimal matching between the surfactant and a lipid for which the packing parameter is not in favor of the formation of a bilayer as it is the case for CHOL, can also stabilize the lamellar structure. Hydrogen bonds between the surfactant and the lipid also contribute to the monolayer stabilization.

Although this study mainly provides basic insights about the interaction of C<sub>16</sub>BC with each of the major membrane components taken individually, it may serve as a useful basis for understanding the interaction of C<sub>16</sub>BC with real membranes or at least, with membrane domains that might be highly enriched in a single component. It may be suggested that under physiological conditions, C<sub>16</sub>BC can interact with the outer leaflet of mammalian plasma membranes without compromising their stability. The presence of rafts composed by SM and CHOL could be favorable to the interaction. However, it must be kept in mind that the interaction of a surfactant with a real membrane might be sensitive to many properties that reflect the mixing of membrane components such as average chain order, average area per lipid, local surface potential, and the lateral distribution of lipid components. Further investigations using ternary mixtures of the three lipids investigated as more representative models of mammalian plasma membrane have to be performed to assess our hypothesis. Moreover, molecular dynamic calculations taking into consideration the reorientation of the molecules about the bilayer normal and the fast acyl chain conformation changes could also provide additional information about the interaction of C<sub>16</sub>BC in a dynamic environment, more representative of a real membrane.

### **Acknowledgments**

The research was funded through the ARC grant, financed by the French Community of Belgium and the Belgium Technical Cooperation (BTC). M.D. and L.L. thanks the Belgian National Foundation for Scientific Research (FNRS) for their position as Research Associate and Senior Research Associate positions respectively.

### **Supporting information**

Enlargement of the  $\Pi$ -A isotherm of SM monolayer showing the change of slope at  $\sim 25$  mN/m.

This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

## 5. References

- Almeida P.F.F. (2009). Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**, 72-85.
- Andersen K., Westh P., Otzen, D. E. (2008). A global study of myoglobin–surfactant interactions. *Langmuir*, **15**, 399-407.
- Brasseur R., Tammo M. (1990). *Theoretical analysis of membrane molecular organization in:* Brasseur R., Ed molecular description of biological components by computer aided conformational analysis, CRC Press, Boca Raton, pp. 203-219.
- Bouchemal K., Agnely F., Koffi A., Ponchel G. (2009). A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1, 2 on Pluronic F127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *Journal of Colloid and Interface Science*, **338**, 169-176.
- Bouffioux O., Berquand A., Eeman M., Paquot M., Dufrêne Y.F., Brasseur R., Deleu M. (2007) Molecular organization of surfactin–phospholipid monolayers: Effect of phospholipid chain length and polar head. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**, 1758-1768.
- Boury F., Gautier J.-C., Bouligand Y., Proust J.-E. (2001) Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **20**, 219-227.
- Brasseur R., Killian J.A., De Kruijff B., Ruyschaert J.M. (1987). Conformational analysis of gramicidin–gramicidin interactions at the air-water interface suggests that gramicidin aggregates into tube-like structures similar as found in the gramicidin-induced hexagonal H<sub>II</sub> phase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **903**, 11-17.
- de la Maza A., Parra J.L. (1995). Solubilization of unilamellar liposomes caused by quaternary ammonium surfactants. *Journal of Controlled Release*, **37**, 33-42.
- Deleu M., Michel Paquot M., Tommy Nylander T. (2008) Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal*, **94**, 2667-2679.
- Demel R.A., Geurts Van Kessel W.S.M., Zwaal R.F.A., Roefofsen B. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **406**, 97–107.
- de Oliveira C.A., Machado A.E.H., Pessine F.B.T. (2005). Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. *Chemistry and Physics of Lipids*, **133**, 69-78.
- Eeman M., Deleu M., Paquot M., Thonart P., Dufrêne Y.F. (2005) Nanoscale properties of mixed Fengycin/Ceramide monolayers explored using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, **21**, 2505-2511.

Eeman M., Francius G., Dufrêne Y.F., Nott K., Paquot M. and Deleu M. (2009) Effect of cholesterol and fatty acids on the molecular interactions of Fengycin with Stratum Corneum mimicking lipid monolayers. *Langmuir*, **25**, 3029-3039.

Georgiev G.As., Kutsarova E., Jordanova A., Krastev R. and Lalchev Z. (2010) Interactions of Meibomian gland secretion with polar lipids in Langmuir monolayer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **78**, 317-327.

Goñi F.M. , Alonso A. , Bagatolli L.A., Brown R.E., Marsh D., Prieto M., Thewalt J.L. (2008). Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta*. **2008**, 1781, 665-684.

Goñi F.M., Alonso A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim. Biophys. Acta*. **2009**, 1788, 169-177.

Goodrich F.C.: In: *Proceedings of second international Congree on interface activity*; Schulman, J.H., Ed.; Butterworths/Academic press, London/New York, 1965, Vol. 1, p. 85.

Hąc-Wydro K., Jędrzejek K., Dynarowicz-Łątka P. (2009) Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **72**, 101-111.

Hąc-Wydro K., Wydro P., Dynarowicz-Łątka P. (2005) Interactions between dialkyldimethylammonium bromides (DXDAB) and sterols-a monolayer study. *Journal of Colloid and Interface Science*, **286**, 504-510.

Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. (1997). Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, **271**, 244-257.

Heerklotz H., Seelig J. (2000). Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1508**, 69-85.

Ishitsuka Y., Pham D.S., Waring A.J., Lehrer R.I., Lee K.Y.C. (2006) Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: Effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 1450-1460.

Joung W.-D., Han Y.-K., Oh S.-G., Yi S.-C. (2001) Mixed monolayer behaviors of vitamin derivatives and cholesterol. *Synthetic Metals*, **117**, 181-182.

Kanintronkul Y., Srihirin T., Angsuthanasombat C., Kerdcharoen T. (2005) Insertion behavior of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba insecticidal protein into lipid monolayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **442**, 180-186.

Knauf K., Meister A., Kerth A, Blume A. (2010). Interaction of alkyltrimethylammonium bromides with DMPC-d54 and DMPG-d54 monolayers studied by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS). *Journal of Colloid and Interface Science*, **342**, 243–252.

Kodama M., Shibata O., Nakamura S., Lee S. and Sugihara G. (2004) A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoylphosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmaterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **33**, 211-226.

Koval M., Pagano R.E. (1991). Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1082**, 113-125.

Kupiainen M., Falck E., Ollila S., Niemela P., Gurtovenko A.A., Hyvonen M.T., Patra M., Karttunen M., and IVattulainen I. (2005) Free volume properties of sphingomyelin, DMPC, DPPC, and PLPC bilayers. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **2**, 401-413.

Lins L., Brasseur R. (1995). The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal*, **9**, 535-540.

Lins L., Thomas-Soumarmon A., Pillot T., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Brasseur R. (1999). Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide and apolipoprotein E  $\alpha$ -helices. *Journal of Neurochemistry*, **73**, 758-769.

Lundberg D., Ljusberg-Wahren H., Norlin A., Holmberg K. (2004) Studies on dodecyl betainate in combination with its degradation products or with phosphatidyl choline-phase behavior and hemolytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, **278**, 478-487.

Maget-Dana R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**, 109-140.

Marcotte L., Barbeau J., Edwards K., Karlsson G., Lafleur M. (2005). Influence of the lipid composition on the membrane affinity, and the membrane-perturbing ability of cetylpyridinium chloride. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **266**, 51-61.

Marsh D. (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1286**, 183–223.

Matti V., Säily J., Ryhänen S.J., Holopainen J.M., Borocci S., Mancini G., Kinnunen P.K.J. (2001) Characterization of mixed monolayers of phosphatidylcholine and a dicationic gemini surfactant SS-1 with a Langmuir Balance: Effects of DNA. *Biophysical Journal*, **81**, 2135-2143.

Mohlin K., Karlsson P., Holmberg K. (2006) Use of cleavable surfactants for alkyl ketene dimer (AKD) dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **274**, 200-210.

Nararrete R., Serrano R. (1983) Solubilization of yeast plasma membranes and mitochondria by different types of non-denaturing detergents *Biochimica et Biophysica Acta*, **728**, 403-408.

Nielsen A. D., Arleth L., Westh P. (2005). Analysis of protein-surfactant interactions-a titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between *Humicola insolens* cutinase and an anionic surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1752**, 124–132.

Nsimba Zakanda F., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2010) Les dérivés de la glycine bêtaïne: méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, **14**, 737-748.

Nsimba Zakanda F., Laurent P., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2011a) Alkylbetainate chlorides: synthesis and behavior of monolayers at the air-water interface. *Thin Solid Films*, **520**, 344-350.

Nsimba Zakanda F., Nott K., Paquot M., Mvumbi Lelo G. and Deleu M. (2011b) Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**, 176-180.

Rakotomanga M., Loiseau P.M., Michèle Saint-Pierre-Chazalet M. (2004) Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1661**, 212-218.

Razafindralambo H., Blecker C., Mezdoor S., Deroanne C., Crowet J.M., Brasseur R., Lins L., Paquot M. (2009). Impacts of the Carbonyl Group Location of Ester Bond on Interfacial Properties of Sugar-Based Surfactants: Experimental and Computational Evidences. *The Journal of Physical Chemistry B*, **113**, 8872-8877.

Razafindralambo H., Dufour S., Paquot M., Deleu M. (2009). Thermodynamic studies of the binding interactions of surfactin analogues to lipid vesicles. Application of isothermal titration calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **95**, 817-821.

Razafindralambo H., Richel A., Wathelet B., Blecker C., Wathelet J.P., Brasseur R., Lins L., Miñones Jr. J., Paquot M. (2011). Monolayer properties of uronic acid bicatenary derivatives at the air-water interface: effect of hydroxyl group stereochemistry evidenced by experimental and computational approaches. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **13**, 15291-15298.

Santos H.A., Manzanares J.A., Murtomäki L., Kontturi K. (2007). Thermodynamic analysis of binding between drugs and glycosaminoglycans by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **32**, 105-114.

Shaikh S.R., Dumauval A.C., Jensi L.J., Stillwell W. (2001) Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1512**, 317-328.

Sinn C.G., Dimova R., Antonietti M. (2004). Isothermal Titration Calorimetry of the polyelectrolyte/water interaction and binding of Ca<sup>2+</sup>: Effects determining the quality of polymeric scale inhibitors. *Macromolecules*, **37**, 3444-3450.

Slotte P.J. (1999) Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **102**, 13-27

Subbaiah P.V., Sircar D., Lankalapalli R.S., Bittman R. (2009) Effect of double bond geometry in sphingosine base on the antioxidant function of sphingomyelin. *Archives of Biochemistry and biophysics*, **481**, 72-79.

Sun Y.-T., Sui S.-F. (2002) Study on the insertion process of human apolipoprotein H into spread phospholipid monolayers by monitoring the initial change in surface pressure. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **198-200**, 239-247.

Thompson R.A., Allenmark S. (1992) Factors influencing the micellar catalyzed hydrolysis of long-chain alkyl betainates. *J. Colloid Interface Sci.* 148, 241-246.

Tsao H.-K., Tseng W.L. (2001). The Interactions between ionic surfactants and phosphatidylcholine vesicles: conductometry. *Journal of Chemical Physics*, **115**, 8125-8132

Wydro P. (2007) The influence of the size of the hydrophilic group on the miscibility of zwitterionic and nonionic surfactants in mixed monolayers and micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **316**, 107-113.

Wydro P., Paluch M. (2009) The miscibility of dodecyltrihydroxyethylammonium bromide with cationic, nonionic and anionic surfactants in mixed monolayers and micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **348**, 70-75.

Yamamoto S.K., Shibata O., Sakai M., Sasaki Y., Lee S., Sugihara G. (1995) Mixed monolayer of deoxycholic acid with cholesterol on aqueous NaCl solution at pH 1.2 and 25°C. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **5**, 1249-1253.

# **VI. Effet d'adsorption de quantites croissantes des chlorures d'alkylbétainate sur l'intégrité des vésicules lipidiques**

Les principaux résultats sont contenus dans cet article :

Publication V

Nsimba Zakanda F., Lins L., Razafindralambo H., Blecker C., Paquot M., Mvumbi Ielo G., Deleu M. (XXXX). Integrity of lipid vesicles in presence of alkylbetainate chloride surfactants : Spectrofluorimetric, Isothermal Titration Calorimetry and Zeta potential studies

En preparation pour être soumis dans: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : Biomembranes*.

## **Titre: Effet d'adsorption de quantites croissantes des chlorures d'alkylbétainate sur l'intégrité des vésicules lipidiques**

### **Objectif et stratégie expérimentale**

Les surfactants interagissant avec les membranes biologiques sont susceptibles d'endommager l'intégrité de celles-ci soit en formant des pores permanents, soit en les déstabilisant de manière transitoire, ou encore en les désintégrant par formation de micelles mixtes. Ces phénomènes sont connus pour être dépendants de la concentration (Deleu *et al.*, 2003).

Dans ce dernier volet, l'effet de l'ajout des concentrations croissantes de  $C_nBC$  dans les suspensions de vésicules lipidiques a été étudié. L'objectif était d'étudier la possibilité des  $C_nBC$  de perméabiliser et / ou de solubiliser des vésicules lipidiques de composition variée dans des conditions proches des conditions physiologiques (tampon, pH). Pour cela, des solutions des  $C_nBC$  ont été mélangées ou progressivement ajoutées à des suspensions de vésicules lipidiques encapsulant ou non une sonde fluorescente. L'adsorption des  $C_nBC$  sur la surface de vésicules lipidiques, la perméabilité et / ou la solubilisation de ces derniers par les  $C_nBC$  ont été caractérisées à l'aide des techniques de spectrométrie de fluorescence et de Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC) ainsi que des mesures du potentiel zêta et de la taille des particules.

Les paramètres physico-chimiques étudiés sont:

- CMC : concentration micellaire critique
- % HPTS : pourcentage de libération de la sonde fluorescente
- Rsat: rapport molaire de saturation
- Rsol: rapport molaire de solubilisation
- $C^{sat}$ : concentration de saturation
- $C^{sol}$  : concentration de solubilisation
- $\zeta$  : potentiel zêta

## Principaux résultats

Les têtes polaires des  $C_nBC$  sont neutralisées dans le tampon salin. L'adsorption des  $C_nBC$  sur les vésicules lipidiques est endothermique au départ et exothermique par la suite. Elle ne dépend pas de la nature des lipides formant ces vésicules mais dépend de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des  $C_nBC$ .  $C_{12}BC$  a saturé les vésicules lipidiques à des concentrations supérieures à celles de  $C_{16}BC$  dans tous les cas. Ces concentrations sont au dessus de leurs CMC respectives.  $C_{10}BC$ ,  $C_{14}BC$  et  $C_{16}BC$  ont faiblement perméabilisé les vésicules lipidiques de POPC, POPG et POPC/SM/CHOL à des concentrations allant de 1,25 à 250  $\mu M$  (correspondant aux rapports molaires  $C_nBC$ /lipid de 0,1 à 20). Cependant, le  $C_{12}BC$  a induit une perméabilité élevée dans toutes les vésicules lipidiques étudiées à des concentrations élevées (supérieures à 62,5  $\mu M$ ). La perméabilité induite par  $C_{12}BC$  dépend de la composition du vésicule lipidique et se présente dans l'ordre suivant : POPC/SM/CHOL > POPC > POPG. Cependant, la solubilisation des membranes par les  $C_nBC$  n'a pas été observée du fait que la mesure de taille des particules à la fin du titrage des vésicules lipidiques par des solutions micellaires de  $C_{12}BC$  et  $C_{16}BC$  à l'ITC n'a montré que des particules de taille supérieure à celle des vésicules lipidiques pures.

**Integrity of lipid vesicles in presence of alkylbetainate chloride surfactants:  
Spectrofluorimetric, Isothermal Titration Calorimetry and Zeta potential measurements**

Francis Nsimba Zakanda<sup>a,d\*</sup>, Laurence Lins<sup>b</sup>, Hary Razafindralambo<sup>a,c</sup>, Christophe Blecker<sup>c</sup>,  
Michel Paquot<sup>a</sup>, Georges Mvumbi Lelo<sup>d</sup> and Magali Deleu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle, Gembloux Agro-Bio Tech-Université de Liège,  
Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>b</sup> Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Gembloux Agro-Bio Tech-Université de  
Liège, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>c</sup>Unité de Technologie des industries Agro-alimentaires, Gembloux Agro-Bio Tech-  
Université de Liège, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium

<sup>d</sup> Service de Biochimie, Département des Sciences de Base, Faculté de Médecine, Université  
de Kinshasa B.P.127 Kinshasa XI, R.D. Congo

\*Corresponding author

Phone : (32) 81 62 22 32

Fax : (32) 81 62 22 31

E-mail : nsimbazak@yahoo.fr, fnsimbazakanda@student.ulg.ac.be, fnsimba@unikin.cd

## Abstract

In this study, membrane binding and permeabilization of/by alkylbetainate chlorides ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ), glycine betaine-based ester surfactants are studied using fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC) techniques in combination with zeta ( $\zeta$ )-potential measurements, to get insight into the interaction of  $C_nBC$  with membranes. 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylglycerol and a ternary mixture of 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine/sphingomyelin/cholesterol (50:20:30 mol %), mimicking eucaryotic cell, bacterial cell and plasma membrane rafts, respectively, are used as model membranes.

Membrane binding is thus caused almost exclusively by hydrophobic effect and not by electrostatic attractions. Fluorescence spectroscopy has shown that membrane leakage occur at large  $C_nBC$  concentration and is inversely proportional to  $C_nBC$ 's alkyl chain length, leading to weaker chain organization of the inserted surfactant into the membrane core. ITC has given rise to an endothermic process followed by an exothermic one. Membrane perturbation leading to pore formation is likely the main mechanism of  $C_nBC$  interaction with membranes. At large surfactant concentration,  $C_nBC$  molecules aggregate at the membrane surface. This phenomenon induces particle aggregation and lead consequently to membrane surface charge increase.

**Keywords:** Glycine betaine-based esters, liposome, adsorption, leakage, permeability, vesicle aggregation.



## **VII. Discussion générale**

La glycine bêtaïne (GB) est contenue dans de grandes quantités de déchets produits par les industries de la betterave sucrière et du bioéthanol (Caqueret *et al.*, 2008 ; Lever *et al.*, 2010). Dans le contexte de la production de tensioactifs (TA) d'origine végétale et respectueux de l'environnement, la GB est utilisée comme partie hydrophile des TA zwitterioniques et cationiques (Thompson *et al.*, 1992 ; Tegeler *et al.*, 1995). Le concept de TA hydrolysable a été introduit il y a de nombreuses années, et différents types dont les esters cationiques dérivés de la glycine bêtaïne ont été préparés et caractérisés (Itoh *et al.*, 2009). Peu d'études ont porté sur les utilisations potentielles d'esters dérivés de la glycine bêtaïne. Néanmoins, Mohin *et al.* (2006) ont indiqué leur utilisation dans les procédés de fabrication de papier. Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif de contribuer à l'étude des propriétés tensio-actives et membranaires des alkylbêtaïnates. Les chlorures d'alkylbêtaïnates ( $C_nBC$ ) de longueur de chaîne hydrocarbonée paire de 10 à 16 ont été étudiés.

Les alkylbêtaïnates appartiennent à la classe de tensioactifs doux et biodégradables (Fisicaro *et al.*, 2005 ; Lindstedt *et al.*, 1990). Ils ne sont pas disponibles dans le commerce. Dès lors, les chlorures d'alkylbêtaïnates ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ) ont été synthétisées dans notre laboratoire par voie chimique en utilisant des réactifs moins toxiques et plus respectueux de l'environnement (la GB, le chlorure de thionyle et les alcools gras de longueur de chaîne hydrocarbonée paire de 10 à 16) que ceux utilisés précédemment par d'autres chercheurs (le chlorure de chloroacétyle, la triméthylamine et les mêmes alcools gras que ceux utilisés dans le présent travail) (Lundberg *et al.*, 2004 ; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007). La GB possède une faible réactivité par estérification directe avec les alcools (Auzély-Velty *et al.*, 2003), d'où sa conversion en dichlorure de bêtaïnyle (produit de la réaction de la GB et du chlorure de thionyle :  $SOCl_2$ ) en vue d'accroître sa réactivité. Dans le but d'obtenir un meilleur rendement d'ester à partir de la réaction d'un halogénure d'acyle et d'un alcool en milieu organique, de nombreux auteurs ont utilisé des bases faibles (Stagé *et al.*, 2002 ; Razaeei *et al.*, 2007) ou des acides forts (Ganeshpure *et al.*, 2008 ; Marchetti *et al.*, 2008) comme catalyseurs.

Dans ce travail, le standard du chlorure d'hexadecylbêtaïne ( $C_{16}BC$ ) a été synthétisé à partir de la GB via le dichlorure de bêtaïnyle et de 1-hexadecanol selon une méthode proposée dans la littérature (Granö *et al.*, 2000). Le  $C_{16}BC$  a été ensuite purifié et caractérisé. L'optimisation de l'acylation de 1-hexadecanol par le dichlorure de bêtaïnyle a été faite en évaluant différents paramètres tels que l'influence de la nature du catalyseur/base faible, du solvant organique, du

rapport molaire dichlorure de bétainyle/1-hexadecanol, de la température et de la concentration de réactants.

Les résultats ont montré que le dichlorure de bétainyle possède une réactivité suffisante pour acyler un alcool en milieu organique. Les travaux antérieurs ont montré que les chlorures d'acyles possèdent une réactivité élevée (Dieter, 1999 ; Auzély-Velty *et al.*, 2003). L'acylation de 1-hexadecanol par le dichlorure de bétainyle produit un acide fort, l'acide chlorhydrique (HCl), qui peut jouer le rôle de catalyseur et stabiliser l'ester formé, car les esters cationiques sont stables en milieu acide (Auzély-Velty *et al.*, 2003 ; Tehrani-Bagha *et al.*, 2007). Le C<sub>16</sub>BC a été synthétisé avec le meilleur rendement dans les conditions suivantes : absence de catalyseur/base, un solvant de polarité moyenne (le méthyl-2-butanol-2), un rapport molaire dichlorure de bétainyle/1-hexadecanol de 3/1, une température de 45°C et une concentration en réactants de 0,132 mol/L. Les chlorures de decylbétainate (C<sub>10</sub>BC), de dodecylbétainate (C<sub>12</sub>BC) et de tetradecylbétainate (C<sub>14</sub>BC) ont été obtenus en utilisant les conditions optimales de la synthèse de C<sub>16</sub>BC. Ces produits ont été conservés dans un endroit sec à la température ambiante et ont présenté une très bonne stabilité (pureté) dans le temps.

Les propriétés de surface d'un composé amphiphile peuvent être évaluées d'une part, en déterminant sa CMC en solution. Celle-ci correspond à la concentration à partir de laquelle l'interface est saturée en tensioactifs qui, dès lors, forment des micelles ou agrégats en solution. Une CMC faible reflète un pouvoir d'agrégation plus important du tensioactif. Une autre façon de caractériser un surfactant est d'analyser sa capacité à former une monocouche insoluble à une interface. Ceci peut être réalisé en rapportant l'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire du composé à l'interface air-eau (Sui *et al.*, 2005).

Les propriétés physico-chimiques des chlorures d'alkylbétainates (C<sub>n</sub>BC, n = 10-18) telles que la tension de surface, la concentration micellaire critique (CMC), les pouvoirs moussant et dispersant, l'hydrolyse en milieux acide et basique et la biodégradation ont fait l'objet des études antérieures (Rozycka-Roszak *et al.*, 1988 ; Thompson *et al.*, 1992 ; Lundberg *et al.*, 2004a ; Itoh *et al.*, 2009). Les C<sub>n</sub>BC ont présenté des valeurs de CMC et de pouvoirs dispersants proches de celles des chlorures d'alkyltriméthylammonium (C<sub>n</sub>TAC) avec une chaîne hydrocarbonée longue de 2 de groupes méthylènes. Cependant, le C<sub>10</sub>BC n'a pas de pouvoir dispersant. Le C<sub>10</sub>BC et le C<sub>12</sub>BC n'ont pas montré de pouvoir moussant tandis que le C<sub>14</sub>BC et le C<sub>16</sub>BC ont montré un pouvoir moussant de loin supérieur à celui du C<sub>18</sub>BC

(Rozycka-Roszak *et al.*, 1988 ; Itoh *et al.*, 2009). Les  $C_nBC$  sont extrêmement sensibles à l'hydrolyse alcaline (Thompson *et al.*, 1992) et s'hydrolysent presque quantitativement (95%) en 10 minutes à  $pH = 10$ . Cependant, l'addition de NaCl réduit considérablement leur pourcentage d'hydrolyse (Lundberg *et al.*, 2004b ; Itoh *et al.*, 2009).

Les données sur l'organisation à l'interface air-eau des  $C_nBC$  sont absentes. Leur acquisition et caractérisation constitue le premier objectif de ce travail.

Les isothermes de compression exprimant la pression de surface ( $\Pi$ ) en fonction de l'aire moléculaire ( $A$ ) des molécules pures de  $C_nBC$  dans l'eau ( $pH = 5,5$ ) à  $20^\circ C$ , de  $C_{16}BC$  dans des conditions différentes de la sous-phase (incluant le  $pH$ , la température, les sels de sodium monovalents et divalents et la force ionique de  $Na_2SO_4$ ) à  $20^\circ C$  (point III) ont été établis à l'interface air-eau en utilisant la Balance à Film de Langmuir (BFL).

Les résultats ont montré que le  $C_{10}BC$  et le  $C_{12}BC$  ne sont pas capables de former de monocouches insolubles à l'interface air-eau à  $20^\circ C$ . Les molécules formant ces monocouches se dissolvent progressivement dans la sous-phase aqueuse pendant le processus de compression de l'interface à cause de la faible hydrophobicité de leurs chaînes hydrocarbonées. Le  $C_{10}BC$  n'a montré que la phase gazeuse (G) et le  $C_{12}BC$ , les phases G et liquide expansé (LE). Leurs pressions d'effondrement ( $\Pi_c$ ) n'ont pas été observées. Les résultats similaires ont été obtenus pour les monocouches de bromure de dodecyltriméthylammonium et de dodecyl sulfate de sodium (SDS) à l'interface air-eau à  $20^\circ C$  (McConlogue *et al.*, 1998). Cependant, les  $C_{14}BC$  et le  $C_{16}BC$  ont présenté les 3 phases G, LE et liquide condensé (LC) dans les conditions expérimentales. Leurs aires 'limitantes' ( $A_0$ ) sont 28,1 et 24,0  $A^2/molécule$  pour  $C_{14}BC$  et  $C_{16}BC$ , respectivement. Tandis que leurs aires d'effondrement ( $A_c$ ) et pressions d'effondrement ( $\Pi_c$ ) sont 16,6  $A^2/molécule$  et 41,5  $mN/m$  pour  $C_{14}BC$  et 17,6  $A^2/molécule$  et 52,3  $mN/m$  pour  $C_{16}BC$ . En plus, le  $C_{16}BC$  a montré un isotherme de forme approximativement verticale dans l'eau comparable à celui d'un TA non ionique, avec un maximum de module de compressibilité ( $C_s^{-1}$ ) de 464,4  $mN/m$  à 18,3  $A^2/molécule$  (données non montrées). Le  $C_{14}BC$  et le  $C_{16}BC$  ont formé des monocouches insolubles à l'interface air-eau à  $20^\circ C$ . Cela peut être expliqué par les  $\Pi_c$  observées et les isothermes de compression-expansion des monocouches de  $C_{14}BC$  (données non montrées) et de  $C_{16}BC$  qui sont superposés dans toute la région LC, indiquant que ces molécules restent à l'interface air-eau pendant le processus de compression-expansion. Ces

résultats corroborent ceux obtenus par Itoh *et al.* (2009) concernant les pouvoirs dispersants et moussants des  $C_nBC$ . Comparativement à leurs analogues bromures d'alkyltriméthylammonium ( $C_{14}TAB$  et  $C_{16}TAB$ ), les  $C_{14}BC$  et  $C_{16}BC$  ont présenté des  $A_c$  correspondant presque à la moitié de celles des  $C_{14}TAB$  (47  $A^2$ /molécule) et  $C_{16}TAB$  (43  $A^2$ /molécule), respectivement (Bergeron, 1997). Cela pourrait être dû au fait que les têtes polaires des  $C_nBC$  sont profondément plongées dans l'eau (Rozycka-Roszak *et al.*, 1989) et que leurs molécules se rapprochent plus durant la compression comparativement à celles des  $C_nTAB$ .

Les propriétés de surface des TA dépendent de leurs structures chimiques, leurs concentrations en solution, leurs caractéristiques d'adsorption et de diffusion, la température la force ionique (Dhanabalan *et al.*, 1998 ; Eisner *et al.*, 2007 ; Bowen *et al.*, 2008 ; Turshatov *et al.*, 2008). Dans ce travail, l'influence des conditions expérimentales (le pH, la température, les anions monovalents et divalents de sels de sodium et la force ionique de  $Na_2SO_4$ ) sur l'organisation interfaciale de  $C_{16}BC$  (point III) a été étudiée.

Les résultats ont montré qu'en fonction du pH, le comportement final de la monocouche de  $C_{16}BC$  est gouverné par la nature des ions en excès ( $Cl^-$  ou  $OH^-$ ) dans la sous-phase et que les  $OH^-$ , plus hydratés que les  $Cl^-$ , ont tendance à interagir plus avec les têtes polaires de  $C_{16}BC$  que les  $Cl^-$ . En général, la présence d'ions monovalents ( $OH^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ) n'a pas influencé le comportement interfacial de la monocouche de  $C_{16}BC$  en ce qui concerne les valeurs de  $A_0$  comparativement à celui obtenu dans l'eau (avec le  $Cl^-$ ). Par contre, les ions divalents ( $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ) ainsi que la force ionique de  $Na_2SO_4$  ont fortement influencé les valeurs de  $A_0$  en pénétrant entre les têtes polaires des molécules de  $C_{16}BC$ . Cependant, tous ces ions monovalents et divalents, à l'exception de  $Br^-$ , n'ont pas influencé la valeur de  $\Pi_c$ . Ce qui signifie qu'à forte compression, la stabilité de la monocouche de  $C_{16}BC$  est principalement gouvernée par les interactions hydrophobes. Les  $HPO_4^{2-}$  et  $NO_3^-$  ont permis de diminuer la compressibilité de la monocouche tandis que le  $Br^-$  l'a augmentée comparativement à celle dans l'eau. Une stabilité maximale de la monocouche de  $C_{16}BC$  a été obtenue à 25°C et au-delà de cette température, l'agitation thermique réduit les interactions entre les molécules formant la monocouche.

Dans le tampon PBS de force ionique élevée par contre (point V), la monocouche de  $C_{16}BC$  devient plus expansée ( $A_c = 19,4 A^2$ /molécule) et  $\Pi_c$  (46,2 mN/m) a baissé par rapport à celle

dans l'eau (52,3 mN/m). Ce résultat est dû aux interactions entre les têtes polaires de C<sub>16</sub>BC portant des charges positives et les anions (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and Cl<sup>-</sup>) du tampon qui déstabilisent la monocouche en réduisant les interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles (Boury *et al.*, 2001).

Certains TA sont utilisés pour des applications cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques et/ou thérapeutiques comme agents moussants, émulsifiants, épaississants, mouillants, adhésifs, solubilisants, antibactériens, antifongiques, antiviraux, thérapie génique (Singh *et al.*, 2007). Ils ont la capacité d'interagir avec les membranes modèles et les membranes biologiques en formant des interactions importantes avec des lipides (Schreier *et al.*, 2000). D'où leur utilisation comme outils d'extraction d'ADN ou des systèmes de délivrance de médicaments (Cardenas *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004). L'effet des TA sur les systèmes biologiques est également devenu une préoccupation environnementale. Ainsi, la compréhension du mécanisme moléculaire de leur interaction avec les systèmes biologiques et leur rôle dans les propriétés structurales et fonctionnelles des biomolécules constituent de grands programmes de recherche dans ce domaine (Mazumdar, 2001). Les monocouches lipidiques, bien que beaucoup moins complexes que les membranes biologiques, ont été largement utilisées à titre expérimental comme des systèmes modèles pour étudier les propriétés biologiques des membranes (Brezesinski *et al.*, 2003 ; Deleu *et al.*, 2005 ; Almaleck *et al.*, 2006).

Un autre objectif de ce travail était d'évaluer les interactions entre les C<sub>n</sub>BC avec les composants spécifiques des membranes biologiques (en particulier avec les lipides).

Vu la complexité des membranes biologiques, des modèles ont été utilisés, en particulier des monocouches lipidiques et des vésicules lipidiques.

La technique de monocouche de Langmuir est un moyen efficace pour étudier les interactions entre les lipides et les TA, car elle est relativement rapide à préparer et il est possible de simuler la pression de surface entre 30 et 35 mN/m généralement appropriée pour mimer une membrane biologique (Feng, 1999 ; Silvestro *et al.*, 1998 ; Thakur *et al.*, 2009). Cependant, une monocouche étalée à l'interface air-eau interagit avec la sous-phase d'un seul côté et l'autre côté est en contact avec de l'air. Par conséquent, son environnement est un peu différent de celui d'une membrane cellulaire. Les membranes biologiques se comportent, à certains égards similairement à des vésicules lipidiques, ces derniers peuvent être un modèle

plus proche des membranes cellulaires et conviennent pour les études de perméabilité (Maget-Dana, 1999, Shalel *et al.*, 2003). La solubilisation des composants membranaires par les détergents a longtemps été utilisée pour isoler les constituants spécifiques de la membrane et comprendre la nature et les propriétés des bicouches (Toro *et al.*, 2009). Plusieurs études sur les interactions entre les lipides et les détergents utilisant les systèmes biologiques ou les liposomes imitant les systèmes biologiques réels ont été publiées (Heerklotz et Sleeg, 2000 ; Shalel *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, les isothermes de compression de C<sub>16</sub>BC et de ses mélanges binaires avec les lipides constituant le feuillet externe des membranes des eucaryotes (palmitoyloleoyl phosphatidylcholine, POPC ; sphingomyéline, SM et cholestérol, CHOL) dans le tampon phosphate salin (PBS) à 25°C (point V) ont été caractérisés.

L'augmentation de la concentration en C<sub>16</sub>BC dans les mélanges binaires (C<sub>16</sub>BC/SM, C<sub>16</sub>BC/POPC et C<sub>16</sub>BC/CHOL) déplace les isothermes de mélanges vers la courbe de C<sub>16</sub>BC pur et leurs formes ne sont pas significativement influencées par la proportion de C<sub>16</sub>BC. L'analyse des aires moléculaires moyennes ( $A_{12}$ ) a montré une faible déviation positive pour les mélanges C<sub>16</sub>BC/POPC à toutes les proportions de C<sub>16</sub>BC et pressions de surface étudiées. De faibles déviations négatives et positives mais significatives ont été observées pour les mélanges C<sub>16</sub>BC/SM dépendant de la quantité de C<sub>16</sub>BC et de la pression considérée tandis des déviations non significatives ont été observées pour tous les mélanges C<sub>16</sub>BC/CHOL. Ceci indique que les molécules de C<sub>16</sub>BC et celles de POPC et SM sont miscibles et que le C<sub>16</sub>BC et le CHOL forment un mélange presque idéal. La modélisation moléculaire a montré que l'aire moléculaire occupée par l'assemblage C<sub>16</sub>BC/CHOL correspond à la somme des aires des molécules individuelles et qu'en plus les énergies d'interaction entre C<sub>16</sub>BC et CHOL sont similaires à celles de molécules de CHOL pures. Le comportement idéal observé pour les mélanges C<sub>16</sub>BC/CHOL peut être expliqué par leur complémentarité structurale, le CHOL étant une molécule conique tandis que le C<sub>16</sub>BC est conique inversé.

L'analyse thermodynamique permettant de caractériser les interactions entre les molécules de C<sub>16</sub>BC et celles de lipides a montré que les énergies libres des mélanges ( $\Delta G^{ex}$ ) sont positives pour le C<sub>16</sub>BC et le POPC c.à.d que les interactions entre leurs molécules sont répulsives. Les encombrements de leurs têtes polaires et le fait que les molécules de POPC ne forment pas un assemblage compact peuvent expliquer ce comportement. Un résultat similaire a été obtenu

pour l'acide stéarique et le dioleoyl phosphatidylcholine (Hąc-Wydro *et al.*, 2009). Les interactions entre le C<sub>16</sub>BC et la SM sont soit attractives soit répulsives en fonction de la proportion des constituants de la monocouche et de la pression de surface.

Néanmoins, les valeurs des énergies totales de mélanges ( $\Delta G^M$ ) ont montré que le C<sub>16</sub>BC forme des monocouches mixtes stables avec le POPC et la SM et que les dernières sont plus stables que les premières. Ce qui peut être justifié par les pressions d'effondrement élevées observées pour les monocouches mixtes C<sub>16</sub>BC/SM et la possibilité de formation de la liaison hydrogène entre l'amide de SM et le carbonyle de C<sub>16</sub>BC, observée également en modélisation moléculaire, et pouvant favoriser les interactions hydrophobes (Peter Slotte, 1999) comparativement aux mélanges C<sub>16</sub>BC/POPC.

Ensuite, des expériences de pénétration ont été réalisées. Des monocouches lipidiques pures de dipalmitoyl phosphatidylsérine (DPPS), d'acide dipalmitoyl phosphatidique (DPPA), de dipalmitoylphosphatidyl éthanolamine (DPPE), SM, POPC et de CHOL ont été formées à l'interface air-eau à 25°C à des pressions initiales déterminées. L'eau pure (point IV) ou le tampon PBS (point V) ont été utilisés comme sous-phase. Les C<sub>n</sub>BC, dissous dans l'eau ou dans le tampon, ont été séparément injectées dans la sous-phase aqueuse en absence et en présence de monocouches lipidiques. Les informations obtenues ont mis en exergue l'effet de la nature lipidique (tête polaire chargée ou non et tête polaire petite ou volumineuse) sur les activités membranaires des C<sub>n</sub>BC.

Les résultats ont montré que les C<sub>n</sub>BC pures ont la capacité de s'adsorber et de former des films monomoléculaires à l'interface air-eau à 25°C. La pression de surface ( $\Pi$ ) engendrée est directement proportionnelle à la longueur de la chaîne hydrocarbonée due aux interactions hydrophobes croissantes entre les chaînes hydrocarbonées. Au début, la cinétique d'adsorption est lente et linéaire pour le C<sub>10</sub>BC, rapide et asymptotique pour les C<sub>12</sub>BC et C<sub>14</sub>BC tandis qu'elle est lente et sigmoïde pour le C<sub>16</sub>BC. Ce qui indique les molécules de C<sub>16</sub>BC, moins hydrophiles que celles de C<sub>10</sub>BC, C<sub>12</sub>BC et C<sub>14</sub>BC, ont besoin d'une grande énergie pour traverser les régions hydrophiles formées par les molécules d'eau (Razafindralambo *et al.*, 2004). La présence de deux plateaux au cours de l'adsorption pour tous les C<sub>n</sub>BC indique un réarrangement des molécules à l'interface air-eau (Caro *et al.*, 2009).

Cependant, dans le tampon PBS (comme sous-phase) (point V), l'adsorption de C<sub>16</sub>BC est spontanée et est de loin supérieure à celle dans l'eau pure.  $\Pi$  engendrée est de 25,8 mN/m contre 5,7 mN/m dans l'eau pure. Ceci est dû au fait que les charges positives des molécules de C<sub>16</sub>BC sont neutralisées par les anions du tampon. Ce qui réduit la solubilité des molécules de C<sub>16</sub>BC et par conséquent augmente leur adsorption à l'interface air-eau (Leontidis, 2002 ; Aroti *et al.*, 2007).

Tous les C<sub>n</sub>BC ont facilement pénétré dans des monocouches lipidiques formées dans l'eau pure à la pression de surface de 30 mN/m, pression présumée des membranes biologiques (Demel *et al.*, 1975 ; Marsh *et al.*, 1996 ; Preetha *et al.*, 2006). Les C<sub>n</sub>BC, indépendamment de la longueur de la chaîne alkyle, ont montré une grande affinité vis-à-vis de monocouches lipidiques chargées négativement (DPPS et DPPA) tandis que leur affinité a été moyenne et faible vis-à-vis de monocouches formées de lipides coniques (DPPE et CHOL) et de lipide avec tête polaire volumineuse (POPC), respectivement (point IV). Dans le tampon PBS comme sous-phase (point V), la pénétration de C<sub>16</sub>BC dans les monocouches lipidiques est instantanée, comme son adsorption à l'interface air-eau en l'absence de monocouches lipidiques. La neutralisation de la charge positive de C<sub>16</sub>BC par les anions du tampon réduit sa solubilité et par conséquent augmente son adsorption à l'interface (Leontidis, 2002 ; Aroti *et al.*, 2007). C<sub>16</sub>BC pénètre plus dans les monocouches de SM et CHOL que dans celle de POPC, comme observé dans l'eau pure pour CHOL et POPC. Ce comportement est inattendu du fait que SM et POPC possèdent des têtes polaires identiques volumineuses. La formation des liaisons hydrogènes dans SM, qui stabilisent la monocouche (Peter Slotte, 1999), et la configuration cis d'une des chaînes alkyles de POPC pourraient expliquer les différences de pénétration observées. Le pouvoir pénétrant ( $\Pi_e$ ) de C<sub>16</sub>BC est élevé pour toutes les monocouches, au dessus de  $\Pi$  présumée des membranes biologiques (30-35 mN/m) (Marsh, 1996 ; Silviu, 2003) et se présente dans l'ordre suivant : POPC < CHOL < SM. Ces résultats montrent que dans l'eau, les interactions électrostatiques jouent un rôle important entre les C<sub>n</sub>BC et les lipides constituant les monocouches à côté des interactions hydrophobes. Tandis que dans le tampon, les interactions électrostatiques jouent un rôle mineur. En plus, la complémentarité structurale précédemment évoquée entre les lipides coniques (DPPE et CHOL) et les C<sub>n</sub>BC (coniques inversés), la possibilité de formation des liaisons hydrogènes avec la SM ainsi que l'effet d'encombrement de têtes polaires de molécules de POPC, comparables à celles de C<sub>n</sub>BC, sont des éléments à prendre en considération dans l'interaction entre le C<sub>n</sub>BC et les lipides (Ishitsuka *et al.*, 2006 ; Sánchez *et al.*, 2010).

Les données concernant les activités des  $C_nBC$  avec les membranes biologiques (naturelles et bicouches lipidiques modèles) sont quasi-absentes dans la littérature. Une attention considérable a été accordée à cet aspect (points V et VI) en vue de comprendre le mécanisme d'action des  $C_nBC$  avec les bicouches lipidiques modèles. L'effet des molécules simples et micelles de  $C_nBC$  sur l'intégrité des bicouches lipidiques de composition différentes a été étudié dans les conditions proches des conditions physiologiques (tampon et pH).

Combinant l'ITC, la spectrométrie de fluorescence et les mesures du potentiel zêta ( $\zeta$ ), il a été montré que l'adsorption des  $C_nBC$  sur les membranes modèles (de POPC, POPG, SM et SM/CHOL et SPC), dont les surfaces sont négativement chargées, est fonction de la longueur de la chaîne alkyle des  $C_nBC$  (point VI). L'adsorption de  $C_{16}BC$  sur les membranes de POPC, SM et SM/CHOL (dans le PBS, pH = 7,4 à 25°C) est spontanée ( $\Delta G < 0$ ), exothermique ( $\Delta H < 0$ ) et génère une grande variation d'entropie du système ( $\Delta S > 0$ ) (point V). Ce comportement indique que les têtes polaires des  $C_nBC$  seraient neutralisées par les anions des tampons fortement salins utilisés (Valcarcel *et al.*, 2001) et que les interactions hydrophobes sont dominantes par rapport à celles attractives électrostatiques. Le gain d'entropie observé pendant le processus d'adsorption de l'ion  $C_{16}B^+$  sur les membranes de POPC, SM et SM/CHOL est dû à la déshydratation de la surface des membranes et de  $C_{16}BC$  (Haq *et al.*, 1997 ; Sinn *et al.*, 2004). L'affinité de  $C_{16}BC$  sur les membranes est dans l'ordre suivant : SM/CHOL > SM > POPC (point V).

De faibles % de libération de HPTS dans les membranes (de POPC, POPG et PSC) ont été observés pour le  $C_{10}BC$ , le  $C_{14}BC$  et le  $C_{16}BC$  à des concentrations allant de 1,25 à 250  $\mu M$  (correspondant aux rapports molaires  $C_nBC$ /lipide de 0,1 à 20).

Cependant, le  $C_{12}BC$  a provoqué une libération significative de HPTS dans toutes ces membranes au delà d'une concentration critique (Concentration en  $C_{12}BC$  entre 93,75 et 125  $\mu M$ , correspondant au rapport molaire  $C_{12}BC$ /lipide entre 7,5 et 10), dépendant de la composition de la membrane et cela dans l'ordre suivant : PSC > POPC > POPG. Les interactions électrostatiques entre les têtes polaires positives de  $C_{12}BC$  et celles négatives de groupes phosphates de POPG pourraient stabiliser la barrière de perméabilité de ces membranes (Abraham *et al.*, 2007). Le  $C_{12}BC$  a saturé les membranes à des concentrations de 235, 93 et 96  $\mu M$  pour POPC, POPG et SPC, respectivement. Tandis que les concentrations de solubilisation n'ont pas été observées sauf pour la membrane de POPG.

Le C<sub>16</sub>BC, bien que fortement attiré par les membranes (de POPC, POPG) comparativement à C<sub>12</sub>BC, les stabilise, probablement par des interactions hydrophobes. Ces observations sont renforcées par l'absence de points de solubilisation (point V). C<sub>16</sub>BC a saturé les membranes à des concentrations respectives de l'ordre de 70 μM indépendamment du type de membrane. La perturbation des membranes par le C<sub>16</sub>BC n'a pas été observée (point VI). Dans tous les cas, la mesure de taille des particules après titrage des vésicules lipidiques (de POPC, POPG et PSC) par des solutions micellaires de C<sub>12</sub>BC et C<sub>16</sub>BC a montré des particules de taille supérieure à celle des vésicules lipidiques pures. Les analogues des C<sub>16</sub>BC, les C<sub>16</sub>TAC et le C<sub>16</sub>TAB ont perturbé la membrane de POPC à des rapports molaires TA/lipide de 1 et 36, respectivement (Watanabe *et al.*, 1994 ; Marcotte *et al.*, 2005b). Ce comportement a été observé précédemment pour la perturbation des mêmes types de membranes par le chlorure de cetylpyridinium (Marcotte *et al.*, 2005a).

Les C<sub>n</sub>BC ont montré une affinité importante pour les membranes contenant le CHOL. Du fait que le pouvoir antifongique des composés amphiphiles est lié à leur affinité pour les stérols [permettant la formation des pores transmembranaires qui causent la perméabilité de la bicouche et la libération des composants intracellulaires (de Kruijff et Demel, 1974 ; Czub et baginski, 2006)], les C<sub>n</sub>BC pourraient avoir des activités antifongiques comme certains amphiphiles d'ammonium quaternaire (Kirk *et al.*, 1997 ; Ziani *et al.*, 2009).

## **VIII. Conclusion générale et perspectives**

Le développement des tensioactifs (TA) à base de ressources naturelles renouvelables connaît un essor considérable au cours de ces dernières années. Ils sont faits de blocs de construction naturels tels que les sucres, les acides aminés et les acides gras. Leur faible toxicité, biodégradation rapide et biocompatibilité comparativement aux TA d'origine pétrochimique sont les principales raisons de l'augmentation de l'intérêt industriel pour ces composés.

C'est dans ce cadre général que nous avons voulu contribuer à la valorisation de la glycine bêtaïne (GB), un sous produit des industries de la betterave sucrière et du bioéthanol, en lui conférant des propriétés physico-chimiques et biologiques. Les recherches se sont attachées à la synthèse et la caractérisation d'esters TA basés sur la GB, les chlorures d'alkylbêtaïnes ( $C_nBC$ ,  $n = 10-16$ ). L'étude de leurs propriétés de surface et membranaires devront permettre de donner un aperçu de leur organisation interfaciale et de leurs interactions moléculaires avec les membranes modèles imitant les systèmes biologiques réels.

Ce travail a d'abord permis de synthétiser le chlorure d'hexadécylbêtaïne ( $C_{16}BC$ ) avec un meilleur rendement à partir de la GB (comme matière première de base et activée par le chlorure de thionyle) et les alcools gras. La GB et le chlorure de thionyle sont moins toxiques pour l'environnement comparativement aux réactifs utilisés précédemment, le chlorure de chloroacétyle, la triméthylamine.

L'étude des propriétés de surface a permis de comprendre que l'organisation interfaciale des  $C_nBC$  dépend de la longueur de la chaîne alkyle et que dans l'eau à 20°C, seuls le chlorure de tétradécylbêtaïne ( $C_{14}BC$ ) et le  $C_{16}BC$  forment des monocouches insolubles à l'interface air-eau. Les molécules de chlorure de décylbêtaïne ( $C_{10}BC$ ) et de chlorure de dodécylbêtaïne ( $C_{12}BC$ ) se dissolvent dans la sous-phase aqueuse pendant la compression à cause de la faible hydrophobicité de leurs chaînes alkyles. Ce comportement explique par exemple l'absence du pouvoir moussant observé pour ces deux composés et rapporté par la littérature.

Malgré la charge positive portée par le groupe polaire de  $C_{16}BC$ , sa monocouche s'est comportée comme celle d'un TA non ionique avec l'apparition d'une phase semi-solide (LS). Ce comportement peut signifier que les têtes polaires des molécules de  $C_nBC$  sont orientées profondément dans la phase aqueuse et en interactions avec les molécules d'eau. Les conditions différentes de la sous-phase aqueuse comme le pH et les anions monovalents n'ont pas influencé le comportement de la monocouche de  $C_{16}BC$  tandis que la température au-delà

de 25°C et les anions divalents l'ont influencée, principalement en termes d'aire interfaciale occupée par les molécules.

L'étude des interactions des  $C_nBC$  avec les constituants des membranes biologiques a permis d'acquérir certaines informations concernant leurs activités membranaires. Dans ce travail, deux modèles principaux ont été utilisés : les monocouches et les vésicules lipidiques. Nous avons montré que les conditions du milieu sont prépondérantes. En ce qui concerne l'étude des monocouches à l'aide de la Balance à film de Langmuir, les expériences conduites en phase aqueuse ont montré que les  $C_nBC$  pénètrent dans les monocouches constituées de lipides chargés négativement indépendamment de la longueur de leur chaîne alkyle. Les mêmes effets existent mais de manière moindre pour les lipides avec une tête polaire peu encombrante (chargée ou non) et enfin de lipides avec une tête polaire volumineuse. Ce comportement indique que les attractions électrostatiques ainsi que l'encombrement des molécules (groupes polaires et/ou hydrophobes) jouent un rôle prépondérant à côté des interactions hydrophobes dans le processus d'interaction.

Par contre, dans le tampon salin, les têtes polaires des  $C_nBC$  sont en grande partie neutralisées et leurs interactions avec les lipides sont influencées par la longueur de la chaîne alkyle, indiquant que la composante hydrophobe est prépondérante et que les interactions attractives électrostatiques jouent un rôle mineur. Notons que les liaisons hydrogènes entre les  $C_nBC$  et les lipides qui offrent cette possibilité, comme la SM, contribuent aux interactions polaires. Le  $C_{16}BC$  a montré des miscibilités différentes avec les lipides constituant les membranes pour des raisons qui viennent d'être évoquées. Le  $C_{16}BC$  a formé des mélanges non idéaux avec les lipides zwitterioniques portant une tête polaire volumineuse (POPC et SM) sans déranger la stabilité des monocouches mixtes  $C_{16}BC$ /lipides. Notre travail a montré l'existence d'un mélange idéal entre le  $C_{16}BC$  et le CHOL et une forte affinité de ce premier pour la membrane contenant du CHOL.

En utilisant le deuxième type de modèles membranaires, les vésicules lipidiques, il est possible de mieux décrire les phénomènes d'adsorption, de pénétration et de solubilisation de ceux-ci. Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser ces phénomènes, notamment, la spectrométrie de fluorescence, la calorimétrie de titration isotherme (ITC), la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (mesures de la taille des particules et du potentiel zêta) ainsi que la modélisation moléculaire.

Dans les conditions proches des conditions physiologiques (tampon salin, pH = 7,4), les mesures du potentiel zêta ont montré que le C<sub>10</sub>BC est faiblement attiré par les membranes à cause de sa HBL élevée comparativement aux autres C<sub>n</sub>BC étudiés. Les résultats de la spectrométrie de fluorescence ont montré que le C<sub>10</sub>BC, le C<sub>14</sub>BC et le C<sub>16</sub>BC n'ont pas perturbé l'intégrité des membranes même à des concentrations élevées (250 μM), correspondant au rapport molaire C<sub>n</sub>BC/lipide égal à 20. Par contre, le C<sub>12</sub>BC a perturbé les membranes à une concentration d'environ 87,5 μM (correspondant au rapport molaire C<sub>12</sub>BC/lipide égal à environ 7).

Généralement, la perturbation des membranes par les détergents est proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle (Marcotte *et al.*, 2005 ; Hugonin *et al.*, 2006). Dans notre cas, le C<sub>16</sub>BC a stabilisé les membranes comparativement à C<sub>12</sub>BC, probablement par des interactions hydrophobes selon les travaux réalisés à l'ITC et au Delsanano. Dans tous les cas, le Delsanano utilisé pour la mesure de la taille des particules après titrage des vésicules lipidiques par des solutions micellaires de C<sub>12</sub>BC et C<sub>16</sub>BC à l'ITC n'a montré que la présence de particules de taille supérieure à celle des vésicules lipidiques pures et donc l'absence de micelles. Ce comportement est la conséquence de la formation d'agrégats, probablement de vésicules et de molécules de C<sub>n</sub>BC et/ou de micelles de C<sub>n</sub>BC augmentant de ce fait les valeurs du potentiel zêta.

Au delà des conclusions tirées des différentes recherches réalisées dans le présent travail de thèse, les C<sub>n</sub>BC présentent d'énormes potentialités techno-fonctionnelles et biologiques. Les dérivés de la glycine bêtaïne étudiés sont d'abord des TA (Rozycka-Roszak *et al.*, 1988 ; Itoh *et al.*, 2009). Aujourd'hui, l'hydrolyse et la biodégradation constituent des préoccupations majeures dans l'utilisation de TA. Les TA hydrolysables solubles dans l'eau ont attiré une attention considérable dans un passé récent pour leur capacité à se transformer en composés non TA par des moyens chimiques ou biochimiques, la lumière ultraviolette ou la chaleur après avoir accompli leurs fonctions d'origine. Ils permettent de résoudre certains problèmes tels que l'élimination de mousses ou d'émulsions stables indésirables formées après l'utilisation d'une formulation de TA (Jaeger, 1995 ; Holmberg, 1996 ; Jong et Abbott, 2000 ; Lin et Chen, 2006). Les C<sub>n</sub>BC répondent aux exigences des TA hydrolysables : synthèse simple, activités de surface comparables à celles des TA non hydrolysables, haute stabilité avant et pendant l'utilisation, hydrolyse élevée et contrôlée sous une condition douce après

leur utilisation (Itoh *et al.*, 2007). Ils présentent une sécurité environnementale car leurs produits d'hydrolyse (la GB et les alcools gras) sont des produits d'origine renouvelable (Kubo *et al.*, 1995 ; Elgaali *et al.*, 2002 ; Itoh *et al.*, 2007). En tant que TA, les C<sub>n</sub>BC peuvent avoir plusieurs applications dans les industries alimentaire, cosmétique, agricole, biologique, pétrochimique et environnementale comme agents moussants, émulsifiants, épaississants, mouillants, adhésifs, solubilisants, adjuvants dans les pesticides, antibactériens, antifongiques, antiviraux, vecteurs de gènes (Chang et Franses, 1995 ; Ying, 2006 ; Singh *et al.*, 2007 ; Gomez del Rio *et al.*, 2010).

Du fait de la présence sur leurs groupes polaires d'une charge positive permanente qui est indépendante du pH, les C<sub>n</sub>BC sont des TA cationiques qui peuvent trouver des applications différentes dans les préparations cosmétiques, pour le nettoyage et la stérilisation du matériel chirurgical, dans la formulation des désinfectants à usage domestique et hospitalier, pour la stérilisation des bouteilles ou des récipients alimentaires, notamment dans les produits laitiers et les industries de boissons (Madunić-Čačić *et al.*, 2008) ; dans la fabrication des textiles comme assouplissants (de Paz Báñez *et al.*, 2000 ; Para *et al.*, 2010), comme c'est le cas pour leurs analogues alkyltriméthylammonium (Tsai et Ding, 2004). Ils constituent également un modèle très pratique pour l'étude des propriétés d'adsorption des TA cationiques (Para *et al.*, 2010). Ils peuvent interagir avec l'ADN chargé négativement et avoir des potentialités dans la transfection de ce dernier (Beyer *et al.*, 2006).

Une deuxième voie de valorisation peut être liée à leurs propriétés membranaires. Grâce à leur forte affinité pour les monocouches constituées de lipides chargés négativement, les C<sub>n</sub>BC peuvent avoir des affinités pour des membranes bactériennes, comme observés pour d'autres TA cationiques d'ammonium quaternaire (Kourai *et al.*, 2006 ; Badawi *et al.*, 2010 ; Sajomsang *et al.*, 2010). En plus, leur affinité pour les membranes contenant le cholestérol pourrait leur attribuer une activité antifongique, comme le CHOL a une ressemblance structurale et un effet similaire sur l'ordre de conformation de la chaîne lipidique avec l'ergostérol (Fournier *et al.*, 2008), le principal stérol des membranes fongiques (Mannock *et al.*, 2010). Notre travail a montré que certains C<sub>n</sub>BC peuvent pénétrer des monocouches préformées à 30 mN/m. Ils pourraient dès lors pénétrer dans des bicouches lipidiques *in vivo*. Du fait de leur comportement relativement doux vis-à-vis des membranes modèles, les C<sub>n</sub>BC sont des candidats potentiels comme stabilisateurs d'émulsion, antibactériens, excipients dans

les formulations cosmétiques et pharmaceutiques (Cornaire *et al.*, 2004 ; Öztekin et Erim, 2005).

D'autres travaux restent à réaliser en vue d'obtenir des produits plus respectueux de l'environnement, d'étudier d'autres propriétés de surface des  $C_nBC$ , leurs caractéristiques thermiques, leur toxicité, de bien comprendre leurs mécanismes d'interaction avec les organismes vivants et de définir leurs applications futures :

- La synthèse de  $C_nBC$  par voie enzymatique, bien que coûteuse au niveau industriel avec des temps de réaction longs, présente l'avantage d'être sélective avec des conditions de réaction douces. Cela évitera aussi l'utilisation de certains réactifs chimiques autres que les principaux substrats qui sont non toxiques (la GB et les alcools gras) ;
- Etudier la micellisation des  $C_nBC$  dans l'eau en fonction de la température et en présence de sels. Cela permettra d'obtenir des informations sur la façon dont la température et les anions affectent l'assemblage de molécules de  $C_nBC$  à l'interface ainsi que la concentration micellaire critique (CMC).
- Etudier l'affinité des anions (monovalents et divalents appartenant à la série de Hofmeister) pour les micelles des  $C_nBC$  en vue de définir leur caractère kosmotrope et/ou chaotrope ;
- Etudier les températures de transition de phase et de dégradation des  $C_nBC$  en vue de déterminer leur stabilité thermique ;
- Etudier les propriétés émulsifiantes, solubilisantes...en vue d'exploiter au maximum les potentialités que les  $C_nBC$  peuvent offrir sur les propriétés de surface ;
- Etudier les propriétés des solutions aqueuses et des monocouches des mélanges des  $C_nBC$  avec les TA anioniques du fait de la très forte activité de surface des mélanges des TA cationiques et anioniques comparativement à celle des TA individuels et de leur utilisation pratique comme détergents, émulsifiants, dispersants... ;

- Etudier les interactions des  $C_nBC$  avec les membranes biologiques réels (e.g. les érythrocytes humains, les bactéries), afin d'évaluer la contribution des autres constituants non lipidiques des membranes biologiques (comme les protéines) et d'évaluer le degré de leur toxicité ;
- Former des vésicules cationiques mixtes des  $C_nBC$  avec les lipides, comme le CHOL, pour leur utilisation dans les applications biomédicales comme dans les systèmes de délivrance des médicaments, des gènes fonctionnels et dans la transfection de l'ADN.

## **IX. Références bibliographiques**

Abraham T., Marwaha S., Kobewka D.M., Lewis R.N.A.H., Prenner E.J., Hodges R.S., McElhaney R.N. (2007). The relationship between the binding to and permeabilization of phospholipid bilayer membranes by GS14dK4, a designed analog of the antimicrobial peptide gramicidin S. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**, 2089-2098.

Alfieri R.R., Cavazzoni A., Petronini P.G., Bonelli M.A., Caccamo A.E., Borghetti A.F., et al. (2002). Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect them from apoptosis. *Journal of Physiology*, **540**, 499-508.

Alfieri R.R., Petronini P.G., Bonelli M.A., Desenzani S., Cavazzoni A., Borghetti A.F., et al. (2004). Roles of compatible osmolytes and heat shock protein 70 in the induction of tolerance to stresses in porcine endothelial cells. *Journal of Physiology*, **555**, 757-767.

Alkaya E., Demirer G.N. (2011). Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters. *Biomass and Bioenergy*, **35**, 32-39.

Almaleck S.H., Lairion F., Disalvo E.A., Gordillo G.J. (2006). Lipid monolayers on Hg as a valid experimental model for lipid membranes under electrical fields. *Chemistry and Physics of Lipids*, **139**, 150-156.

Aroti A., Leontidis E., Dubois M., Zemb T., Brezesinski G. (2007) Monolayers, bilayers and micelles of zwitterionic lipids as model systems for the study of specific anion effects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **303**, 144-158.

Auzély-Velty R., Rinaudo M. (2003). Synthesis of starch derivatives with labile cationic groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, **31**, 123-129

Badawi A.M., Hegazy M.A., El-Sawy A.A., Ahmed H.M., Kamel W.M. (2010). Novel quaternary ammonium hydroxide cationic surfactants as corrosion inhibitors for carbon steel and as biocides for sulfate reducing bacteria (SRB). *Materials Chemistry and Physics*, **124**, 458-465.

Barany E., Lindberg M., Loden M. (1999). Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermatitis*, **40**, 98-103.

Benvegnu T., Plusquellec D., Lemiègre L. (2008). Surfactants from renewable sources: synthesis and applications. Monomers, Polymers and Composites from renewable resources, chapter 7, 153-178.

Beyer K., Leine D., Blume A. (2006). The demicellization of alkyltrimethylammonium bromides in 0.1M sodium chloride solution studied by isothermal titration calorimetry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **49**, 31-39.

Boury F., Gautier J.-C., Bouligand Y., Proust J.-E. (2001) Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **20**, 219-227.

Bowen J., Manickam M., Evans S.D., Critchley K., Kendall K., Preece J.A. (2008). The pH-dependent adhesion of nanoparticles to self-assembled monolayers on gold. *Thin Solid Films*, **516**, 2987-2999.

Brezesinski G., Möhwald H. (2003). Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, **100-102**, 563-584.

Caro A.L., Niño M.R.R., Juan M. Rodríguez Patino J.M.R. (2009). Dynamics of penetration of dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) monolayers by  $\beta$ -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **341**, 134-141.

Caqueret V., Bostyn S., Cagnon B., Faudet H. (2008). Purification of sugar beet vinasse-Adsorption of polyphenolic and dark colored compounds on different commercial activated carbons. *Bioresource Technology*, **99**, 5814-5821.

Cardenas M., Campos-Teran J., Nylander T., Lindman B. (2004). DNA and Cationic Surfactant Complexes at Hydrophilic Surfaces. An Ellipsometry and Surface Force Study. *Langmuir*, **20**, 8597-8603.

Catusse J., Strub J.M., Job C., Dorsselaer A., Job D. (2008). Proteome-wide characterization of sugar beet seed vigor and its tissue specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **105**, 10262-1067.

CESIO (Comité européen des agents de surface et leurs intermédiaires organiques), Presentation to the Renewable Raw Materials Group (Working Group 5/Industry) under the European Climate Change Programme (ECCP), Brussels, 13 February 2001.

Chang C.-H., Franses E.I. (1995). Adsorption dynamics of surfactants at the air/water interface: a critical review of mathematical models, data, and mechanisms. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **100**, 1-45.

Cibis E., Ryznar-Luty A., Krzywonos M., Lutosławski K., Miśkiewicz T. (2011). Betaine removal during thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of beet molasses vinasse: Influence of temperature and pH on the progress and efficiency of the process. *Journal of Environmental Management*, **92**, 1733-1739.

Cornaire G., Woodley J., Hermann P., Cloarec A., Arellano C., Houin G. (2004). Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, **278**, 119-131.

Cosquer A., Ficamos M., Jebbar M., Corbel J.-C., Choquet G., Fontenelle C., Uriac P., Bernard T. (2004). Antibacterial activity of glycine betaine analogues: involvement of osmoporters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 2061-2065.

Crocker F.H., Guerin W.F., Boyd S.A. (1995). Bioavailability of naphthalene sorbed to cationic surfactant-mediated smectic clay. *Environmental Science Technology*, **29**, 2953-2958.

Czub J., Baginski M. (2006). Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol-A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 16743-16753.

Dam T., Engberts J.B.F.N., Karthäuser J., Karaborni S., van Os N.M. (1996). *Colloids and Surfaces A: physicochemical and Engineering Aspects*, **118**, 41-.

de la Maza A., Baucells J., Gonzalez-Enseñat P., Parra J.L. (1997). Partition of alkylbetaine surfactants in liposomes modeling the stratum corneum lipid composition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **122**, 43-52.

de Kruijff B., Demel R.A. (1974). Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **339**, 57-70.

Deleu M., Bouffieux O., Razafindralambo H., Paquot M., Hbid C., Thonart P., Jacques P., Brasseur R. (2003). Interaction of Surfactin with Membranes: A Computational Approach. *Langmuir*, **19**, 3377–3385.

Deleu M., Paquot M., Nylander T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, **283**, 358-365.

Demel R.A., Geurts van Kessel W.S.M., Zwaal R.F.A., Roelofsen B., van Deenen L.L.M. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **406**, 97-107.

de Paz Bález M.V., Robinson K.L., Vamvakaki M., Lascelles S.F., Armes S.P. (2000). Synthesis of novel cationic polymeric surfactants. *Polymer*, **41**, 8501-8511.

Dhanabalan A., Prasanth Kumar N., Major S., Talwar S.S. (1998). Variation of monolayer behaviour and molecular packing in zinc arachidate LB films with subphase pH. *Thin Solid Films*, **327–329**, 787-791.

Dieter R.K. (1999). Reaction of acyl chlorides with organometallic reagents: A banquet table of metals for ketone synthesis. *Tetrahedron* **55**, 4177-4236.

Ehrenberg J. (2002). Current situation and future prospects of EU industry using renewable raw materials, coordinated by the European Renewable Resources & Materials Association, European Commission DG Enterprise Unit E.1: Environmental Aspects of Industry Policy, Brussels, February.

Eisner M.D., Jeelani S.A.K., Bernhard L., Windhab E.J. (2007). Stability of foams containing proteins, fat particles and nonionic surfactants. *Chemical Engineering Science*, **62**, 1974-1987.

Elgaali H., Hamilton-Kemp T.R., Newman M.C., Collins R.W., Yu K.S., Archbold D.D. (2002). Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, **42**, 373-380.

Ergun M., Ferda Mutlu S. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, **73**, 251-255.

Ernst R., Miller E.J. (1982). in: Bluestein B.R., Hilton C.L. (Eds.). Surface-active betaines, amphoteric surfactants. Surfactants Science Series, vol. 12, Marcel Dekker, New York, Chapter 2.

Escudero I., Olga Ruiz M. (2011). Extraction of betaine from beet molasses using membrane contactors. *Journal of Membrane Science*, **372**, 258-268.

Feng S.S. (1999). Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure–area measurement of the monolayer at air–water or oil–water interface, *Langmuir*, **15**, 998-1010.

Fisicaro, E., Compari, C., Duce, E., Donofrio, G., Różycka-Roszak, B., Woźniak, E. (2005). Biologically active bisquaternary ammonium chlorides: physico–chemical properties of long chain amphiphiles and their evaluation as non-viral vectors for gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1722**, 224-233.

Fournier I., Barwicz J., Auger M., Tancreède P. (2008). The chain conformational order of ergosterol- or cholesterol-containing DPPC bilayers as modulated by Amphotericin B: a FTIR study. *Chemistry and Physics of Lipids*, **151**, 41-50.

Garcia I., Bonilla J.L., Jiménez P., Ramos E. (1997). Biodegradation of phenol compounds in vinasses using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Research*, **31**, 2005-2011.

Ganeshpure P.A., George G., Das J. (2008). Brønsted acidic ionic liquids derived from alkylamines as catalysts and mediums for Fischer esterification: Study of structure–activity relationship. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemistry*, **279**, 182-186.

Giacobello S., Storti G., Tola G. (2000). Design of a simulated moving bed unit for sucrose–betaine separations. *Journal of Chromatography A*, **872**, 23-35.

Gomez del Rio J., Hayes D.G., Urban V.S. (2010). Partitioning behavior of an acid-cleavable, 1,3-dioxolane alkyl ethoxylate, surfactant in single and binary surfactant mixtures for 2- and 3-phase microemulsion systems according to ethoxylate head group size. *Journal of Colloid and Interface Science*, **352**, 424–435.

Granö H., Yli-Kauhaluoma J., Suortti T., Käki J., Nurmi K. (2000). Preparation of starch betainate: a novel cationic starch derivative. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 277-283.

Goddijn-Wessel T.A.W., Wouters M.G.A.J., Molen E.F.v.d., Spuijbroek M.D.E.H., Steegers-Theunissen R.P.M., Blom H.J., Boers G.H.J., Eskes T.K.A.B. (1996). Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **66**, 1996, 23-29.

Gonzalez-Mazo E., Honing M., Barcelo D., Gomez-Parra A. (1997). Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry. *Environmental Science Technology*, **31**, 504-10.

Hąc-Wydro K., Wydro P., Dynarowicz-Łątka P. (2005). Interactions between dialkyldimethylammonium bromides (DXDAB) and sterols-a monolayer study. *Journal of Colloid and Interface Science*, **286**, 504-510.

Hąc-Wydro K., Jędrzejek K., Dynarowicz-Łątka P. (2009) Effect of saturation degree on the interactions between fatty acids and phosphatidylcholines in binary and ternary Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **72**, 101-111.

Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. (1997). Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, **271**, 244-257.

Hayes K.C., Pronczuk A., Cook M.W., Mark C. Robbins M.C. (2003). Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 1685-1700.

Heerklotz H., Seelig J. (2000). Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1508**, 69-85.

Holmberg K. (1996). Surfactants with controlled half-lives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **5**, 572-579.

Holmberg K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **6**, 148-159.

Hugonin L., Vukojević V., Bakalkin G., Gräslund A. (2006). Membrane leakage induced by dynorphins. *FEBS Letters*, **580**, 3201-3205.

Ishitsuka Y., Pham D.S., Waring A.J., Lehrer R.I., Lee K.Y.C. (2006). Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: Effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 1450-1460.

Itoh Y., Akasaka R. (2009) Comparison of surface-active properties of (Alkyloxycarbonylmethyl) trimethylammonium chlorides and Alkyltrimethylammonium chlorides. *Journal of Surfactants and Detergents*, **12**, 101-107.

Itoh Y., Horiuchi J., Takahashi K. (2007). Alkylaldehyde-bisulfite adducts as cleavable surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **308**, 118-122.

Jaeger D.A. (1995). Cleavable surfactants. *Supramolecular Chemistry*, **5**, 27-30.

Jiménez A.M., Borja R., Martín A., Raposo F. (2005). Mathematical modelling of aerobic degradation of vinasses with *Penicillium decumbens*. *Process Biochemistry*, **40**, 2805-2811.

Jong L.I., Abbott N.L. (2000). A chemodegradable surfactant system based on oxidation of disulfide bonds using hypochlorite. *Langmuir*, **16**, 5553-5561.

Kang B.K., Lee J.S., Chan S.K., Jeong S.Y., Yuk S.H., Khang G., Lee H.B., Cho S.H. (2004). Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral

bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics*, **274**, 65-73.

Karsa D.R., Bailey R.M., Skelmerdine B., Mc Cann S.A. (1999). in: Karsa D.R. (Ed.), *Industrial applications of surfactants IV*, Royal Society of Chemistry, p. 1

Kern F., Lequeux F., Zana R., Candau S.J. (1994). Dynamic Properties of Salt-Free Viscoelastic Micellar Solutions. *Langmuir*, **10**, 1714–1723.

Kirk O., Pedersen F.D., Fuglsang C.C. (1997). Chemoenzymatic synthesis and characterization of a new type of carbohydrate-based cationic antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **7**, 1645-1648.

Kracht M., Rokos H., Özel , Kowall M., Pauli G., Vater J. (1999). Antiviral and Hemolytic Activities of Surfactin Isoforms and Their Methyl Ester Derivatives. *Journal of Antibiotics*, **52**, 613-619.

Kourai H., Yabuhara T., Shirai A., Maeda T., Nagamune H. (2006). Syntheses and antimicrobial activities of a series of new bis-quaternary ammonium compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 437-444.

Kubo I., Muroi H., Kubo A. (1995). Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **3**, 873-880.

Lal H., Virendra M., Viswanathan P.N., Krishna Murti C.R. (1991). Comparative studies on ecotoxicology of synthetic detergents. *Ecotoxicology Environmental Safety*, **7**, 538-545.

Larher F., Rotival-Garnier N., Lemesle P., Plasman M., Bouchereau A. (1996). The glycine betaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs. *Plant Science*, **113**, 21-31.

Leontidis E. (2002). Hofmeister anion effects on surfactant self-assembly and the formation of mesoporous solids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **7**, 81-91.

Lever M., Sizeland P.C.B., Bason L.M., Hayman C.M., Chambers S.T. (1994). Glycine betaine and proline betaine in human blood and urine. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1200**, 259-264.

Lever M., Sizeland P.C., Frampton C.M., Chambers S.T. (2004). Short and longterm variation of plasma glycine betaine concentrations in humans. *Clinical Biochemistry*, **37**, 184-190.

Lever M., Atkinson W., Sizeland P.C.B., Chambers S.T., George P.M. (2007). Inter- and intra-individual variations in normal urinary glycine betaine excretion. *Clinical Biochemistry*, **40**, 447-453.

Lever M., Slow S. (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, **43**, 732-744.

Lewis M.A., Suprenant D. (1983). Comparative acute toxicities of surfactants to aquatic invertebrates. *Ecotoxicology Environmental Safety*, **7**, 313-322.

Lin L.-H., Chen K.-M. (2006). Surface activity and water repellency properties of cleavable-modified silicone surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **275**, 99–106.

Lin L.H., Chiang C.Y., Chen K.M. (2002). Preparation and properties of water-soluble polyester surfactants. I. Preparation and surface activity of poly(ethylene glycol)-dimethyl 5-sulfo-isophthalate sodium salt polyester surfactants. *Journal of Applied Polymer Science*, **86**, 2727-2731.

Lin C.C., Chuang S.C., Lin J.M., Yang Z.J. (1997). Evaluation of the anti-inflammatory hepatoprotective and antioxidant activities of *Lycium chinense* from Taiwan. *Phytomedicine*, **4**, 213-220.

Lindstedt, M., Allemark, S., Thompson, R.A., Edebo, L. (1990). Antimicrobial activity of betaine esters, quaternary ammonium amphiphiles which spontaneously hydrolyze into nontoxic components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**, 1949-1954.

Lu S.C., Tsukamoto H., Mato J.M. (2002). Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury. *Alcohol*, **27**, 155-162.

Lundberg D., Ljusberg-Wahren H., Norlin A., Holmberg K. (2004a). Studies on dodecyl betainate in combination with its degradation products or with phosphatidyl choline—phase behavior and hemolytic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, **278**, 478-487.

Lundberg D., Holmberg K. (2004b). Nuclear magnetic resonance studies on hydrolysis kinetics and micellar growth in solutions of surface-active betaine esters. *Journal of Surfactants and Detergents*, **7**, 239-246.

Macian M., Seguerb J., Infanteb M.R., Selve C., Vinardell M.P. (1996). Preliminary studies of the toxic effects of derived from lysine non-ionic surfactants. *Toxicology*, **106**, 1-9.

Madunić-Čačić D., Sak-Bosnar M., Galović O., Sakač N., Matešić-Puač R. (2008). Determination of cationic surfactants in pharmaceutical disinfectants using a new sensitive potentiometric sensor. *Talanta*, **76**, 259-264.

Maget-Dana R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1462**, 109-140

Manderscheid R., Pacholski A., Weigel H.-J. (2010). Effect of free air carbon dioxide enrichment combined with two nitrogen levels on growth, yield and yield quality of sugar beet: Evidence for a sink limitation of beet growth under elevated CO<sub>2</sub>. *European Journal of Agronomy*, **32**, 228-239.

Mannock D.A., Lewis R.N.A.H., McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (2010). The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid–sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **163**, 403-448.

Marchetti J.M., Errazu A.F. (2008). Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. *Biomass and Bioenergy*, **32**, 892-895.

Marcotte L., Barbeau J., Edwards K., Karlsson G., Lafleur M. (2005a). Influence of the lipid composition on the membrane affinity, and the membrane-pertubing ability of cetylpyridinium chloride. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **266**, 51-61.

Marcotte L., Barbeau J., M. Lafleur M. (2005b). Permeability and thermodynamics study of quaternary ammonium surfactants-phosphocholine vesicle system. *Journal of Colloid and Interface Science*, **292**, 219-227.

Marsh D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1286**, 183-223.

Martinez V., Corsini E., Mitjans M., Pinazo A., Vinardell M.P. (2006). Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. *Toxicology Letters*, **164**, 259–267.

Mazumdar S. (2001). Interaction of surfactants with biomolecules and mimics. Handbook of surfaces and interface of materials, p. 73-128.

McConlogue C.W., Malamud D., Vanderlick T.K. (1998). Interaction of DPPC monolayers with soluble surfactants: electrostatic effects of membrane perturbants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1372**, 124-134.

Miller R.M., Bartha R. (1989) Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 269-274.

Mohlin K., Karlsson P., Holmberg K. (2006). Use of cleavable surfactants for alkyl ketene dimmer (AKD) dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **274**, 200-210.

Morin Couallier E., Salgado Ruiz B., Lameloise M-L., Decloux M. (2006). Usefulness of reverse osmosis in the treatment of condensates arising from the concentration of distillery vinasses. *Desalination*, **196**, 306-317.

Ohta A., Matsubara H., Ikeda N., Aratono M. (2001). Miscibility of binary surfactant mixtures in the adsorbed film and micelle: the effect of size of polar head group. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **183-185**, 403-413.

Osborne D.W., Ward A.J.I. (1991). Symposium on Zwitterionic Surfactants: Preface. *Langmuir*, **7**, 840–841.

Öztekin N., Erim F.B. (2005). Determination of cationic surfactants as the preservatives in an oral solution and a cosmetic product by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**, 1121-1124.

Para G., Hamerska-Dudra A., Wilk K.A., Warszynski P. (2010). Surface activity of cationic surfactants, influence of molecular structure. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **365**, 215–221.

Peter Slotte J. (1999) Sphingomyelin–cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **102**, 13-27.

Petronini P.G., Alfieri R.R., Losio M.N., Caccamo A.E., Cavazzoni A., Bonelli M.A., et al. (2000). Induction of BGT-1 and amino acid system A transport activities in endothelial cells exposed to hyperosmolarity. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **279**, 1580–1589.

Preetha A., Huilgol N., Banerjee R. (2006). Comparison of paclitaxel penetration in normal and cancerous cervical model monolayer membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **53**, 179-186.

Quéau M., Renault J., Uriac P., Corbel J.-C., Travert M.-F., Bernard T., Donnio P.-Y. (2003). Activité antibactérienne de deux analogues de la glycine bétaïne vis-à-vis d'*Escherichia coli*. *Pathologie Biologie*, **51**, 516-519.

Razafindralambo H., Thonart P., Paquot M. (2004). Dynamic and equilibrium surface tensions of surfactin aqueous solutions. *Journal of Surfactants and Detergents*, **7**, 41-46.

Rezaei Z., Khabnadideh S., Zarshenas M.M., Jafari M.R. (2007). Esterification of tertiary alcohols in steroids under different conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemistry*, **1-2**, 57-61.

Rozycka-Roszak, B., Walkowiak, U., Witek, S., przestalski, S. (1989). Micelle hydration by  $^1\text{H}$  NMR. *Colloid and Polymer Science*, **267**, 831-833.

Roukas T. (1998). Pre-treatment of beet molasses to increase pollulan production. *Process Biochemistry*, **33**, 805-810.

Sajomsang W., Ruktanonchai U.R., Gonil P., Warin C. (2010). Quaternization of N-(3-pyridylmethyl) chitosan derivatives: Effects of the degree of quaternization, molecular weight and ratio of N-methylpyridinium and N,N,N-trimethyl ammonium moieties on bactericidal activity. *Carbohydrate Polymers*, **82**, 1143-1152.

Sánchez M., Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2010). Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Colloid and Interfaces Science*, **341**, 240-247.

Satgé C., Verneuil B., Branland P., Granet R., Krausz P., Rozier J., Petit C. (2002). Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, **49**, 373-376.

Schreier S., Malheiros S.V.P., de Paula E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1508**, 210-234.

Schwab U., Torronen A., Toppinen L., Alfthan G., Saarinen M., Aro A., Uusitupa M. (2002). Betaine supplementation decreases plasma homocysteine concentrations but does not affect body weight, body composition, or resting energy expenditure in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 961-967.

Shalel S., Streichman S., Marmur A. (2003). The use of hemolysis kinetics to evaluate erythrocyte-bound surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **27**, 215-222.

Sibila M.A., Garrido M.C., Perales J.A., Quiroga J.M. (2008). Ecotoxicity and biodegradability of an alkyl ethoxysulphate surfactant in coastal waters. *Science of the Total Environment*, **394**, 265-274.

Silvestro L., Axelsen P.H. (1998). Infrared spectroscopy of supported lipid monolayer, bilayer, and multibilayer membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **96**, 69-80.

Silvius J.R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1610**, 174–183.

Singh R.P., Gupta N., Singh S., Singh A., Suman R., Annie K. (2002). Toxicity of ionic and nonionic surfactants to six macrobes found in Agra. *India Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **69**, 265–70.

Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, **25**, 99-121.

Sinn C.G., Dimova R., Antonietti M. (2004). Isothermal Titration Calorimetry of the polyelectrolyte/water interaction and binding of Ca<sup>2+</sup>: Effects determining the quality of polymeric scale inhibitors. *Macromolecules*, **37**, 3444-3450.

Slow S., Lever M., Lee M.B., George P.M., Chambers S.T. (2004). Betaine analogues alter homocysteine metabolism in rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 870-880.

Söderlund T., Zhu K., Jutila A., Paavo K.J. Kinnunen P.K.J. (2002). Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, **26**, 75-83.

Sopade P.A., Lee S.B., White E.T., Halley P.J. (2007). Glass transition phenomena in molasses. *LWT - Food Science and Technology*, **40**, 1117-1122.

Storer M.K., McEntyre C.J., Lever M. (2006). Separation of cationic aracyl derivatives of betaines and related compounds. *Journal of Chromatography A*, **104**, 263-271.

Sui W., Song G., Chen G., Xu G. (2005). Aggregate formation and surface activity property of an amphiphilic derivative of chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **256**, 29-33.

Tegeler A., Ruess W., Gmahl E. (1995). Determination of amphoteric surfactants in cosmetic cleansing products by high-performance liquid chromatography on a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A*, **715**, 195-198.

Tehrani-Bagha A.R., Oskarsson H., van Ginkel C.G., Holmberg K. (2007). Cationic ester-containing gemini surfactants: Chemical hydrolysis and biodegradation. *Journal Colloid and Interface Science*, **312**, 444-452.

Thakur G., Micic M., Leblanc R.M. (2009). Surface chemistry of Alzheimer's disease: A Langmuir monolayer approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **74**, 436-456.

Thompson R.A., Allenmark S. (1992). Factors influencing the micellar catalysed hydrolysis of long-chain alkyl betainates. *Journal of Colloid and Interface Science*, **148**, 241-246.

Togrul H., Arslan N. (2004). Mathematical model for prediction of apparent viscosity of molasses. *Journal of Food Engineering*, **62**, 281-289.

Toro C., Sanchez S.A., Zanocco A., Lemp E., Gratton E., Gunther G. (2009). Solubilization of lipid bilayers by myristyl sucrose ester: effect of cholesterol and phospholipid head group size. *Chemistry and Physics of Lipids*, **157**, 104-112.

Tsai P.-C., Ding W.-H. (2004). Determination of alkyltrimethylammonium surfactants in hair conditioners and fabric softeners by gas chromatography–mass spectrometry with electron-impact and chemical ionisation. *Journal of Chromatography A*, **1027**, 103–108.

Turshatov A.A., Zaitsev S.Yu., Sazonov S.K., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Möbius D. (2008). Anion effects on monolayers of a new amphiphilic styryl-pyridinium dye at the air–water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **329**, 18-23.

Vaccari G., Tamburini E., Sgualdino G., Urbaniec K., Klemes J. (2005). Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. *Journal of Cleaner Production*, **13**, 499-507.

Valcarcel C.A., Serra M.D., Potrich C., Bernhart I., Tejuca M., Martinez D., Pazos F., Lanio M.E., Menestrina G. (2001). Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolysins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal*, **80**, 2761-2774.

Vollenbroich D., Pauli G., Özel M., Vater J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 44-49.

Wang N., Besser J.M., Buckler D.R., Honegger J.L., Ingersoll C.G., Johnson B.T., Kurtzweil M.L., MacGregor J., McKee M.J. (2005). Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, **59**, 545–551.

Watanabe S., Regen S.L. (1994). Quaternary Ammonium-Based Surfactants That Can Recognize Cholesterol-Rich Membranes and Proton-Ionizable Analogs That Cannot. *Journal of The American Chemical Society*, **116**, 5762-5765.

Yamada N., Promden W., Yamane K., Tamagake H., Takashi H., Tanaka H., Takabe T. (2009). Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of sugar beet e importance of long-distance translocation of betaine under norma land salt-stressed conditions. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 2058-2070.

Ying G.G. (2006). Fate, behaviour and effect of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, **32**, 417–431.

Zhang B., Zhao H., Zhou S., Shi C., Wang C., Ni J. (2009). A novel UASB–MFC–BAF integrated system for high strength molasses wastewater treatment and bioelectricity generation. *Bioresource Technology*, **100**, 5687-5693.

Ziani K., Fernández-Pan I., Royo M., Maté J.I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, **23**, 2309-2314.

Site Web:

[http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/2010/table\\_en/2010enfinal2.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/agrista/2010/table_en/2010enfinal2.pdf) (consulté le 28/08/2011).

<http://www.biofuels-platform.ch/infos/eu-bioethanol.php> (consulté le 28/08/2011).

## Productions scientifiques

Nsimba Zakanda F., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2010). Les dérivés de la glycine bétaïne : méthodes de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 14(4), 737-748.

Nsimba Zakanda F., Laurent P., Paquot M., Mvumbi Lelo G., Deleu M. (2011). Alkylbetainate chloride: Synthesis and behavior of monolayers at the air-water interface. *Thin Solid Films*, 520, 344-350.

Nsimba Zakanda F., Nott K., Paquot M., Mvumbi lelo G., Deleu M. (2011). Penetration behaviour of alkylbetainate chlorides into lipid monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86, 176-180.

Nsimba Zakanda F., Lins L., Nott K., Paquot M., Mvumbi lelo G., Deleu M. (2012). Interaction of hexadecylbetainate chloride with biological relevant lipids. *Langmuir*, DOI: 10.1021/la2040328.

Nsimba Zakanda F., Lins L., Razafindralambo H., Blecker C., Paquot M., Mvumbi lelo G., Deleu M. (XXXX). Integrity of lipid vesicles in presence of alkylbetainate chloride surfactants: Spectrofluorimetric, Isothermal Titration Calorimetry and Zeta potential studies. En préparation pour être soumis dans: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : Biomembranes*.