

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2022 -2023

N° 47

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Philomène Dos Santos

Utilisation des systèmes nano- colloïdaux par voie transdermique : le cas des nanoparticules lipidiques solides

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 5 juillet 2023

JURY

Président : Stéphanie David - MCU, Pharmacien, HDR (Université de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas)

Membres :

Véronique Moreau – Pharmacien, Loches (37)

Emilie Munnier- PR- Pharmacien, Directrice de thèse (Université de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas)

Jacqueline Resende de Azevedo – MCU (Université Claude Bernard Lyon 1, LAGEP : Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique)

ANNEE : 2022 - 2023

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAUDEAU, Mme Claire POUPLARD

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDEAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

36 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE

HERVE-AUBERT
JUSTE
LAJOIE
LANOUE
MARC
MAVEL
OUDIN
POUPET
PASQUALIN
PRIE
SAHLI
SOUCE
TAUBER
VELGE-ROUSSEL
VERCOUILLIE
VERGOTE
VIERRON
ZHANG

Katel
Matthieu
Laurie
Arnaud
Jillian
Sylvie
Audrey
Cyril
Côme
Gildas
Ramla
Martin
Clovis
Florence
Johnny
Jackie
Emilie
Bei-Li

CHIMIE ANALYTIQUE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
CHIMIE THERAPEUTIQUE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PHARMACOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE
PHARMACOGNOSIE
CHIMIE ANALYTIQUE
BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
PHARMACOLOGIE

FOUCAULT-FRUCHARD
FOUCAULT
MARLET

3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

Laura
Amélie
Julien

PHARMACIE CLINIQUE
HEMATOLOGIE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

POUPIN
RAMDANI
TULOUP

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

Pierre
Yanis
Vianney

BIOSTATISTIQUES ET SANTE PUBLIQUE
IMMUNOLOGIE
PHARMACIE CLINIQUE

3 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

AMRANE
MEHENNI
VERGER

Dyhia
Lyes
Alexis

CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE ANALYTIQUE
PHARMACIE GALENIQUE

WALTERS-GALOPIN

Susan

1 PRAG

ANGLAIS

GERBIER (contrat enseig)

1 contrat d'enseignement
Soledad
ANGLAIS

EPARDAUD
MEVELEC
MOIRE

3 CHARGÉS DE RECHERCHE
Mathieu
Marie-Noëlle
Nathalie
INRAE
INRAE
INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

D'e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

D'e ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

D'e faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

D'e coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 5 juillet 2023

L'étudiant

Dos Santos Philomène



Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND

Remerciement

Je remercie Madame Munnier pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse ainsi que tous les membres du jury : Madame David, Madame Moreau et Madame Resende de Azevedo pour être présentes ce jour et juger mon travail.

Merci également à toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide pendant cette thèse, merci Véronique d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de m'avoir appris le métier de pharmacien durant ces stages passés en ta compagnie. Ilyasse, Charles, Véronique et maman, merci pour vos précieuses relectures et le temps accordé à mon travail.

Je remercie ensuite mes parents pour leur infinie patience pendant la rédaction de ma thèse et pendant l'intégralité de mes études d'une façon générale, merci de m'avoir donné la possibilité d'en être là aujourd'hui. Papa, maman, c'est enfin fini !!

A Gabrielle, qui a toujours été là (même quand tu es   l'autre bout du monde), merci d'avoir été un tel soutien pendant toutes ces années je n'aurai pas réussi sans toi.

A Héloïse, merci d'être un exemple de résilience et d'être l'amie que tu es pour moi depuis si longtemps.

A mes amis qui ont partagé ces années d'études, de fêtes et de galères en Touraine ou en Occitanie : Théo, Victor, Rémi, Nico, Pierre, Maxence, Marina, Richard, Thibault, Lucas, Camille, Alexia, Samuel et les autres ; merci pour ces moments de joies.

Je remercie enfin Faz pour sa présence et l'apaisement qui a su m'apporter tout au long de la rédaction de cette thèse. Merci d'avoir contenu mes humeurs et calmer mes doutes, ce ne sont pas des remerciements qu'il te faudrait mais une véritable récompense. Merci de m'avoir toujours encouragé et pour ton soutien au quotidien.

Table des matières

Remerciement	4
Introduction.....	1
I. Dermatologie et systèmes nano-colloïdaux	3
A. La peau.....	3
1. Définition.....	3
2. Les différentes couches.....	3
a. L'épiderme.....	4
b. Le derme.....	5
c. L'hypoderme.....	5
d. Les annexes cutanées	6
3. Pénétration cutanée	7
a. Définition	7
b. La voie intercellulaire	8
c. La voie transcellulaire.....	8
d. La voie folliculaire.....	9
e. Mécanismes d'absorption	9
4. La voie cutanée et la voie transdermique	10
a. Définitions	10
b. Formes galéniques.....	10
c. Stratégies d'amélioration de la pénétration cutanée	13
B. Les systèmes lipidiques de transport nano-colloïdaux.....	19
1. Définition.....	19
2. Les principaux systèmes lipidiques nano-colloïdaux.....	19
a. Les microémulsions	19
b. Les nanoémulsions	20
c. Les liposomes	21
d. Les transférosomes	22
e. Les niosomes	22
f. Les éthosomes	23
g. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN).....	23
h. Les transporteurs de lipides nanostructurés (NLC)	24

II. Nanoparticule lipidique solide (SLN).....	25
A. Généralités	25
1. Définition.....	25
2. Composition des SLN	25
a. Les lipides	25
b. Les tensioactifs	26
c. Les polymères.....	26
d. Les phospholipides	26
e. Influence du lipide	27
f. Influence du tensioactif	27
3. Modèle d'incorporation de substance active	27
4. Voies d'administration et applications.....	29
a. La voie topique et transdermique	29
b. La voie parentérale.....	29
c. La voie orale	29
d. La voie respiratoire.....	29
e. La voie nasale	29
g. La voie oculaire	30
B. Méthodes de fabrication.....	30
1. Préparation des SLN par homogénéisation à haute pression	30
a. Homogénéisation à chaud.....	31
b. Homogénéisation à froid	32
2. Préparation des SLN par ultrasonication	33
3. Préparation des SLN par la technique de la microémulsion	34
4. Préparation des SLN par la méthode de la double émulsion.....	35
5. Préparation des SLN par émulsification et évaporation d'un solvant	36
6. Préparation des SLN par émulsification et diffusion d'un solvant	37
7. Préparation des SLN par injection de solvant ou nanopréciipitation.....	38
8. Préparation des SLN en utilisant les fluides supercritiques.....	39
a. Expansion rapide d'une solution supercritique (RESS).....	40
b. Technique de la solution d'antisolvant supercritique (SAS).....	40
c. Particules produites à partir d'une solution saturée en gaz (PGSS).....	41
9. Synthèse des différents procédés de préparation de SLN.....	43
10. Séchage des dispersions de SLN	45
C. Caractérisation des SLN	46

1. La taille, la charge de surface et la morphologie des SLN	46
a. Taille et tension de surface des SLN	46
b. Morphologie des SLN	48
2. Le taux de cristallinité du lipide	48
3. L'efficacité d'encapsulation de la substance active	49
D. Les limites des SLN.....	50
III. Optimisation d'une méthode de préparation et caractérisation de nanoparticules lipidiques solides pour délivrer de la nifédipine par voie transdermique.....	52
A. Design de l'étude.....	52
1. Préparation des SLN par nanoprécipitation	53
2. Optimisation des paramètres expérimentaux.....	53
3. Choix de la nature et de la concentration des composants	53
B. Matériels et méthodes.....	54
1. Matériel.....	54
2. Préparation des SLN.....	56
3. Détermination de la taille des SLN.....	57
4. Suivi de stabilité et efficacité d'encapsulation.....	58
C. Résultats expérimentaux.....	60
1. Influence et optimisation des paramètres opératoires.....	60
a. Débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse	61
b. Temps d'agitation après injection de la phase organique	62
c. Température de l'eau lors de l'injection	63
d. Température de refroidissement après l'agitation	64
e. Concentration lipidique dans le mélange final.....	65
f. Conclusion sur l'optimisation des paramètres opératoires	68
2. Criblage de la formule.....	69
h. Changement de polymère	70
i. Etude du ratio lipide / polymère	72
j. Etude de l'ajout de phosphatidylcholine (PC)	73
k. Changement de lipide	75
l. Conclusion sur le criblage de la formulation	77
3. Suivi de stabilité et efficacité d'encapsulation.....	78
a. Evaluation qualitative de la stabilité	78
b. Evaluation quantitative de l'efficacité d'encapsulation	81
D. Conclusion de l'étude et perspectives	83

Conclusion	85
Annexe	87
Annexe 1 : Graphiques des résultats obtenus pour l'étude de l'influence et l'optimisation des paramètres opératoires.....	87
Annexe 2 : Graphiques des résultats obtenus pour l'étude de l'influence et l'optimisation de la formule 92	
Annexe 3 : Graphiques représentant les résultats obtenus pour l'ajout de la nifédipine dans les formules optimisées.....	95
Bibliographie.....	96

Liste des acronymes

<u>SLN</u>	Nanoparticules lipidiques solides
<u>SA</u>	Substance active
<u>PC</u>	Phosphatidylcholine
<u>AS</u>	Acide stéarique
<u>HPLC</u>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<u>DT</u>	Dispositif médical

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma des différentes couches de la peau [9]	3
Figure 2 : Coupe transversale de l'épiderme [9]	4
Figure 3 : Schéma des différentes voies de pénétration de la peau [24].....	8
Figure 4 : Types de dispositifs transdermiques (DT)	12
Figure 5 : Photographie comparant l'apparence d'une émulsion, d'une microémulsion et d'une nanoémulsion [54]	19
Figure 6 : Schéma d'un liposome [52].	21
Figure 7 : Schéma d'un transf�rosome [52].	22
Figure 8 : Schéma d'un niosome [52]	22
Figure 9 : Schéma d'un �thosome [52].....	23
Figure 10 : Schéma comparant une SLN classique (en haut à gauche) � différents NLC dont le cœur varie selon la composition lipidique : NLC à cristallisation imparfaite (en haut à droite), NLC � cœur solide emprisonnant des nano gouttelettes de lipide liquide (en bas à gauche) et NLC � cœur lipidique sous forme amorphe (en bas à droite) [59]	24
Figure 11 : Schéma des différents modèles d'incorporation de substance active dans les SLN.....	27
Figure 12 : Schéma de l'homog�n�sation à haute pression [70]	30
Figure 13 : Schéma de la technique d'homog�n�sation haute pression à chaud pour la préparation de SLN [72].	31
Figure 14 : Schéma de la technique d'homog�n�sation haute pression à froid pour la préparation de SLN [72].	32
Figure 15 : Schéma de la méthode de préparation des SLN par ultrasonication [76].	33
Figure 16 : Schéma de la méthode de préparation des SLN par microémulsion [76].....	34
Figure 17 : Schéma de la préparation des SLN par la méthode de la double émulsion [76]	35
Figure 18 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES SLN PAR émulsification et évaporation D'UN SOLVANT [76]	36
Figure 19 : Schéma de la préparation des SLN par émulsification et diffusion d'un solvant [76].....	37
Figure 20 : Schéma représentant la préparation de nanoparticules par nanoprécipitation	38
Figure 21 : Schéma représentant la formation de nanoparticules par nanoprécipitation [80].....	39
Figure 22 : schéma d'un procédé de préparation de SLN par expansion rapide d'un fluide supercritique [82].....	40
Figure 23 : Schéma de la technique SAS pour la préparation de SLN [71].....	41
Figure 24 : Schéma représentant la technique de PGSS pour la préparation de nanoparticules lipidiques solides [71].....	42
Figure 25 : Schéma du séchage des dispersions liquides de SLN par la méthode de la nébulisation avec un atomiseur [69].....	45
Figure 26 : Schéma de fonctionnent de diffusion dynamique de la lumière [86].....	46
Figure 27 : Schéma de l'expulsion de la substance active au cours du temps [59].....	51
Figure 28 : Schéma de la classification biopharmaceutique des médicaments [97]	55
Figure 29 : Photo du dispositif utilisé pour la production des SLN	58
Figure 30 : Photo d'un échantillon de SLN formées avec une phase organique concentrée à 100mg.g ⁻¹ (lipide/éthanol).....	66
Figure 31 : Taille et PDIx100 des SLN obtenues en fonction du temps et de la présence de PC dans la formule de référence	74
Figure 32 : Graphique représentant le potentiel Zeta des SLN en fonction du temps et de la présence de PC dans la formule de référence	74

Figure 33 : Photographie prise en microscopie optique à lumière polarisée d'échantillon de formule de SLN et de nifédipine seule	79
Figure 34 : Photographies au cours du temps des différentes formules de SLN contenant de la nifédipine par microscopie optique à lumière polarisée	80
Figure 35 : concentration de nifédipine retrouvée dans le surnageant au cours du temps, analysée par HPLC.	82
Figure 36 : Graphique comparant la taille et le PDI en fonction du temps selon les essais	83

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Différents types de polymères [47]	17
Tableau 2 : Synthèse des différents procédés de préparation de nanoparticules lipidiques solides [73].	43
Tableau 3 : Description des état cristallins des lipides [61]	48
Tableau 4 : Présentation des polymères choisis pour la formulation de SLN	56
Tableau 5 : Paramètres opératoires et formulation de l'expérience de référence	60
Tableau 6 : Liste des paramètres opératoires et les variations appliquées pour étudier leur influence	61
Tableau 7 : Taille, PDI et potentiel Zeta des échantillons en fonction du débit d'injection à T=0h, T=24h et T=72h.....	61
Tableau 8 : Taille, PDI et potentiel zeta des échantillons en fonctiondu temps d'agitation à T=0H, T=24H ET T=96H.	63
Tableau 9 : Taille, PDI et potentiel Zeta des échantillons en fonction de la température de l'eau lors de l'agitation à T=0H, T=24H ET T=96H	64
Tableau 10 : Taille, PDI et potentiel Zeta des échantillons en fonction de la température de refroidissement à T=0H, T=24H ET T=96H.....	65
Tableau 11 : Taille, PDI et potentiel zeta des échantillons en fonction de la concentration lipidiquedans le mélange final à T=0H, T=24H ET T=96H	67
Tableau 12 : Résumé des variations opératoires sélectionnées	68
Tableau 13 : Comparaison entre l'expérience de référence et l'expérience optimisée	68
Tableau 14 : Expérience de référence pour le screening de la formule	69
Tableau 15 : Liste des variations appliquées pour l'étude de la formule.....	70
Tableau 16 : taille, pdi et potentiel zeta des échantillons en fonction du polymère utilisé a t=0h, t=24h, T=48h et t=96h.....	71
Tableau 17 : Taille, PDI et potentiel zeta des échantillons en fonction du ratio entre le lipide et le polymère à T=0H, T=24H, T=48H ET T=168H	72
Tableau 18 : Taille, PDI et potentiel Zeta des échantillons en fonction du couple lipide/polymère à T=0h, T=24h, T=48h et T=96h.....	75
Tableau 19 : Comparaison entre les formules optimisées après screening et la formule de référence avant screening	77

Liste des équations

�quation 1: Loi de diffusion de Fick.....	9
�quation 2: Calculs de l'efficacité d'encapsulation (%).....	49
�quation 3 : Calcul de l'efficacité d'encapsulation (%).....	58
�quation 4 : Calcul expérimental de l'efficacité d'encapsulation (%)	81

Introduction

Les nouvelles substances actives développées de nos jours souffrent très souvent d'une faible biodisponibilité à cause de leur caractère lipophile, de leur haut poids moléculaire mais aussi de leur très faible solubilité dans l'eau. On estime que 40% des substances actives sur le marché et 90% des substances actives en développement sont peu solubles dans l'eau [1].

De plus la biodisponibilité des substances actives est d'avantage réduite lors de l'administration per os car le passage par le tractus gastrointestinal peut dégrader les substances actives (activité enzymatique, interactions avec le contenu de l'estomac) et modifier leur absorption. Ensuite les substances actives subissent les effets de premier passage hépatique et leur biodisponibilité est de nouveau réduite par l'activité enzymatique du foie [2]. Afin d'atteindre la dose minimale effective par voie orale, les substances actives peu solubles avec une faible biodisponibilité sont fortement dosées pour pallier la dégradation par l'estomac et le foie, et administrés de façon répétée. Les forts dosages entraînent parfois le dépassement de la fenêtre thérapeutique et l'apparition d'effets indésirables, de plus la transformation de la substance active en métabolites potentiellement toxique par le foie peut également entraîner l'apparition d'effets indésirables [3].

Parmi les solutions qu'il existe pour améliorer la biodisponibilité des substances actives peu solubles dans l'eau et limiter les effets de premiers passages gastrique et hépatique, on retrouve l'utilisation d'autres voies d'administration telle que la voie transdermique. La voie transdermique permet d'atteindre la circulation générale sans passer par le tractus gastrointestinal et le foie et permet également une administration moins fréquente de la substance active [2].

Une autre solution pour améliorer la biodisponibilité des substances actives peu solubles est l'utilisation de systèmes nano-colloïdaux pour transporter et encapsuler les substances actives. Un système nano-colloïdale se définit comme étant le mélange transparent et stable entre une phase dispersante et une phase dispersée, ici la phase dispersée est présente sous forme de particules ou vésicules nanométriques (entre 1 nm et quelques micromètres) [4]. Ces nanoparticules ou nanovésicules assurent le transport des substances actives : c'est-à-dire qu'elles se lient à la substance active pour l'acheminer jusqu'au site d'action. Les systèmes de transport permettent le passage de la substance active à travers des interfaces impénétrables par la substance active seule (en raison de sa solubilité, sa polarité, son poids moléculaire etc.) [5].

Les systèmes nano-colloïdaux permettent également d'encapsuler les substances actives c'est-à-dire de les recouvrir complètement d'une substance (lipide, polymère, tensioactif) qui servira de barrière physico-chimique entre ces dernières et l'extérieur. L'encapsulation des substances actives permet de prévenir leur dégradation, augmenter leur stabilité face aux agressions extérieures (UV, température, oxygène etc.) et mieux cibler leur relargage car la biodistribution de la substance active ne dépend plus de ces propriétés physico-chimique mais de celles du système dans lequel elle est encapsulée [6].

Ainsi cette thèse a pour sujet les systèmes nano-colloïdaux utilisés par voie transdermique pour l'encapsulation et le transport de substances actives peu solubles ou lipophiles. La voie transdermique sera présentée ainsi que les différents systèmes nano-colloïdaux existants pour encapsuler les substances actives. Une attention particulière sera apportée aux nanoparticules lipidiques solides (*solid lipid nanoparticles, SLN*) comme système nano-colloïdal car la partie expérimentale de cette thèse aura pour objectif de proposer un procédé de fabrication de SLN adapté à la voie transdermique et aux substances actives lipophiles.

Le sujet de cette thèse ainsi que la rédaction de la partie expérimentale ont été rendues possibles grâce aux travaux réalisés pendant le stage de fin d'étude du cycle d'ingénieur généraliste de l'IMT Mines Albi-Carmaux au centre RAPSODEE (Recherche d'Albi en génie des Procédés des Solides Divisés, de l'Energie et de l'Environnement) encadrés par Fabienne Espitalier, Suenia De Paiva Lacerda et Thibault Massias dans le cadre de sa thèse « Génération de solides assistée par CO₂ supercritique pour la délivrance d'un actif pharmaceutique par voie transdermique » sous la direction de Marie-Alexandrine Bolzinger, Jacqueline Resende de Azevedo et de Fabienne Espitalier.

I. Dermatologie et systèmes nano-colloïdaux

A. La peau

1. Définition

La peau est le plus grand organe du corps humain, elle représente environ 15% du poids total du corps humain. Elle enveloppe l'ensemble du corps afin de former une barrière physique contre les agressions extérieures de natures chimiques ou biologiques, mais aussi des radiations ultra-violettes. La peau joue également un rôle dans la thermorégulation, aide au maintien de l'équilibre hydrique au sein du corps et joue un rôle sensoriel (sensible au toucher, à la douleur et à la température) [7] [8].

2. Les différentes couches

La peau est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Ces trois couches sont représentées dans la Figure 1 ci-dessous [9]. L'épaisseur de ces trois couches varie selon leur emplacement sur le corps humain, par exemple l'épaisseur de l'épiderme des paupières est la plus fine de tout le corps humain (environ 0,1 mm) contrairement aux paumes de mains et la plante des pieds (environ 1,5 mm) et le dos possède un derme 30 à 40 fois plus épais que l'épiderme qui le recouvre [7].

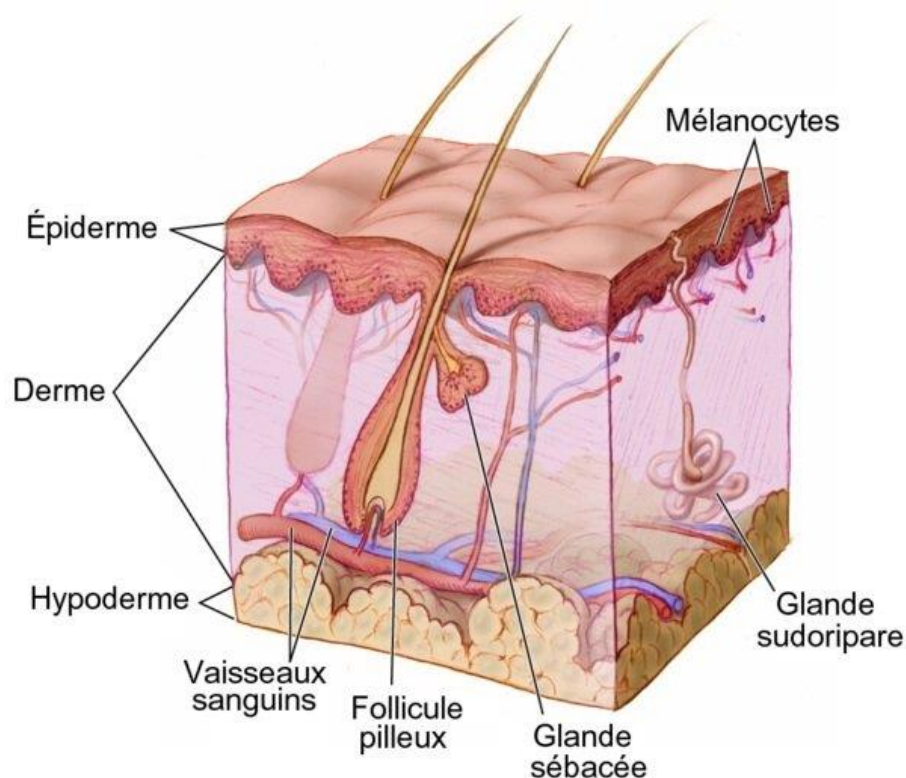


FIGURE 1 : SCHEMA DES DIFFERENTES COUCHES DE LA PEAU [9]

a. L'épiderme

L'épiderme est la couche supérieure de la peau, en contact direct avec l'extérieur, elle n'est pas vascularisée mais comprend des terminaisons nerveuses permettant la sensation tactile. L'épiderme est lui-même composé de quatre sous-couches (schématisées dans la Figure 2 [9]) recouvertes d'un film hydrolipidique. De la plus profonde à la plus superficielle on trouve trois couches de cellules vivantes et une couche de cellules mortes :

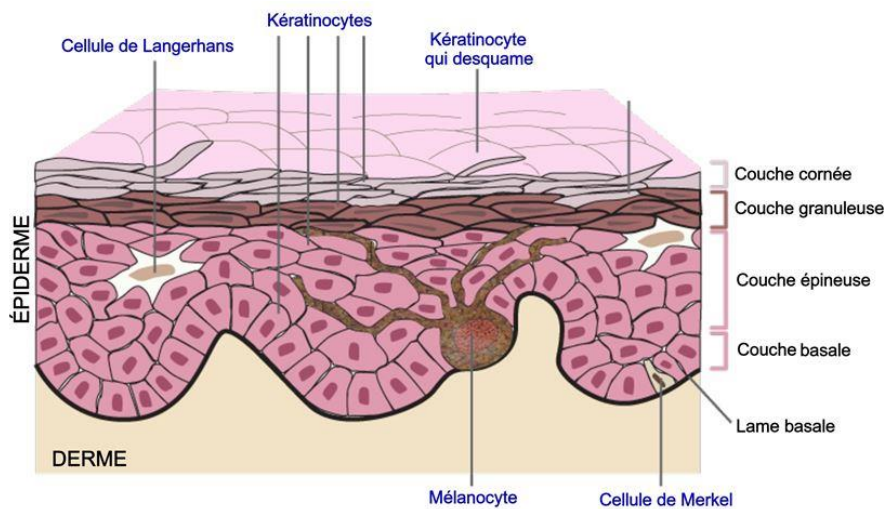


FIGURE 2 : COUPE TRANSVERSALE DE L'EPIDERME [9]

- La couche basale : elle repose sur la lame basale, une membrane qui sépare le derme de l'épiderme. La couche basale est composée de kératinocytes, des cellules qui constituent presque 90% de toutes les couches de l'épiderme et se divisent activement pour assurer le renouvellement de l'épiderme. Elle est également composée de mélanocytes qui répondent aux rayons UVB par une sécrétion de molécules de mélanine pigmentant et protégeant la peau et de cellules de Merkel jouant le rôle de mécanorécepteur (sensible au toucher) pour les terminaisons nerveuses sensorielles présentes dans la peau.
- La couche épineuse : ici les kératinocytes ont des formes variées, polygonales dans les assises inférieures et qui s'aplatissent dans les assises supérieures. Les kératinocytes sont reliés entre eux par des structures appelées desmosomes leur donnant un aspect épineux en microscopie. On trouve également des cellules de Langerhans qui participent à la défense immunologique de la peau, elles sont des cellules présentatrices d'antigènes transportant les antigènes cutanés dans les ganglions lymphatiques.

- La couche granuleuse : c'est la dernière couche de cellules vivantes de l'épiderme, les kératinocytes sont différenciés en cellules contenant des granules de kératohyaline et des granules lamellaires. La kératohyaline est un précurseur de la kératine permettant son agrégation et la formation de la matrice cytoplasmique des cellules de la couche cornée. Les granules lamellaires quant à eux permettent l'apport de glycolipides entre les cellules assurant leur cohésion.
- La couche cornée : la couche la plus superficielle de l'épiderme, elle est composée de kératinocytes morts, qui ont perdu leurs noyaux et organites, appelés cornéocytes. Les cornéocytes sont des cellules plates, dites squameuses, majoritairement composées de kératine (protéine hydrophile) et qui sont organisées telles des briques dans une matrice lipidique rendant la couche cornée pratiquement imperméable à l'eau. Les cellules de la couche cornée sont continuellement éliminées et remplacées par les cellules sous-jacentes, ce phénomène s'appelle la desquamation [10].
- Le film hydrolipidique : les granules lamellaires produits dans la couche granuleuse et qui remontent dans la couche cornée se mélangent en surface avec le sébum (mélange de lipides) produit par les glandes sébacées. Ces lipides se mélangent à l'eau présente en surface de la peau pour former le film hydrolipidique qui recouvre presque toute la peau (à l'exception des zones dépourvues de glandes sébacées comme les paumes des mains et des pieds). Ce film hydrolipidique vient renforcer la barrière déjà formée par la couche cornée car, du fait de sa composition, il empêche la pénétration des molécules hydrophiles et limite l'entrée des molécules lipophiles [11].

b. Le derme

Sous l'épiderme, le derme est un tissu innervé et vascularisé composé principalement de fibroblastes qui synthétisent les fibres de collagènes et d'élastines composant la matrice extra-cellulaire et apportant résistance et élasticité à la peau. Le derme contient les glandes sébacées qui produisent le sébum excrété à la surface de la peau constituant le film hydrolipidique qui protège la peau des agressions extérieures. Il contient également les glandes sudoripares qui permettent la transpiration aidant à la régulation de la température corporelle et les follicules pileux donnant naissance aux poils [10].

c. L'hypoderme

C'est la couche la plus profonde de la peau située entre le derme et le muscle, elle est majoritairement composée d'adipocytes permettant le stockage des graisses [10].

d. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont d'origine ectodermique (elles dérivent du feuillet embryonnaire externe de l'embryon qui forme les couches externes comme la peau, les muqueuses, les dents etc.) et comprennent les glandes sudoripares (apocrines, eccrines et apoecrines), les glandes sébacées, les follicules pileux et les ongles. Les annexes cutanées ont la capacité d'aider au renouvellement de l'épithélium lorsque que celui-ci est altéré, en permettant la migration de kératinocytes depuis les annexes et jusqu'à la surface de l'épiderme [7].

- Glandes sudoripares apocrines : ce sont les plus grandes glandes sudoripares, elles sont majoritairement localisées aux niveaux axillaires et inguinaux, et s'activent en cas de stimuli hormonaux ou émotionnels tel que le stress. Les glandes sudoripares apocrines sont annexées aux follicules pilosébacés et déversent directement leurs sécrétions dans un canal excréteur qui débouche dans le conduit pilosébacé du follicule, au-dessus de la glande sébacée. La sécrétion de ces glandes sudoripares est visqueuse et peu volatile, elle est dégradée par les bactéries en surface de la peau en composés plus petits et volatiles responsables de l'odeur de la sueur [7] [12].
- Glandes sudoripares eccrines : Contrairement aux glandes apocrines, les glandes sudoripares eccrines déversent directement leur sécrétion à la surface de la peau et sont impliquées dans la régulation de la température corporelle. La sueur qu'elles produisent pour rafraîchir le corps répond à des stimuli thermiques, ces glandes sont plus abondantes au niveau de la plante des pieds, moins présentes dans le dos, et ne sont pas annexées aux follicules pilosébacés [7].
- Glandes sudoripares apoecrines : Elles furent découvertes en 1987 par Sato & *al* [13] et leur existence a été confirmée dans des études récentes ([14] [15]) mais d'avantages de recherches sont nécessaire pour comprendre leur développement et leur rôle dans la production de sueur [16]. Ces glandes sont plus petites que les glandes apocrines mais plus grandes que les glandes eccrines, elles déversent leur sécrétion directement à la surface de la peau comme les glandes eccrines mais sont plutôt localisées dans la région axillaire. Ces glandes se développeraient à la puberté à partir de précurseurs de glandes eccrines et produisent de grandes quantités de sueurs jusqu'à dix fois supérieure à la sécrétion des glandes eccrines [17].
- Les glandes sébacées : elles sont présentes sur une grande partie du corps mais en plus grand nombre au niveau du visage et du cuir chevelu. Les glandes sébacées sont arrangées en lobules annexées aux follicules pileux (donnant le follicule pilosébacé), leurs cellules contiennent de nombreuses gouttelettes de lipide appelées sébum. Ce sébum est excrété des glandes sébacées par le canal sébacé qui débouche dans le follicule pileux et mène le sébum à la surface de la peau où il participe au maintien de la barrière hydrolipidique [7].

- Les follicules pileux : ils nous protègent des éléments extérieurs et permettent la bonne répartition des sécrétions provenant des glandes sudoripares apocrines. C'est dans les follicules pileux que naissent les cheveux et les poils, ils sont renouvelés de façon cyclique selon trois phases : la phase anagène (croissance du poil, follicule profond), la phase catagène (la partie profonde du follicule se résorbe) et la phase télogène (le poil est au repos et tombe lorsqu'un nouveau follicule anagène se forme) [18].
- Les ongles : ils protègent l'extrémité des doigts, augmentent les sensations et permettent d'attraper ou de gratter. Les ongles sont composés de deux parties : la partie externe visible qui est composée de kératinocytes et la partie interne, cachée sous la peau, qui contient des vaisseaux sanguins, des nerfs et des mélanocytes. Les ongles poussent d'environ 0,1 mm par jour [7] .

3. Pénétration cutanée

a. Définition

La perméation cutanée, la pénétration cutanée et l'absorption cutanée sont des termes utilisés pour décrire le passage d'une molécule à travers la peau. Dans les années 1980, la distinction entre ces termes est précise et leurs définitions sont les suivantes :

- La perméation cutanée est la pénétration d'une molécule d'une couche à une autre qui possède une structure et une fonction différente de la première couche.
- La pénétration cutanée décrit le passage d'une molécule dans une couche spécifique de la peau.
- L'absorption cutanée est la pénétration d'une molécule à travers la peau et jusqu'à la circulation générale [19].

Néanmoins la distinction entre ces notions n'est plus toujours aussi évidente. Des travaux plus récents portant sur la pénétration cutanée utilisent ces termes comme synonymes ([20], [21]) car dès qu'une molécule traverse la couche cornée, celle-ci pourrait atteindre les parties plus profondes de la peau comme le derme qui est vascularisé. La concentration de la molécule à la surface de la peau, la présence d'autres substances ou encore l'altération physique de la barrière cutanée peuvent modifier la pénétration d'une molécule, il est alors difficile de prévenir le passage d'une partie de la dose de la molécule dans la circulation générale ou dans une couche de la peau différente de la couche cible [22].

En raison de son rôle de barrière physique entre notre organisme et le monde qui nous entoure, la peau est difficilement pénétrée par les éléments extérieurs. Le film hydrolipidique qui recouvre la peau ainsi que la couche cornée hydrophobe forment de concert une barrière contre la plupart des molécules. De plus, les jonctions serrées et les desmosomes présents entre les cellules de l'épiderme compliquent d'avantage la pénétration des molécules de haut poids moléculaire à travers la peau. Le pH en surface de la peau est plutôt acide, entre 4,0 et 6,0 ce qui peut rendre difficile la survie de certains organismes à sa surface [23].

Malgré toutes ces protections, la peau peut être traversée par les molécules et les microorganismes via trois principales voies de pénétration : la voie intercellulaire, la voie transcellulaire et la voie folliculaire schématisées dans la Figure 3 [24].

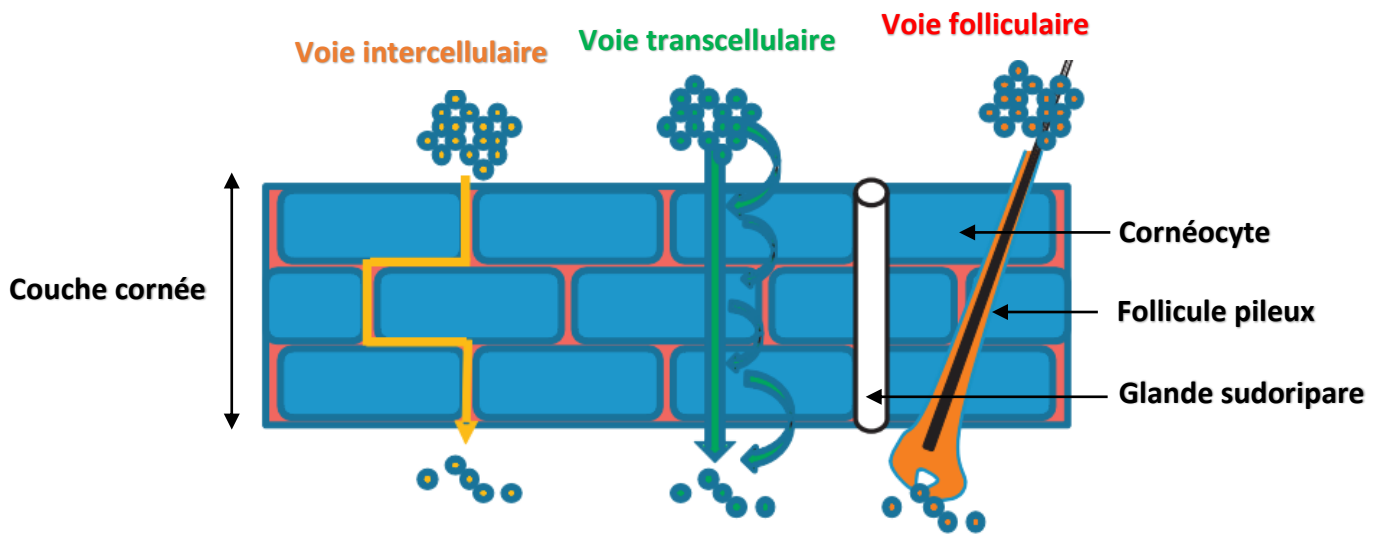


FIGURE 3 : SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES DE PENETRATION DE LA PEAU [24]

b. La voie intercellulaire

C'est la voie de pénétration la plus utilisée par les molécules amphiphiles ou lipophiles car elle consiste à pénétrer la peau entre les cornéocytes, dans la matrice lipidique qui les entoure. C'est un chemin sinueux car les cornéocytes ne sont pas arrangés de façon régulière les uns par rapport aux autres, rendant difficile le passage des molécules de haut poids moléculaire. Seulement les molécules de faible poids moléculaire peuvent diffuser dans cet espace intercellulaire. La surface relative de cette voie est plutôt faible mais la vitesse de diffusion des molécules est élevée en raison de la résistance diffusionnelle faible des espaces intercellulaires [22] [25].

c. La voie transcellulaire

Cette voie consiste à traverser les cornéocytes à la fois par leurs liaisons, les cornéodesmosomes, et au travers de la matrice de kératine. Les cornéodesmosomes sont des tunnels protéiques entourés d'une couche de lipides, ainsi canalisant les molécules de petites tailles, hydrophiles ou amphiphiles. La surface représentée par les cornéocytes et les cornéodesmosomes est grande au sein de la couche cornée mais la vitesse de diffusion par cette voie y est beaucoup plus faible que la voie intercellulaire [22] [25] [19].

d. La voie folliculaire

La voie folliculaire opère moins fréquemment que les précédentes car dans cette voie les molécules pénètrent la peau par les annexes cutanées notamment les follicules pileux ou encore les glandes sudoripares qui ne représentent que 0,1% de la surface totale de la peau. Le passage par les glandes sudoripares est plus difficile que par les follicules pileux car les glandes produisent des sécrétions en direction de l'extérieur ; ainsi les molécules doivent circuler à contre-courant du flux de sueur. Aussi, on retiendra surtout la diffusion des molécules par le follicule pileux, cette voie est utilisée par les molécules de haut poids moléculaire et les systèmes d'encapsulation comme les nanoparticules car elle permet l'entrée de molécules de plus grandes tailles que les voies précédentes. Le passage des molécules par le follicule pileux permet leur diffusion jusqu'au derme [22] [24] [26].

e. Mécanismes d'absorption

L'absorption cutanée se fait par diffusion passive à travers les couches de la peau selon un gradient de concentration, les molécules vont de la zone où elles sont les plus concentrées vers la moins concentrée avec une vitesse de diffusion proportionnelle à la différence de concentration entre les deux zones. Cette diffusion peut être décrite par la loi de diffusion de Fick (équation 1) :

ÉQUATION 1: Loi de diffusion de Fick

$$J = \frac{DC_vK}{h}$$

Cette loi représente le flux de molécules diffusées (J , quantité de molécules absorbées par unité de surface et de temps) en fonction du coefficient de diffusion de la molécule dans la peau (D), de la concentration de la molécule à la surface de la peau (C_v), du coefficient de partage de la molécule entre son vecteur et la membrane à traverser (K) et enfin de l'épaisseur de membrane (h).

Ainsi l'absorption des molécules par la peau est quantitativement importante si le coefficient de diffusion de la molécule est grand, si la molécule est fortement concentrée à la surface de la peau, si l'épaisseur de la peau est faible ou encore si la molécule a une affinité importante pour la couche à traverser (augmentation de K) [27] [28].

4. La voie cutanée et la voie transdermique

a. Définitions

La voie cutanée pour l'administration de substance active signifie que la formulation est appliquée sur la surface de la peau en vue d'une action locale. Pour la voie transdermique c'est le même principe, mais ici l'action voulue est systémique et la substance active diffuse jusqu'à atteindre la circulation générale. Dans les deux cas, la substance active ainsi appliquée diffuse à travers les différentes couches de la peau jusqu'au site d'action, la vitesse de diffusion de la substance active peut être modulée grâce à la formulation dans laquelle elle est introduite.

b. Formes galéniques

Il existe plusieurs formes galéniques possibles pour la voie cutanée et la voie transdermique, des formulations liquides, solides et semi-solides. Les formules comme les gels et les crèmes sont préférées pour la voie cutanée car dans ces formes galéniques la biodisponibilité de la substance active est faible (1 à 3%) contrairement aux dispositifs transdermiques (DT) dont les substances actives ont une biodisponibilité comprise entre 30 et 70% et qui sont utilisés majoritairement pour la voie transdermique.

Le choix de la forme galénique prend en compte l'état de la peau, pour le visage on pourra choisir entre :

- Gel : pour les peaux normales à grasses.
- Lotion : pour les peaux normales à sèches.
- Crème : pour les peaux sèches.

Les lésions de la peau influencent aussi le type de forme galénique : on préférera les formes à base d'eau (gels, crèmes) pour les lésions humides et suintantes , et les formes grasses (pommades et pâtes) pour les blessures sèches et squameuses [29].

Les formulations liquides

Les formulations liquides monophasées sont composées d'eau parfois additionné d'autres solvants. Ces formulations sont surtout utilisées pour les solutions désinfectantes (exemple : solution de chlorhexidine) car elles agissent principalement sur la surface de la peau. Le temps de séjour des formulations liquides sur la peau est court en raison de l'évaporation rapide des solvants (souvent un l'alcool comme l'éthanol) et de la très faible viscosité de la formule, ce temps de séjour faible rend difficile le transport des substances actives dans les couches profondes de la peau.

Les formulations liquides polyphasées peuvent contenir une faible quantité d'huile ou de poudre dispersée dans la phase aqueuse. Ainsi, lors de l'évaporation de celle-ci, la poudre ou huile reste en surface et augmente le temps de séjour de la substance active [29].

Les formulations semi-solides

Ce sont les formulations les plus utilisées pour la voie topique, les principales étant les gels, les crèmes et les pommades.

- Les gels : composés d'une phase aqueuse ou alcoolique, épaissie par des excipients et pouvant contenir une substance active dissoute (gel monophasé) ou dispersée (gel polyphasé) ou encore intégrée dans un vecteur de transport (nanoencapsulation, micelles) dispersé dans le gel.
- Les crèmes : ce sont des émulsions entre une phase aqueuse et une phase lipidique (émulsion eau-dans-huile ou huile-dans-eau). Les crèmes sont moins grasses que les pommades, et souvent mieux acceptées par le patient, mais elles sont moins occlusives que ces dernières. La substance active peut être dissoute dans une des phases, dispersée ou encore intégrée dans un vecteur de transport (nanoencapsulation, micelles) dispersé dans la crème.
- Les pommades : composées uniquement ou en grande partie de corps gras, les pommades riches en hydrocarbures aliphatiques sont très occlusives (préviennent la perte d'eau et la déshydratation de l'épiderme) et restent longtemps sur la peau. Ainsi, elles prolongent le temps de séjour de la substance active et son transport dans les couches de la peau. Mais souvent trop grasses et difficiles à utiliser, les pommades sont peu appréciées des patients.
- Les pâtes : ce sont des formulations semi-solides contenant une grande quantité de poudre (supérieure à 50% de la formule totale) en suspension dans des corps gras (pâte grasse, ex : pâte à l'oxyde de zinc) ou dans une phase aqueuse (pâte à l'eau, ex : dentifrice). Elles sont occlusives et moins grasses que les pommades [29] [30].

Les formulations solides

- Les poudres : surtout utilisées pour une action en surface de la peau (antiseptique, réduction de friction, absorption des exsudats) car elles diminuent l'hydratation de la couche cornée et donc le passage de la substance active. On peut les retrouver sous forme de sprays : ils déposent une couche de poudre en surface de la peau grâce à un solvant volatil dans lequel la substance active est dissoute.
- Les dispositifs transdermiques (DT) : ce sont des solides composés d'une partie qui adhère à la peau, ils contiennent une dose de substance active dispersée dans un support qui contrôle sa libération. Les patchs peuvent avoir une action locale (anesthésie locale, traitement de la douleur aiguë ou éruption cutanée) mais sont surtout utilisés pour la voie transdermique en vue d'une action systémique. Les patchs transdermiques sont détaillés ci-dessous [29].

Les dispositifs transdermiques

Les dispositifs transdermiques (DT) sont une bonne alternative à la voie orale pour certaines substances actives car ils permettent d'éviter les variations de pH lors du passage gastrique et permettent d'atteindre la circulation générale sans passer par le foie (évitant ainsi les effets de premier passage hépatique). De plus, les DT sont faciles d'utilisation et améliorent l'observance du patient.

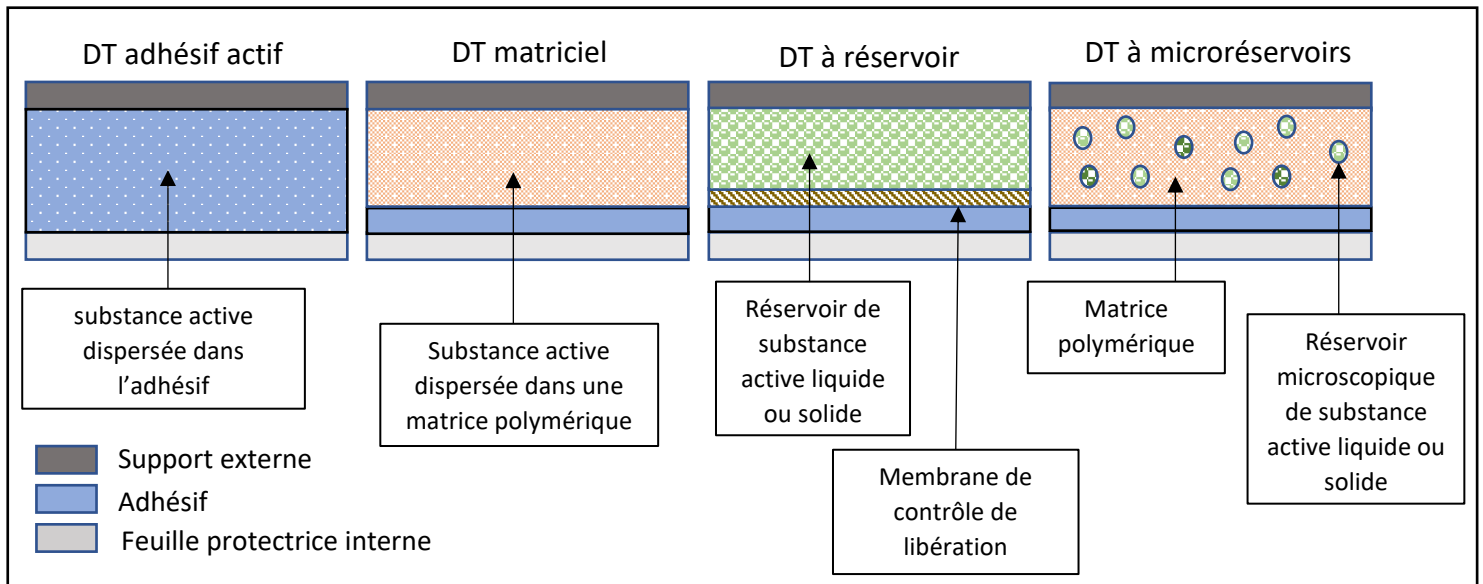


FIGURE 4 : TYPES DE DISPOSITIFS TRANSDERMQUES (DT)

Plusieurs types de DT existent et sont décrits dans la Figure 4, un DT est composé des éléments suivants :

- Une feuille protectrice interne : c'est une protection occlusive en aluminium ou polymère qui recouvre la partie adhésive du DT. Elle doit être retirée pour appliquer le DT sur la peau ; pour cette raison la feuille doit être à la fois facile à séparer du DT mais également s'accrocher suffisamment à celui-ci pour éviter les retraits accidentels.
- Un adhésif : il est un point essentiel du DT, l'adhésif doit tenir aussi longtemps que la durée de vie du DT, il doit être non-irritant et doit pouvoir être retiré sans douleur et sans résidu d'adhésif. On utilise des adhésifs sensibles à la pression (PSA) dans la fabrication des patchs car aucun solvant, eau ou chaleur n'est nécessaire pour activer leur pouvoir adhésif. Ces adhésifs se lient à une surface en fonction de la pression que l'on applique dessus. Certaines substances actives peuvent être directement intégrées dans l'adhésif, c'est le cas des DT à adhésif actif.

- Une matrice ou réservoir : c'est dans cette partie du DT que l'on trouve la substance active. Celle-ci peut être dispersée dans une matrice polymérique, c'est le cas des DT matriciels, dont la viscosité peut être modifiée en fonction de la quantité de polymères incorporés. Il est possible de créer des DT matriciels multicouches où la substance active est dispersée dans des matrices de viscosité différente modifiant ainsi sa libération (la vitesse de libération de la substance active étant dépendante de la viscosité et du maillage de la matrice). La substance active peut également être dissoute ou dispersée dans un réservoir liquide ou visqueux (souvent composé de silicone) qui permet sa libération sans entrave : ce sont les DT à réservoir. Pour contrôler la libération des substances actives contenues dans ces DT il faut ajouter une membrane de libération entre le réservoir et l'adhésif. Ces DT à réservoir, contrairement aux DT matriciels, ne peuvent être coupés sans être altérés. Enfin, il existe des DT à microréservoirs, ce sont des DT dans lesquels des microgouttelettes de réservoirs (contenant la substance active dissoute ou dispersée) sont réparties dans une matrice polymérique. Ces DT n'ont pas besoin de membrane de contrôle de libération.
- Une membrane de contrôle de la libération : elle peut être semi-perméable ou microporeuse, la membrane est utilisée dans les DT à réservoir pour contrôler la libération de la substance active. Elle est composée de polymères et se situe entre l'adhésif et le réservoir.
- Un support externe : c'est une surface occlusive ou respirante qui protège le DT de l'extérieur, elle doit être suffisamment souple pour permettre au DT de bouger avec la peau [29] [30] [31].

c. Stratégies d'amélioration de la pénétration cutanée

La voie cutanée et la voie transdermique présentent des avantages face aux autres voies d'administration des substances actives tels que : une meilleure observance des patients, pas d'effet de premier passage hépatique ou gastrique, administration possible même chez le patient inconscient (contrairement à la voie orale), pas d'effets indésirables gastriques. Mais les voies cutanée et transdermique sont dépendantes de différents paramètres qui peuvent modifier la biodisponibilité des substances actives : hydratation de la couche cornée, taille des molécules de substance active, leur caractère lipophile/hydrophile et leur solubilité ; tous ces critères influencent la perméation de la peau et la pénétration des substances actives modifiant ainsi leur biodisponibilité [32]. De plus il existe un effet de premier passage cutané qui diminue la biodisponibilité des substances actives comme par exemple la nitroglycérine dont environ 20% de la dose administrée par voie transdermique est métabolisée lors du passage cutané [33].

Il existe, en plus de la formulation, des techniques ou des composants pour améliorer la pénétration des substances actives dans la peau et pallier les inconvénients de cette voie.

Ces stratégies de promotion de la pénétration cutanée peuvent être regroupées en cinq catégories : les stratégies qui optimisent les propriétés des substances actives et leurs formulations, celles qui modifient la couche cornée, les stratégies qui contournent ou retirent la couche cornée, les méthodes électriques et enfin les vésicules et particules de transport [34].

Optimisation des propriétés de la substance active et sa formulation

Cette méthode vise à améliorer les propriétés des substances actives et de leurs véhicules pour augmenter leur pénétration cutanée.

Pour cela on peut augmenter la solubilité, le coefficient de partage et le transport de la substance active à travers la couche cornée en utilisant un précurseur plus soluble dans la couche cornée ou avec un meilleur coefficient de partage comme certaines prodrogues qui seront plus lipophiles ou moins polaires. En effet si la substance active ne peut pas traverser correctement la couche cornée alors toute la substance active ne pourra pas se solubiliser dans la partie aqueuse de l'épiderme, sous la couche cornée. Les prodrogues passeront plus facilement la couche cornée et seront ensuite hydrolysées par les estérases de l'épiderme viable pour donner la substance active optimisant ainsi sa solubilité dans la partie aqueuse de l'épiderme [35].

La solubilité peut aussi être augmentée en diminuant le point de fusion du système dans lequel est contenu la substance active car la solubilité d'un soluté est meilleure dans un solvant donné (les lipides de la peau y compris) lorsque le point de fusion est faible. Le point de fusion d'un mélange peut être diminué lorsqu'on forme un système eutectique : mélange de composés à des ratios empêchant leurs cristallisations respectives, le mélange se comporte alors comme un corps pur du point de vue de la fusion (le mélange fond uniformément à température constante) et ainsi le point de fusion du mélange est plus faible que le point de fusion de chaque composé. On peut ainsi abaisser le point de fusion de la substance active afin que celui-ci soit proche de la température de la peau pour augmenter sa solubilité (exemple : la crème anesthésiante EMLA® est un mélange eutectique entre de la lidocaïne et de la prilocaïne) [35].

Enfin, la substance active pénètre mieux la peau lorsque son activité thermodynamique est forte, cette relation entre flux de substance active et activité thermodynamique fût démontrée par Twist et Zatz en 1988 [36]. L'activité thermodynamique maximale d'une substance est atteinte lorsque celle-ci se trouve en super-saturation dans son véhicule ou son solvant, ainsi des systèmes de transport ou des solutions super-saturées en substance active sont utilisés dans les formulations pour augmenter la pénétration cutanée de la substance active [37]. Une solution super-saturée en une substance active signifie qu'elle contient une plus grande quantité de substance active qu'elle ne peut en dissoudre normalement, on obtient ces solutions en évaporant une partie du solvant ou en mélangeant avec un co-solvant. Les solutions super-saturées sont instables thermodynamiquement et la substance active risque de précipiter, on utilise alors des polymères qui empêchent la formation de cristaux et stabilisent la solution pendant quelques heures [38].

Modification de la couche cornée

Modifier les propriétés de la couche cornée peut améliorer la pénétration cutanée de la substance active. Il y a deux stratégies qui visent à modifier la couche cornée.

La première stratégie consiste à augmenter l'hydratation de la couche cornée pour faciliter la pénétration de la substance active qu'elle soit hydrophile ou lipophile, pour cela on utilise des matériaux occlusifs et des corps gras dans les formulations topiques et transdermiques pour limiter les pertes d'eau trans-épidermiques. On peut également augmenter l'apport d'eau dans la couche cornée en ajoutant des humectants aux formulations.

La deuxième stratégie modifiant la couche cornée est l'utilisation de promoteurs chimiques de pénétration cutanée. Ces promoteurs chimiques fonctionnent selon un ou plusieurs de ces trois mécanismes :

- Altération des lipides constituant la couche cornée.
- Interaction avec les protéines intercellulaires.
- Amélioration du coefficient de partage de la substance active ou du solvant dans la couche cornée.

Tous les composés chimiques ne peuvent pas être des promoteurs de la pénétration cutanée, ils doivent respecter certains critères. Les promoteurs chimiques doivent être pharmacologiquement inertes, non-toxiques, non-allergiques, non-irritants, avoir une action rapide et réversible sur la couche cornée et être compatibles physiquement et chimiquement avec la substance active et la formulation. Parmi les composés chimiques utilisés comme promoteurs de la pénétration cutanée on retrouve, entre autres, les tensioactifs, les sulfoxydes, l'azone, les pyrrolidones, l'urée, les alcools, les terpènes et huiles essentielles et les acides gras [34] [39].

Les avantages des promoteurs chimiques de la pénétration cutanée sont leur faible coût et leur incorporation simple dans les formes galéniques (pas d'instrumentation supplémentaire nécessaire) [40]. Néanmoins, avec ces composés chimiques, il est souvent difficile d'allier efficacité et tolérance car en altérant la couche cornée ces composés chimiques peuvent également altérer les cellules viables sous la couche cornée et ainsi avoir une potentielle toxicité ou avoir un pouvoir irritant, c'est le cas par exemple du DMSO (diméthylsulfoxyde) qui peut se montrer irritant utiliser à des fortes concentrations [41].

Contournement ou retrait de la couche cornée

La couche cornée étant difficile à pénétrer en raison de sa structure très ordonnée et de son film hydrolipidique, certaines méthodes d'amélioration de la pénétration cutanée cherchent à la contourner voir la retirer pour faciliter la pénétration des substances actives.

Pour contourner la couche cornée il est possible d'utiliser des microaiguilles qui sont recouvertes ou remplies d'une solution de substance active (si ce sont des aiguilles pleines ou creuses, respectivement). Ces microaiguilles, d'une longueur de 10 à 200 μm , viennent uniquement percer la couche cornée et permettent à la substance active de directement pénétrer sous celle-ci [34] [39].

Promouvoir l'utilisation de la voie transfolliculaire pour la pénétration des substances actives dans la peau est aussi une méthode pour contourner la couche cornée car les follicules pileux s'enfoncent dans le derme. Comme décrit précédemment, la voie folliculaire est surtout une voie d'entrée pour les molécules de haut poids moléculaire mais il existe des stratégies pour promouvoir le passage des substances actives via cette voie. Il est possible d'utiliser des solvants organiques volatiles pouvant dissoudre le sébum ou des systèmes d'émulsions miscibles avec ce dernier pour solubiliser la substance active et l'acheminer dans le follicule pilo-sébacé en évitant ainsi le flux de sébum qui limite l'entrée de la substance active dans le follicule [42]. Néanmoins la promotion de la voie folliculaire reste limitée par la faible surface que représente les follicules sur la surface de la peau (environ 0,1% de la surface totale de la peau) [41].

Enfin il est possible de retirer la couche cornée ou diminuer son épaisseur pour faciliter l'entrée des substances actives. Pour cela il existe la méthode du « tape-stripping » qui consiste à coller une bande adhésive à la peau et à la retirer plusieurs fois pour enlever les couches supérieures de la couche cornée. Cette méthode a été utilisée notamment en 2003 par Tsai & al. [43] sur de la peau de souris, il a ainsi été démontré que du propylène glycol (PEG) de plus haut poids moléculaire pouvait pénétrer la peau une fois la couche cornée retirée par « tape-stripping » que lorsque celle-ci était intacte : la pénétration du PEG est facilitée jusqu'à un poids moléculaire de 986 Dalton (Da) après « tape-stripping » contre 414 Da pour la peau intacte. Néanmoins cette méthode est contraignante et sa reproductibilité est mauvaise, il est peu probable qu'elle soit un jour utilisée en clinique [44]. Des techniques plus avancées existent comme la micro-dermabrasion qui est également utilisée pour retirer la couche cornée, elle consiste à projeter des particules d'oxyde d'aluminium sur la peau pour ainsi la couper et créer des micro-conduits pour la pénétration de la substance active [34] [39].

Vésicules et particules de transport

Les vésicules et particules de transport visent à encapsuler la substance active pour la protéger et faciliter son entrée dans la peau, elles sont incorporées dans différentes formulations comme les crèmes, les gels mais aussi les patchs. Les vésicules et particules sont de taille micro ou nanométrique pour favoriser le passage dans la peau notamment via les follicules pileux et peuvent être composées de différentes molécules. On retrouve notamment parmi les vésicules et particules de transport les nanotubes de carbone qui sont des structures tubulaires nanométriques creuses composées de graphite et qui peuvent contenir un grand volume de substance active à transporter. Les nanotubes de carbone n'entrent pas dans l'organisme, ils ont pour but d'être appliqués sur la peau grâce à des dispositifs transdermiques et de permettre à la substance active de traverser la couche cornée [45]. Les nanotubes de carbone se sont montrés efficaces dans les dispositifs transdermiques délivrant de la nicotine [46], mais causent des irritations de la peau [45].

Les nanoparticules polymériques sont un autre type de particule de transport, elles sont composées de polymères : un polymère est une macromolécule composée d'une répétition d'un même motif appelé monomère, liés entre eux par des liaisons covalentes. On retrouve des nanoparticules polymériques composées de polymères naturels, synthétiques biodégradables et synthétiques non-biodégradables [47]. Des exemples de nanoparticules polymériques appartenant à chaque catégorie de polymère sont décrits dans le Tableau 1 [47] :

TABLEAU 1 : DIFFERENTS TYPES DE POLYMERES [47]

	Types de polymères utilisés pour des nanoparticules	Polymère
Polymères naturels	Polysaccharidiques	Cellulose, amidon, agarose, alginate, chitosan
	Polymères à base de protéine	Collagène, albumine, gélatine
Polymère synthétiques biodégradables	Polyesters	Acide polylactique, acide polyglycolique
	Polyamides	Poly(imino-carbonates)
	Polymères à base de phosphore	Polyphosphates, polyphosphonates
Polymères synthétiques non-biodégradables	Polymères dérivés de cellulose	Carboxyméthylcellulose, éthylcellulose, acétate de cellulose
	Polymères de silicone	Silice colloïdale, Polydiméthylsiloxane, Polyméthacrylate
	Autres polymères	Polyvinyle pyrrolidone, poloxamers, éthyle vinyle acétate

Les polymères naturels ont une bonne biocompatibilité et sont non-toxiques sur de grandes plages de concentration mais leurs propriétés comme le contrôle de la libération du principe actif sont moins bonnes que celles des polymères synthétiques. Les polymères synthétiques quant à eux, ont une biocompatibilité moins bonne que les polymères naturels. La capacité du polymère (naturel ou synthétique) à être biodégradable est un avantage car cela augmente la biodisponibilité de la substance active. Elle permet une libération plus ciblée et une concentration plasmatique constante mais affecte la stabilité des nanoparticules. Elle entraîne notamment une libération incomplète de la substance active [47]. Aussi le choix du polymère utilisé dans la formation de nanoparticules polymériques est important car selon sa nature ses propriétés et sa biocompatibilité peuvent varier.

Les derniers grands types de vésicule et particule de transport sont les vésicules composées en partie ou exclusivement de lipides ou phospholipides. Leur avantage comparé aux autres vésicules est qu'il existe un très grand nombre de lipides et molécules lipidiques pouvant être utilisés pour la fabrication de vésicules et particules de transport lipidiques. Les structures et les propriétés de ces vésicules peuvent être modulées en fonction des lipides utilisés parmi le grand choix disponible permettant ainsi la formation de vésicules et particules variées : des particules solides (nanoparticules lipidiques solides), des vésicules lipidiques au cœur aqueux permettant l'encapsulation de principes actifs lipophiles, hydrophiles et amphiphiles (liposomes et dérivés) etc. [48]. Les vésicules et particules lipidiques possèdent également une très bonne biocompatibilité et sont très peu toxiques ou irritantes. Par exemple Müller & al en 1996 [49] ont étudié la cytotoxicité de particules de polymères (polyesters : poly-acide lactique et poly-acide lactique-co-glycolique) et de nanoparticules lipidiques solides contenant de la magnétite. Cette étude in vitro a démontré que les nanoparticules lipidiques solides étaient dix fois moins toxiques pour les cellules que les particules polymériques [49] [50]. De plus, les particules lipidiques sont dégradées par les lipases présentes dans le sang et assurent ainsi la libération complète de la substance active qui peut néanmoins être modulée grâce aux propriétés des lipides et autres excipients [50].

Pour toutes ces raisons, les vésicules et particules lipidiques sont les systèmes de transport et d'encapsulation les plus prometteurs pour les principes actifs peu solubles. Aussi les vésicules et particules lipidiques de transport les plus étudiées seront détaillées dans la partie suivante du document [39].

B. Les systèmes lipidiques de transport nano-colloïdaux

1. Définition

Les vésicules et particules de transport sont des systèmes colloïdaux avec des particules ou vésicules, contenant la substance active, d'une taille de quelques dizaines de nanomètres allant jusqu'à un millimètre. Le système est dit colloïdal quand une substance est en suspension dans une autre, sous forme de particules suffisamment petites (entre 1 nanomètre et quelques micromètres) pour former un mélange homogène au microscope optique. Par exemple le lait est une suspension colloïdale : on retrouve une phase aqueuse dans laquelle les microparticules de lipides sont en suspension, mais à l'œil nu et au microscope optique le lait semble homogène. Le système colloïdal est cinétiquement stable contrairement aux émulsions classiques [51]. On parle de systèmes nano-colloïdaux quand les particules ont une taille inférieure à 500 nm. Ce sont les systèmes colloïdaux les plus utilisés dans l'encapsulation des substances actives et seront décrits ci-dessous. Ces systèmes de transport permettent de modifier les propriétés physico-chimiques des substances actives et d'améliorer leur passage à travers la peau, ils peuvent :

- Contrôler la libération de la substance active.
- Augmenter le temps de contact avec la peau.
- Assurer une protection physique et chimique de la substance active [52].

Les avantages des systèmes de transport nano-colloïdaux résident dans leur petite taille obtenue notamment grâce à leur haute énergie de surface, leur forme, leur composition et les molécules qui les entourent [53].

2. Les principaux systèmes lipidiques nano-colloïdaux

a. Les microémulsions

Ce sont des émulsions thermodynamiquement stables, composées d'eau, d'huile (liquide organique apolaire) et d'une grande quantité de tensioactif, avec des globules d'une taille allant de 1 à 100 nm. Les microémulsions sont transparentes avec une faible viscosité. (Figure 5) [54].

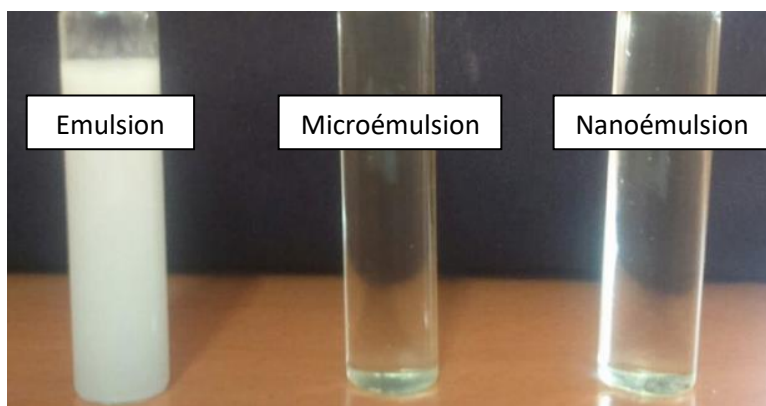


FIGURE 5 : PHOTOGRAPHIE COMPARANT L'APPARENCE D'UNE EMULSION, D'UNE MICROEMULSION ET D'UNE NANOEMULSION [54]

Les microémulsions augmentent la solubilité des substances actives hydrophiles. Elles peuvent altérer la structure lipidique de la peau (pour améliorer la pénétration cutanée) et améliorer la stabilité de la substance active dans la formule [53] [55]. La structure d'une microémulsion

est celle d'une dispersion de domaines d'eau et d'huile séparés par une couche de tensioactif. On distingue trois types de structures pour les microémulsions : les microémulsions huile-dans-eau (globules d'huiles dispersés dans l'eau), eau-dans-huile (globules d'eau dispersés dans l'huile) et les microémulsions bicontinues lorsque l'on retrouve l'eau et l'huiles non pas sous formes de globules mais sous forme de domaines continus et interconnectés en une structure désordonnée et fluctuant rapidement [56]. Les microémulsions sont faciles à préparer mais leur coût peut vite augmenter avec la quantité de tensioactifs onéreux. De plus une grande quantité de tensioactif peut entraîner des irritations de la peau et des muqueuses [54].

b. Les nanoémulsions

Ce sont des émulsions transparentes (voir Figure 5) avec des particules de taille comprise entre 20 et 200 nm, thermodynamiquement instables contrairement aux microémulsions et ainsi énergivore à la production. Cependant les nanoémulsions peuvent rester dans un état métastable sur une longue période grâce à leur petite taille et à l'usage de tensioactifs. Néanmoins les tensioactifs sont utilisés en moins grande quantité que dans les microémulsions (environ 20% du poids totale dans les microémulsions contre 3 à 10% dans les nanoémulsions [54]). De ce fait les nanoémulsions sont moins irritantes que les microémulsions. Les nanoémulsions ont de nombreux avantages :

- elles permettent de formuler des substances actives hydrophiles mais aussi hydrophobes.
- elles apportent de l'hydratation à la peau.
- elles améliorent la pénétration cutanée.
- elles encapsulent de grande quantité de substance active.

La caféine, l'aspirine ou l'insuline sont des substances actives utilisées dans des nanoémulsions pour la voie transdermique [53] [55]. Mais les nanoémulsions souffrent de problèmes de stabilité lors du stockage avec par exemple des changements de couleur, d'odeur et de consistance qui peuvent être désagréable pour l'utilisateur [57]. De plus leur coût de production est élevé [54].

c. Les liposomes

Ce sont des systèmes vésiculaires constitués d'une bicouche phospholipidique permettant d'emprisonner dans leur cœur une phase aqueuse. Un liposome est schématisé dans la Figure 6 [52].

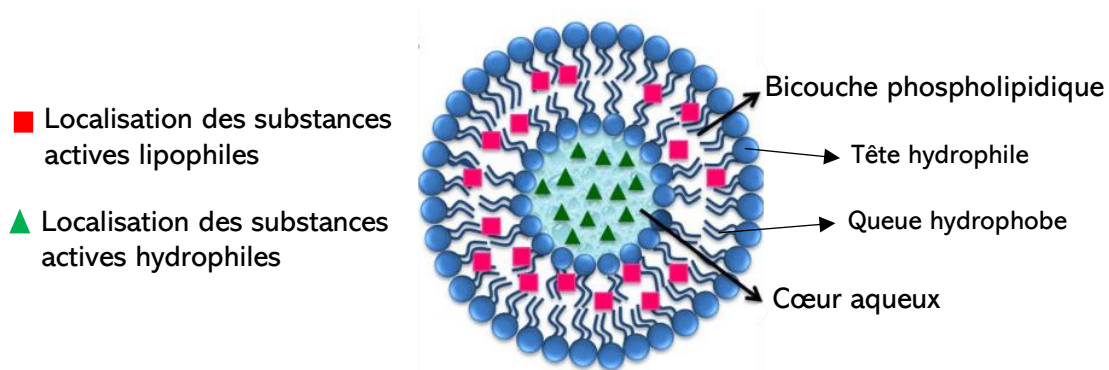


FIGURE 6 : SCHEMA D'UN LIPOSOME [52].

Les liposomes ont été les premières vésicules lipidiques utilisées par voie cutanée, elles peuvent incorporer une grande variété de substances actives. Les substances actives lipophiles seront plutôt incorporées dans la bicouche lipidique alors que les substances actives hydrophiles seront incorporées dans le cœur du liposome. Les liposomes représentent un système de transport non-toxique et biocompatible avec la peau (en raison de sa composition en phospholipides). Ils permettent d'obtenir des hautes concentrations locales en substances actives sur la peau ce qui permet d'augmenter la diffusion de la substance active.

Néanmoins leurs mécanismes de pénétration de la peau ne sont pas encore totalement élucidés. Ils sont préférés pour la voie topique car leur configuration ne semble pas leur permettre d'atteindre les couches profondes de la peau. Le liposome pourrait pénétrer les couches superficielles de la couche cornée mais la rigidité du liposome semble entraîner la dislocation de la bicouche lipidique et l'écoulement de la substance active. Aussi, des liposomes plus flexibles (composition de la bicouche lipidique différente) seront utilisés pour la voie transdermique. En exemple de produits pharmaceutiques qui contiennent des liposomes on peut citer la crème topique antifongique Pevaryl® qui est composée de liposomes d'éconazole ou encore la crème solaire Actinica® (dispositif médical) qui prévient des cancers non-mélanome chez les personnes à risques [53] [55].

d. Les transférosomes

Les transférosomes sont des liposomes déformables capables de traverser des pores plus petits que leur propre taille, ils sont illustrés dans la Figure 7 [52]. Ce sont des vésicules métastables très hydrophiles, la flexibilité de la membrane est apportée par l'ajout d'un ou plusieurs tensioactifs dans la bicouche phospholipidique tel que le sodium cholate, les esters de sorbitane ou encore les polysorbates. Grâce à cette capacité à se déformer, les transférosomes pénètrent plus profondément dans la peau jusqu'à atteindre le derme. Les transférosomes sont utilisés avec succès dans la voie transdermique contrairement aux liposomes dont ils s'inspirent [53] [55].

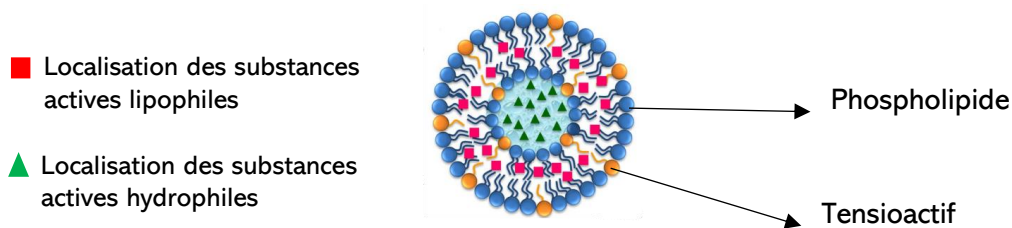


FIGURE 7 : SCHEMA D'UN TRANSFEROSOME [52].

e. Les niosomes

Les niosomes sont des vésicules composées uniquement de tensioactifs non-ioniques comme les esters de sorbitanes (exemple : les Spans[®]) et polysorbates (exemple : les Tweens[®]), ils sont schématisés dans la Figure 8 [52].

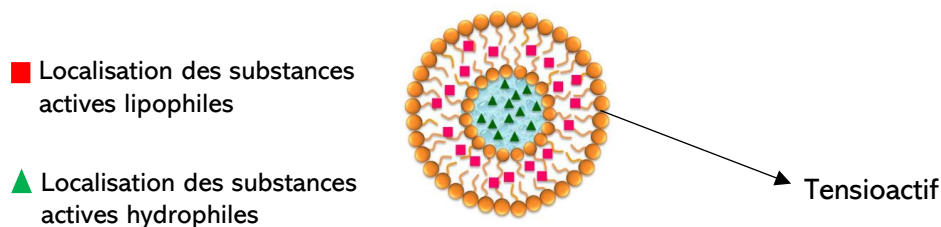


FIGURE 8 : SCHEMA D'UN NIOSOME [52]

Les niosomes peuvent encapsuler les substances actives hydrophiles et hydrophobes, ils ont la capacité d'augmenter le temps de résidence de la substance active dans la couche cornée et l'épiderme. Les niosomes ont été étudiés en tant qu'alternative aux liposomes en raison de leur moindre coût de production et de la grande variété de tensioactifs actifs disponibles [53] [55].

f. Les éthosomes

Les éthosomes sont des vésicules composées d'une bicouche phospholipidique avec un cœur aqueux et une grande concentration d'éthanol (20 à 45%), un éthosome est schématisé dans la Figure 9 [52].

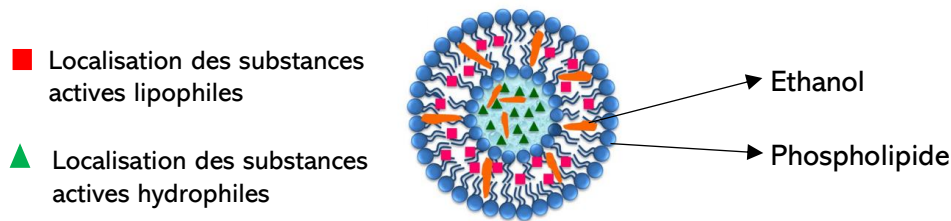


FIGURE 9 : SCHEMA D'UN ETHOSOME [52]

La quantité d'éthanol apportée dans les éthosomes permet d'obtenir des vésicules plus petites et plus flexibles que les liposomes. De plus, la présence d'éthanol semble augmenter la pénétration de la substance active dans les couches plus profondes de la peau faisant de l'éthosome un bon système de transport nano-colloïdal pour la voie transdermique. Les éthosomes présentent également une grande capacité d'encapsulation car l'éthanol permet de solubiliser de nombreuses substances actives notamment les substances actives lipophiles. Par exemple, le tacrolimus, le kétoprofène, la testostérone et le clotrimazole sont encapsulés dans des éthosomes et utilisés par voie transdermique [53] [55]. Ses capacités à atteindre les couches profondes de la peau et à encapsuler une grande quantité de substance active confèrent aux éthosomes un avantage face aux premières vésicules lipidiques développées : les liposomes.

g. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les nanoparticules lipidiques solides, appelées solid lipid nanoparticles (SLN) en anglais, sont composées d'un cœur lipidique solide à température ambiante entouré d'une couche de tensioactif, de phospholipide ou de polymère, le tout le plus souvent dispersé dans une phase aqueuse. Les SLN permettent d'encapsuler les substances actives lipophiles qui vont se disperser dans la matrice de lipide solide. L'avantage des SLN est que le cœur de lipide solide protège très bien les substances actives contre les agressions extérieures. C'est le cas du rétinol (substance active majoritairement utilisée en dermocosmétique) que l'on retrouve souvent encapsulé dans des SLN en raison de sa sensibilité à la lumière et à l'oxygène [53] [58].

Les nanoparticules lipidiques solides seront détaillées dans la suite du document car la deuxième partie de cette thèse est dédiée au développement d'une méthode de préparation et de caractérisation de SLN. Aussi, leurs compositions, méthodes de fabrications ainsi que leurs avantages et inconvénients seront revus plus en détails dans la suite du document.

h. Les transporteurs de lipides nanostructurés (NLC)

Les transporteurs de lipides nanostructurés, appelés nanostructured lipid carriers (NLC) en anglais, sont des nanoparticules assez similaires aux SLN mais ici le cœur de la nanoparticule est composé d'un mélange entre des lipides solides et des lipides liquides à température ambiante. En mélangeant des lipides de nature différente, le cœur des NLC se retrouve moins organisé que le cœur solide et cristallisé des SLN, les lipides des NLC peuvent cristalliser de façon imparfaite, se retrouver sous forme amorphe ou encore présenter un cœur solide avec des nano gouttelettes de lipide liquide (schématisé dans la Figure 10 [59]). Les nanostructures ainsi formées dans la matrice lipidique permettent d'encapsuler plus de substance active que dans les SLN dont la matrice est trop structurée pour incorporer une grande quantité de substance active. De plus en raison de cette structure imparfaite, moins de substance active est expulsée à l'extérieur de la nanoparticule contrairement aux SLN [53] [58].

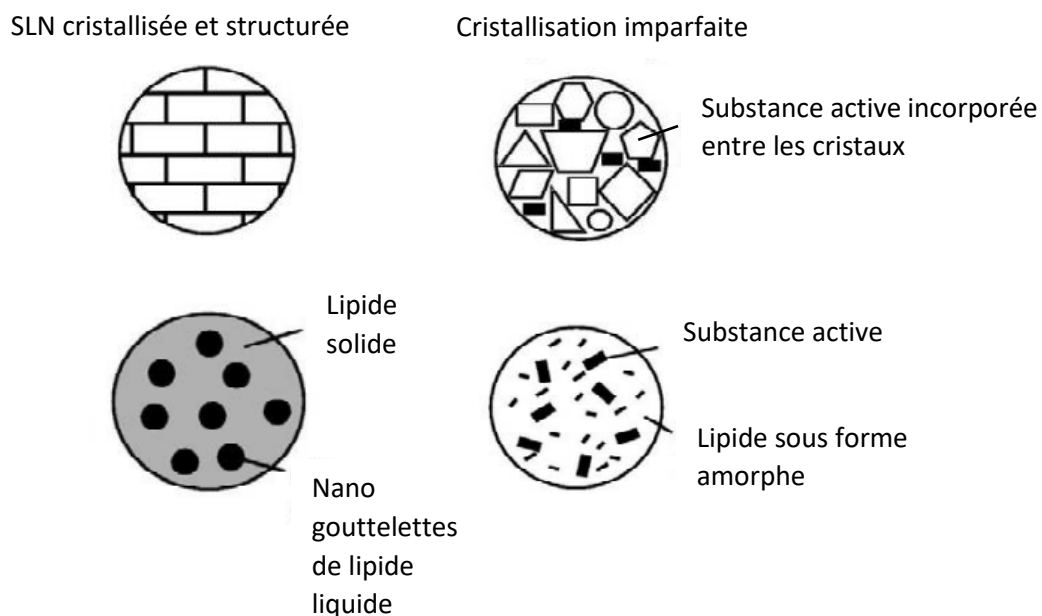


FIGURE 10 : SCHEMA COMPARANT UNE SLN CLASSIQUE (EN HAUT A GAUCHE) A DIFFERENTS NLC DONT LE CŒUR VARIE SELON LA COMPOSITION LIPIDIQUE : NLC A CRISTALLISATION IMPARFAITE (EN HAUT A DROITE), NLC A CŒUR SOLIDE EMPRISONNANT DES NANO GOUTTELETTES DE LIPIDE LIQUIDE (EN BAS A GAUCHE) ET NLC A CŒUR LIPIDIQUE SOUS FORME AMORPHE (EN BAS A DROITE) [59]

II. Nanoparticule lipidique solide (SLN)

A. Généralités

1. Définition

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont des systèmes de transport nano-colloïdaux composés de lipides solides à température ambiante, comme l'acide stéarique dont le point de fusion est compris entre 67 et 72°C ou encore la tristéarine avec un point de fusion entre 72 et 75°C, stabilisés avec des tensioactifs ou des polymères et le plus souvent dispersés en milieu aqueux. Les SLN ont une taille comprise entre 50 et 1000 nm (compatible avec la voie intraveineuse), elles sont utilisées pour encapsuler les substances actives dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique et permettent de :

- Contrôler la libération de la substance active.
- Modifier le taux de dissolution de la substance active (c'est la dire la mesure de la vitesse de dissolution de la substance active dans l'organisme) et ainsi améliorer la biodisponibilité pour la voie orale et parentérale.
- Améliorer la biodisponibilité de la substance active en augmentant sa distribution dans les tissus.
- Assurer une protection chimique et physique des substances actives sensibles [60].

Les nanoparticules permettent d'encapsuler et délivrer les substances actives lipophiles ou peu solubles dans l'eau grâce à leur matrice lipidique, cet avantage est intéressant car beaucoup de substances actives dans l'industrie pharmaceutique présentent des problèmes de solubilité dans l'eau.

2. Composition des SLN

Les SLN sont préparées à partir de lipides solides à température ambiante, d'eau et d'une molécule amphiphile : tensioactif, polymère ou phospholipides par exemple ; cette molécule amphiphile vient envelopper les particules de lipide pour les stabiliser et servir d'interface entre la nanoparticule et l'eau [61].

a. Les lipides

Les lipides utilisés dans les SLN sont sélectionnés en fonction de leur point de fusion. Ils doivent être solides à température ambiante et également être non-toxiques, biocompatibles et biodégradables pour l'usage pharmaceutique. Parmi les catégories de lipides utilisés on retrouve les triglycérides (ex : tripalmitine, trimirystine), les monoglycérides (ex : monostéarate de glycérol), les acides gras (ex : acide stéarique, acide palmitique), les alcools gras (ex : l'hexadécanol aussi appelé alcool cétylique), les cires (ex : palmitate de cétyle, cire d'abeille) ou encore un mélange entre ces différents lipides [61].

b. Les tensioactifs

Ce sont des molécules amphiphiles (tête polaire hydrophile et queue apolaire et lipophile) qui viennent diminuer la tension interfaciale entre deux milieux. Dans le cas des SLN, les tensioactifs viennent entourer les nanoparticules et les stabiliser dans le milieu aqueux, ils interviennent également dans la taille des nanoparticules. Pour la fabrication des SLN on retrouve :

- Les tensioactifs non-ioniques tels que les polysorbates (Tween®) : ils ne présentent pas de charge et sont moins irritants que les tensioactifs cationiques et anioniques.
- Les tensioactifs anioniques : la tête hydrophile est chargée négativement et conduit à une charge négative des nanoparticules en milieux aqueux. Exemple : le lauryl sulfate de sodium très utilisé en cosmétique.
- Les tensioactifs cationiques : ils sont chargés positivement et apportent une charge positive à la surface des nanoparticules dans le milieu aqueux. Exemples : le bromure de cetrimonium [61].

Néanmoins, malgré les avantages qu'ils présentent dans la composition des SLN, certains tensioactifs sont irritants pour la peau ou la voie parentérale quand ils sont utilisés à de fortes concentrations [62]. Aussi, d'autres molécules amphiphiles aux propriétés tensioactives peuvent remplacer les tensioactifs classiques dans la composition des SLN.

c. Les polymères

Les polymères sont des macromolécules amphiphiles composées d'un grand nombre de répétition d'un même motif appelé monomère. Ils ont des propriétés tensioactives et peuvent remplacer les tensioactifs classiques pour stabiliser des nanoparticules lipidiques solides. Les polymères retrouvés dans la composition des SLN sont notamment les Poloxamers (copolymères de polyoxypropylène et de polyéthylène glycol), les PEG (polyéthylènes glycol) et l'alcool polyvinylique [63].

d. Les phospholipides

Ce sont des lipides amphiphiles estérifiés par des acides gras et un groupement phosphate. La forme la plus commune de phospholipide est la lécithine (contenant majoritairement de la phosphatidylcholine (PC)) mais on retrouve également la phosphatidyléthanolamine ou la phosphatidylsérine. La lécithine possède des propriétés tensioactives amphotères (la charge de la lécithine dépend du pH du milieu) et peut être utilisée seule dans la production de SLN ou en tant que co-tensioactif (associé à un polymère ou un tensioactif classique) pour stabiliser la dispersion de SLN [61].

e. Influence du lipide

Il existe un grand nombre de lipides solides à température ambiante disponibles pour la production des SLN, la plupart de ces lipides sont des mélanges dont la composition peut varier entre différents fournisseurs ou entre différents lots (exemple : le Précirrol® ATO 5 qui est un mélange d'esters d'acides palmitique (C16) et stéarique (C18) et de glycérides et qui sera utilisé dans la partie expérimentale de cette thèse). Ces légères variations de composition peuvent exercer une influence sur la qualité des SLN produites (variation de potentiel zeta, de la vitesse ou du type de cristallisation du lipide). De plus le caractère hydrophile, la viscosité ou encore la forme des cristaux du lipide composant les SLN exercent une influence sur leur stabilité, leur taille ou le procédé de fabrication [64] [65].

f. Influence du tensioactif

Le tensioactif joue un rôle important dans la formation des SLN, il réduit la tension de surface entre l'eau et les SLN et réduit leur taille : plus on ajoute de tensioactif plus les SLN sont de petite taille. Le type de tensioactif utilisé joue également un rôle, selon son poids moléculaire, le tensioactif en excès lors de la production de SLN mettra plus ou moins de temps à s'arranger en d'autres structures (monomères émulsifiés, micelles ou liposomes) : les tensioactifs de bas poids moléculaire vont plus rapidement se réarranger et trouver un nouvel équilibre que les tensioactifs de haut poids moléculaire comme les Poloxamers® ou encore la lécithine. De plus l'utilisation de plusieurs tensioactifs permet de produire des SLN plus petites et plus stables que les formules contenant un unique tensioactif [66].

3. Modèle d'incorporation de substance active

Les substances actives peuvent être incorporées dans les SLN selon trois modèles schématisés ci-dessous (Figure 11). La façon dont la substance active va se disperser dans le lipide lors de la solidification de nanoparticule va dépendre de la méthode de fabrication mais aussi de la nature et de la quantité de lipide ou de substance active utilisée.

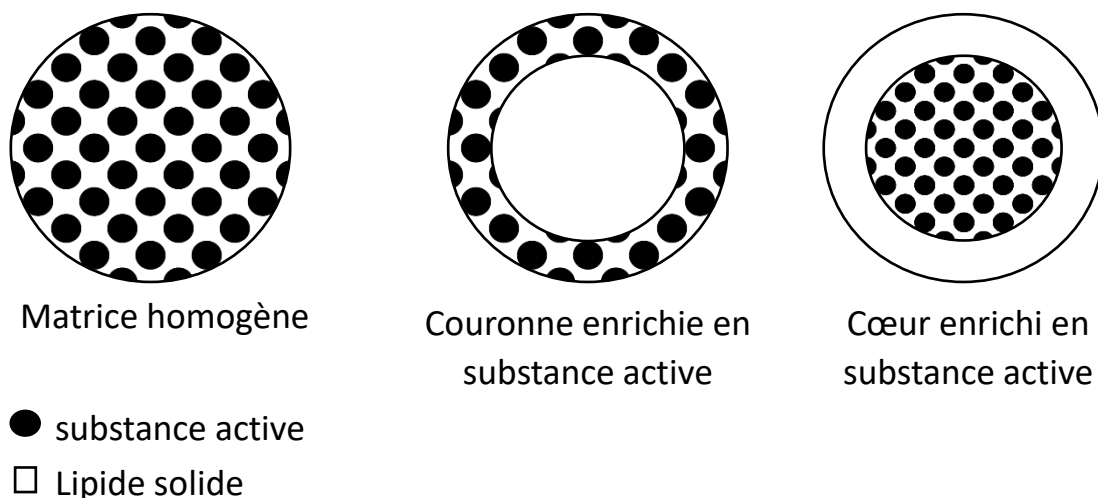


FIGURE 11 : SCHEMA DES DIFFERENTS MODELES D'INCORPORATION DE SUBSTANCE ACTIVE DANS LES SLN

On retrouve le modèle à matrice homogène, dans ce modèle la substance active est dispersée dans toute la SLN de façon homogène. Ce modèle est retrouvé pour les substances actives hautement lipophiles qui se dispersent bien dans la matrice de lipides solides à température ambiante. Le modèle à matrice homogène est obtenu principalement par homogénéisation à froid afin que la dispersion obtenue entre la substance active lipophile et la matrice lipidique soit gardée à l'état solide pendant tout le processus pour éviter l'enrichissement en substance active de certaines zones de la SLN pouvant se produire lors des chauffages et refroidissements successifs [59].

Le modèle à couronne enrichie est obtenu lorsque les SLN sont produites à chaud avec des quantités plutôt faibles de substance active. Ce modèle apparaît lorsque la dispersion homogène de la substance active dans le lipide solide à température ambiante se déphase pendant le processus de refroidissement au cours duquel les gouttelettes de lipides deviennent des nanoparticules lipidiques solides. Le lipide, présent en grande quantité, va précipiter au cœur de la SLN en formation avant la substance active. Cette dernière, repoussée de la matrice lipidique solide en formation au cœur de la SLN, va se concentrer dans le pourtour de la nanoparticule et ainsi la couronne de la SLN va s'enrichir en substance active. Lorsque toute la SLN se sera solidifiée, la substance active sera surtout retrouvée dans la couronne de la SLN permettant une libération rapide de la substance active (surtout utilisé pour la voie topique) [59].

Le dernier modèle d'incorporation de substance active au sein d'une SLN est le modèle à cœur enrichi en substance active. Ici c'est la situation inverse, pendant le refroidissement le lipide solide et la substance active se déphasent mais dans ce modèle la concentration de la substance active est importante (proche de la saturation) et cette dernière précipite avant le lipide au sein de la SLN. Une fois totalement solidifiée, on obtient une nanoparticule au cœur enrichi en substance active et à la couronne faiblement concentrée en substance active qui servira de membrane de contrôle pour la libération de la substance active [59] [67].

Ces trois modèles représentent les cas idéaux de dispersion de la substance active au sein des SLN, néanmoins des mélanges entre deux ou trois modèles d'incorporation peuvent être retrouvés lors de la production de SLN. Il faut surtout retenir que la structure des SLN formées dépend de la nature physico-chimique de la substance active et de la matrice lipidique ainsi que les interactions qu'il existe entre les deux. De plus, cette structure des SLN peut être influencée par les conditions et méthodes de préparations [59].

4. Voies d'administration et applications

Les nanoparticules lipidiques solides sont utilisées dans la voie topique et transdermique. Néanmoins, leur capacité à encapsuler les substances actives et à augmenter leur biodisponibilité ou leur distribution, en font un bon système de transport pour d'autres voies d'administration.

a. La voie topique et transdermique

Cette voie a déjà été décrite ci-dessus, les SLN permettent d'améliorer la pénétration cutanée des substances actives en augmentant leur distribution dans les tissus et offrent une protection physique et chimique aux substances actives sensibles. Les SLN peuvent être incorporées dans des gels, des crèmes ou des patchs en vue d'une administration locale ou systémique de la substance active [65].

b. La voie parentérale

La voie parentérale décrit l'administration d'une substance active par injection (sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse). En raison de leur composition physiologiquement bien tolérée et de leur bonne capacité de stockage après lyophilisation ou stérilisation, les SLN sont des bons systèmes de transport pour la voie parentérale et notamment pour l'injection intraveineuse. Lorsque les SLN sont injectées en intraveineuse, leur petite taille leur permet de circuler dans les systèmes microvasculaires (artérioles, capillaires, veinules) en évitant l'absorption par les macrophages. Ainsi les SLN sont des bons systèmes de transport pour le transport des gènes dans le cadre de la thérapie génique pour le traitement de cancer notamment, mais aussi pour le transport de substances actives au travers de la barrière hématoencéphalique pour le traitement des tumeurs cérébrales, du SIDA ou des troubles neurologiques et psychiatriques [68].

c. La voie orale

Les SLN peuvent être intégrées sous forme de granules ou de poudres au sein d'un comprimé, d'une gélule ou d'une capsule. Elles protègent la substance active de la dégradation dans le tractus gastrointestinal et favorisent les interactions avec l'épithélium intestinal ce qui prolonge l'efficacité des substances actives [63].

d. La voie respiratoire

Les poumons offrent une grande surface pour l'absorption de substances actives tout en évitant les effets du passage gastrohépatique. Les SLN sous forme de poudre peuvent être nébulisées et absorbées rapidement par voie respiratoire où leur taille leur permettra de traverser les parois des alvéoles pour rejoindre la circulation générale [63].

e. La voie nasale

La voie nasale est une voie d'administration non invasive et intéressante en raison de la rapide absorption des substances actives et l'évitement du tractus gastrointestinal. Les SLN ont été étudiées en tant que système de transport améliorant l'absorption à travers la muqueuse nasale notamment pour la vectorisation de vaccins [63].

g. La voie oculaire

Les SLN augmentent la biodisponibilité des substances actives par voie oculaire grâce à leur biocompatibilité et à leurs propriétés muco-adhésives qui leur permettent d'interagir avec la muqueuse oculaire et de prolonger le temps de résidence de la substance active dans la cornée. Les SLN sont notamment étudiées pour l'administration d'antibiotiques dans des solutions ophtalmiques [63].

B. Méthodes de fabrication

La fabrication des SLN permet d'obtenir des dispersions aqueuses de nanoparticules mais également des SLN sous forme de poudre solide selon la méthode de fabrication utilisée. Néanmoins les dispersions de SLN peuvent être converties en poudre solide grâce à des méthodes de déshydratation adaptées [69]. Les principales méthodes de préparation des SLN sont décrites ci-dessous.

1. Préparation des SLN par homogénéisation à haute pression

L'homogénéisation à haute pression consiste à propulser une dispersion de lipides fondus à travers une petite cavité de quelques micromètres de diamètre à haute pression (100 à 2000 bars). A la sortie de la cavité la dispersion est à très haute vitesse à la suite de la perte rapide de pression et va être projetée contre les parois de la chambre de l'homogénéisateur comme schématisé dans la Figure 12 [70]. Le phénomène de cavitation créé par la rapide chute de pression et les forces d'impact et de cisaillement lorsque la solution est propulsée contre les parois de l'homogénéisateur cassent les particules de la dispersion entraînant une réduction de leur taille (inférieure au micromètre).

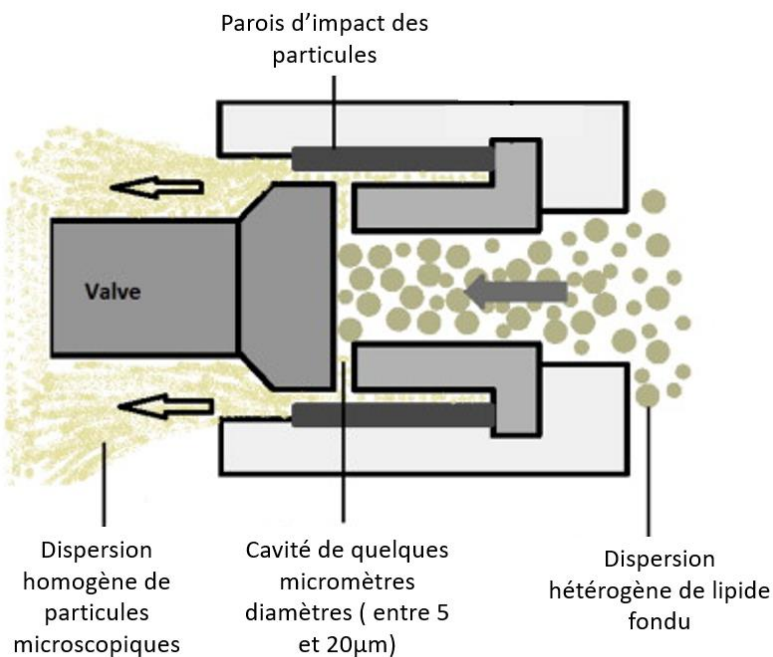


FIGURE 12 : SCHEMA DE L'HOMOGENEISATION A HAUTE PRESSION [70]

L'homogénéisateur à haute pression est un appareil communément utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la production de particules microscopiques (nanoémulsion, microémulsion, dispersion, encapsulation etc.) notamment pour la fabrication d'émulsion pour la nutrition parentérale.

Ainsi la préparation des SLN par homogénéisation à haute pression est une technique facilement transposable à l'échelle industrielle car le procédé existe pour la production d'autres formulations. De plus, il ne nécessite pas l'utilisation de solvant organique et le temps de production est faible. Il existe deux techniques d'homogénéisation à haute pression : l'homogénéisation haute pression à chaud et l'homogénéisation haute pression à froid, dans les deux techniques la substance active est dispersée ou dissoute dans la phase lipidique chauffée environ 5 à 10°C au-dessus du point de fusion du lipide [69] [71].

a. Homogénéisation à chaud

L'homogénéisation haute pression à chaud est schématisée dans la Figure 13 [72].

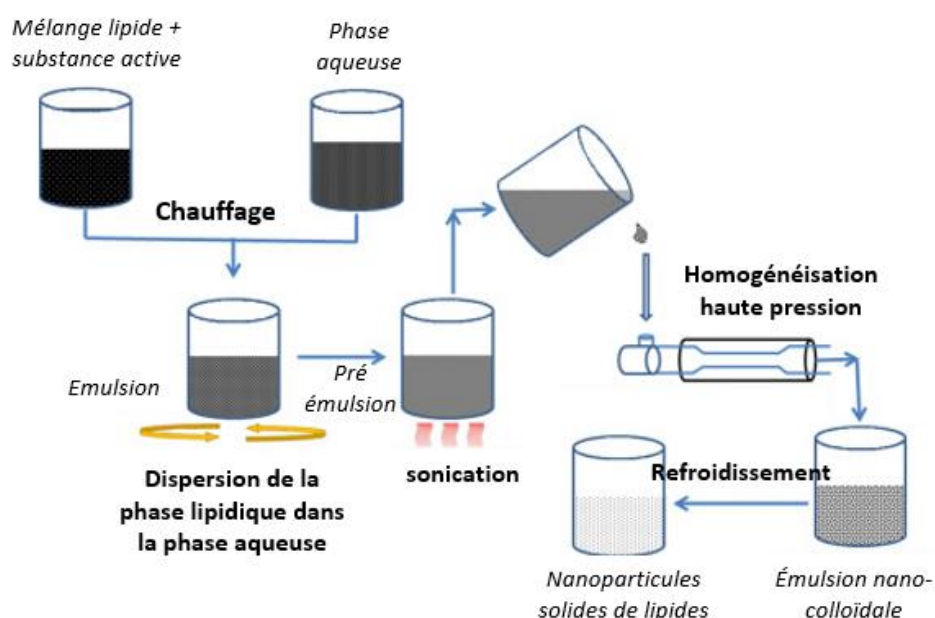


FIGURE 13 : SCHEMA DE LA TECHNIQUE D'HOMOGENEISATION HAUTE PRESSION A CHAUD POUR LA PREPARATION DE SLN [72].

Pour cette technique la substance active est dispersée ou dissoute dans la phase lipidique chauffé 5 à 10°C au-dessus du point de fusion du lipide. Ce mélange est ensuite dispersé dans une phase aqueuse chauffée à la même température, une pré-émulsion est ainsi obtenue après sonication dans un bain à ultrason, puis cette pré-émulsion est homogénéisée à haute pression 5 à 10°C au-dessus du point de fusion du lipide. Le passage de la pré émulsion dans l'homogénéisateur peut être répété jusqu'à l'obtention de particules de la taille désirée, néanmoins une répétition trop importante d'homogénéisation peut entraîner une augmentation de la taille des particules par coalescence. L'émulsion nano-colloïdale résultant de l'homogénéisation à haute pression est ensuite refroidie pour obtenir une dispersion de nanoparticules lipidiques solides [73]. Cette technique est utilisée pour les substances actives lipophiles ou insolubles. Les substances actives sensibles à la chaleur peuvent être préparées avec cette technique car l'exposition à des hautes températures est brève.

Néanmoins cette technique n'est pas recommandée pour les substances actives hydrophiles car la substance active pourrait se répartir dans la phase aqueuse lors de l'homogénéisation réduisant l'efficacité d'encapsulation ou se concentrer dans la partie extérieure de la nanoparticule de lipide entraînant une libération rapide de la substance active [71].

b. Homogénéisation à froid

L'homogénéisation haute pression à froid est schématisée dans la Figure 14 [72].

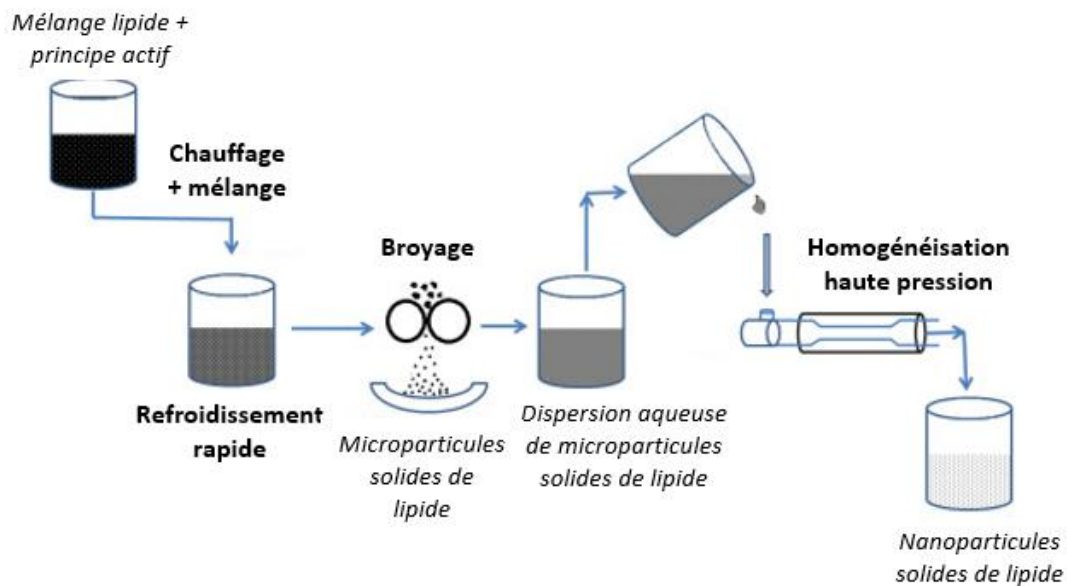


FIGURE 14 : SCHEMA DE LA TECHNIQUE D'HOMOGENEISATION HAUTE PRESSION A FROID POUR LA PREPARATION DE SLN [72].

Le lipide et la substance active sont mélangés 5 à 10°C au-dessus du point de fusion du lipide, puis le mélange est rapidement refroidi grâce à de l'azote liquide ou de la glace sèche afin d'obtenir une dispersion solide et homogène entre la substance active et le lipide. La solution solide est broyée en microparticules au moyen d'un broyeur à billes ou d'un mortier. Les microparticules de lipides sont ensuite dispersées dans une phase aqueuse à température ambiante. La dispersion est ensuite homogénéisée à haute pression toujours à température ambiante ou inférieure, afin d'obtenir une dispersion de nanoparticules lipidiques solides [74]. Cette méthode est mieux adaptée aux substances actives hydrophiles car il n'y a pas d'interactions entre la phase lipidique fondue et la phase aqueuse, réduisant ainsi le passage de la substance active de la phase lipidique vers la phase aqueuse. Si la substance active est peu soluble dans le lipide il est possible d'ajouter un tensioactif dans la phase lipidique pour aider la dispersion ou solubilisation de celui-ci [75].

2. Préparation des SLN par ultrasonication

La méthode de préparation des SLN par ultrasonication est schématisée dans la Figure 15 [76].

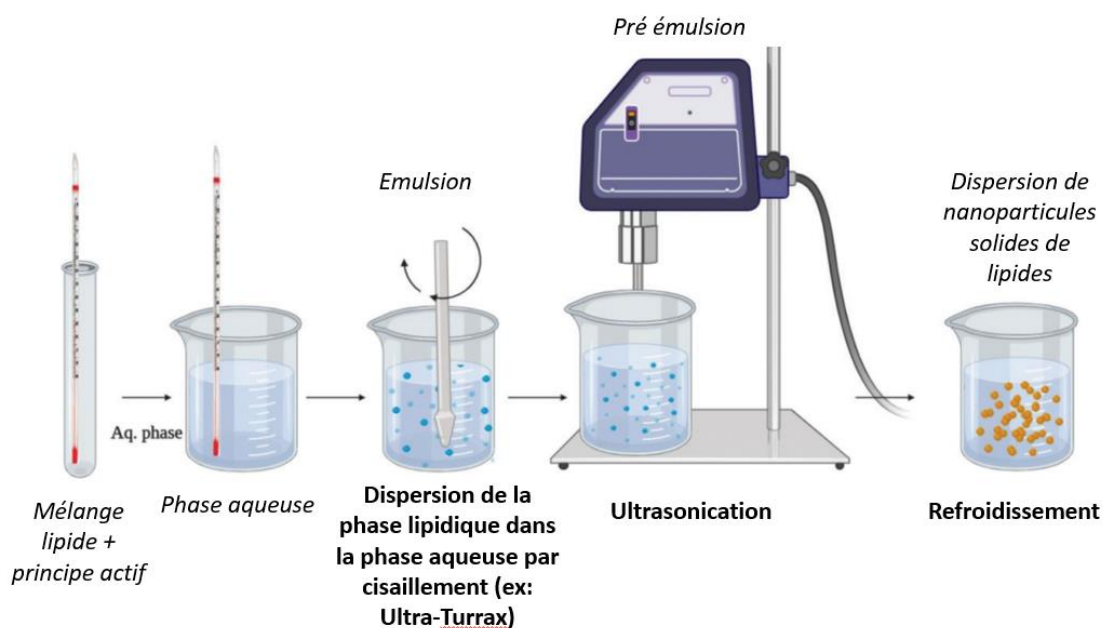


FIGURE 15 : SCHEMA DE LA METHODE DE PREPARATION DES SLN PAR ULTRASONICATION [76].

La méthode par ultrasonication se base sur le phénomène de cavitation. Les vagues de sons créées par le sonicateur et appliquées sur la dispersion créent des chutes brutales de pression qui perturbent l'intégrité des particules et permettent ainsi de réduire leur taille. La phase lipidique et la phase aqueuse sont d'abord mélangées à l'aide d'un appareil à force de cisaillement (ex : Ultra-Turrax®) à une température environ 5 à 10°C au-dessus du point de fusion du lipide. La pré-émulsion ainsi obtenue est ensuite passée au sonicateur et refroidie pour obtenir une dispersion de nanoparticules lipidiques solides. Afin de prévenir la recristallisation du lipide, l'entièreté du processus doit se faire à une température 5 à 10°C supérieure au point de fusion du lipide. La méthode de préparation des SLN par ultrasonication est simple à mettre en œuvre (matériel de laboratoire commun) et sans utilisation de solvant organique mais présente des inconvénients. Une filtration de la dispersion finale peut être nécessaire afin de retirer les impuretés notamment les particules de métal générées par le sonicateur ce qui rajoute une étape supplémentaire au procédé de fabrication des SLN. De plus, des microparticules (trop grandes) sont souvent retrouvées dans les dispersions de SLN produites par ultrasonication [71].

3. Préparation des SLN par la technique de la microémulsion

La méthode de préparation des SLN par la technique de la microémulsion est schématisée dans la Figure 16 [76].

Pour la technique de la microémulsion, la phase lipidique contenant la substance active et la phase aqueuse contenant de l'eau, un tensioactif et un co-tensioactif sont mélangées sous agitation modérée à une température supérieure au point de fusion du lipide afin d'obtenir une microémulsion transparente. Dans cette méthode la microémulsion est thermodynamiquement et cinétiquement stable. Elle est formée spontanément grâce aux grandes quantités de tensioactif (très fort ratio tensioactif/lipide) [73] [77]. La microémulsion est ensuite dispersée dans un grand volume d'eau froide (2 à 10°C) sous agitation faisant précipiter la phase lipidique sous forme de nanoparticules. Cette technique a l'avantage de ne pas utiliser de grandes quantités d'énergies ni de hautes températures, elle est compatible avec les substances actives sensibles à la chaleur. Néanmoins cette technique produit des dispersions de SLN très diluées nécessitant une étape supplémentaire pour retirer l'excès d'eau (lyophilisation ou ultrafiltration) et fortement concentrées en tensioactifs et co-tensioactifs [69] [73].

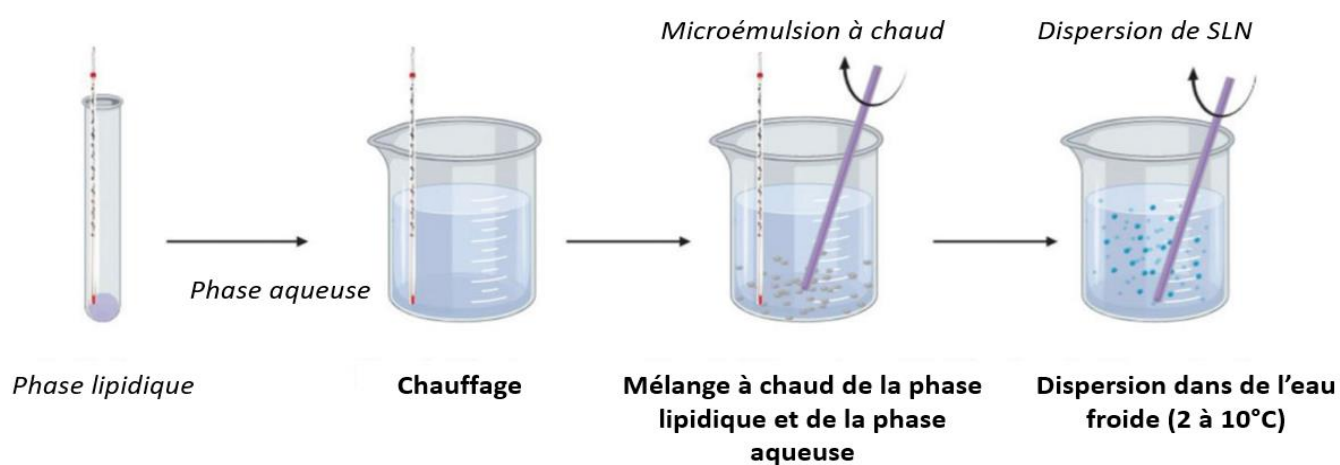


FIGURE 16 : SCHEMA DE LA METHODE DE PREPARATION DES SLN PAR MICROEMULSION [76].

4. Préparation des SLN par la méthode de la double émulsion

La méthode de préparation des SLN par la technique de la double émulsion est schématisée dans la Figure 17 [76].

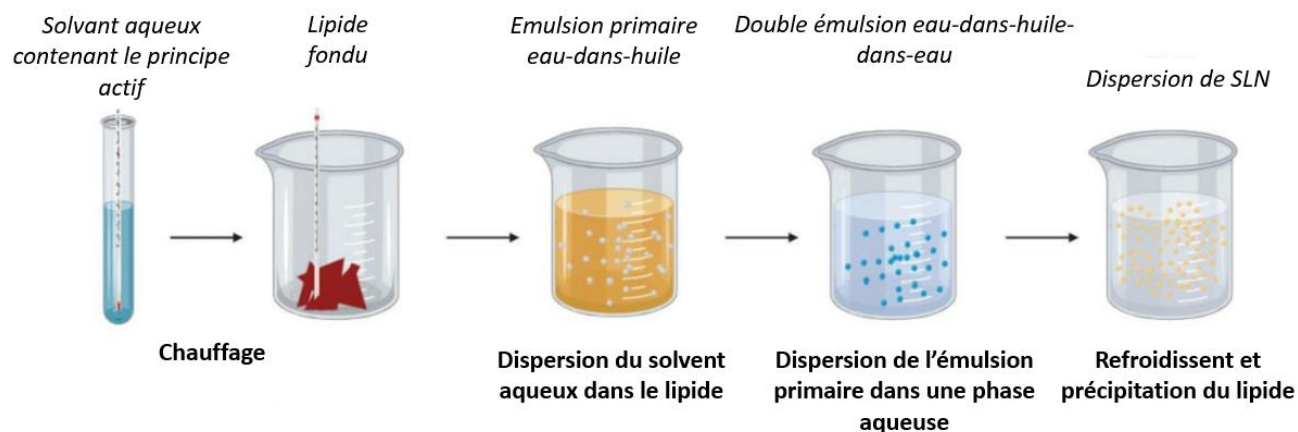


FIGURE 17 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES SLN PAR LA METHODE DE LA DOUBLE EMULSION [76]

La méthode de préparation des SLN par double émulsion consiste à préparer une première émulsion eau-dans-huile en dispersant un solvant aqueux contenant la substance active solubilisée (uniquement des substances actives hydrophiles) dans un lipide chauffé au-dessus de son point de fusion. Ce lipide peut être mélangé à des molécules tensioactives comme la lécithine pour stabiliser l'émulsion. Une fois l'émulsion primaire obtenue, celle-ci est dispersée dans une phase aqueuse contenant des tensioactifs et des co-tensioactifs pour obtenir une double émulsion (eau-dans-huile-dans-eau) transparente. Afin d'obtenir une double émulsion avec les gouttelettes les plus fines possible, l'émulsion primaire et la double émulsion sont homogénéisées par un homogénéisateur à force de cisaillement (ex : Ultra-Turrax®) et par sonication [78]. Le solvant contenu dans l'émulsion primaire diffuse dans la phase aqueuse continue et le lipide précipite en plus de se solidifier par refroidissement [79]. Cette technique est simple pour préparer des SLN mais utilise des tensioactifs, de plus la taille et la forme des particules produites sont très variables avec souvent des particules micrométriques [71].

5. Préparation des SLN par émulsification et évaporation d'un solvant

La méthode de préparation des SLN par la technique de l'émulsification et évaporation d'un solvant est schématisée dans la Figure 18 [76].

Ici le lipide et la substance active sont solubilisés dans un solvant organique non-miscible à l'eau (ex : cyclohexane, toluène ou chloroforme). Cette phase organique est ensuite dispersée dans une phase aqueuse à l'aide d'un Ultra-Turrax® puis dans un homogénéisateur à haute pression afin d'obtenir une émulsion avec des gouttelettes de phase organique les plus fines possible. Le solvant est ensuite évaporé à température ambiante sous agitation magnétique et préférentiellement sous une pression réduite (ex : évaporateur rotatif) [71]. Lors de l'évaporation du solvant, le lipide et la substance active précipitent dans l'eau sous forme de nanoparticules lipidiques solides. Le principal intérêt de cette technique est qu'elle est compatible avec les substances actives thermosensibles car elle ne présente pas d'exposition à de fortes températures. Mais le principal désavantage est l'utilisation de solvants toxiques tel que le toluène qui peuvent interagir avec la substance active et dont les résidus pouvant persister après l'évaporation peuvent être néfastes [76].

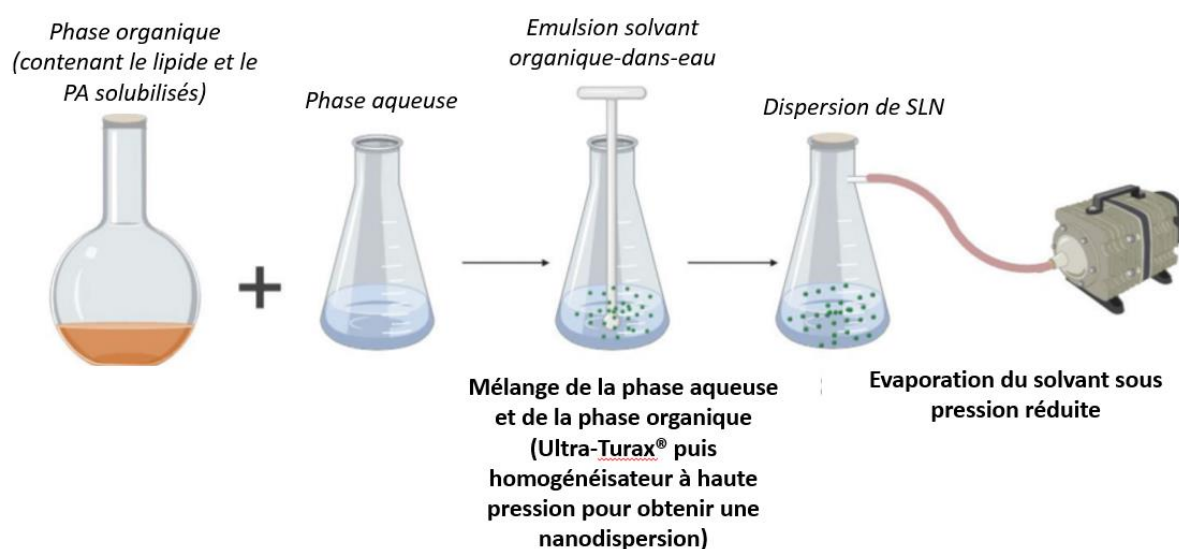


FIGURE 18 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES SLN PAR EMULSIFICATION ET EVAPORATION D'UN SOLVANT [76]

6. Préparation des SLN par émulsification et diffusion d'un solvant

Contrairement à la méthode précédente où le solvant utilisé était non-miscible à l'eau, dans la méthode de l'émulsification et diffusion d'un solvant, le solvant utilisé doit être solvant des lipides et miscible avec l'eau. La méthode de préparation des SLN par la technique de l'émulsification et diffusion d'un solvant est schématisée dans la Figure 19 [76].

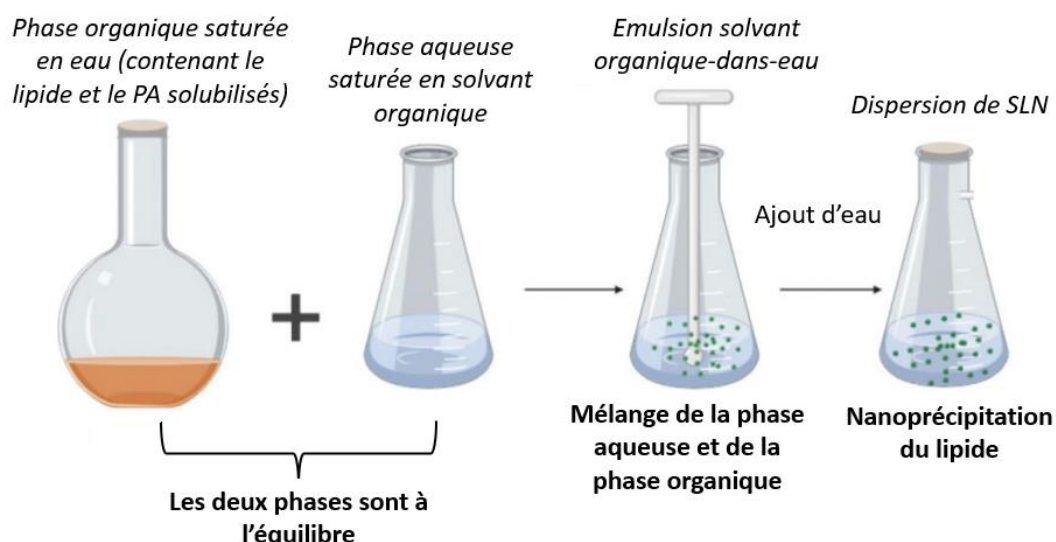


FIGURE 19 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES SLN PAR EMULSIFICATION ET DIFFUSION D'UN SOLVANT [76].

Cette méthode consiste dans un premier temps à mélanger deux phases sous agitation magnétique : une phase organique saturée en eau dans laquelle le lipide et la substance active sont solubilisés et une phase aqueuse saturée en solvant organique (miscible à l'eau) et contenant des tensioactifs. Les deux phases étant mutuellement saturées, le résultat du mélange permet d'obtenir une émulsion solvant organique-dans-eau car le solvant organique dispersé ne peut pas diffuser dans la phase continue qui est déjà saturée en solvant. Après cette étape d'émulsification, de l'eau est rapidement ajoutée au mélange ; ainsi la phase aqueuse, dispersante, n'est plus saturée en solvant et le solvant organique qui était dispersé va pouvoir diffuser dans la phase aqueuse entraînant la précipitation (sous forme de nanoparticules) du lipide et de la substance active qui étaient solubilisés dans la phase organique. Après la nanoprécipitation, le solvant qui a diffusé dans la phase aqueuse peut être éliminé par évaporation ou lyophilisation [71]. Bien qu'elle ressemble à la méthode précédente, la préparation des SLN par émulsification et diffusion d'un solvant est une méthode facile à mettre en œuvre, sans utilisation d'énergie ou de hautes températures (pas d'homogénéisation par haute pression ou Ultra-Turrax®). Elle ne nécessite pas la dissolution préalable de la substance active dans le lipide (ce qui être une étape difficile selon l'affinité de la substance active pour le lipide). Mais le désavantage de la préparation des SLN par émulsification et diffusion d'un solvant est la nécessité de concentrer la dispersion de SLN obtenue et de la séparer du solvant organique. De plus, la substance active peut facilement diffuser dans la phase aqueuse ce qui résulte en une faible capacité d'encapsulation des SLN [71].

7. Préparation des SLN par injection de solvant ou nanoprécipitation

La nanoprécipitation ou méthode par injection de solvant est représentée par la Figure 20. Cette méthode consiste dans un premier temps (1) en la préparation d'une phase organique, à partir d'un solvant organique miscible à l'eau et contenant le lipide solide à température ambiante et la substance active lipophile à encapsuler. Dans un second temps (2), cette phase organique est injectée via une aiguille et sous agitation dans de l'eau chauffée. Après un temps d'agitation déterminé, le mélange est ensuite refroidi pour accélérer la solidification du lipide.

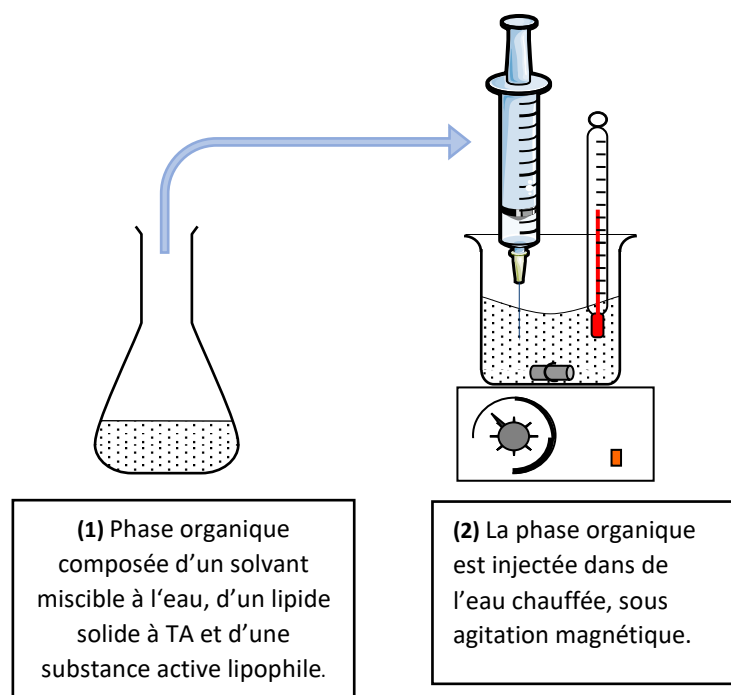


FIGURE 20 : SCHEMA REPRESENTANT LA PREPARATION DE NANOPARTICULES PAR NANOPRECIPITATION

Lors de l'injection, les microgouttelettes de phase organique qui se retrouvent dans le milieu aqueux vont être réduites en taille et se concentrer en lipide grâce à la diffusion du solvant de la phase organique vers le milieu aqueux. Lors de la diffusion du solvant, la concentration en lipide augmente localement entraînant la formation de zones où le lipide se trouve en sursaturation dans la microgouttelette. La sursaturation signifie que la solubilité maximale du lipide dans la microgouttelette de phase organique a été atteinte et que le lipide est présent en excès. Ainsi, le lipide en excès précipite sous forme solide jusqu'à former les nanoparticules lipidiques solides. De plus, la diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse entraîne des variations de tension à la surface des microgouttelettes de phase organique. Les turbulences et pulsations créées par les variations de tension de surface peuvent casser les microgouttelettes en particules plus fines, qui elles-mêmes pourront se transformer en nanoparticules lipidiques solides par diffusion du solvant et précipitation du lipide. La Figure 21 schématise ces deux phénomènes permettant la formation de nanoparticules lipidiques solides par nanoprécipitation [80].

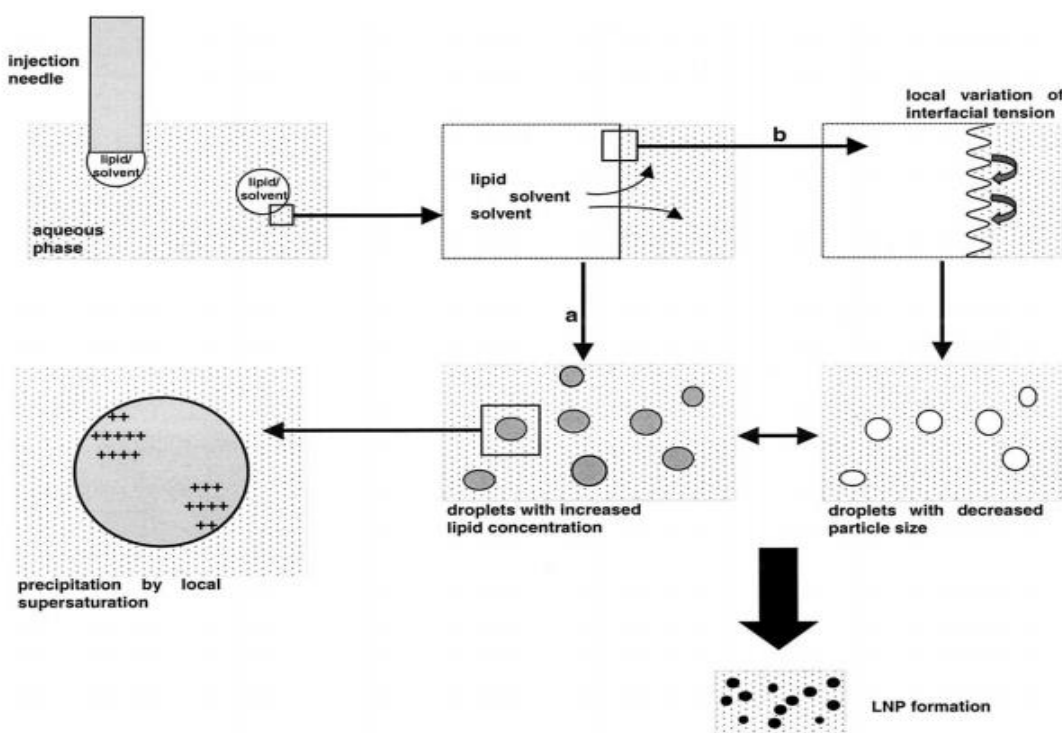


FIGURE 21 : SCHEMA REPRESENTANT LA FORMATION DE NANOPARTICULES PAR NANOPRECIPITATION [80].

8. Préparation des SLN en utilisant les fluides supercritiques

Cette méthode se base sur les propriétés particulières des fluides supercritiques : ce sont des substances (comme l'eau, le dioxyde de carbone ou le propane) qui sous de fortes températures et pressions dépassent leur point critique (frontière séparant l'état liquide de l'état gazeux) et se retrouvent à l'état de fluide supercritique. Les fluides supercritiques ont les propriétés de diffusion et la viscosité d'un gaz mais un pouvoir solvant et une densité comparables à ceux d'un liquide. Le fort pouvoir solvant des fluides supercritiques est modulable en fonction de la pression permettant ainsi d'extraire des molécules d'un mélange pour les précipiter dans un autre compartiment à pression plus faible. Le CO₂ est le fluide supercritique le plus utilisé car les conditions pour obtenir du CO₂ supercritique sont plus raisonnables que d'autres substances (température > 31,1 °C et pression > 73,8 bar) et le CO₂ peut solubiliser un grand nombre de composés [81].

Le CO₂ supercritique est déjà utilisé en industrie (agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique) et son utilisation pour la préparation des SLN est prometteuse, diverses techniques sont développées selon si le CO₂ joue le rôle de soluté, de solvant ou d'antisolvant. Les trois grandes techniques sont :

- L'expansion rapide d'une solution supercritique (abrégé RESS).
- La solution antisolvant supercritique (SAS) et ses procédés dérivés.
- Les particules produites à partir d'une solution saturée en gaz (PGSS) [71].

a. Expansion rapide d'une solution supercritique (RESS)

Le CO₂ arrive sous forme supercritique dans une chambre d'extraction où se trouve la substance active et le lipide. Le lipide et la substance active sont solubilisés dans le CO₂ supercritique, le CO₂ ainsi saturé va ensuite entrer dans une chambre d'expansion à faible pression. Dans cette chambre d'expansion les conditions de pression et de température ne sont plus respectées pour maintenir le CO₂ sous forme supercritique. Il reprend sa forme gazeuse ainsi le lipide et la substance active précipitent dans cette chambre car ils ne sont plus solubles dans le CO₂ gazeux. Un schéma représentant la méthode RESS est présenté dans la Figure 20 ci-dessous [82]. La morphologie des particules produites (amorphe ou cristalline) dépend des conditions de température, pression et chute de pression entre la chambre d'extraction et la chambre d'expansion ou encore la géométrie et la dimension de la buse d'entrée dans la chambre d'expansion [82]. La technique RESS est très utilisée pour réduire la taille d'une seule substance (micronisation de la carbamazépine, de l'ibuprofène ou encore de l'érythromycine) mais est plus difficile à utiliser lorsqu'il faut co-précipiter deux substances telles que le lipide et la substance active d'une SLN surtout quand ces derniers n'ont pas la même solubilité dans le CO₂ supercritique [82].

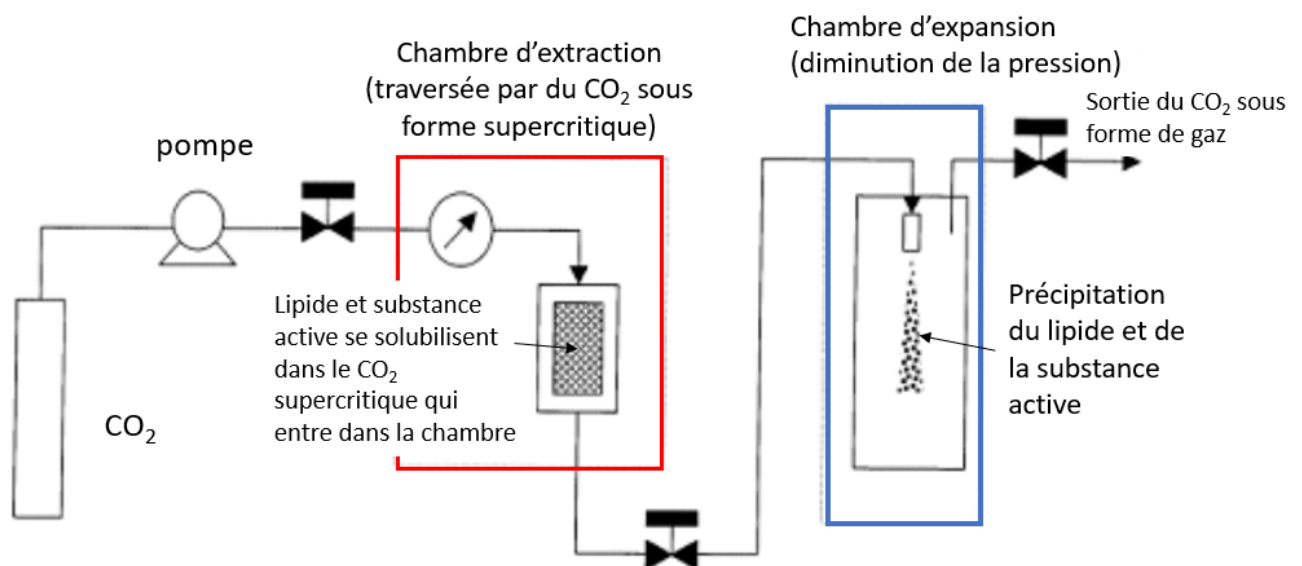


FIGURE 22 : SCHEMA D'UN PROCEDE DE PREPARATION DE SLN PAR EXPANSION RAPIDE D'UN FLUIDE SUPERCRITIQUE [82]

b. Technique de la solution d'antisolvant supercritique (SAS)

Cette méthode est utilisée pour les substances actives et les lipides non-solubles dans le CO₂ supercritique et pour lesquels l'utilisation de la technique RESS n'est pas possible. Dans cette technique on utilise un solvant organique dans lequel la substance active et le lipide sont solubles et qui est aussi miscible avec le CO₂ supercritique (ex : éthanol ; dichlorométhane, acétone, méthanol). La phase organique composée de la substance active et du lipide solubilisés dans le solvant vont être mis en contact avec le CO₂ supercritique dans une cuve. Le CO₂ va entrer dans la cuve puis va être mis au contact de la solution organique et ressortir de la cuve saturé en solvant.

La substance active et le lipide seront en sursaturation dans le solvant organique qui migre dans le CO₂ supercritique (ici le CO₂ joue le rôle d'un antisolvant : il abaisse la solubilité de la substance active et du lipide et génère une sursaturation de ces derniers).

La substance active et le lipide en saturation vont précipiter sous forme de nanoparticules lipidiques solides dans le fond de la cuve à cause de cet effet antisolvant [82]. Un schéma de la technique SAS est présenté dans la Figure 23 [71].

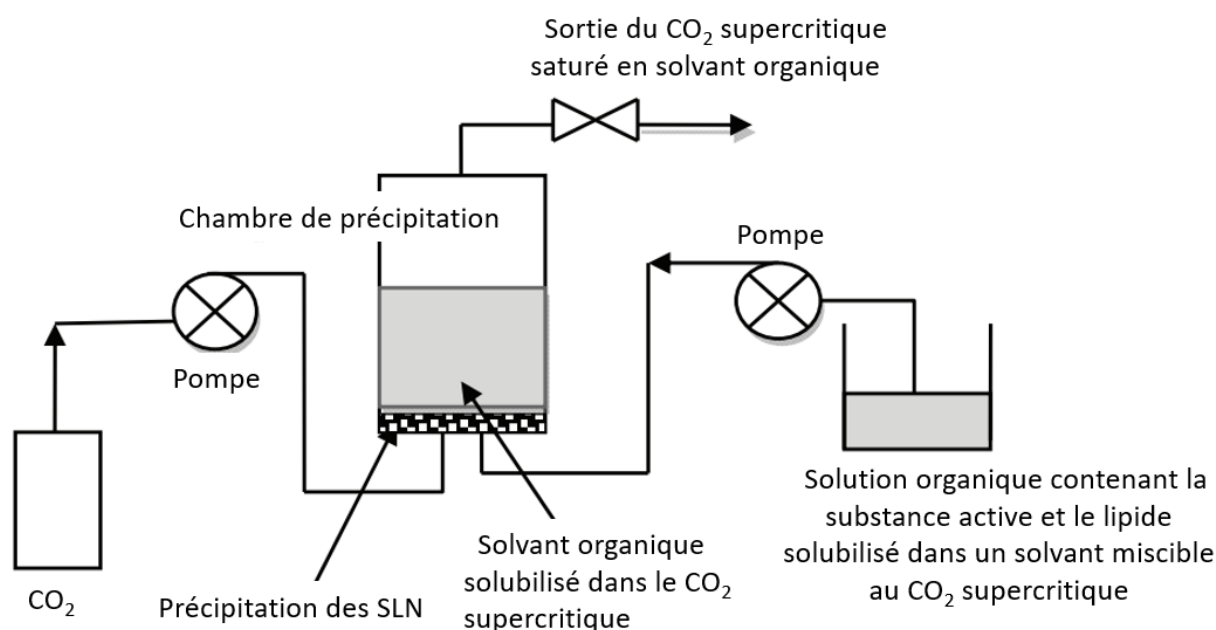


FIGURE 23 : SCHEMA DE LA TECHNIQUE SAS POUR LA PREPARATION DE SLN [71].

La très bonne solubilité des solvants organiques dans le CO₂ supercritique permet d'obtenir des nanoparticules exemptes de solvant, néanmoins il peut être difficile de trouver un solvant dans lequel le lipide et la substance active soient tous les deux solubles. C'est pourquoi il est possible de solubiliser la substance active et le lipide dans deux solvants différents et ensuite d'amener ces deux solutions organiques dans la chambre de précipitation pour les faire précipiter simultanément [82]. L'autre désavantage de la technique SAS est le manque de contrôle sur la forme des nanoparticules formées. On peut retrouver des nanoparticules en formes de bâtonnet, de flocon ou de papillon. C'est un problème pour l'industrie pharmaceutique qui utilise majoritairement des particules sphériques [82].

c. Particules produites à partir d'une solution saturée en gaz (PGSS)

C'est la technique utilisant les fluides supercritiques la mieux adaptée aux substances actives, aux lipides et autres excipients (polymères, tensioactifs) avec un faible point de fusion et non solubles dans le CO₂ supercritique. Cette technique consiste à solubiliser, sous pression, du CO₂ compressé dans le lipide fondu ou solide et contenant également la substance active. Le CO₂ une fois compressé a une meilleure solubilité dans le lipide que le lipide dans le CO₂. C'est pourquoi on parle de solution saturée en gaz : ici une solution de lipide et de substance active dans laquelle la quantité maximale possible de CO₂ est dissoute. Cette solution saturée en CO₂ va ensuite être envoyée dans une chambre d'expansion où la pression est plus faible. Le CO₂ n'est plus compressé et s'échappe sous forme de gaz alors que le lipide et la substance active précipitent [73]. Le schéma de la technique PGSS est présenté dans la Figure 24 [71].

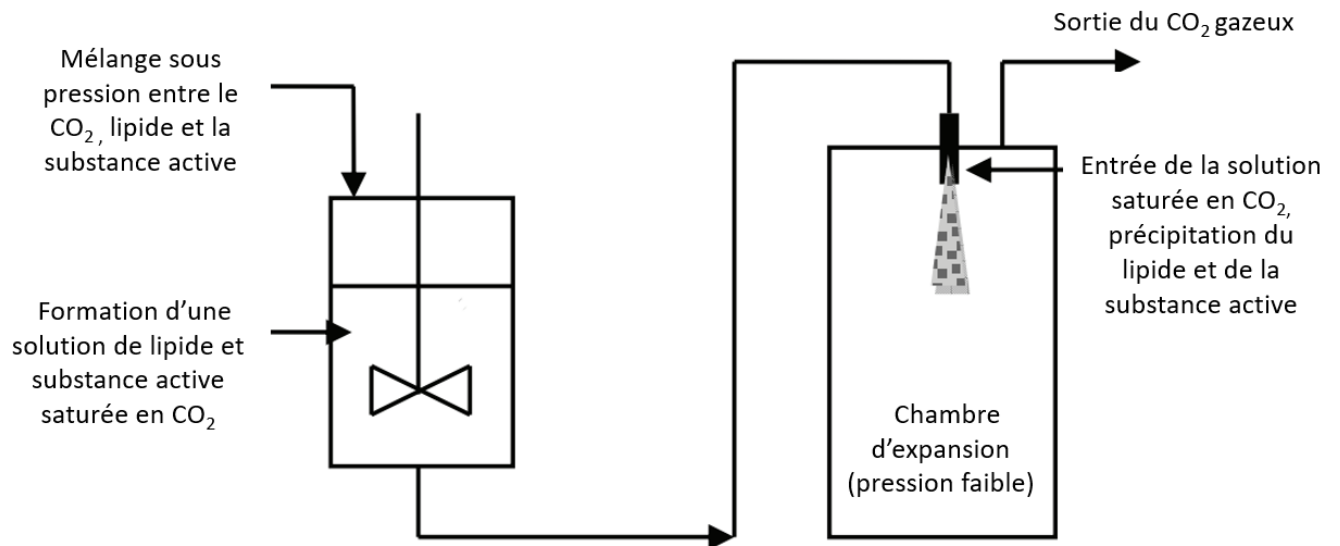


FIGURE 24 : SCHEMA REPRESENTANT LA TECHNIQUE DE PGSS POUR LA PREPARATION DE NANOPARTICULES LIPIDIQUES SOLIDES [71].

L'avantage de la technique PGSS est qu'elle n'utilise pas de solvant et ne nécessite pas que le lipide et la substance active soient solubles dans le CO_2 supercritique. Néanmoins lorsque l'on solubilise une trop grande quantité de CO_2 dans le lipide, la matrice lipidique est altérée et lors de la précipitation de ce dernier les particules risquent d'avoir des formes irrégulières responsables de la libération rapide de la substance hors de la nanoparticule [83].

9. Synthèse des différents procédés de préparation de SLN

Les avantages et inconvénients de chaque procédé de préparation de SLN sont réunis dans le Tableau 2 [73].

TABEAU 2 : SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS PROCÉDES DE PRÉPARATION DE NANOPARTICULES LIPIDIQUES SOLIDES [73].

Méthode de préparation	Mécanisme d'action	Avantage	Inconvénient
Homogénéisation haute pression à chaud	Phénomène de cavitation causé par la rapide chute de pression dans la chambre de l'homogénéisateur	Utilisé en industrie Procédé transposable	Peu compatible avec les substances actives hydrophiles Risque de répartition de la SA dans la phase aqueuse
Homogénéisation haute pression à froid	Phénomène de cavitation causé par la rapide chute de pression dans la chambre de l'homogénéisateur	Pas d'exposition à de forte température Mieux adapté aux SA hydrophiles	Coûteux en énergie Exposition à de fortes pressions
Ultrasonication	Phénomène de cavitation causé par la rapide chute de pression des vagues de son	Facile à mettre en œuvre Particules de petites tailles (30-180nm)	Contamination par les particules de métal du sonicateur Présence de microparticules Coûteux en énergie
Microémulsion	Réduction spontanée de la tension interfaciale et formation de nanoparticules	Peu coûteux en énergie Compatibles avec les SA sensibles à la chaleur	Dispersion de SLN obtenue très diluée Nécessite des grandes quantités de tensioactifs
Double émulsion	Diffusion du solvant, contenu dans l'émulsion primaire, dans la phase continue et précipitation du lipide et de la SA sous forme de SLN	Simple à mettre en œuvre Compatibles avec les SA sensibles à la chaleur	Utilisation de tensioactifs Présence de microparticules Forte force de cisaillement utilisée
Emulsification et évaporation d'un solvant	Emulsification de nanogouttelettes lipidiques puis évaporation du solvant (non miscible à l'eau) permettant la précipitation en SLN	Peu coûteux en énergie Compatibles avec les SA sensibles à la chaleur	Résidus de solvants toxiques Dispersion de SLN obtenue très diluée
Emulsification et diffusion d'un solvant	Emulsification de nanogouttelettes lipidiques puis diffusion du solvant (miscible à l'eau) permettant la précipitation en SLN	Peu coûteux en énergie Compatibles avec les SA sensibles à la chaleur	Dispersion de SLN obtenue très diluée Risque de répartition de la SA dans la phase aqueuse Faible capacité d'encapsulation

Méthode de préparation	Mécanisme d'action	Avantage	Inconvénient
Nanoprécipitation ou injection de solvant	Injection d'une phase organique (lipide + SA + solvant miscible à l'eau) dans une phase aqueuse, diffusion du solvant et précipitation des SLN	Procédé rapide et facile à mettre en œuvre Peu coûteux en énergie Compatibles avec les SA sensibles à la chaleur	Utilisation de tensioactifs
Procédé par fluide supercritique RESS	Extraction du lipide et de la SA par CO ₂ supercritique puis passe en CO ₂ permettant la précipitation des SLN	Obtention de SLN sous forme de poudre sèche Pas d'utilisation de solvant	Procédé coûteux Nécessite un lipide et une SA soluble dans le CO ₂ Co-précipitation entre le lipide et la SA difficile selon leur solubilité dans le CO ₂
Procédé par fluide supercritique SAS	CO ₂ supercritique joue le rôle d'antisolvant et génère de la sursaturation de lipide et SA au sein d'un solvant organique miscible au CO ₂ . Précipitation des SLN	Obtention de SLN sous forme de poudre sèche Utilisé pour les lipides et SA non-soluble dans le CO ₂	Procédé coûteux Formes des SLN irrégulières
Procédé par fluide supercritique PGSS	Solution lipidique saturée en CO ₂ compressé, précipitation de la phase lipidique en SLN lors de la diminution de pression et l'échappement du CO ₂ gazeux	Obtention de SLN sous forme de poudre sèche Pas d'utilisation de solvant	Procédé coûteux Formes des SLN irrégulières

10. Séchage des dispersions de SLN

Les dispersions de SLN obtenues avec les techniques décrites précédemment peuvent être transformées en dispersion solide après une étape de déshydratation pour améliorer leur stabilité et leur stockage. La déshydratation des SLN est souvent réalisée par lyophilisation ou par nébulisation avec un atomiseur et la poudre obtenue peut être conservée sur une longue période. La méthode par nébulisation avec atomiseur est une méthode moins coûteuse que la lyophilisation. Elle consiste à atomiser la dispersion de SLN à l'aide d'une centrifugeuse, d'une buse ou d'ultrasons pour la convertir en fines gouttelettes qui seront instantanément introduites dans une chambre de séchage. Dans la chambre de séchage les gouttelettes de dispersion de SLN entrent en contact avec un gaz chaud permettant le séchage rapide de la dispersion et l'obtention de particules solides sèches. A la sortie de la chambre de séchage, un séparateur cyclonique permet de séparer l'air chaud de la dispersion solide. La méthode de la nébulisation avec atomiseur est schématisée dans la Figure 25 [69].

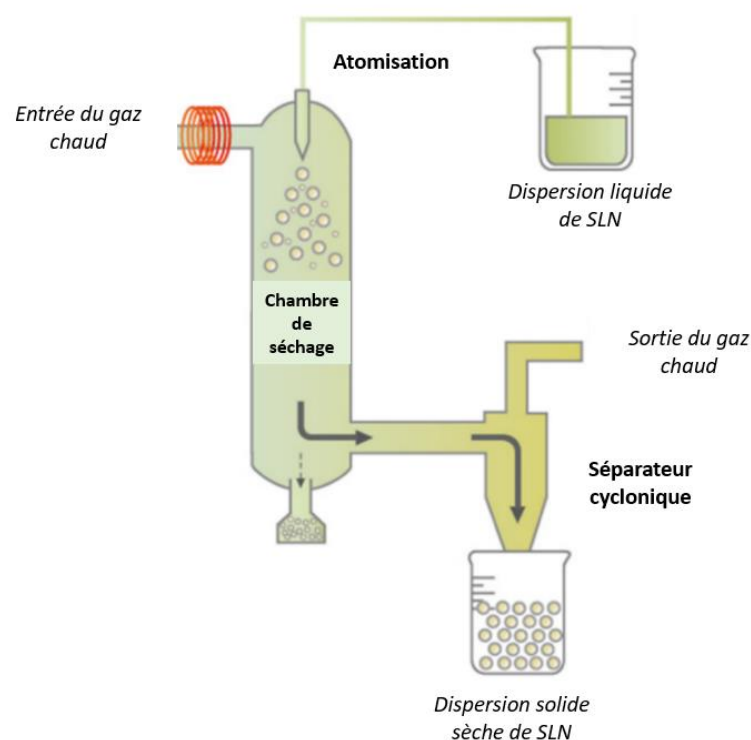


FIGURE 25 : SCHEMA DU SECHAGE DES DISPERSIONS LIQUIDES DE SLN PAR LA METHODE DE LA NEBULISATION AVEC UN ATOMISEUR [69].

Cette technique peut entraîner l'agrégation des particules due à l'utilisation de hautes températures du gaz de séchage, qui peuvent partiellement fondre les particules. Aussi il est recommandé d'utiliser des lipides avec des points de fusion supérieurs à 70°C [75]. Par exemple, lors du développement d'un procédé de séchage de microparticules lipidiques par nébulisation avec atomiseur en 2021 par Wolska et al. [84], le gaz chaud entrant avec une température comprise entre 70°C et 120°C et ressortait avec une température moyenne de 45°C. Les lipides alors utilisés étaient le béhénate de glycéryle appelé Compritol® (point de fusion compris entre 69 et 74°C) et l'acide stéarique (point de fusion de 69,6°C dans cette étude) [84].

C. Caractérisation des SLN

Une fois les SLN produites, celles-ci doivent être caractérisées pour contrôler leur qualité. Divers tests et instruments existent pour contrôler les SLN, les principales caractéristiques vérifiées sont :

- La taille, la morphologie et la charge de surface des SLN.
- Le taux de cristallinité du lipide.
- Le taux d'encapsulation de la substance active.

Ces caractéristiques seront détaillées ci-dessous [85].

1. La taille, la charge de surface et la morphologie des SLN

a. Taille et tension de surface des SLN

La taille et la distribution des SLN en solution peuvent être analysées principalement en mesurant l'angle de diffraction de la lumière émise par un laser (méthode de la diffraction laser ou LD), ou en mesurant la variation de l'intensité de la lumière diffusée à travers l'échantillon (méthode de la diffusion dynamique de la lumière ou DLS) selon la taille des particules de l'échantillon.

La méthode de la diffraction laser se base sur le fait que les petites particules diffusent la lumière à des angles plus grands que les grandes particules. La diffraction laser permet d'analyser des particules d'une grande gamme de tailles (entre 40nm et 2000 μm) mais est plus sensible sur les particules micrométriques diffusant plus de lumière que les nanoparticules. Afin de détecter le plus précisément possible la taille des SLN, il est recommandé de coupler la diffraction laser avec la méthode de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) [71].

La DLS consiste à irradier une suspension de SLN avec un laser émettant à 532 nm et de mesurer les variations d'intensité de la lumière diffusée. Les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée sont plus grandes lorsque les particules sont petites, car leurs micromouvements aléatoires en solution, appelés mouvements browniens, ont une vitesse plus importante que pour les particules plus grandes (schématisé dans la Figure 26 [86]) [61].

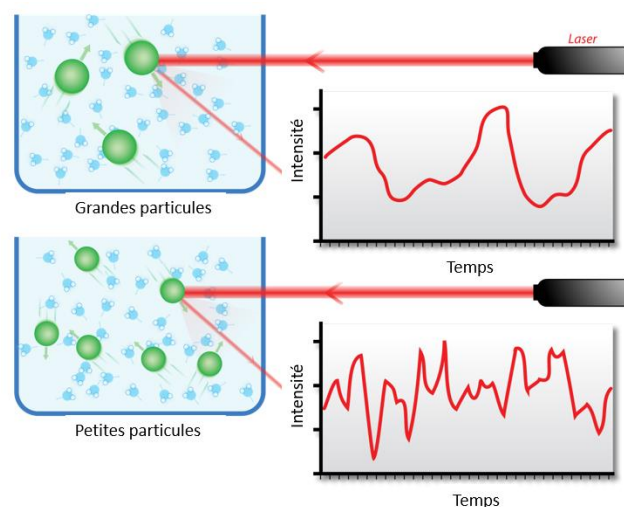


FIGURE 26 : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE [86].

La DLS permet de mesurer des particules ayant une taille comprise entre 3 nm et 3 μ m. Cette méthode d'analyse est rapide et sensible aux nanoparticules. Afin que les nanoparticules lipidiques solides traversent efficacement la peau, il est essentiel de déterminer correctement leur taille. La revue de Bolzinger et al. [87] rapporte que les nanoparticules d'une taille inférieure à 300 nm ont une meilleure pénétration via la voie folliculaire que les particules de plus grande taille et seules les nanoparticules inférieures à 122 nm atteignent le bulbe des follicules pileux et donc s'enfoncent le plus profondément dans le derme [87].

L'analyse par DLS permet d'obtenir, en plus du diamètre moyen de la population de SLN, une indication sur la distribution de la taille des particules : l'indice de polydispersité (PDI). Plus celui-ci est grand et plus l'échantillon est polydisperse. Cela signifie que sa distribution de taille est grande. On parle d'échantillon monodisperse lorsque toutes les particules ont la même taille et d'échantillon polydisperse lorsqu'il existe plusieurs tailles de particules au sein de l'échantillon [71]. Un PDI égal à 1 signifie que la dispersion contient un grand nombre de particules de taille différente. A l'inverse, un PDI égal à 0 signifie que toutes les particules de l'échantillon ont la même taille. En générale il est admis qu'une dispersion avec un PDI supérieur à 0,2 est considérée comme polydisperse [61].

Enfin la plupart des instruments mesurant la diffusion dynamique de la lumière peuvent également effectuer des mesures du potentiel zeta par diffusion électrophorétique de la lumière (variation de la lumière diffusée à travers des particules mises en mouvement par un champ électrique). Le potentiel zeta correspond à la charge électrique en surface des SLN lorsqu'elles sont dispersées dans un liquide. Le potentiel zeta permet de prédire la stabilité de la dispersion de SLN au cours du temps. Il est admis que le potentiel zeta possède une valeur critique (± 30 mV) qui marque la séparation entre les émulsions stables et instables : au-dessus de ± 30 mV en valeur absolue les émulsions sont généralement stables (elles subissent une répulsion électrostatique optimale pour des valeurs supérieures à ± 60 mV en valeur absolue). En-dessous de ± 30 mV les émulsions sont généralement instables (entre 5 et 15 mV les émulsions subissent une floculation limitée tandis qu'avec un potentiel zeta entre 3 et 5 mV les émulsions sont instables et floculent rapidement) [61]. En effet, un potentiel zeta élevé (donc une importante charge électrique positive ou négative en surface des SLN) peut stabiliser une dispersion colloïdale en réduisant l'aggrégation des particules grâce aux répulsions électriques [74].

b. Morphologie des SLN

La forme des SLN est caractérisée par microscopie. Il existe différentes techniques de microscopie pour analyser les SLN :

- Microscopie électronique à transmission : permet de déterminer la structure cristalline de la particule et les structures internes.
- Microscopie électronique à balayage : permet d'obtenir des images de la surface des nanoparticules afin d'étudier leur forme.
- Microscopie à force atomique : comme la microscopie électronique à balayage, elle permet de visualiser la topographie de la surface des nanoparticules avec une plus grande précision [76].

2. Le taux de cristallinité du lipide

Le taux de cristallinité et les états polymorphiques du lipide contenu dans les SLN sont différents du lipide seul. Ces paramètres influencent le taux d'encapsulation de la substance active en modifiant l'espace disponible dans la matrice lipidique. Les lipides possèdent trois formes cristallines (le polymorphe α , le polymorphe β' et le polymorphe β) et un potentiel état de surfusion appelé « supercooled melt » décrit dans le Tableau 3 ci-dessous [61] :

TABLEAU 3 : DESCRIPTION DES ETAT CRISTALLINS DES LIPIDES [61]

Etat	Capacité d'incorporation de la substance active	Stabilité	Taille du cristal	Morphologie des particules
Lipide en surfusion	Très élevée	Très faible	Etat liquide	Sphère
Cristal polymorphe α	Elevée	Faible	Quelques microns	Sphéroïde
Cristal polymorphe β'	Faible	Elevée	Inférieur à 5 μm	Sphéroïde
Cristal polymorphe β	Très faible	Très élevée	20 – 100 μm	Plaquettes et forme d'aiguille

Pendant le stockage, les formes cristallines moins stables (lipide en état de surfusion et polymorphe α) ont tendance à évoluer vers les polymorphes β' et β plus stables. Néanmoins ces polymorphes ont une moins bonne capacité d'encapsulation des principes actifs, une plus grande taille et pour le polymorphe β une forme non-sphéroïde. Lors de la transition en polymorphe β , le passage des nanoparticules vers la forme plaquettaire ou d'aiguille entraîne une augmentation de la surface globale des particules et l'apparition de surface non stabilisées par les tensioactifs. Aussi il est préférable que les lipides des nanoparticules se stabilisent en polymorphe β' et ne transitionnent pas, ou très lentement, vers la forme β [61].

Le taux de cristallinité et le polymorphisme des cristaux de lipide peuvent être caractérisés par microscopie électronique à transmission comme dit précédemment, mais aussi par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). C'est une technique d'analyse qui consiste à chauffer un échantillon de SLN et un échantillon du lipide seul puis de comparer leur enthalpie de fusion (chaleur absorbée par un corps lorsqu'il passe de l'état solide à l'état liquide) [68].

Le taux de cristallinité et le polymorphisme peuvent également être explorés par diffusion de rayons X : les nanoparticules sont traversées par des rayons X et l'analyse du rayon diffusé fournit des informations sur l'ordre ou le désordre au sein des atomes de l'échantillon. Il est alors possible de quantifier les phases cristallines présentes dans l'échantillon et d'estimer la taille des cristaux [66].

3. L'efficacité d'encapsulation de la substance active

L'efficacité d'encapsulation ou capacité d'encapsulation peuvent être déterminés en mesurant la quantité de substance active libre (méthode indirecte) ou la quantité de substance active encapsulée dans les SLN (méthode directe) selon la formule suivante (Equation 2) :

ÉQUATION 2: CALCULS DE L'EFFICACITE D'ENCAPSULATION (%)

Méthode indirecte

$$\text{efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{quantité totale de SA} - \text{quantité de SA libre}}{\text{quantité totale de SA}} * 100$$

Méthode directe

$$\text{efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{quantité de SA encapsulé}}{\text{quantité totale de SA}} * 100$$

Il est nécessaire de séparer la phase aqueuse des SLN pour pouvoir effectuer les mesures de substance active libre ou encapsulée. Pour cela, il est possible d'utiliser la centrifugation ou l'ultrafiltration ou encore la chromatographie sur gel. La quantification de la substance active quant à elle peut être réalisée par spectrophotométrie UV ou par chromatographie liquide haute performance selon ses caractéristiques physico-chimiques [65].

D. Les limites des SLN

Les nanoparticules lipidiques solides présentent de nombreux avantages en tant que systèmes de transport nano-colloïdaux [88]:

- Système de transport non-toxique et biocompatible.
- Amélioration de la biodisponibilité des substances actives.
- Contrôle de la libération de la substance active.
- Possibilité d'incorporation de nombreuses substances actives lipophiles ou peu solubles dans l'eau.
- Utilisation pour différentes voies d'administration.
- Facilité de production.

Mais les SLN ont également des limites. Les deux inconvénients majeurs sont la stabilité (augmentation de taille des particules et phénomène de gélification) et l'expulsion de la substance active. Lorsque la dispersion de SLN est bien optimisée, La SLN ne cristallise pas complètement pendant un stockage allant jusqu'à trois ans et subit différents changements d'état entre le polymorphe α et β' . Mais il arrive qu'un phénomène de gélification se mette en place : la dispersion liquide de SLN devient de plus en plus visqueuse jusqu'à former un gel. Ce phénomène arrive rapidement et est difficile à prédire. Il est lié à l'augmentation de taille des SLN et à leur agrégation notamment à cause de la transformation des nanoparticules en forme plaquettaire et forme d'aiguille lors de la cristallisation du lipide en polymorphe β . Ce phénomène de gélification est accentué par la lumière, les hautes températures et les forces de cisaillement. Pour prévenir ou retarder son apparition il est possible d'ajouter un co-tensioactif avec une forte mobilité moléculaire comme le glycocholate. Le potentiel zeta est un bon outil pour prédire ce phénomène de gélification. Lorsque le potentiel zeta est faible, en valeur absolue, les particules pourront plus facilement s'agréger et entraîner une gélification [66].

Le deuxième inconvénient majeur rencontré avec les SLN est l'expulsion de la substance active au cours du temps. Celle-ci est intégrée dans la matrice lipidique solide lors de la formation des SLN. La substance active trouve sa place entre les chaînes d'acide gras et dans les imperfections de la structure cristalline du lipide. Mais au cours du stockage, la forme cristalline du lipide peut changer pour se réarranger en une structure cristalline plus ordonnée et demandant moins d'énergie (polymorphe β' et β). Cette nouvelle cristallisation plus ordonnée va diminuer l'espace disponible pour la substance active (moins d'imperfection et d'espace dans et entre les lipides) jusqu'à l'expulser en dehors de la matrice comme schématisé dans la Figure 27 [59].

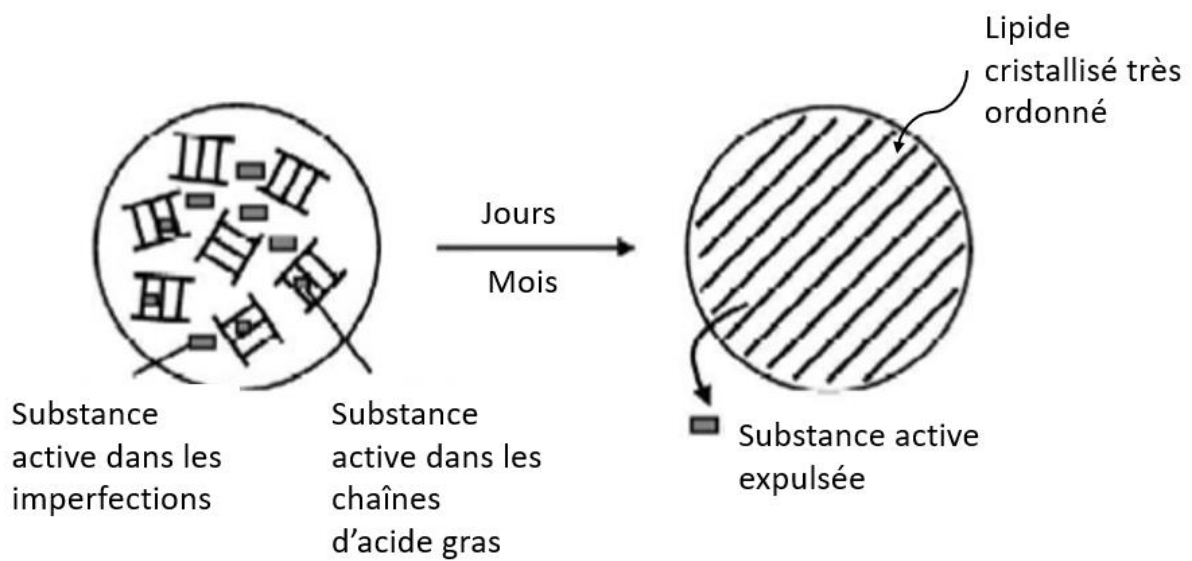


FIGURE 27 : SCHEMA DE L'EXPULSION DE LA SUBSTANCE ACTIVE AU COURS DU TEMPS [59].

L'expulsion de la substance active hors de la matrice lipidique dépend notamment des lipides utilisés. Plus les lipides auront une structure semblable plus la cristallisation de la matrice sera ordonnée (ex : la tristéarine qui est un triglycéride composé de trois molécules identiques d'acide stéarique) [59].

III. Optimisation d'une méthode de préparation et caractérisation de nanoparticules lipidiques solides pour délivrer de la nifédipine par voie transdermique.

A. Design de l'étude

Le but de cette étude est de développer et optimiser une méthode de préparation de nanoparticules lipidiques solides permettant d'encapsuler des substances actives lipophiles ou peu solubles dans l'eau. Les nanoparticules ainsi formées pourront être incorporées dans une formule topique et utilisées comme vecteur de transport en vue d'une administration transdermique des substances actives qu'elles contiennent. Dans cette étude la substance à encapsulée choisie est la nifédipine (antagoniste du calcium), une substance active peu soluble dans l'eau appartenant à la classe BCS II. La nifédipine est une substance active utilisée par voie orale sous forme de comprimé, comprimés pelliculés ou encore sous forme de gélules pour le traitement de l'angine de poitrine et de l'hypertension. En raison de sa faible solubilité dans l'eau et du passage par le tractus gastro-intestinal, la biodisponibilité de la nifédipine est réduite par voie orale, elle est donc une substance active adéquate pour être intégrée au sein de nanoparticules lipidiques solides. Ces nanoparticules lipidiques solides seront préparées en utilisant la technique de la nanoprécipitation, ou injection de solvant, décrite pour la première fois par Sjöström et Bergenstahl en 1992 [89]. La nanoprécipitation fût choisie comme méthode de préparation de nanoparticules dans cette étude car elle est rapide et simple à mettre en œuvre (pas d'utilisation de haute température ou haute pression) et sa reproductibilité fût démontrée par Westesen en 1996 [90] [66]. Ainsi, il est possible d'utiliser la nanoprécipitation pour proposer une méthode facilement optimisable en laboratoire et reproductible. L'étude comprend l'optimisation des paramètres opératoires propres à la préparation de nanoparticules (par la méthode de la nanoprécipitation), et l'analyse de la nature et de la concentration des composants afin de déterminer leur influence sur la taille, la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des nanoparticules formées. L'objectif sera de déterminer la meilleure combinaison de paramètres ainsi que la meilleure formulation pour obtenir des SLN compatibles avec une application transdermique. La compatibilité des formules de SLN avec une application transdermique sera déterminée par la taille des SLN et leur stabilité. Le but est d'obtenir des SLN d'une taille inférieure à 100 nm pour favoriser leur pénétration à travers l'épiderme et stable pendant au moins 24 heures pour permettre la réalisation des tests de perméabilité transcutanée [87] [91]. Les meilleures combinaisons, celles qui répondront le mieux aux critères imposés par la voie transdermique, seront analysées par microscopie optique et chromatographie haute performance (HPLC) pour déterminer leur capacité à encapsuler la substance active. Cette étude a été menée au sein du centre RAPSODEE (Recherche d'Albi en génie des Procédés des Solides Divisés, de l'Energie et de l'Environnement), encadrée par Thibault Massias dans le cadre de sa thèse « Génération de solides assistés par CO₂ supercritique pour la délivrance d'un actif pharmaceutique par voie transdermique » [92].

1. Préparation des SLN par nanoprécipitation

Les SLN de cette étude seront préparées selon la méthode de la nanoprécipitation ou méthode par injection de solvant détaillée dans la Partie II.B.7 « Préparation des SLN par injection de solvant ou nanoprécipitation » page 43. La méthode de préparation des SLN par nanoprécipitation est une méthode simple, facile à mettre en œuvre en laboratoire : elle ne nécessite pas d'utilisation de produits coûteux, d'appareillages complexes ou de hautes température ou pression. De plus, cette méthode permet d'obtenir rapidement une dispersion aqueuse de SLN permettant ainsi la réalisation de plusieurs essais par jour.

2. Optimisation des paramètres expérimentaux

Il existe différents paramètres opératoires modifiables lors de la nanoprécipitation afin de déterminer leur influence sur le phénomène de nanoprécipitation. La modification des différents paramètres opératoires peut entraîner des variations de taille et de stabilité des nanoparticules formées.

Les paramètres examinés dans cette partie de l'étude sont les suivants :

- Le débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse
- Le temps d'agitation après injection de la phase organique
- La température de la phase aqueuse lors de l'injection
- La température de refroidissement après l'agitation
- La concentration lipidique dans le mélange final

L'objectif est de faire varier chaque paramètre opératoire indépendamment et analyser les SLN obtenues en termes de taille et de stabilité afin de déterminer pour chaque paramètre la valeur nous permettant d'obtenir :

- Des SLN d'une taille permettant le passage transdermique : idéalement une taille d'environ 100 nm [87]. La distribution granulométrique de la préparation de SLN sera aussi un critère de sélection : la population de SLN devra également être homogène et monodisperse en termes de taille.
- Des SLN stables au cours du temps : minimum 24 heures pour permettre la réalisation de tests de perméabilité transcutanée [91]. La stabilité des SLN sera déterminée par les changements au niveau de la distribution granulométrique au cours du temps et les changements de répulsion électrique entre les particules et la phase aqueuse.

Une fois les paramètres expérimentaux optimisés pour répondre au mieux aux objectifs de l'étude, ceux-ci seront fixés pour la suite de l'étude.

3. Choix de la nature et de la concentration des composants

La formulation de SLN par nanoprécipitation comprend une phase aqueuse composée d'eau et une phase organique composée d'un solvant organique, généralement d'un tensioactif et de la substance active lipophile. Dans certains cas, la phase aqueuse peut également être un mélange d'eau et de tensioactif.

L'ajout d'un tensioactif dans la phase aqueuse ou organique permet une réduction de la taille des nanoparticules mais peut néanmoins entraîner des irritations cutanées comme des dermatites de contact (notamment les tensioactifs ioniques) s'ils sont utilisés à des fortes

concentration et selon la famille chimique à laquelle ils appartiennent [62]. Pour cette raison, la formulation choisie pour cette étude ne contiendra pas de tensioactifs connu comme étant irritants. Un polymère amphiphile sera utilisé comme tensioactif pour réduire les tensions de surface entre le lipide et l'eau, en raison de leur taille, les polymères amphiphiles stabilisent les particules par encombrement stérique et sont moins irritants que les tensioactifs classiques [93].

La formule de cette étude sera donc la suivante :

- Eau seule pour la phase aqueuse.
- Ethanol comme solvant pour la phase organique. C'est un solvant couramment utilisé dans l'industrie chimique et pharmaceutique [94], dont on connaît les données de sécurité et qui est facile à se procurer.
- Polymère amphiphile à déterminer, jouant le rôle de tensioactif.
- Phosphatidylcholine (PC) aussi appelée lécithine, qui sera incorporée dans la phase organique et utilisée comme co-tensioactif non irritant et plus naturelle qu'un tensioactif classique pour mieux solubiliser la substance active et augmenter la quantité de substance active encapsulée [95].
- Lipide solide à température ambiante à déterminer.

L'objectif du choix des composants sera de :

- Déterminer le couple polymère / lipide permettant d'obtenir les SLN les plus petites et les plus stables.
- Faire varier le ratio entre le polymère et le lipide dans la phase organique pour étudier son influence sur la taille et la stabilité des SLN.
- Déterminer l'influence de l'ajout de phosphatidylcholine comme co-tensioactif dans la formulation.

B. Matériels et méthodes

1. Matériel

La substance active choisie est la nifédipine. C'est un antagoniste du calcium indiqué dans le traitement de l'angor (angine de poitrine) et de l'hypertension artérielle. Par voie orale, il présente fréquemment des effets secondaires au niveau du tractus gastro intestinal et sa biodisponibilité est variable selon les individus (45-68%) dus aux effets de premier passage hépatique [96]. De plus c'est une substance active presque insoluble dans l'eau appartenant à la classe BCS II ; la BCS (Biopharmaceutical Classification System) correspond à la classification biopharmaceutique des principes actifs délivrés par voie orale. Ils sont classés en quatre classe selon deux paramètres (la solubilité en milieux aqueux et la perméabilité à travers la muqueuse intestinale) comme représenté dans la Figure 28 [97]. La nifédipine appartient donc à la classe II soit les principes actifs peu solubles et très perméable. Il faut savoir que 40% des principes actifs sur le marché appartiennent à la classe II ou IV et que 90% des nouveaux composés chimiques sont également de classe II ou IV [1].

Pour toutes ces raisons la nifédipine est un bon candidat pour l'étude de l'encapsulation de substance active lipophile ou peu soluble dans l'eau. La nifédipine (pure à 99,6%) a été achetée auprès de LEAP Chem, Chine.

Les lipides utilisés sont des lipides dont le point de fusion est supérieur à la température ambiante et dont l'innocuité est avérée pour les utilisations pharmaceutiques et dermocosmétiques. Dans cette étude les lipides disponibles sont l'acide stéarique (pur à 98%) acheté chez Alfa Aesar® (USA) et le précirol ATO 5® qui a été offert par Gattefossé® (France). Le précirol ATO 5® est un mélange d'esters d'acides palmitique (C16) et stéarique (C18) et de glycérides. L'acide stéarique et le précirol ATO 5® ont respectivement des points de fusion compris entre 69-72°C et 50-60°C.

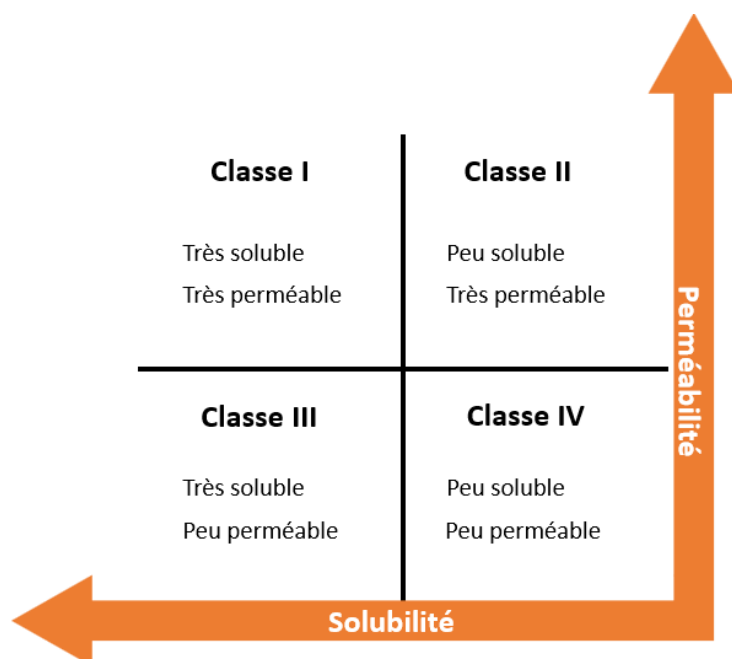
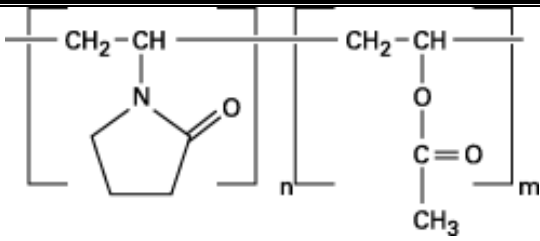
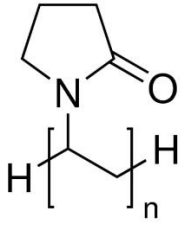
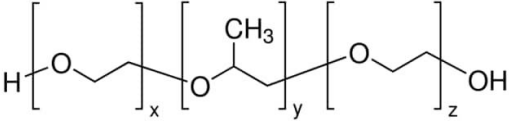
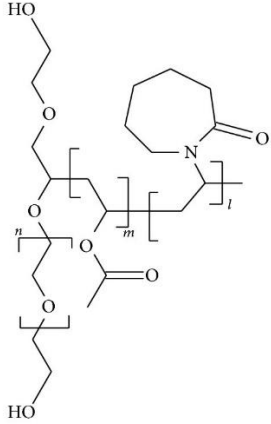


FIGURE 28 : SCHEMA DE LA CLASSIFICATION BIOPHARMACEUTIQUE DES MEDICAMENTS [97]

Les polymères amphiphiles sont obtenus chez BASF® (Allemagne). Les polymères choisis sont : PVP VA®, PVP K30®, Poloxamer 188 et le SoluPlus®, leur nom chimique ainsi que leur formule sont présentés dans le Tableau 4.

TABLEAU 4 : PRESENTATION DES POLYMERES CHOISIS POUR LA FORMULATION DE SLN

Nom commerciaux	Nom chimique	Formule	Poids moléculaire (kDa)
PVP VA®	Copolymère de poly(vinylpyrrolidone-co-acétate de vinyle)	 [98]	≤ 50
PVP K30®	Polyvinylpyrrolidone	 [99]	≤ 40
Poloxamer 188	Copolymère à blocs de poly(éthylène glycol), poly(propylène glycol) et poly(éthylène glycol)	 [100]	≤ 10
Soluplus®	Copolymère greffé de caprolactame de polyvinyle, d'acétate de polyvinyle et de polyéthylène glycol	 [101]	≤ 140

Enfin, la phosphatidylcholine (PC) a été achetée chez Sigma Aldrich© (USA).

2. Préparation des SLN

Les SLN ont été préparées selon la méthode de nanoprécipitation par injection de solvant présentée ci-dessus. Le lipide, le polymère, la phosphatidylcholine et la nifédipine sont dissouts dans de l'éthanol absolu à l'aide d'une plaque chauffante sous agitation magnétique. Le mélange organique ainsi obtenu est ensuite injecté via une seringue montée d'une aiguille (0,45 x 13mm), dans un bécher à double enveloppe contenant de l'eau distillée sous agitation magnétique. L'eau distillée contenue dans le bécher est chauffée grâce à l'eau qui traverse la double enveloppe et qui provient d'un bain-marie thermostaté.

Le débit d'injection est contrôlé grâce à un pilote injecteur : le PHD 2000 de HARVAD APPARTUS (France). Le dispositif ainsi décrit est visible sur la Figure 29.

3. Détermination de la taille des SLN

La distribution de taille des SLN produites a été analysée par DLS (*Dynamic Light Scattering*), cette méthode mesure les variations d'intensité de la lumière diffusée à travers l'échantillon. Plus les particules sont petites, plus leur mouvement brownien est important et plus l'intensité de la lumière diffusée fluctue.

Les analyses par DLS nous permettent d'avoir une information sur :

- La taille des SLN : analyse de l'ordre du nanomètre [66].
- L'indice de polydispersité (PDI) de l'échantillon nous informe à propos de l'hétérogénéité de taille entre les particules de l'échantillon. Plus l'indice de polydispersité de l'échantillon est grand, plus l'échantillon est polydisperse (PDI=0 signifie que les particules de l'échantillon ont toutes exactement la même taille, PDI=1 signifie que l'échantillon est fortement polydisperse avec de nombreuses tailles de particules).

Dans le cas de vecteurs lipidiques tels que les SLN, un $PDI \leq 0,3$ est acceptable et indique un échantillon homogène en termes de taille de particule [102]. Dans cette étude un $PDI \leq 0,2$ est souhaité.

- Le potentiel Zeta des SLN : le potentiel Zeta donne une prédiction sur la stabilité de la dispersion de SLN dans le temps : plus celui-ci est grand (en valeur absolue), plus les répulsions électriques sont fortes et le risque d'agrégation des particules est moindre [103]. On considère qu'une formulation avec un potentiel Zeta d'environ - 30 mV ou +30 mV possède une bonne stabilité physique [104]. Dans cette étude un potentiel Zeta ≤ -30 mV ou +30mV est souhaité pour assurer une bonne stabilité en suspension aqueuse.

L'appareil utilisé dans cette étude pour les analyses par DLS est le Zetasizer Malvern Nano-ZS. Les échantillons de SLN ont été analysés avec un angle de 173° dans une cellule à 20°C . Chaque échantillon a été dilué dans de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration en SLN de 1mg.g^{-1} appropriée pour l'analyse de distribution de taille avec cet appareil. Chaque échantillon a été analysé trois fois afin de déterminer la taille, l'indice de polydispersité et le potentiel Zeta moyen des échantillons de SLN.

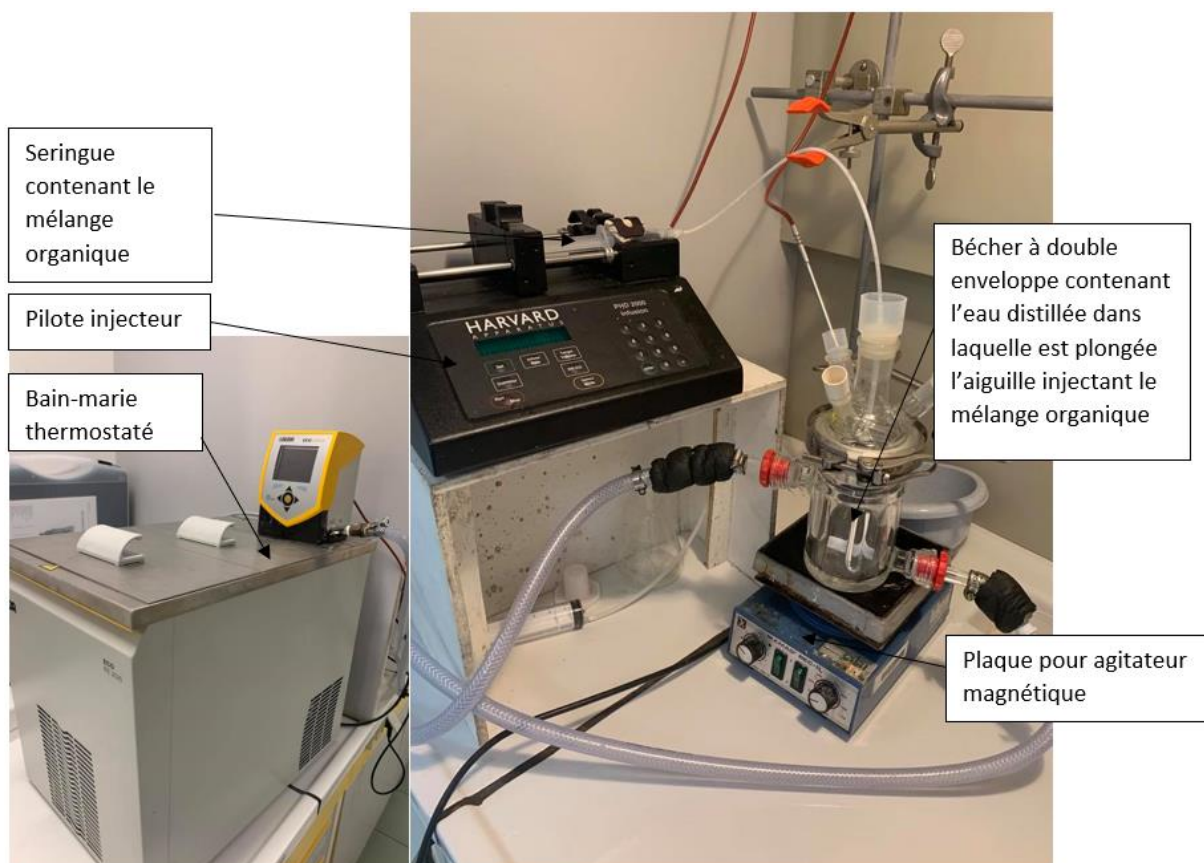


FIGURE 29 : PHOTO DU DISPOSITIF UTILISÉ POUR LA PRODUCTION DES SLN

4. Suivi de stabilité et efficacité d'encapsulation

Les SLN fabriquées sont stockées pendant une semaine à 3°C. La taille, le potentiel Zeta et l'indice de polydispersité sont analysés à 24h, 48h et 96h pour déterminer leur stabilité. La quantité de nifédipine dans le surnageant est également analysé au cours du temps pour exprimer l'expulsion de la substance active et déterminer la stabilité des SLN à la fois de façon qualitative par observation microscopique et quantitative par HPLC. Les échantillons sont observés par microscopie optique (Leica® S9i) à lumière polarisée pour visualiser la nifédipine expulsée dans le surnageant au cours du temps. Les échantillons sont observés à t₀, 24h et 48h sans traitement supplémentaire de purification ou de concentration, et des photographies de ces observations sont réalisées grâce au Leica® KL300 LED.

La détermination quantitative de la nifédipine expulsée dans le surnageant et l'efficacité d'encapsulation sont également explorés. L'efficacité d'encapsulation correspond à la quantité de substance active encapsulée dans les SLN comparée à la quantité totale de substance active initialement utilisée pour la préparation des SLN, elle s'exprime selon la formule suivante :

ÉQUATION 3 : CALCUL DE L'EFFICACITÉ D'ENCAPSULATION

$$\text{efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{quantité de substance active encapsulée}}{\text{quantité de substance active initiale}} * 100$$

La méthode directe et la méthode indirecte sont utilisées pour déterminer l'efficacité d'encapsulation et déterminer la concentration de nifédipine retrouvée dans le surnageant au cours du temps. Pour séparer les SLN de la phase aqueuse, les échantillons sont centrifugés à 100 000×G et filtrés sur filtre seringue (membrane en ester de cellulose, taille des pores 0,22 µm). Ensuite, pour la méthode indirecte, le surnageant est dilué avec du méthanol (mélange 50-50) et analysé par HPLC pour quantifier la nifédipine expulsée et la nifédipine solubilisée dans la phase aqueuse. Pour la méthode directe, le culot récupéré après la centrifugation et contenant les SLN sont solubilisés avec un mélange eau-méthanol (50-50) pour casser les SLN. Le mélange eau-méthanol-SLN est ensuite analysé par HPLC pour quantifier la nifédipine encapsulée dans les SLN.

C. Résultats expérimentaux

1. Influence et optimisation des paramètres opératoires

Afin d'étudier l'influence de paramètres opératoires sur une expérience, il est avisé de se baser sur une expérience témoin dont on connaît les valeurs des paramètres et les résultats obtenus avec ceux-ci. Cette expérience témoin sert ainsi de référence lors de l'analyse des résultats obtenus en faisant varier les paramètres.

Pour cette étude, un premier protocole de nanoprécipitation est utilisé comme expérience de référence. Ce premier protocole est élaboré de façon empirique, sans optimisation, après plusieurs essais en laboratoire. Les paramètres opératoires et la formulation utilisée pour cette expérience de référence sont réunis dans le Tableau 5 :

TABLEAU 5 : PARAMETRES OPERATOIRES ET FORMULATION DE L'EXPERIENCE DE REFERENCE

Paramètres opératoires	
Débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse	Injection manuelle, valeur inconnue
Temp d'agitation après injection de la phase organique (min)	10
Température de l'eau lors de l'injection (°C)	45
Température de refroidissement après l'agitation	Température ambiante
Concentration lipidique dans le mélange final (mg.g ⁻¹)	0,38
Formulation	
Phase aqueuse	Eau distillée
Solvant	Ethanol
Lipide	Acide stéarique
Polymère	PVP VA
Ratio lipide/polymère	1 : 2
Concentration lipidique dans le solvant (mg.g ⁻¹)	25
Concentration en polymère dans le solvant (mg.g ⁻¹)	50

Cette expérience de référence nous donne les résultats suivants :

- Taille des SLN : 255 ± 8 nm à T0, puis 274 ± 5 nm après 24 heures.
- PDI : 0,1 à T0 et à T24h.
- Potentiel Zeta : -21 ± 1 mV à T0 et -21 ± 1 mV à T24h.

Pour connaître leur influence sur la taille et la stabilité des SLN formées, les paramètres opératoires sont explorés l'un après l'autre, à partir de l'expérience de référence, en appliquant les variations présentées dans le Tableau 6. Pour chaque paramètre exploré, la variation donnant les meilleurs résultats par rapport à l'expérience de référence est sélectionnée pour la suite de l'étude. La formulation de l'expérience de référence reste inchangée durant les essais concernant les paramètres opératoires.

TABLEAU 6 : LISTE DES PARAMETRES OPERATOIRES ET LES VARIATIONS APPLIQUEES POUR ETUDIER LEUR INFLUENCE

Paramètres opératoires	Variations appliquées
Débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse (mL.min ⁻¹)	1 23
Temps d'agitation après injection de la phase organique (min)	0 10 20 30
Température de l'eau lors de l'injection (°C)	45 70
Température de refroidissement après l'agitation	Température ambiante Bain glacé à 3°C
Concentration lipidique dans le mélange finale (mg.g ⁻¹)	0,5 1 1,5 2 5

a. Débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse

Le débit d'injection est un paramètre qui n'était pas défini lors de l'expérience de référence car elle a été réalisée avant l'acquisition du pilote injecteur. Avec le pilote injecteur il est possible de définir le débit d'injection, un faible débit (1 mL.min⁻¹) et un débit maximal possible avec le pilote injecteur (23 mL.min⁻¹) sont testés pour étudier l'influence du débit d'injection sur la taille et la stabilité des SLN formées.

Pour rappel, le reste des paramètres opératoires utilisés sont les mêmes que pour l'expérience de référence (Tableau 5). Les résultats obtenus pour ces deux expériences sont représentés sous forme de graphiques dans l'Annexe 1 (p. 82) et réunis ci-dessous dans le Tableau 7 :

TABLEAU 7 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU DEBIT D'INJECTION A T=0h, T=24h ET T=72h.

Débit d'injection (mL.min ⁻¹)	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
1	202,9 ± 6,7	0,169 ± 0,025	-29,0 ± 1,2
23	117,7 ± 6,0	0,223 ± 0,016	-26,5 ± 0,7

Débit d'injection (mL.min ⁻¹)	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
1	279,7 ± 3,8	0,057 ± 0,027	-22,6 ± 2,0
23	514,8 ± 2,1	0,072 ± 0,033	-16,5 ± 0,6

Débit d'injection (mL.min ⁻¹)	Taille (nm)	Résultats à T=72h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
1	299,6 ± 2,6	0,072 ± 0,031	-23,1 ± 2,2
23	532,4 ± 1,7	0,078 ± 0,042	-18,7 ± 0,7

Les résultats montrent que les SLN sont légèrement plus petites avec le débit fort (en moyenne 117,7 nm à T=0 h contre 202,9 nm pour le débit faible) lors de leur formation, mais augmentent vite en taille avec le temps jusqu'à atteindre une taille supérieure à 500 nm. Les SLN formées à faible débit grossissent également au cours du temps jusqu'à atteindre 300 nm. Cette augmentation de taille peut être due à l'agrégation entre les particules dont le potentiel Zeta diminue au cours du temps ; moins de répulsions électriques entre les particules signifie qu'elles ont tendance à plus s'agréger [66]. Le PDI est acceptable pour les deux expériences (la population de particules est homogène) [102].

Le débit fort (23 mL.min⁻¹) a été choisi pour la suite des expériences aucun lipide n'est retrouvé à la surface de l'eau avec le débit fort, contrairement au débit faible qui ne permet pas de disperser toute la phase organique et dont une partie remonte à la surface de l'eau. Toute la phase organique n'est pas dispersée avec le débit faible car celle-ci voit sa viscosité augmenter dans la seringue en raison de la vitesse d'injection trop faible. En effet, la phase organique est légèrement chauffée pour mieux solubiliser le lipide dans l'éthanol et refroidie dans la seringue (qui est non chauffée) si l'injection est trop longue. De plus, la taille des SLN à T=0 h est moindre avec le débit fort.

b. Temps d'agitation après injection de la phase organique

Après l'injection de la phase organique, les deux phases sont mélangées à l'aide d'un agitateur magnétique à une vitesse de 700 rpm (vitesse maximale pour le montage). Une expérience est réalisée avec le débit sélectionné précédemment (23 mL.min⁻¹) et les autres paramètres de l'expérience de référence. Après injection de la phase organique, un prélèvement des SLN formées est fait après 0, 10, 20 et 30 minutes d'agitation.

Les données obtenues pour cette expérience sont réunies dans le Tableau 8 et sous forme de graphiques dans l'Annexe 1 (p. 83).

On remarque que plus le temps d'agitation augmente, plus les SLN formées sont grosses et plus la population de particules est polydisperse (le PDI est plus grand quand le temps d'agitation augmente). Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Lepeltier en 2013 sur la nanoprécipitation ou encore Balavandy en 2014, montrant qu'un temps d'agitation faible permet d'obtenir des SLN de plus petite taille [105] [106].

Ainsi, un temps d'agitation de 3 minutes est choisi pour la suite des expériences car l'expérience sans agitation présente des lipides en surface de la phase aqueuse après injection.

TABLEAU 8 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU TEMPS D'AGITATION A T=0H, T=24H ET T=96H.

Temps d'agitation (min)	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
0	239,8 ± 8,2	0,088 ± 0,022	-20,9 ± 0,4
10	283,3 ± 6,0	0,151 ± 0,017	-22,0 ± 0,4
20	318,0 ± 6,2	0,227 ± 0,019	-20,4 ± 0,9
30	356,1 ± 7,7	0,320 ± 0,006	-20,8 ± 1,1

Temps d'agitation (min)	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
0	295,0 ± 4,7	0,055 ± 0,016	-22,2 ± 0,3
10	306,3 ± 3,5	0,119 ± 0,077	-25,1 ± 1,0
20	358,4 ± 2,9	0,099 ± 0,042	-23,9 ± 0,2
30	452,9 ± 8,7	0,157 ± 0,016	-24,6 ± 0,8

Temps d'agitation (min)	Taille (nm)	Résultats à T=96h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
0	486,5 ± 5,1	0,039 ± 0,012	-20,0 ± 0,3
10	495,0 ± 4,6	0,047 ± 0,034	-20,8 ± 0,5
20	705,7 ± 7,6	0,183 ± 0,055	-20,4 ± 0,3
30	501,2 ± 6,8	0,259 ± 0,045	-17,3 ± 0,8

c. Température de l'eau lors de l'injection

La phase aqueuse est chauffée lors de l'injection de la phase organique et pendant le temps d'agitation. Lors de l'expérience de référence, l'eau est chauffée à 45°C. Avec les nouveaux paramètres sélectionnés, des nouvelles expériences sont réalisées avec une eau à température ambiante, une eau chauffée à 45°C et une eau chauffée à 70°C.

Les comparaisons des résultats obtenus sont exposées dans le Tableau 9 et sous forme de graphiques dans l'Annexe 1 (p. 84). Seuls les résultats pour l'eau à température ambiante ne sont pas exposés car cette expérience n'a pas permis d'obtenir des SLN : les particules obtenues ont une taille moyenne de 1118 nm et sont très polydisperses (PDI = 0,684).

Les données montrent que l'on obtient des SLN plus petites à T=0 h avec l'eau chauffée à 70°C, de plus le potentiel Zeta est grand en valeur absolue (supérieur à +30 mV ou -30 mV) avec l'eau à 70°C ce qui est favorable à la stabilité des SLN. Ces résultats sont dus au fait que la température de fusion de l'acide stéarique est comprise entre 69 et 72°C ; lors de l'injection de la phase organique dans la phase aqueuse chauffée à 70°C celui-ci fond et permet une meilleure dispersion. De plus, d'après Huang et Zhang [107], le coefficient de diffusion (qui définit la capacité d'une substance à diffuser dans une autre) du solvant dans l'eau augmente lorsque la température augmente ainsi le solvant diffuse mieux dans l'eau permettant un meilleur ajustement de la taille des nanoparticules. Ils ont ainsi observé une diminution de la taille des nanoparticules de 100 nm lorsque la température de la phase aqueuse augmente de 0 à 80°C.

Pour ces raisons, la température de l'eau choisie lors de l'injection de la phase organique et lors du temps d'agitation est de 70°C.

TABEAU 9 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE DE L'EAU LORS DE L'AGITATION A T=0H, T=24H ET T=96H

Température de l'eau (°C)	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
45	255,0 ± 7,7	0,088 ± 0,040	-21,2 ± 1,2
70	156,3 ± 3,8	0,106 ± 0,009	-34,9 ± 2,3
Température de l'eau (°C)	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
45	273,0 ± 5,1	0,111 ± 0,011	-21,3 ± 1,4
70	285,7 ± 3,9	0,065 ± 0,048	-30,8 ± 0,6
Température de l'eau (°C)	Taille (nm)	Résultats à T=96h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
45	291,6 ± 2,2	0,113 ± 0,024	-16,2 ± 2,1
70	291,1 ± 5,7	0,098 ± 0,023	-28,9 ± 1,9

d. Température de refroidissement après l'agitation

Lors de l'expérience de référence, la solution finale est refroidie à température ambiante après l'agitation. Ici, une deuxième expérience est réalisée avec un refroidissement dans de l'eau à 3°C pour comparer l'impact de la vitesse de refroidissement sur la taille et la stabilité des SLN.

Les résultats des expériences avec refroidissement à température ambiante ou avec refroidissement à 3°C sont réunis dans le Tableau 10 ou représentés sous forme de graphiques dans l'Annexe 1 (p.85).

On observe des SLN plus petites et plus stables (potentiel Zeta proche des -30mV) avec le refroidissement à 3°C. Ces résultats mettent en évidence qu'une température de refroidissement plus faible favorise la cristallisation complète et plus rapide du lipide en nanoparticules. Le refroidissement à 3°C est choisi pour la suite des expériences.

TABEAU 10 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE DE REFROIDISSEMENT A T=0H, T=24H ET T=96H

Température de refroidissement	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Température ambiante (TA)	239,8 ± 8,2	0,168 ± 0,022	-20,9 ± 0,4
3°C	160,5 ± 1,0	0,161 ± 0,013	-28,0 ± 2,1

Température de refroidissement	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
TA	358,7 ± 4,8	0,075 ± 0,016	-20,8 ± 0,3
3°C	305,1 ± 4,5	0,062 ± 0,004	-26,2 ± 0,3

Température de refroidissement	Taille (nm)	Résultats à T=96h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
TA	486,5 ± 3,5	0,039 ± 0,031	-20,0 ± 0,4
3°C	328,7 ± 0,7	0,039 ± 0,032	-25,1 ± 0,8

e. Concentration lipidique dans le mélange final

Les expériences concernant la concentration lipidique ne permettent pas seulement de déterminer quelle concentration lipidique permet d'obtenir les SLN les plus petites et stables mais aussi de déterminer la concentration maximale de lipide incorporable dans le mélange final sans interférer sur la qualité des SLN formées (en termes de taille et stabilité).

En effet, plus la concentration lipidique augmente dans le mélange final, plus le nombre de SLN pouvant être formées à partir de cet échantillon final augmente. Il est intéressant d'augmenter le nombre de SLN formées pour chaque opération de nanopréciipitation afin d'optimiser le rendement de cette expérience. De plus, l'augmentation de la concentration en lipide permet également d'augmenter la concentration de substance active dans le mélange final (à concentration constante entre le lipide et la substance active).

Pour augmenter la concentration lipidique dans le mélange final il y a deux façons de procéder :

- On peut augmenter la concentration lipidique dans la solution organique sans modifier le volume d'injection : dans l'expérience de référence la concentration lipidique dans l'éthanol est de 25 mg.g⁻¹, elle est augmentée jusqu'à 100 mg.g⁻¹ car au-delà de cette concentration la viscosité de la phase organique est trop importante pour permettre l'injection de celle-ci dans la phase aqueuse.
- On peut augmenter le volume d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse.

Lors de cette expérience, la concentration lipidique dans l'éthanol choisie est de 50 mg.g⁻¹ car les résultats étaient semblables à ceux avec la concentration lipidique dans l'éthanol de l'expérience de référence (25 mg.g⁻¹). La phase organique concentrée à 100 mg.g⁻¹ n'est pas sélectionnée car la viscosité de celle-ci ne permet pas la bonne dispersion du lipide dont une partie sédimente en amas au fond de l'échantillon (Figure 30).

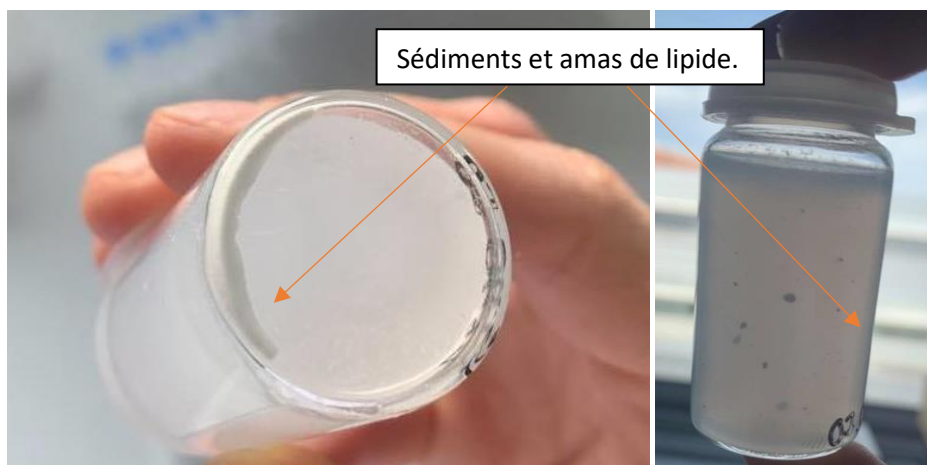


FIGURE 30 : PHOTO D'UN ECHANTILLON DE SLN FORMEES AVEC UNE PHASE ORGANIQUE CONCENTREE A $100\text{MG}\cdot\text{G}^{-1}$ (LIPIDE/ETHANOL)

Après avoir fixé la concentration lipidique dans l'éthanol à $50\text{ mg}\cdot\text{G}^{-1}$ plusieurs essais sont réalisés en augmentant le volume d'injection, toujours dans le but d'augmenter la concentration lipidique dans le mélange final.

Pour rappel, l'expérience de référence a une concentration lipidique dans le mélange final de $0,38\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Ici les essais sont réalisés avec des concentrations de $0,5$; 1 ; $1,5$; 2 et $5\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Pour se faire, les volumes de phase lipidique injectés sont respectivement de $2,1$; $4,2$; $6,3$; $8,4$ et $21,0\text{ ml}$. Les résultats de ces expériences sont réunis dans le Tableau 11 et sous forme de graphique dans l'Annexe 1 (p.86).

L'augmentation de la concentration lipidique a augmenté la taille des SLN qui lors de l'expérience précédente était inférieure à 200 nm à $T=0\text{ h}$. Néanmoins les SLN semblent stables dans le temps : lors de l'expérience précédente sur la température de refroidissement, la taille des SLN doublait entre $T=0\text{ h}$ et $T=96\text{ h}$ (pour le refroidissement à 3°C , la taille des SLN à $T=0\text{ h}$ était de $160,5 \pm 1,0\text{ nm}$ contre $328,7 \pm 0,7\text{ nm}$ à $T=96\text{ h}$) : la taille augmente seulement de quelques dizaines de nanomètres. On remarque donc une assez forte augmentation de la taille à $T=0\text{ h}$ lors de l'augmentation de la concentration lipidique : 160 nm avant augmentation contre environ 225 nm lors des essais d'augmentation de la concentration lipidique. On observe aussi une meilleure stabilité au cours du temps et une faible influence sur l'homogénéité de la population de SLN (le PDI reste acceptable hormis pour l'expérience à $5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

Seule l'expérience avec une concentration en lipide de $5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ présente un PDI supérieur à la limite fixée de $0,2$ lors de la formation à $T=0\text{ h}$. La population de SLN formée est plus dispersée que dans les autres expériences. On remarque que tout le lipide n'a pas été dispersé sous forme de SLN avec l'apparition de flaques de lipide en surface. Cette mauvaise dispersion du lipide lors de cette expérience peut être due à l'augmentation de viscosité de la formulation. L'augmentation de la quantité de lipide et du volume injecté (ici 21 ml soit un volume presque trois fois supérieur à l'expérience précédente concentrée à $2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de lipide) dans la phase finale a augmenté la viscosité de celle-ci rendant les forces de cisaillement dues à l'agitation magnétique plus faibles [104]. Les forces de cisaillement trop faibles n'ont pas pu disperser tout le lipide dont une partie est remontée en surface de la phase aqueuse.

On peut donc conclure que l'expérience avec une concentration lipidique de 5 mg.g⁻¹ ne peut pas être choisie pour la suite des expériences car tout le lipide n'est pas dispersé. On choisit l'expérience avec laquelle tout le lipide est dispersé, stable, homogène en taille et avec laquelle on peut incorporer le maximum de nifédipine. On peut supposer que plus on augmente la quantité de lipide, plus il est possible d'incorporer des grandes quantités de nifédipine car un seul ratio lipide/nifédipine est utilisé dans la suite des expériences. Aussi pour ces raisons, la concentration lipidique dans le mélange final choisie est celle à 2mg.g⁻¹ car c'est la concentration la plus grande avec laquelle on obtient des résultats corrects en termes de taille et de stabilité.

TABLEAU 11 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION LIPIDIQUE DANS LE MELANGE FINAL A T=0H, T=24H ET T=96H

Concentration lipidique dans le mélange final (mg.g⁻¹)	Volume injecté (ml)	Taille (nm)	Résultats à T=0h PDI	Potentiel Zeta (mV)
0,5	2,1	248,6 ± 2,2	0,142 ± 0,044	-32,0 ± 1,3
1	4,2	237,0 ± 4,6	0,104 ± 0,029	-28,6 ± 2,2
1,5	6,3	219,9 ± 3,2	0,085 ± 0,011	-25,6 ± 0,2
2	8,4	222,0 ± 1,0	0,085 ± 0,016	-25,4 ± 0,7
5	21,0	212,3 ± 2,0	0,205 ± 0,005	-25,6 ± 0,9

Concentration lipidique dans le mélange final (mg.g⁻¹)	Volume injecté (ml)	Taille (nm)	Résultats à T=24h PDI	Potentiel Zeta (mV)
0,5	2,1	279,6 ± 2,6	0,170 ± 0,042	-31,0 ± 1,0
1	4,2	245,6 ± 2,4	0,110 ± 0,016	-28,4 ± 0,3
1,5	6,3	233,1 ± 1,6	0,088 ± 0,014	-23,0 ± 1,4
2	8,4	238,1 ± 1,3	0,102 ± 0,019	-25,2 ± 2,3
5	21,0	240,9 ± 1,7	0,140 ± 0,024	-20,2 ± 1,0

Concentration lipidique dans le mélange final (mg.g⁻¹)	Volume injecté (ml)	Taille (nm)	Résultats à T=96h PDI	Potentiel Zeta (mV)
0,5	2,1	276,7 ± 2,7	0,124 ± 0,036	-29,8 ± 1,1
1	4,2	254,4 ± 2,2	0,106 ± 0,006	-31,3 ± 1,0
1,5	6,3	240,6 ± 0,9	0,088 ± 0,014	-24,3 ± 2,7
2	8,4	241,1 ± 2,4	0,084 ± 0,024	-32,4 ± 0,3
5	21,0	231,5 ± 0,3	0,139 ± 0,004	-30,6 ± 0,9

f. Conclusion sur l'optimisation des paramètres opératoires

L'étude de l'influence des paramètres opératoires à savoir :

- Le débit d'injection de la phase organique
- Le temps d'agitation lors du mélange des phases
- La température du mélange pendant l'agitation
- La température de refroidissement
- La concentration lipidique dans la solution finale

Les paramètres sélectionnés sont les suivants :

TABEAU 12 : RESUME DES VARIATIONS OPERATOIRES SELECTIONNEES

Paramètres opératoires	Variation sélectionnée
Débit d'injection (mL.min ⁻¹)	23
Temps d'agitation (min)	3
Température du mélange (°C)	70
Température de refroidissement (°C)	3
Concentration lipidique dans la phase finale (mg.g ⁻¹)	2

Les résultats obtenus avec tous ces paramètres et la comparaison entre l'expérience de référence et l'expérience optimisée est décrite dans le Tableau 13.

TABEAU 13 : COMPARAISON ENTRE L'EXPERIENCE DE REFERENCE ET L'EXPERIENCE OPTIMISEE

		Expérience de référence	Expérience optimisée
T = 0h	Taille (nm)	255,1 ± 7,7	222,0 ± 1,0
	PDI	0,094 ± 0,042	0,085 ± 0,016
	Potentiel Zeta (mV)	-21,2 ± 1,2	-23,6 ± 0,9
T = 24 h	Taille (nm)	273,8 ± 5,1	232,3 ± 1,1
	PDI	0,112 ± 0,013	0,085 ± 0,016
	Potentiel Zeta (mV)	-21,3 ± 1,4	-25,4 ± 0,7
T = 96 h	Taille (nm)	Non étudié	241,1 ± 2,4
	PDI	Non étudié	0,084 ± 0,024
	Potentiel Zeta (mV)	Non étudié	-32,4 ± 0,3

L'optimisation des paramètres a permis une légère diminution de la taille des SLN. Cette diminution aurait pu être plus marquée si la concentration lipidique n'avait pas été augmentée lors de la dernière expérience (SLN à T=0 h avant l'augmentation de la concentration lipidique : 160,5 ± 1,0 nm). Le PDI quant à lui est correcte dans les deux expériences et révèle que les SLN formées sont homogènes en taille. Le potentiel Zeta, légèrement plus élevé dans l'expérience

optimisée permet de diminuer ou de ralentir le grossissement des SLN mais reste faible pour garantir une stabilité dans le temps.

Les paramètres de l'expérience optimisée sont conservés pour l'étude de la formulation.

2. Criblage de la formule

La formule d'une dispersion de SLN par nanopréciipitation se compose généralement d'une phase aqueuse contenant de l'eau avec parfois un tensioactif, et une phase organique contenant un lipide solide à température ambiante, un tensioactif et une substance active lipophile.

Dans cette étude, aucun tensioactif connus pour provoquer des irritations cutanées n'est utilisé pour éviter des problèmes de tolérance par voie transdermique, mais un polymère amphiphile jouant le rôle d'un tensio-actif le remplace et de la phosphatidylcholine est ajoutée à la phase organique comme co-tensioactif naturel. Le criblage de la formule comprend l'étude du :

- Changement de polymère
- Ratio lipide / polymère
- L'ajout de phosphatidylcholine
- Changement de lipide

Pour chaque ratio ou excipient étudié, les paramètres opératoires précédemment optimisés sont utilisés, la taille et la stabilité des SLN obtenues sont analysées afin de déterminer les éléments les plus pertinents pour l'obtention de SLN petites et stables. L'expérience de référence pour l'étude du screening de la formule est la dernière expérience réalisée précédemment, à savoir celle avec les paramètres optimisés mais la formule non optimisée, cette expérience est résumée dans le Tableau 14.

TABEAU 14 : EXPERIENCE DE REFERENCE POUR LE SCREENING DE LA FORMULE

Paramètres opératoires optimisés	
Débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse	23 mL.min ⁻¹
Temp d'agitation après injection de la phase organique	3 min
Température de l'eau lors de l'injection	70 °C
Température de refroidissement après l'agitation	3 °C
Concentration lipidique dans le mélange finale	2 mg.g ⁻¹
Formule non optimisée	
Phase aqueuse	Eau distillée
Solvant	Ethanol absolu
Lipide	Acide stéarique
Polymère	PVP VA
Ratio lipide/polymère	1 : 2
Concentration lipidique dans le solvant	25 mg.g ⁻¹
Concentration en polymère dans le solvant	50 mg.g ⁻¹
Phosphatidylcholine	Non ajoutée

Résultats obtenus	
T = 0 h	Taille : $222,0 \pm 1,0$ nm PDI : $0,085 \pm 0,016$ Potentiel Zeta : $-23,6 \pm 0,9$ mV
T = 24 h	Taille : $232,3 \pm 1,1$ nm PDI : $0,085 \pm 0,016$ Potentiel Zeta : $-25,4 \pm 0,7$ mV
T = 96 h	Taille : $241,1 \pm 2,4$ nm PDI : $0,084 \pm 0,024$ Potentiel Zeta : $-32,4 \pm 0,3$ mV

Les changements d'excipients et variations de ratios réalisés à partir de cette expérience de référence sont énoncés dans le Tableau 15 :

TABLEAU 15 : LISTE DES VARIATIONS APPLIQUEES POUR L'ETUDE DE LA FORMULE

Paramètres	Variations appliquées
Changement de polymère	PVP VA PVP K30 Poloxamer 188 SoluPlus®
Changement du ratio lipide / polymère	1 : 2 1 : 5 1 : 10
Ajout de lécithine	25 mg
Changement de lipide	Acide stéarique Précirrol ATO 5

Les paramètres sont étudiés les uns après les autres dans l'ordre exposé dans ce tableau. Les résultats obtenus pour chaque variation sont comparés entre eux et avec l'expérience de référence. Les variations permettant d'obtenir les SLN les plus petites et les plus stables sont sélectionnées pour chaque paramètre. La substance active est incorporée à la formule comprenant les paramètres sélectionnés à la fin de ces essais.

h. Changement de polymère

Un polymère est une macromolécule composée d'un grand nombre de répétitions d'un ou plusieurs monomères liés ensemble par des liaisons covalentes. Par leur taille et leur composition, les polymères sont des molécules potentiellement moins irritantes que les tensioactifs classiques retrouvés dans la préparation des SLN comme les tensioactifs non-ioniques (les Tween® et les Span® qui sont respectivement les polysorbates et les esters de sorbitane) et surtout les tensioactifs ioniques (sodium cholâtes et ses dérivés) à de fortes concentrations [108] [109]. Il est intéressant d'observer les effets du changement de polymère dans la formule car les polymères sont des molécules dont les propriétés peuvent varier et dépendent du type d'assemblage entre les monomères, du degré de polymérisation ou encore de la nature chimique des monomères. Ainsi, pour les polymères amphiphiles, l'équilibre

hydrophile/lipophile (HLB) peut varier entre les différents polymères modifiant donc leur pouvoir tensioactif et la taille des SLN ainsi obtenues. De plus l'impact du polymère sur la viscosité de la phase lipidique exerce également une influence sur la taille et la stabilité des SLN [110]. Les différents polymères disponibles au laboratoire sont testés aux mêmes ratios que dans la formule de référence. Les résultats obtenus avec les différents polymères sont réunis dans le Tableau 16 et également représentés sous forme de graphiques dans l'Annexe 2 (p.87).

TABLEAU 16 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU POLYMERE UTILISE A T=0H, T=24H, T=48H ET T=96H

Polymère utilisé dans la formule	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
PVP VA (formule de référence)	222,0 ± 0,9	0,120 ± 0,005	-23,6 ± 0,9
PVP K30	234,2 ± 2,6	0,219 ± 0,007	-34,7 ± 3,5
Poloxamer 188	62,6 ± 6,4	0,181 ± 0,012	-32,1 ± 3,3
SoluPlus®	645,8 ± 40,7	0,704 ± 0,012	-32,4 ± 1,0

Polymère utilisé dans la formule	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
PVP VA (formule de référence)	232,2 ± 1,1	0,085 ± 0,016	-25,4 ± 0,7
PVP K30	270,0 ± 3,5	0,180 ± 0,006	-33,7 ± 0,2
Poloxamer 188	886,2 ± 29,8	0,489 ± 0,061	-28,0 ± 2,5
SoluPlus®	870,5 ± 48,7	0,554 ± 0,145	-28,5 ± 3,5

Polymère utilisé dans la formule	Taille (nm)	Résultats à T=48h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
PVP VA (formule de référence)	238,1 ± 1,3	0,102 ± 0,019	-25,2 ± 2,3
PVP K30	268,6 ± 0,5	0,146 ± 0,022	-31,1 ± 2,1
Poloxamer 188	-	-	-
SoluPlus®	-	-	-

Polymère utilisé dans la formule	Taille (nm)	Résultats à T=168h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
PVP VA (formule de référence)	244,6 ± 1,2	0,095 ± 0,023	-34,9 ± 0,2
PVP K30	272,8 ± 3,4	0,129 ± 0,022	-31,3 ± 1,7
Poloxamer 188	-	-	-
SoluPlus®	-	-	-

Les résultats montrent que le PVP VA et le PVP K30 donnent des SLN d'environ 250 nm ayant une stabilité satisfaisante. Les résultats obtenus avec ces deux polymères sont similaires car ils ont une composition proche ; ce sont tous les deux des polyvinylpyrrolidones, et donc leurs propriétés tensioactives sont assez semblables. Concernant le Poloxamer 188® et le SoluPlus®, ces deux polymères ont donné des SLN très instables, avec des PDI très supérieurs à 0,2 après 24 heures voir dès T0 pour le SoluPlus®.

L'étude avec le SoluPlus® est arrêtée après ces essais en raison de la trop forte instabilité et de la taille trop importante des SLN à la formation (SLN à T0 = 645,8 nm) à cette concentration, d'autre concentration n'ont pas été explorées pour ce polymère.

Pour la suite des essais, le PVP K30® et le Poloxamer 188® sont conservés. Malgré l'instabilité des SLN formées avec le Poloxamer 188®, leur très faible taille à T0 est intéressante (seulement 62,6 nm) et l'optimisation du reste de la formule permet peut-être de stabiliser les essais avec le Poloxamer 188®. En raison des propriétés similaires entre le PVP VA® et le PVP K30®, seul le PVP K30® est choisi pour la suite de l'étude car il permettait d'avoir une phase lipidique à la viscosité plus faible que le PVP VA (meilleures propriétés de dispersion). La phase lipidique contenant le PVP K30 ayant une viscosité plus faible, celle-ci s'injecte plus facilement et se disperse mieux dans la phase aqueuse lors de l'agitation.

i. Etude du ratio lipide / polymère

Le ratio entre le lipide et le polymère est de 1:2 dans la formule de référence. Ce ratio peut être modifié afin d'améliorer la capacité d'encapsulation et la taille des SLN [111]. Des formules contenant des quantités croissantes de polymère (PVP K30® et Poloxamer 188® avec un ratio lipide/polymère de 1:2, 1:5, 1:10) sont testées, mais les résultats de ces expériences présentées dans le Tableau 17 et dans l'Annexe 2 (p.88) ne permettent pas de mettre en évidence une réelle influence du changement de ratio lipide/polymère sur la taille et la stabilité des SLN.

Pour cette raison le ratio le plus faible entre le lipide et le polymère, soit le ratio 1:2 (comme utilisé dans la formule de référence), est conservé pour la suite des expériences afin de ne pas consommer plus d'excipients que nécessaire.

TABLEAU 17 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU RATIO ENTRE LE LIPIDE ET LE POLYMER A T=0H, T=24H, T=48H ET T=168H

Ratio lipide : polymère	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30 (1:2)	234,2 ± 2,6	0,219 ± 0,007	-34,7 ± 3,5
AS + PVP K30 (1:5)	261,0 ± 10,61	0,227 ± 0,048	-32,1 ± 1,6
AS + PVP K30 (1:10)	271,9 ± 3,2	0,187 ± 0,013	-25,1 ± 0,4
AS + Poloxamer 188 (1:2)	62,6 ± 6,4	0,180 ± 0,012	-32,1 ± 3,3
AS + Poloxamer 188 (1:5)	222,9 ± 1,2	0,119 ± 0,013	-24,9 ± 4,2
AS + Poloxamer 188 (1:10)	191,1 ± 1,1	0,233 ± 0,003	-23,2 ± 0,6

Ratio lipide : polymère	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30 (1:2)	270,0 ± 3,5	0,180 ± 0,006	-33,7 ± 0,2
AS + PVP K30 (1:5)	278,1 ± 1,6	0,186 ± 0,027	-31,5 ± 1,6
AS + PVP K30 (1:10)	272,9 ± 4,9	0,188 ± 0,022	-25,2 ± 0,4
AS + Poloxamer 188 (1:2)	886,2 ± 29,8	0,489 ± 0,061	-28,0 ± 2,5
AS + Poloxamer 188 (1:5)	2139,0 ± 107,7	0,874 ± 0,006	-23,0 ± 3,4
AS + Poloxamer 188 (1:10)	2169,0 ± 164	0,945 ± 0,069	-23,6 ± 2,9

Ratio lipide : polymère	Taille (nm)	Résultats à T=48h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30 (1:2)	268,6 ± 0,5	0,146 ± 0,022	-31,1 ± 2,1
AS + PVP K30 (1:5)	276,0 ± 2,4	0,133 ± 0,019	-30,7 ± 1,3
AS + PVP K30 (1:10)	269,1 ± 1,7	0,188 ± 0,022	-26,8 ± 0,9
AS + Poloxamer 188 (1:2)	-	-	-
AS + Poloxamer 188 (1:5)	-	-	-
AS + Poloxamer 188 (1:10)	-	-	-

Ratio lipide : polymère	Taille (nm)	Résultats à T=168h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30 (1:2)	272,8 ± 3,4	0,129 ± 0,022	-31,3 ± 1,7
AS + PVP K30 (1:5)	272,3 ± 6,42	0,166 ± 0,024	-26,3 ± 1,1
AS + PVP K30 (1:10)	266,8 ± 5,5	0,169 ± 0,025	-26,5 ± 0,8
AS + Poloxamer 188 (1:2)	-	-	-
AS + Poloxamer 188 (1:5)	-	-	-
AS + Poloxamer 188 (1:10)	-	-	-

j. Etude de l'ajout de phosphatidylcholine (PC)

La phosphatidylcholine (PC) est un glycérophospholipide contenant un résidu de choline. C'est une substance produite par l'organisme humain, jouant un rôle dans la structuration des membranes des cellules et dans la signalisation cellulaire [112]. On la retrouve en grande quantité dans la bile mais aussi le jaune d'œuf et le soja. La PC est grandement utilisée dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique comme solubilisant ou émulsifiant dans les émulsions huile-dans-eau grâce à ses propriétés tensioactives [113] [114].

L'ajout de PC est intéressant dans cette étude car elle représente une alternative aux tensioactifs classiques (comme les tensioactifs ioniques et non-ioniques cités précédemment) potentiellement irritants. Au contraire, la phosphatidylcholine est un lipide essentiel à la composition de membranes cellulaires des êtres vivants, elle est donc non-toxique et bien tolérée par la peau [114]. L'ajout de PC comme émulsifiant dans l'optimisation de la formule doit permettre de réduire la taille des SLN en augmentant la surface de contact entre l'eau et le lipide (cela réduit la tension de surface entre les SLN et l'eau, permettant une réduction de leur taille) [115].

Pour étudier l'effet de la phosphatidylcholine, celle-ci est ajoutée à 12,5 mg.g⁻¹ d'éthanol absolu dans la formule de référence. Les graphiques ci-dessous (Figure 31 et 32) comparent les résultats obtenus entre la formule de référence (Tableau 5) avec ou sans PC :

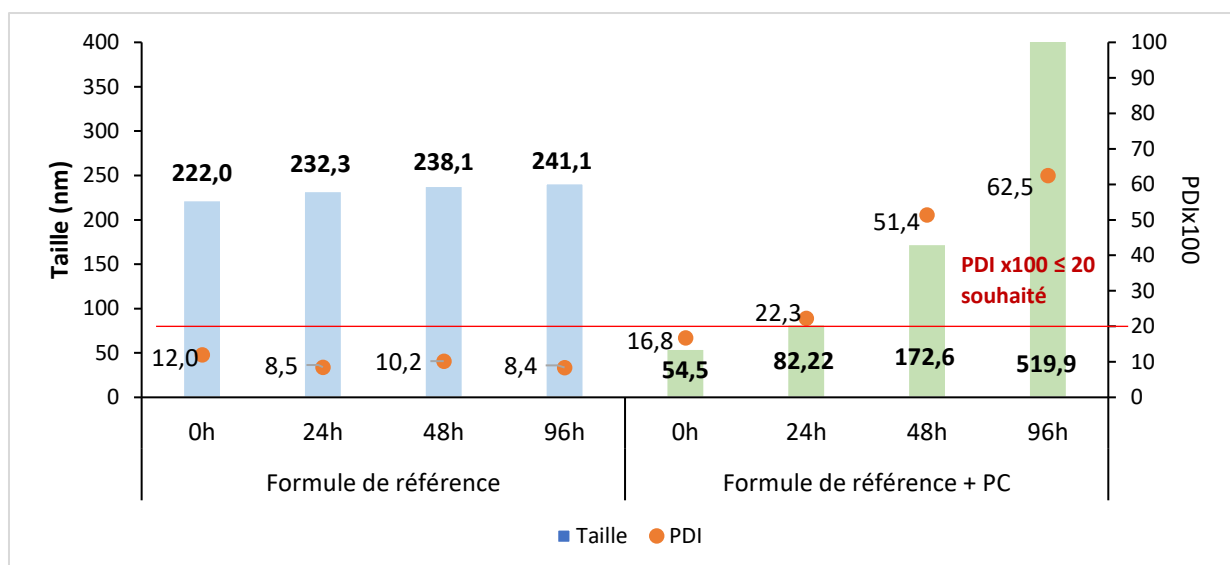


FIGURE 31 : TAILLE ET PDIX100 DES SLN OBTENUES EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA PRESENCE DE PC DANS LA FORMULE DE REFERENCE

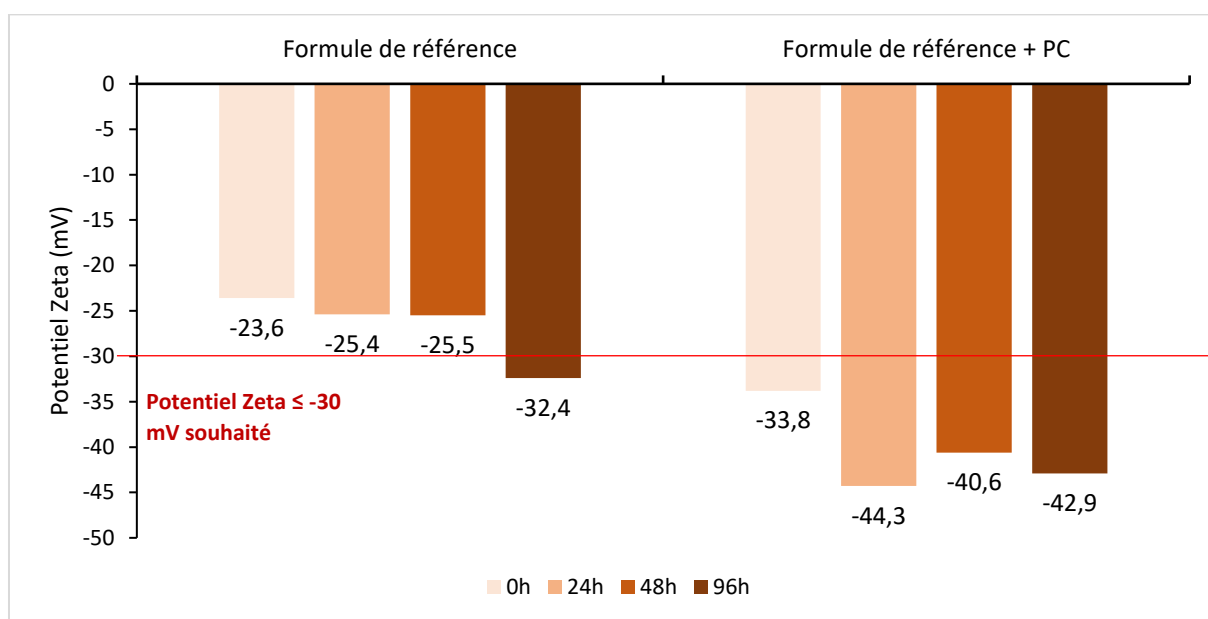


FIGURE 32 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LE POTENTIEL ZETA DES SLN EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA PRESENCE DE PC DANS LA FORMULE DE REFERENCE

On remarque une très nette diminution de taille après l'ajout de la PC dans la formule de référence. Notamment à T0, lors de la formation, les SLN formées avec la phosphatidylcholine comme co-émulsifiant ont une taille de 54,5 nm contre 222,0 nm pour la formule de référence sans PC. Néanmoins si la taille diminue avec l'ajout de la PC dans la formule, le PDI et la dispersion de taille augmentent. On remarque que le PDI augmente fortement entre T0 et T96h, cela indique que la dispersion de SLN est de plus en plus hétérogène en termes de taille de particule. Cela se traduit également sur la taille moyenne des SLN qui est multipliée par 10 entre T0 et T96h, contrairement à la formule sans PC qui reste stable en termes de taille et de PDI pendant 96 heures.

Le potentiel Zeta est légèrement plus élevé dans la formule avec PC car elle agit comme un tensioactif sur les particules en augmentant les interactions répulsives, mais ne permet pas de stabiliser la dispersion. Il est possible que la formule avec PC soit moins stable en raison de la formation de systèmes micellaires (micelles ou liposomes) entre la phosphatidylcholine et l'eau distillée ou encore par la formation de multicouches de PC autour des SLN [95].

Malgré ces problèmes de stabilité, la formule contenant la PC permet d'obtenir des SLN ayant une taille inférieure à 100 nm et stables ($PDI < 0,2$) pendant les premières 24 heures ce qui est compatible avec une application transdermique (stables assez longtemps pour réaliser des tests transcutanés qui sont effectués sur une durée de 24 heures [91] et une taille permettant le passage transcutané à savoir inférieur à 100 nm [87]). Pour cette raison la phosphatidylcholine est conservée dans la formule pour la suite des expériences en vue d'optimiser la préparation des SLN.

k. Changement de lipide

Le lipide joue un rôle important dans la formation des SLN, des lipides ayant des caractéristiques différentes comme le caractère lipophile ou la viscosité, peuvent influencer la formation des SLN [116]. Pour cette raison, l'acide stéarique a été remplacé par un autre lipide disponible au laboratoire : le Précirol ATO 5®, afin de comparer les SLN obtenues avec ces deux lipides. Comme deux polymères ont été sélectionnés précédemment, pour la suite des expériences, quatre formules sont comparées afin de tester tous les couples lipide/polymère à savoir :

- Acide stéarique + PVP K30®
- Acide stéarique + Poloxamer 188®
- Précirol ATO 5® + PVP K30®
- Précirol ATO 5® + Poloxamer 188®

Ces quatre formules contiennent de la phosphatidylcholine (à $12,5 \text{ mg.g}^{-1}$ d'éthanol comme sélectionné précédemment pour la diminution de taille des SLN) et le ratio entre le lipide et le polymère est de 1:2 également comme sélectionné dans les expériences précédentes. Les résultats obtenus avec ces 4 formules sont résumés dans le Tableau 18 ci-dessous et sous forme de graphiques dans l'Annexe 2 (p.89).

TABLEAU 18 : TAILLE, PDI ET POTENTIEL ZETA DES ECHANTILLONS EN FONCTION DU COUPLE LIPIDE/POLYMER A T=0h, T=24h, T=48h ET T=96h

Couple lipide/polymère	Taille (nm)	Résultats à T=0h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30	$54,5 \pm 0,1$	$0,168 \pm 0,007$	$-33,8 \pm 0,8$
Acide stéarique + Poloxamer 188	$57,8 \pm 0,9$	$0,227 \pm 0,012$	$-51,6 \pm 2,4$
Précirol ATO 5 + PVP K30	$70,9 \pm 0,6$	$0,273 \pm 0,027$	$-52,7 \pm 1,6$
Précirol ATO 5 + Poloxamer 188	$98,6 \pm 1,5$	$0,321 \pm 0,020$	$-58,6 \pm 2,7$

Couple lipide/polymère	Taille (nm)	Résultats à T=24h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30	82,2 ± 1,1	0,223 ± 0,007	-44,3 ± 1,5
Acide stéarique + Poloxamer 188	138,3 ± 4,5	0,444 ± 0,056	-43,1 ± 3,0
Précirrol ATO 5 + PVP K30	70,6 ± 1,6	0,259 ± 0,015	-41,7 ± 0,6
Précirrol ATO 5 + Poloxamer 188	95,1 ± 0,6	0,318 ± 0,004	-53,3 ± 2,3

Couple lipide/polymère	Taille (nm)	Résultats à T=48h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30	172,6 ± 2,9	0,514 ± 0,065	-40,6 ± 0,7
Acide stéarique + Poloxamer 188	692,6 ± 29,27	0,730 ± 0,087	-41,6 ± 7,6
Précirrol ATO 5 + PVP K30	69,9 ± 0,3	0,268 ± 0,027	-49,7 ± 1,4
Précirrol ATO 5 + Poloxamer 188	92,5 ± 1,6	0,299 ± 0,045	-39,0 ± 0,8

Couple lipide/polymère	Taille (nm)	Résultats à T=96h	
		PDI	Potentiel Zeta (mV)
Acide stéarique + PVP K30	519,9 ± 9,2	0,625 ± 0,034	-42,9 ± 1,6
Acide stéarique + Poloxamer 188	-	-	-
Précirrol ATO 5 + PVP K30	68,7 ± 0,4	0,247 ± 0,019	-37,6 ± 2,1
Précirrol ATO 5 + Poloxamer 188	94,0 ± 0,3	0,268 ± 0,011	-41,6 ± 3,0

Ces essais permettent de mettre en évidence l'influence du lipide sur la formation des SLN car les SLN obtenues diffèrent selon le lipide utilisé. Les résultats montrent que le Précirrol ATO 5® permet d'obtenir des SLN plus stables qu'avec l'acide stéarique : les essais avec le Précirrol ATO 5® ont une taille constante pendant 96 heures contrairement aux essais avec l'acide stéarique qui deviennent instables (augmentation de taille et de PDI) après 48 heures pour le couple Acide Stéarique (AS) + PVP K30 et après 24 heures pour le couple AS + Poloxamer 188.

Le PDI reste un peu élevé pour les essais avec le Précirrol ATO 5® (légèrement supérieur à 0,2) mais reste constant tout au long des essais ce qui prouve que la population de SLN reste homogène en termes de taille. Le potentiel Zeta reste également relativement stable durant les essais et pour les deux lipides.

Le Précirrol ATO 5® semble être un meilleur candidat que l'acide stéarique pour l'obtention d'une formulation de SLN optimisée pour l'application transdermique (SLN plus petites et plus stables), mais les deux lipides vont continuer à être étudiés dans la suite des essais portant sur l'efficacité d'encapsulation et le suivi de la stabilité (suivi de la nifédipine expulsée au cours du temps). Seule la formule contenant le couple AS + Poloxamer 188® est retiré de la suite des essais car c'est la seule formule dont les SLN formées ont une taille supérieure à 100 nm, 24h après leur formation. Or, pour rappel, afin d'être utilisées pour une application transdermique, les SLN formées doivent avoir une taille idéalement inférieure à 100 nm (favorise le passage transcutané) et être stable pendant minimum 24 heures (permettant d'effectuer les tests transdermiques) [87] [91].

I. Conclusion sur le criblage de la formulation

Le criblage de la formulation comprenait l'étude du :

- Changement de polymère.
- Changement du ratio lipide/polymère.
- L'ajout de phosphatidylcholine.
- Changement du couple lipide/polymère.

Le criblage avait pour but d'optimiser la formulation de référence afin d'obtenir des SLN d'environ 100 nm et stables pendant minimum 24 heures. L'étude du criblage de la formulation a permis de déterminer l'influence de chaque changement sur la formation de SLN. Aussi il a été mis en évidence que la phosphatidylcholine permet une forte diminution de la taille des SLN mais impacte négativement la stabilité de celles-ci (augmentation de la taille et du PDI au cours du temps excepté pour la formule contenant le Précirol ATO 5® et le PVP K30® où seul le potentiel zeta est affecté). Cependant, l'étude a mis en évidence que le changement de ratio entre le lipide et le polymère influence peu la taille et la stabilité des SLN. Concernant le changement de polymère et le changement de lipide, les différents couples lipide/polymère montrent que les SLN de Précirol ATO 5® sont mieux stabilisées par les polymères que les SLN d'acide stéarique et que les polymères PVP K30® et Poloxamer 188® permettent d'obtenir de meilleurs résultats en termes de taille que les autres polymères malgré un manque de stabilité pour les formules avec le Poloxamer 188.

Après le criblage de la formulation, les formules optimisées sélectionnées pour la suite des expériences sont réunies dans le Tableau 19 ci-dessous. Les formules optimisées (1, 2 et 3) sont comparées, à 24 heures, à la formule de référence avant screening (mais après l'optimisation des paramètres) pour montrer l'amélioration de la taille et de la stabilité des SLN après l'optimisation de la formule.

TABLEAU 19 : COMPARAISON ENTRE LES FORMULES OPTIMISEES APRES SCREENING ET LA FORMULE DE REFERENCE AVANT SCREENING

	Lipide (50mg.g ⁻¹ d'éthanol)	Polymère (25 mg.g ⁻¹ d'éthanol)	Ratio lipide/polymère	Présence de PC (12.5 mg.g ⁻¹ d'éthanol)	Taille après 24 h (nm)	PDI après 24 h	Potentiel Zeta après 24 h (mV)
Formule 1	Ac. stéarique	PVP K30	1 :2	Oui	82,2 ± 1,1	0,223 ± 0,007	-44,3 ± 1,5
Formule 2	Précirol ATO 5	PVP K30	1 :2	Oui	70,6 ± 1,6	0,259 ± 0,015	-41,7 ± 0,6
Formule 3	Précirol ATO 5	Poloxamer 188	1 :2	Oui	95,1 ± 0,6	0,318 ± 0,004	-53,3 ± 2,3
Formule de référence	Ac. stéarique	PVP VA	1 :2	Non	232,2 ± 1,1	0,085 ± 0,016	-25,4 ± 0,7

3. Suivi de stabilité et efficacité d'encapsulation

Dans ces essais la nifédipine a été incorporée aux formules sélectionnées précédemment. La nifédipine est ajoutée à hauteur de 10% de la quantité du lipide (soit 5 mg.g⁻¹ d'éthanol) dans les trois formules optimisées. Le choix d'ajouter 10% de nifédipine est dû à des tests réalisés préalablement et montrant que 10% de nifédipine est la quantité maximale que l'on peut introduire dans la formulation sans impacter la taille et la stabilité des SLN. Les résultats de ces expériences sont présentés sous forme de graphique dans l'Annexe 3 (p.90).

Ces trois formules sont étudiées au cours du temps afin de déterminer leur stabilité vis-à-vis de la nifédipine, à savoir : les formules sont-elles en mesure d'encapsuler la nifédipine (calcul de l'efficacité d'encapsulation à T0) et les formules entraînent-elles une expulsion de la nifédipine encapsulée au cours du temps (quantification de la nifédipine présente dans le surnageant au cours du temps). L'expulsion de la nifédipine encapsulée au cours du temps de ces trois formules est d'abord évaluée qualitativement par microscopie optique à lumière polarisée puis une évaluation quantitative est réalisée par HPLC pour déterminer à T0 l'efficacité d'encapsulation et la nifédipine présente dans le surnageant au cours du temps. Pour l'efficacité d'encapsulation, la dispersion de SLN est centrifugée et le culot contenant les SLN est récupéré et dilué dans un mélange eau-méthanol (50-50) avant d'être analysé par HPLC afin de déterminer la nifédipine encapsulée dans les SLN. Concernant la quantification au cours du temps de la nifédipine présente dans le surnageant, ce dernier est récupéré après centrifugation puis dilué dans un mélange eau-méthanol (50-50) avant d'être analysé par HPLC.

a. Evaluation qualitative de la stabilité

Afin de déterminer qualitativement la stabilité des SLN dans les trois formules sélectionnées, des photos des dispersions de SLN sont prises au cours du temps afin de visualiser l'apparition ou non de cristaux de nifédipine en dehors des SLN, signe que toute la nifédipine n'est encapsulée ou qu'une partie est expulsée au cours de temps. Des premières photos sont prises de la nifédipine seule (non-encapsulée) et des trois formules exemptes la nifédipine. Ces photos sont prises grâce à un microscope optique à lumière polarisée et d'une caméra (Figure 33). Ces photos permettent de distinguer les SLN de la nifédipine non-encapsulée dans les photos suivantes.

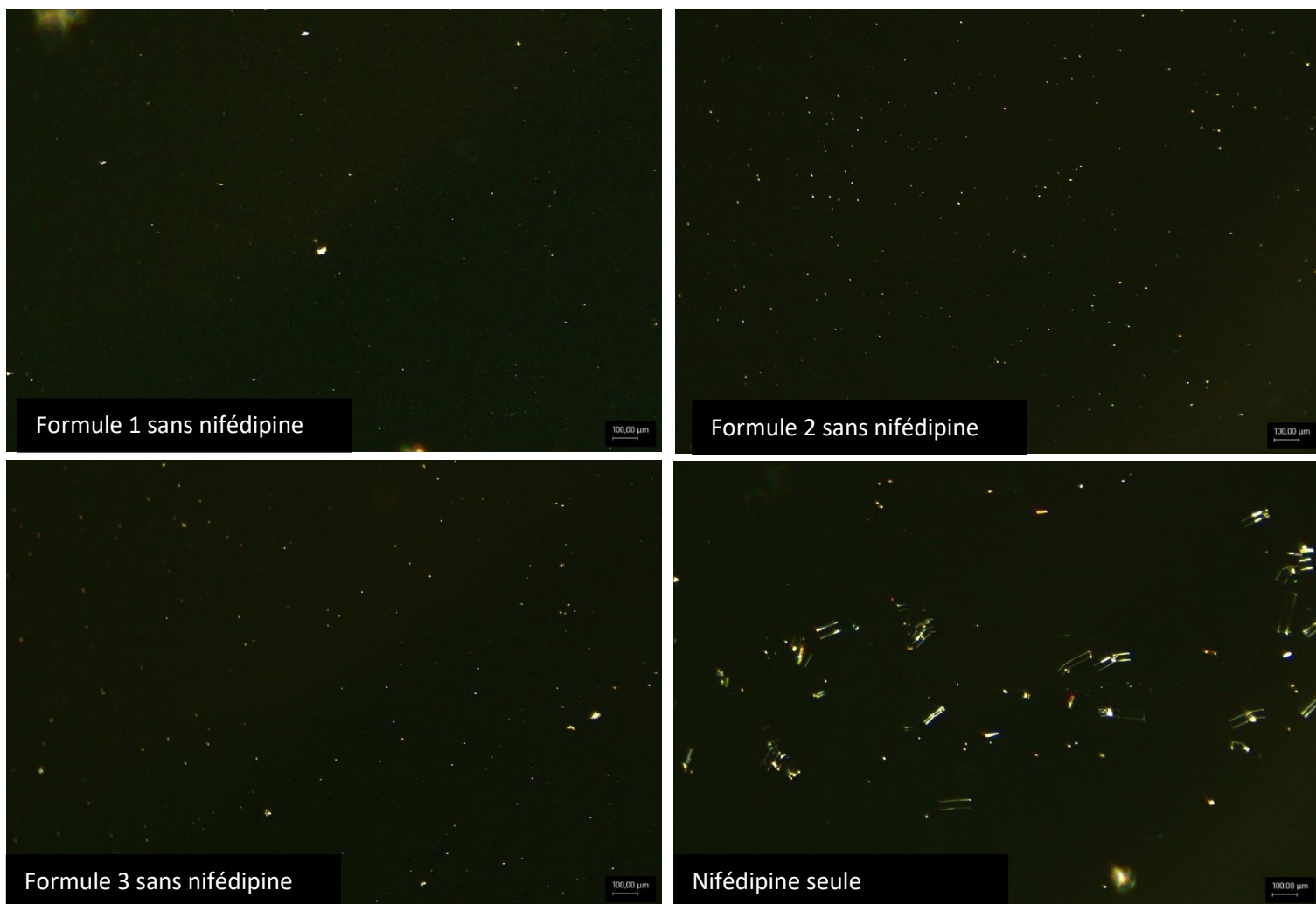


FIGURE 33 : PHOTOGRAPHIE PRISE EN MICROSCOPIE OPTIQUE A LUMIERE POLARISEE D'ECHANTILLON DE FORMULE DE SLN ET DE NIFEDIPINE SEULE

Pour suivre la stabilité des SLN des trois formules sélectionnées, des photos sont prises de chaque formule contenant 10% de nifédipine (en % de lipide) à T0, T24h et T48h. Ces clichés sont présentés dans la Figure 34. Le résultat de ses clichés nous permet d'exclure la formule 3, seule formule contenant le Poloxamer 188 et également seule formule présentant de gros cristaux de nifédipine non-encapsulée facilement distinguables des autres éléments du cliché et cela dès T0. La présence de ces cristaux pourrait indiquer que toute la nifédipine de cette formule n'est pas encapsulée ou que celle-ci n'est pas stable dans le temps et expulse une partie de la nifédipine.

A l'inverse les photos au cours du temps des formules 1 et 2, contenant toutes les deux le PVP K30, présentent des points brillants qui pourraient être des cristaux de nifédipine, néanmoins ceux-ci sont trop petits pour être clairement identifiables. Ces photos ne permettent pas de mettre en évidence une différence qualitative de stabilité entre les formules 1 (acide stéarique + PVP K30) et 2 (Précirrol ATO 5® + PVP K30). Aussi, l'efficacité d'encapsulation et l'analyse quantitative de la stabilité au cours du temps sont effectuées sur la formule 2 car il a été déterminé précédemment que les polymères stabilisent mieux les SLN de Précirrol ATO 5® (cf. Tableau 18 sur le changement de lipide p.78).



FIGURE 34 : PHOTOGRAPHIES AU COURS DU TEMPS DES DIFFERENTES FORMULES DE SLN CONTENANT DE LA NIFEDIPINE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE A LUMIERE POLARISEE

b. Evaluation quantitative de l'efficacité d'encapsulation

L'évaluation quantitative de l'efficacité d'encapsulation est réalisée sur la Formule 2 (Précirol ATO 5 : 50 mg.g⁻¹ d'éthanol, PVP K30 : 25 mg.g⁻¹ d'éthanol, Phosphatidylcholine : 12.5 mg.g⁻¹ d'éthanol) contenant 10 % de nifédipine (en % du lipide) soit dans ces expériences 200 µg.g⁻¹ de dispersion de SLN finale. L'échantillon de Formule 2 est analysé 5 fois par HPLC (à T=0 , T= 60 min, T= 150 min, T= 210 min et T=24 h soit 1440 min) après centrifugation et filtration du surnageant sur filtre-seringue. La filtration sur filtres seringues risque de retenir une partie de la nifédipine non-encapsulée sur le filtre car les cristaux peuvent être trop petits pour sédimenter. Cette technique de filtration est la plus simple à mettre en place dans les conditions du laboratoire mais d'autres techniques doivent être explorées dans la suite du projet pour séparer les SLN de la phase aqueuse comme la lyophilisation ou la dialyse.

Le culot est dilué avec un mélange eau-méthanol pour casser les SLN et pouvoir analyser la quantité de nifédipine encapsulée à T0. L'analyse du culot par HPLC nous donne une concentration de nifédipine dans la dispersion de SLN de 80 µg.g⁻¹ soit d'après la formule de l'efficacité d'encapsulation :

ÉQUATION 4 CALCUL EXPERIMENTAL DE L'EFFICACITE D'ENCAPSULATION (%)

$$\text{efficacité d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{concentration de substance active encapsulée}}{\text{concentration de substance active initiale}} * 100$$

La concentration de substance active initiale étant de 200 µg.g⁻¹, l'efficacité d'encapsulation de la formule 2 est de 40%, ce n'est pas une haute efficacité d'encapsulation mais c'est une valeur moyenne de l'ordre de celles retrouvées dans la littérature [117] [118].

Après filtration, le surnageant est dilué dans un mélange eau-méthanol puis analysé par HPLC pour connaître la quantité de nifédipine solubilisée, non-encapsulée et expulsée. Cette opération est répétée au cours du temps sur un totale de 24 heures, afin de suivre l'évolution de la concentration de nifédipine dans le surnageant et de déduire la stabilité de la formule. Les résultats de la quantification de la nifédipine au cours du temps dans le surnageant sont représentés sur la Figure 36.

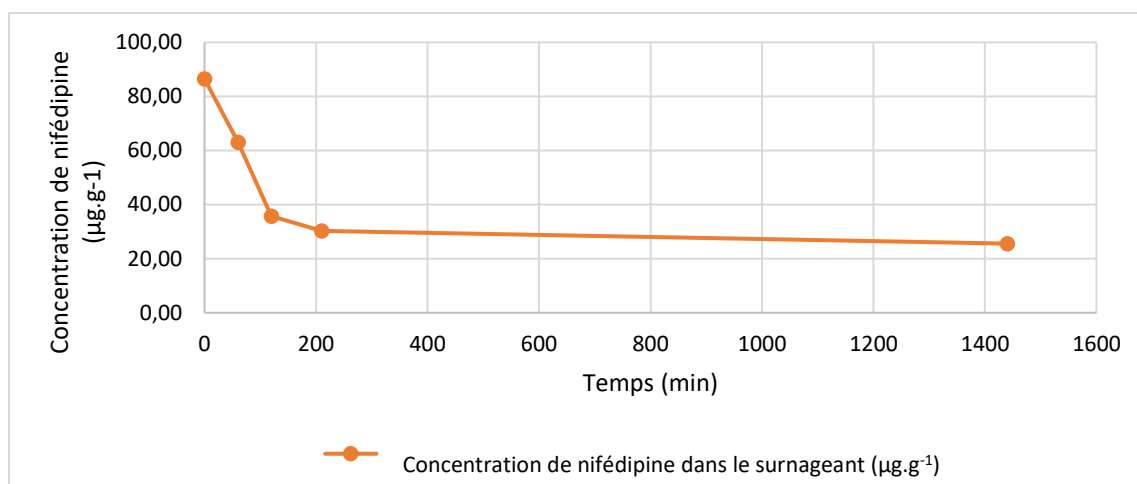


FIGURE 35 : CONCENTRATION DE NIFÉDIPINE RETROUVEE DANS LE SURNAGEANT AU COURS DU TEMPS, ANALYSEE PAR HPLC.

Dans le graphique de la Figure 36, on peut tout d'abord remarquer que la concentration de nifédipine dans le surnageant à T0 est d'environ $85 \mu\text{g.g}^{-1}$, une fois additionnée à la concentration retrouvée dans le culot à T0 ($80 \mu\text{g.g}^{-1}$) on obtient une concentration totale d'environ $165 \mu\text{g.g}^{-1}$, un résultat qui s'éloigne d'environ 17% de la concentration de nifédipine initialement utilisée dans la formule 2 ($200 \mu\text{g.g}^{-1}$). Ces 17% de nifédipine manquante semble confirmer l'hypothèse qu'une partie de la nifédipine est retenue sur le filtre-seringue lors de la filtration.

La concentration de nifédipine présente dans le surnageant au cours du temps semble diminué entre T0 et T=5h avant d'atteindre un plateau à environ $25 \mu\text{g.g}^{-1}$. Le plateau de $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ de nifédipine dans le surnageant pourrait correspondre seulement à la nifédipine solubilisée dans la phase aqueuse de la dispersion car la solubilité de la nifédipine dans l'eau pure est de $5-6 \mu\text{g.g}^{-1}$ [119]. Ici la solubilité de la nifédipine est plus grande à cause de la présence du polymère et de la PC qui jouent le rôle de tensioactif. Aussi on peut supposer que toute la nifédipine expulsée n'a pas pu se solubiliser. Les cristaux de nifédipine expulsée ont pu rester accrochés au filtre-seringue ou s'agréger aux SLN et se retrouver dans le culot après centrifugation. Comme le rapporte Danesmand & al. [120], il est difficile de quantifier la capacité d'encapsulation dans les SLN en raison notamment de la difficulté à séparer la phase aqueuse des SLN, et aussi en raison de la faible solubilité des substances actives lipophiles dans l'eau qui fausse les résultats de la quantification indirecte lorsque la substance active expulsée ne se retrouve pas dans le surnageant.

Il est donc difficile de conclure sur les résultats obtenus concernant la capacité d'encapsulation des SLN, d'autres analyses sont nécessaires et d'autres méthodes de séparations de la phase aqueuse des SLN doivent être explorées (dialyse, colonne de séparation ou encore lyophilisation [120]) pour pouvoir comparer aux résultats obtenus ici.

D. Conclusion de l'étude et perspectives

Le but de cette étude est de développer et optimiser une méthode de préparation de nanoparticules lipidiques solides permettant d'encapsuler des substances actives lipophiles ou peu solubles dans l'eau, ici, la nifédipine. La méthode de préparation choisie est la nanoprécipitation, et la formulation ne contient pas de tensioactif classique jugé trop irritant en vue d'une application transdermique des SLN mais un polymère et de la PC. La méthode de préparation ainsi que la formulation sont optimisées avec pour objectif d'obtenir des SLN homogènes d'environ 100 nm et stables pendant minimum 24 heures.

La nanoprécipitation par injection de solvant est démontrée comme étant une méthode simple et efficace pour obtenir des SLN. Les paramètres opératoires tels que les températures, le temps d'agitation ou la concentration lipidique sont optimisés pour réduire la taille des SLN et les stabiliser. Les SLN sont préparées à partir de différents lipides et polymères. En comparant les différents couples et ratios selon la taille et la stabilité des SLN obtenues, trois formules sont sélectionnées. Celle-ci permettaient d'obtenir des SLN inférieures à 100 nm pendant plus de 24 heures mais légèrement plus polydisperses que les formules précédentes en raison de l'ajout de phosphatidylcholine comme co-tensioactif qui peut former des structures micellaires dans la dispersion aqueuse.

Ces trois formules sont ensuite analysées par microscopie optique à lumière polarisée pour vérifier l'expulsion de la substance active. Le Poloxamer 188 a qualitativement démontré qu'il ne permet pas une bonne encapsulation de la substance active contrairement au PVP K30. Concernant les lipides testés, le Précirol ATO 5® est mieux stabilisé dans le temps grâce au polymère contrairement à l'acide stéarique, sans différence au niveau de la taille des SLN à la formation. La Figure 37 ci-dessous compare les résultats obtenus avant et après l'optimisation des paramètres et l'optimisation de la formule (en utilisant la formule optimisée contenant le Précirol ATO 5 et le PVP K30).

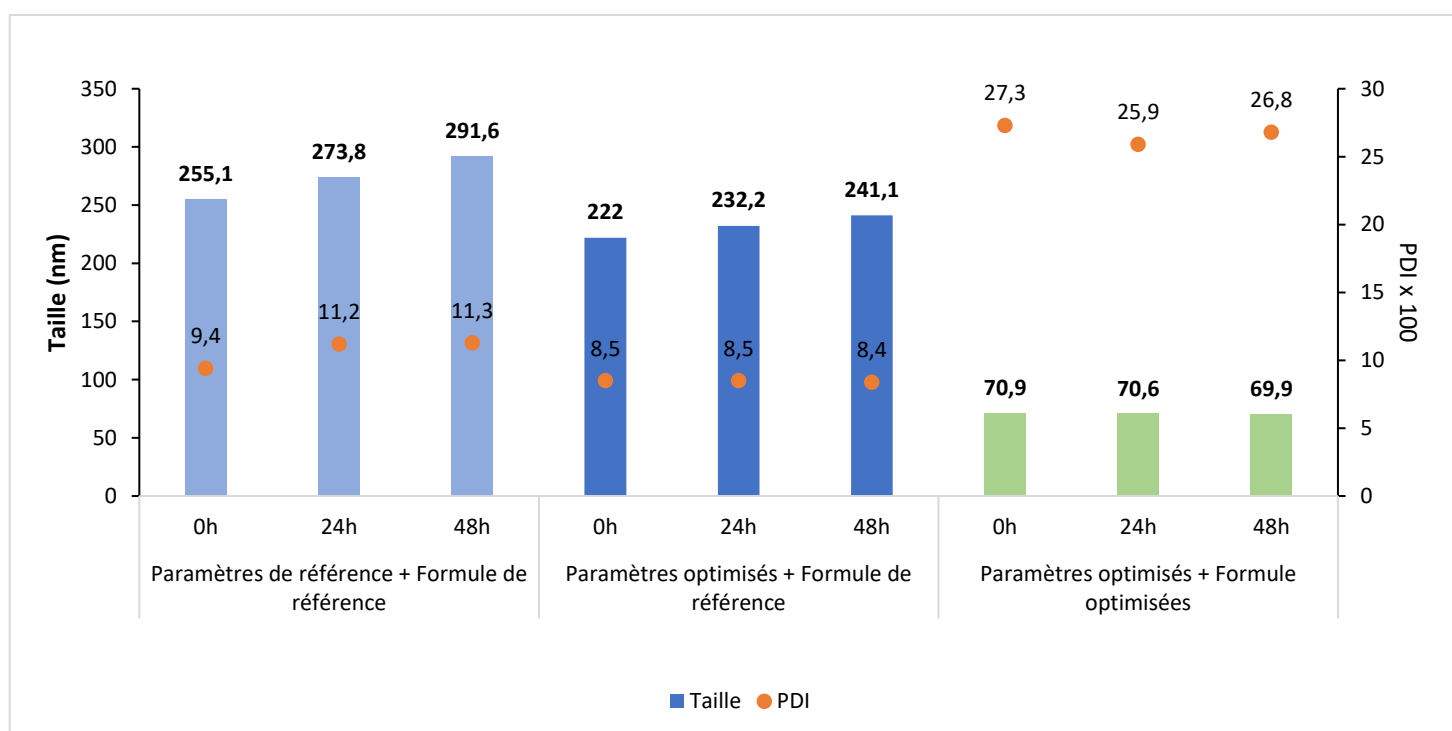


FIGURE 36 : GRAPHIQUE COMPARANT LA TAILLE ET LE PDI EN FONCTION DU TEMPS SELON LES ESSAIS

La formule optimisée contenant le Précirrol ATO 5® et le PVP K30 a été analysée par HPLC pour déterminer l'efficacité d'encapsulation et évaluer quantitativement la concentration de nifédipine présente dans le surnageant. Les résultats de ces expériences ne permettent pas d'apporter une réponse précise quant à l'efficacité d'encapsulation de cette formule : la séparation entre la nifédipine expulsée contenue dans la phase aqueuse et les SLN est difficile. D'autres expériences sont nécessaires pour séparer correctement les SLN de la phase aqueuse.

Conclusion

Dans cette thèse, les systèmes de transport et d'encapsulation nano-colloïdaux ont été décrits, en accordant une attention particulière aux nanoparticules lipidiques solides (SLN) comme système de délivrance de médicaments prometteurs [103]. Les systèmes nano-colloïdaux sont largement explorés pour améliorer la solubilité, la biodisponibilité et l'efficacité des médicaments et pour réduire leur toxicité et leurs effets secondaires (amélioration de la tolérance médicamenteuse) [121]. Plusieurs méthodes de préparation et de caractérisation des systèmes nano-colloïdaux ont été décrites dans la littérature [122].

Les SLN sont identifiées comme une classe particulièrement intéressante de systèmes nano-colloïdaux en raison de leur capacité à encapsuler une large gamme de molécules actives, de leur stabilité améliorée par rapport aux autres systèmes et de leur potentiel pour des applications dans divers domaines de la médecine [59]. Dans cette thèse, des approches de formulation sont étudiées, ainsi que l'influence des paramètres de formulation sur les propriétés physico-chimiques et la performance des SLN.

De nombreux défis sont identifiés pour le développement et la mise en œuvre des SLN en tant que systèmes de délivrance de médicaments. La production à grande échelle est un défi majeur, car il est nécessaire de maintenir la qualité, l'uniformité et la stabilité des SLN tout en augmentant l'échelle de production [123]. Les techniques de fabrication actuelles sont encore limitées en termes d'efficacité et de coûts, et de nouvelles approches devront être explorées pour surmonter ces limitations [124].

La compréhension approfondie des mécanismes d'interaction entre les SLN et les systèmes biologiques est essentielle pour optimiser leur performance en tant que systèmes de délivrance de médicaments [125]. Les mécanismes d'interaction incluent la libération du médicament, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination [126]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ces processus et concevoir des SLN plus efficaces [127].

L'évaluation de la toxicité et de la sécurité des SLN est un aspect crucial pour garantir leur acceptabilité clinique [66]. Bien que les SLN présentent généralement une toxicité réduite par rapport aux autres systèmes de délivrance de médicaments, il est important d'évaluer leur toxicité à long terme et leur biocompatibilité, en particulier lorsqu'elles sont utilisées pour des applications spécifiques, telles que l'administration ophtalmique ou la vaccination [128].

Les perspectives pour les SLN incluent l'exploration de nouvelles méthodes de préparation et de caractérisation, le développement de formulations multifonctionnelles pour la délivrance combinée de médicaments et l'amélioration de la précision du ciblage des SLN [129]. En outre, l'intégration des SLN avec d'autres technologies émergentes, telles que la thérapie génique, la médecine régénérative et les nanorobots, peut ouvrir de nouvelles voies pour la découverte et le développement de traitements innovants [130].

En conclusion, cette thèse a contribué à la compréhension des systèmes de transport et d'encapsulation nano-colloïdaux, en mettant l'accent sur les nanoparticules lipidiques solides. Les SLN ont été étudiées en termes de méthodes de formulation, de caractérisation et de performance, ainsi que de défis et d'opportunités pour leur application dans le domaine

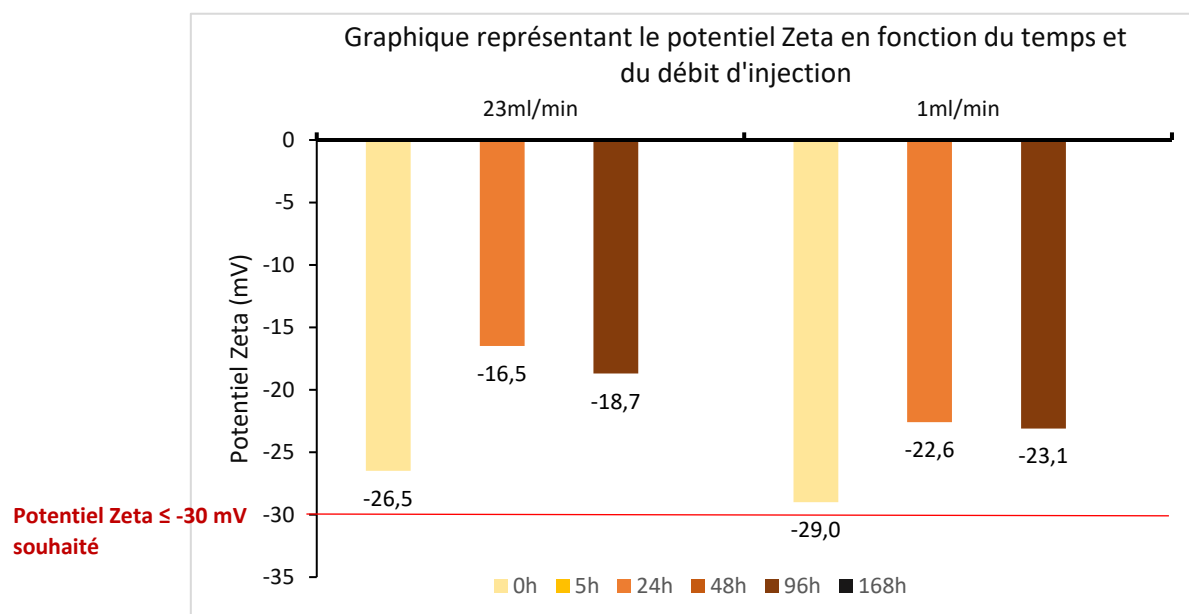
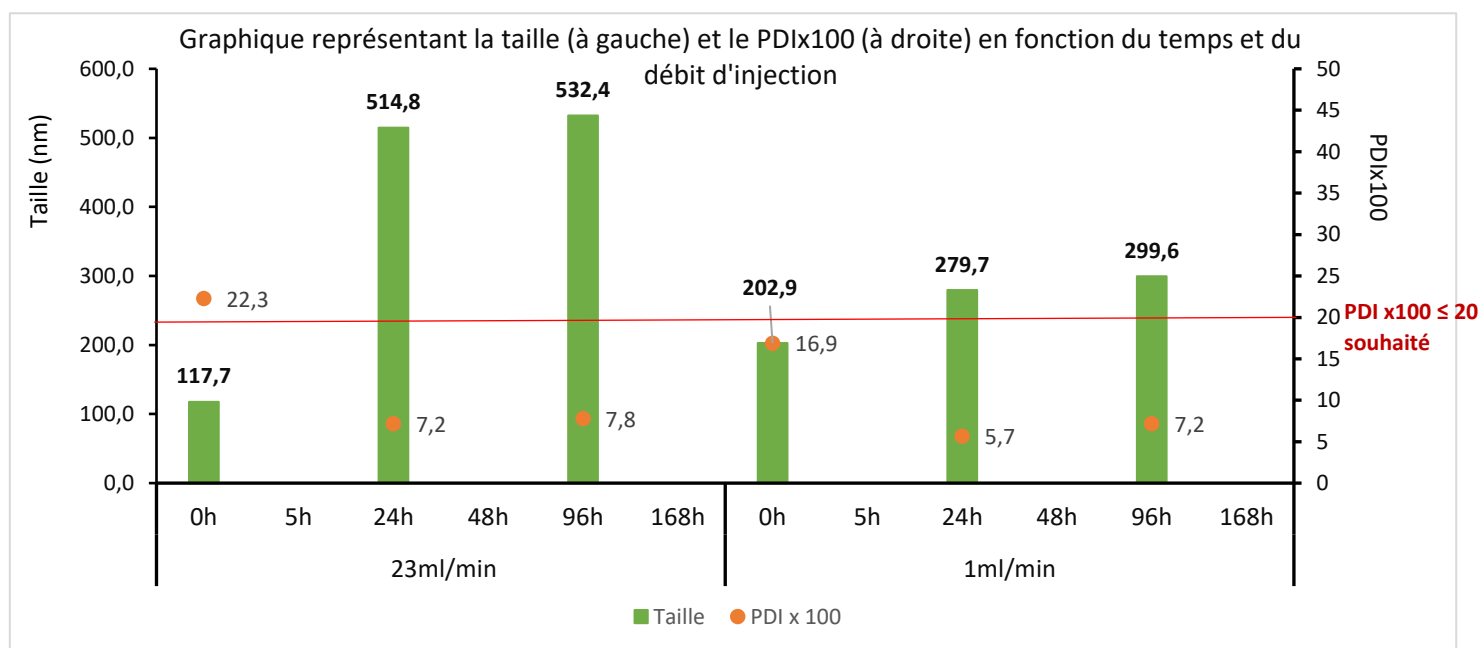
médical [131]. Les résultats obtenus soutiennent le potentiel des SLN en tant que système de délivrance de médicaments efficace et polyvalent, tout en soulignant les défis qui restent à surmonter pour assurer leur succès clinique [132].

Les recherches futures devront se concentrer sur l'amélioration des méthodes de fabrication, l'optimisation des interactions entre les SLN et les systèmes biologiques, et l'évaluation de la toxicité et de la sécurité à long terme [125]. Les travaux futurs devraient également envisager l'intégration des SLN avec d'autres technologies émergentes pour exploiter leur potentiel dans des applications médicales novatrices [133]. Enfin, l'accent devrait être mis sur le développement de formulations multifonctionnelles et de systèmes de ciblage précis pour maximiser l'efficacité des SLN en tant que systèmes de délivrance de médicaments [134].

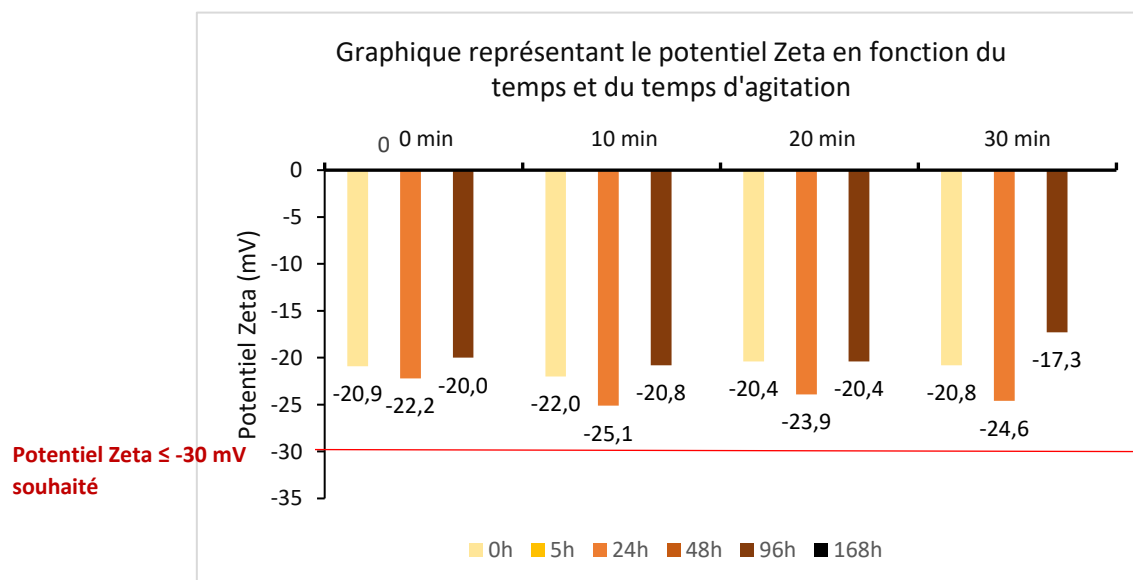
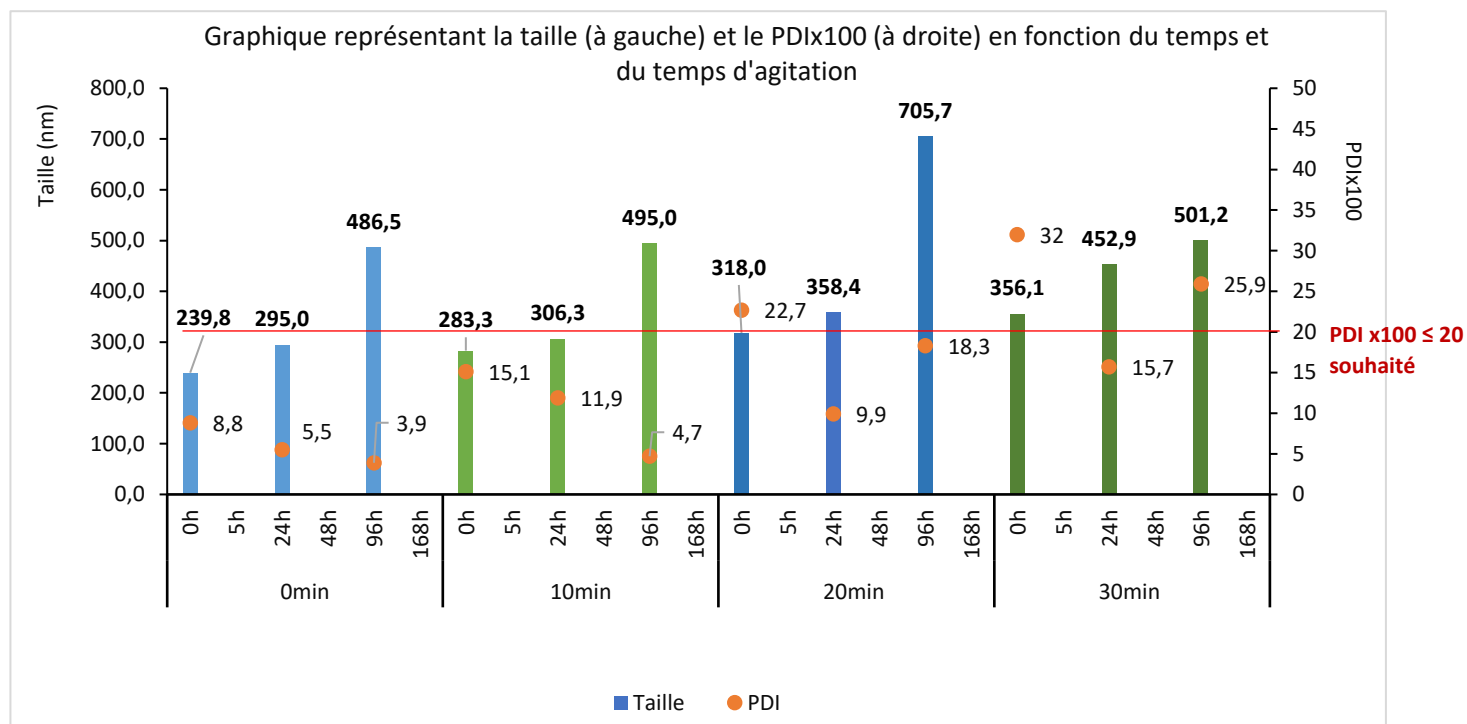
Annexe

Annexe 1 : Graphiques des résultats obtenus pour l'étude de l'influence et l'optimisation des paramètres opératoires

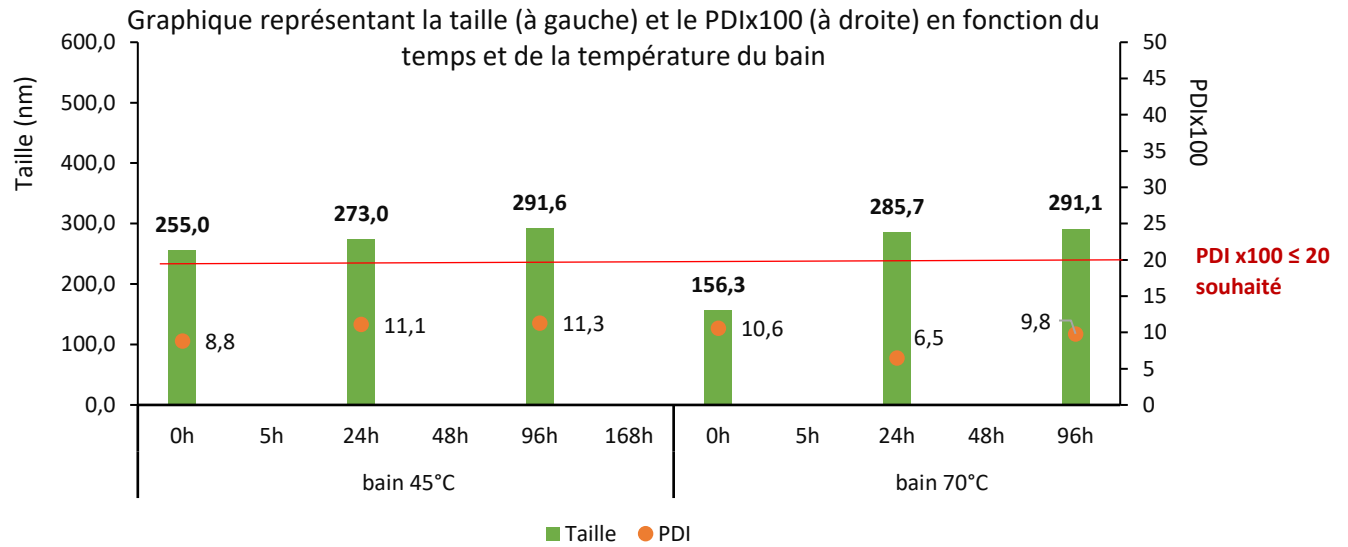
Débit d'injection



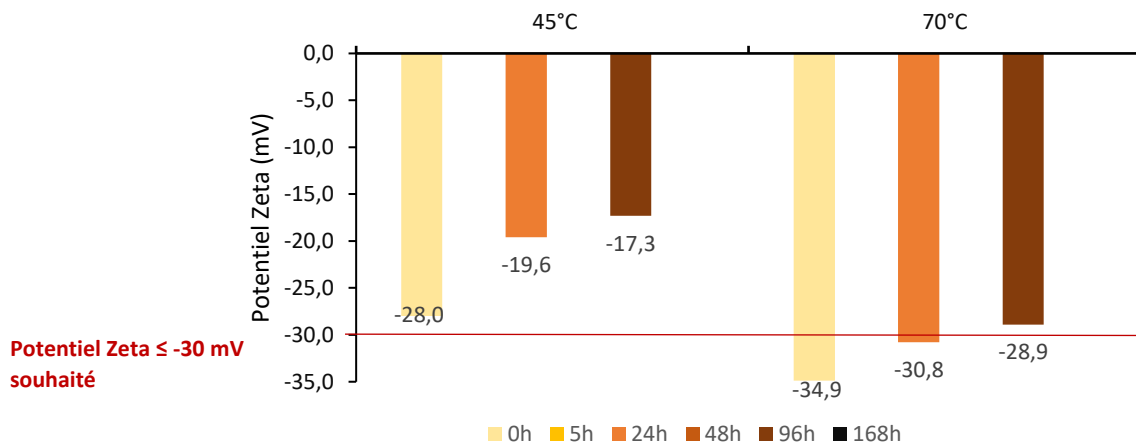
Temps d'agitation



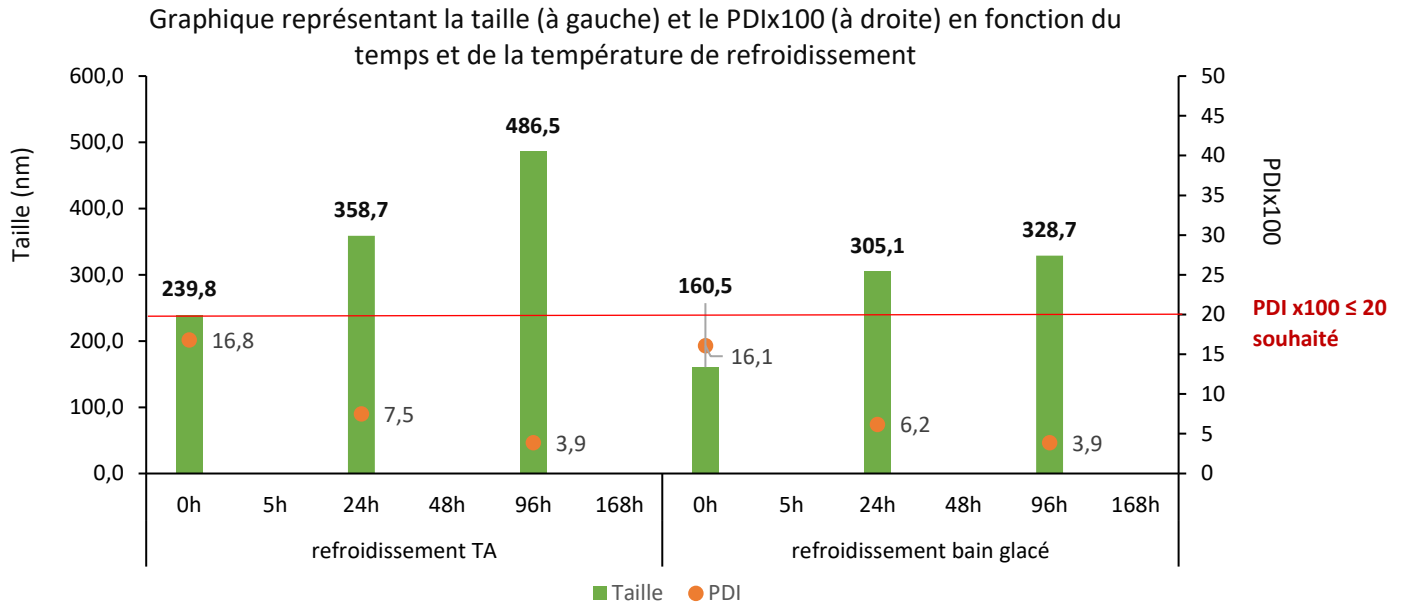
Température du bain



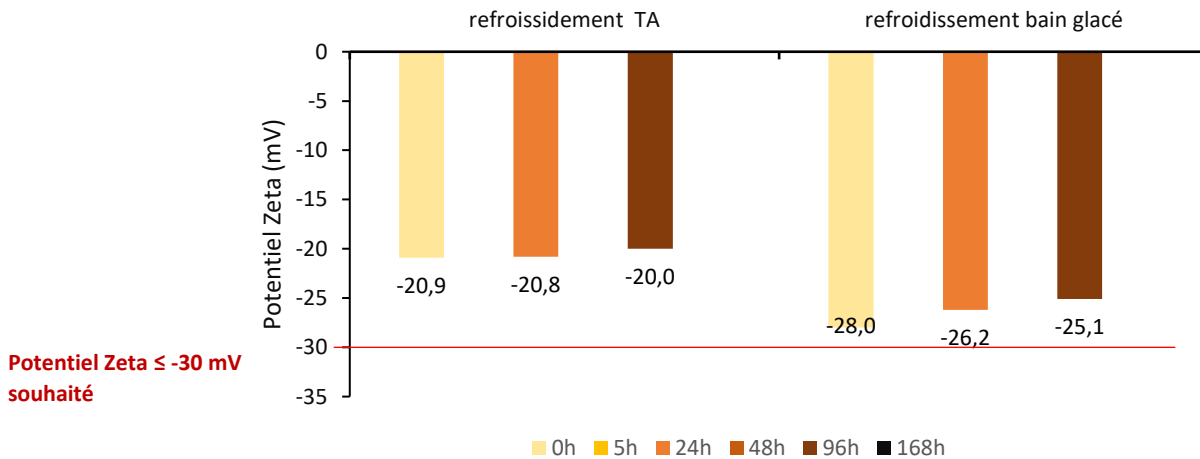
Graphique représentant le potentiel Zeta en fonction du temps et de la température du bain



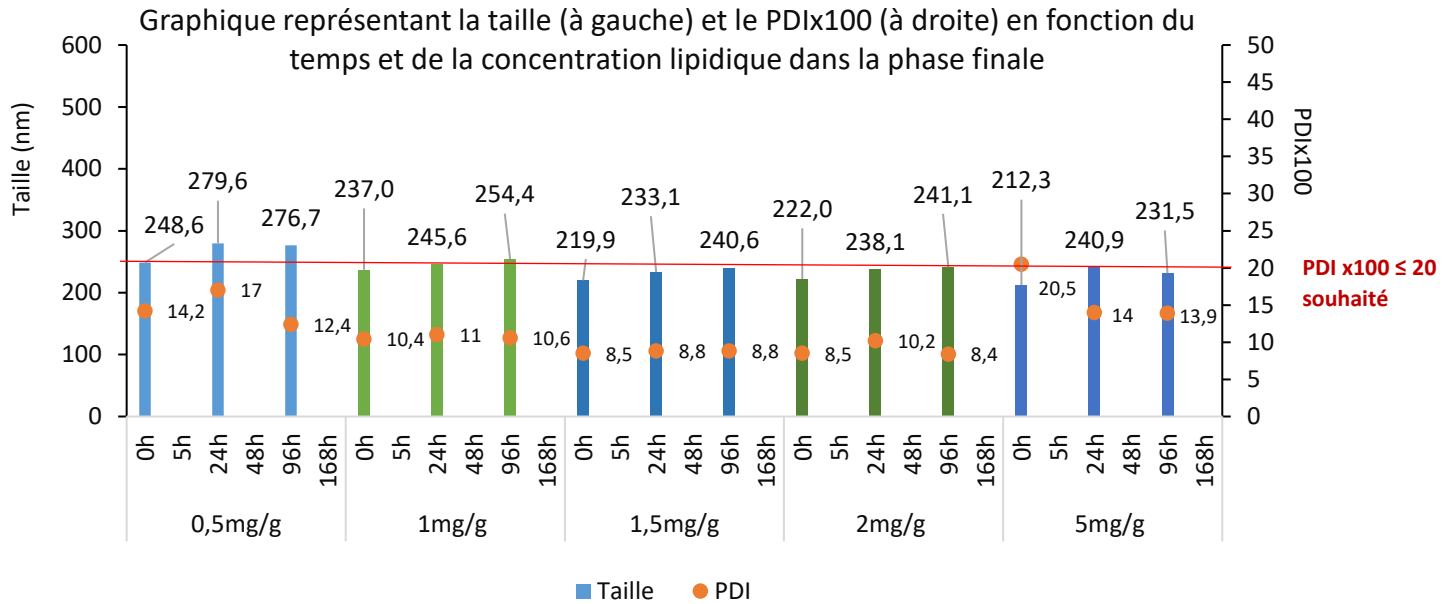
Température de refroidissement



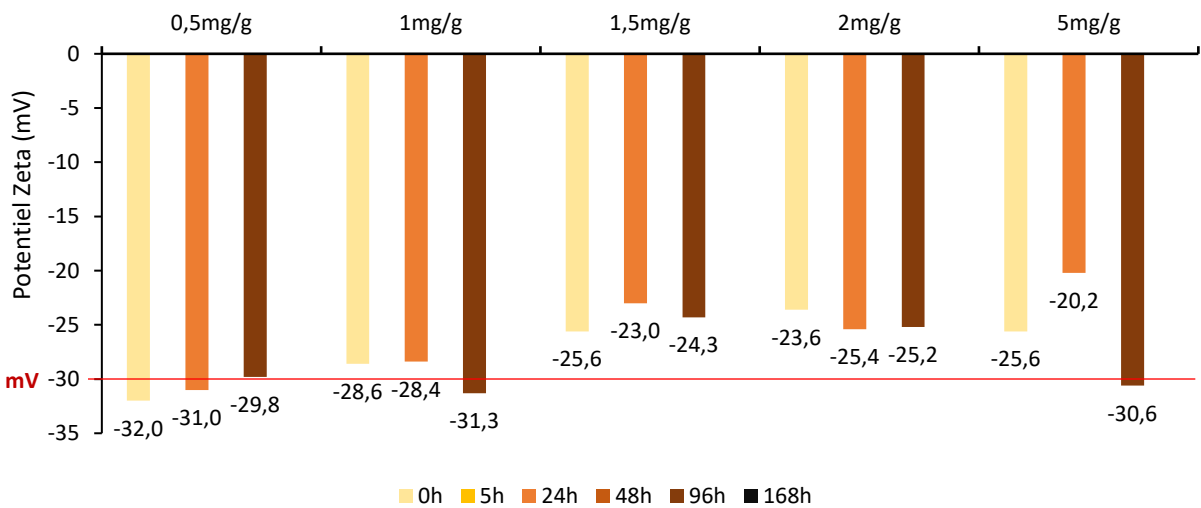
Graphique représentant le potentiel Zeta en fonction du temps et de la température de refroidissement



Concentration lipidique dans la phase finale



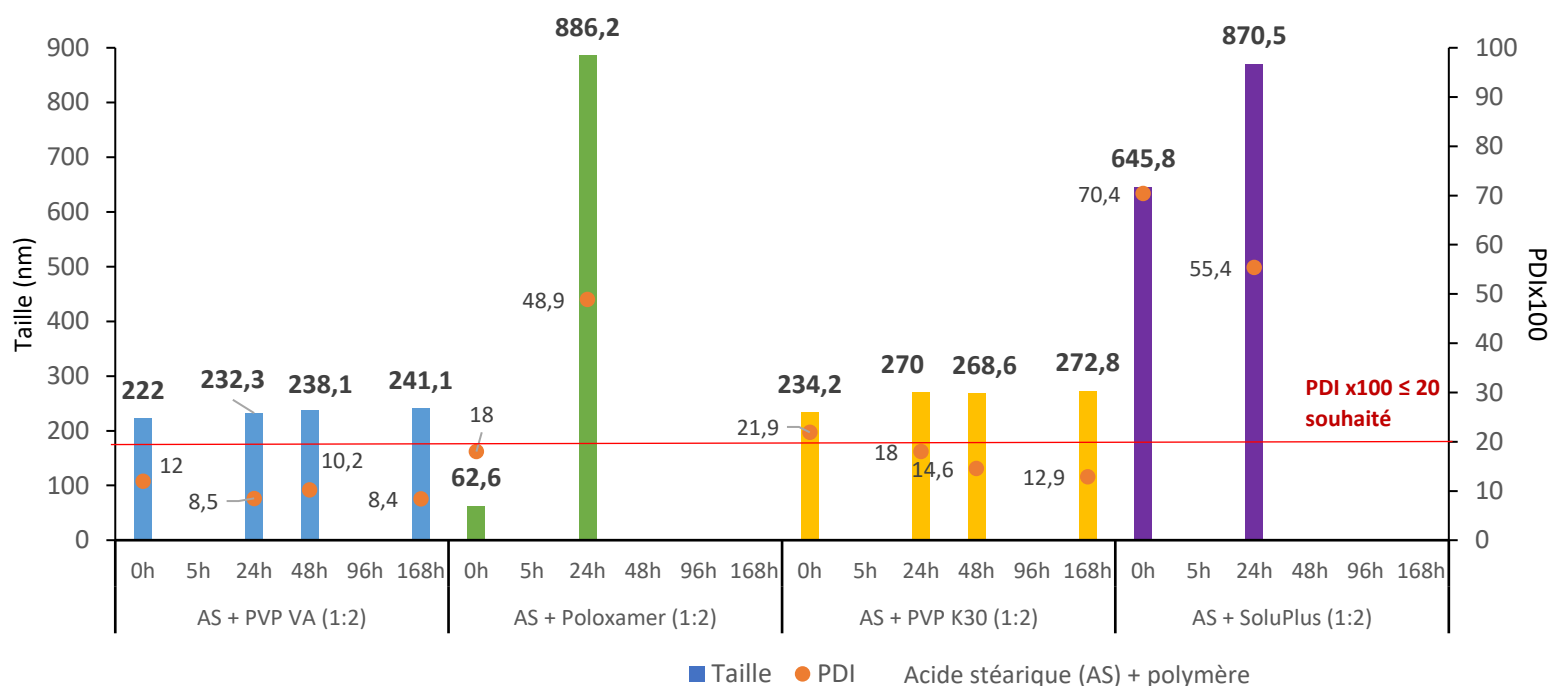
Graphique représentant le potentiel Zeta en fonction du temps et de la concentration lipidique dans la phase finale



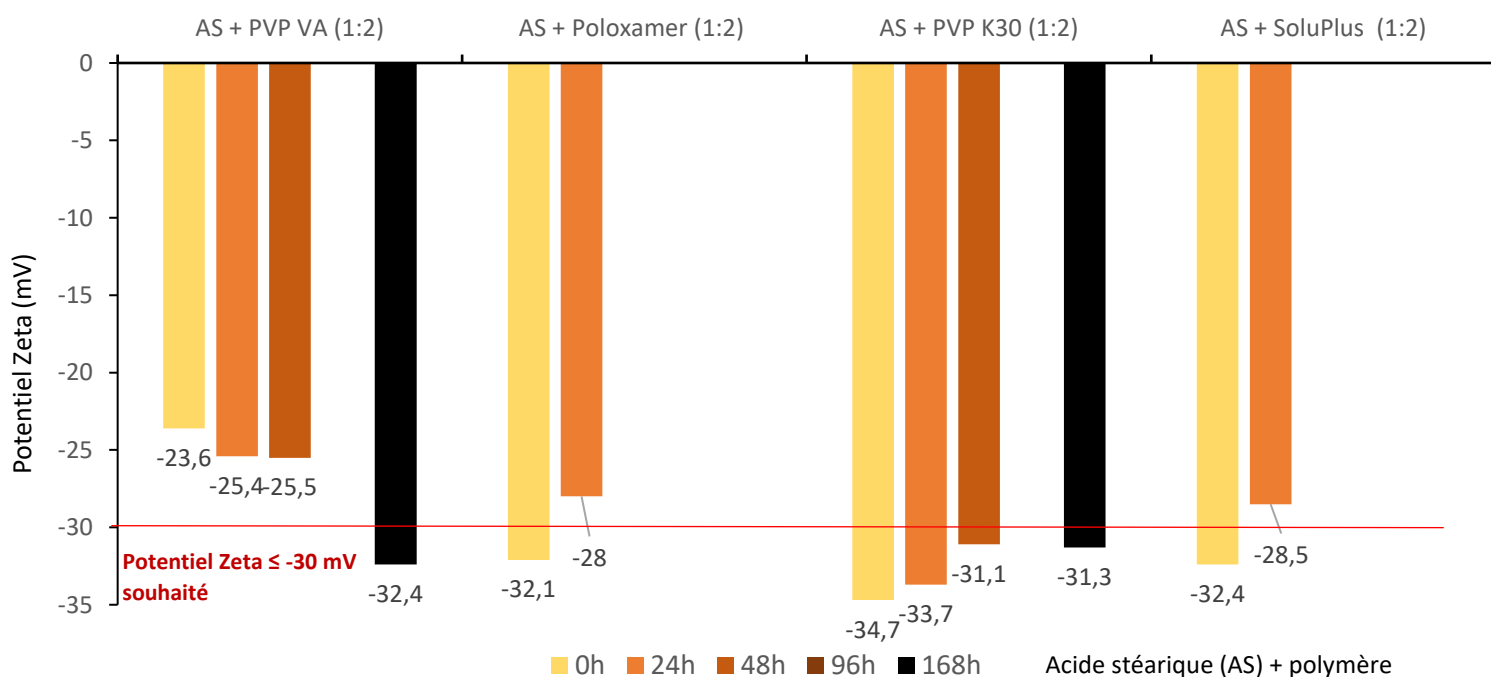
Annexe 2 : Graphiques des résultats obtenus pour l'étude de l'influence et l'optimisation de la formule

Changement de polymère

Graphique représentant la taille (à gauche) et le PDIx100 (à droite) en fonction du temps et du polymère utilisé

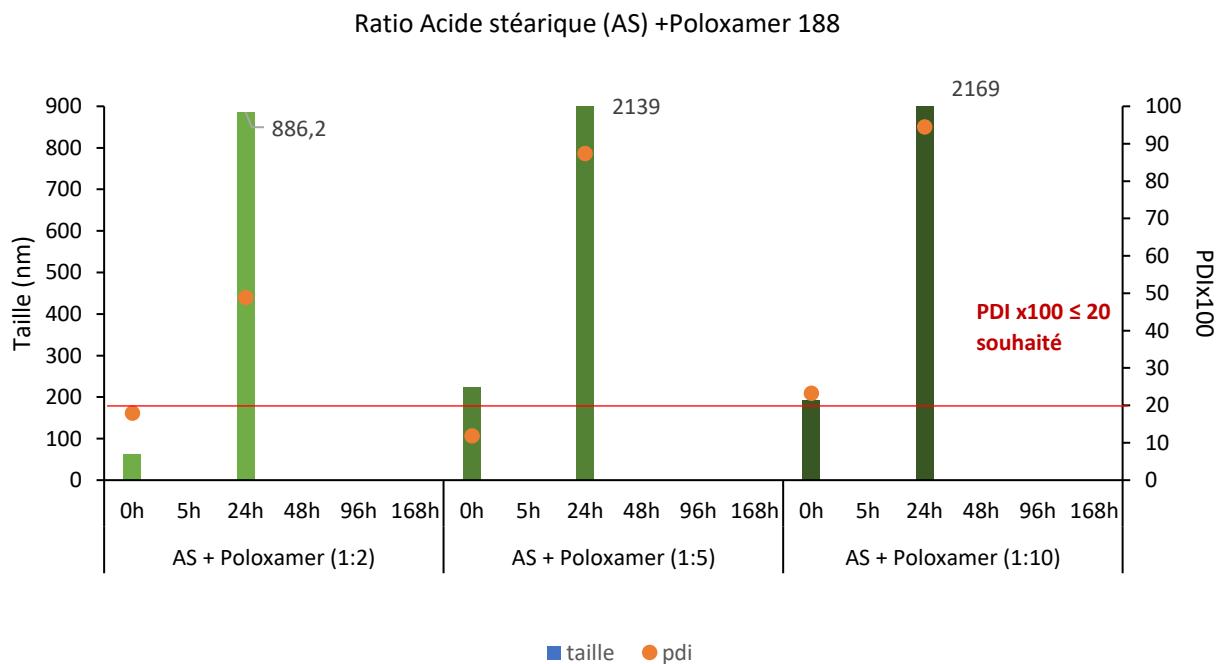
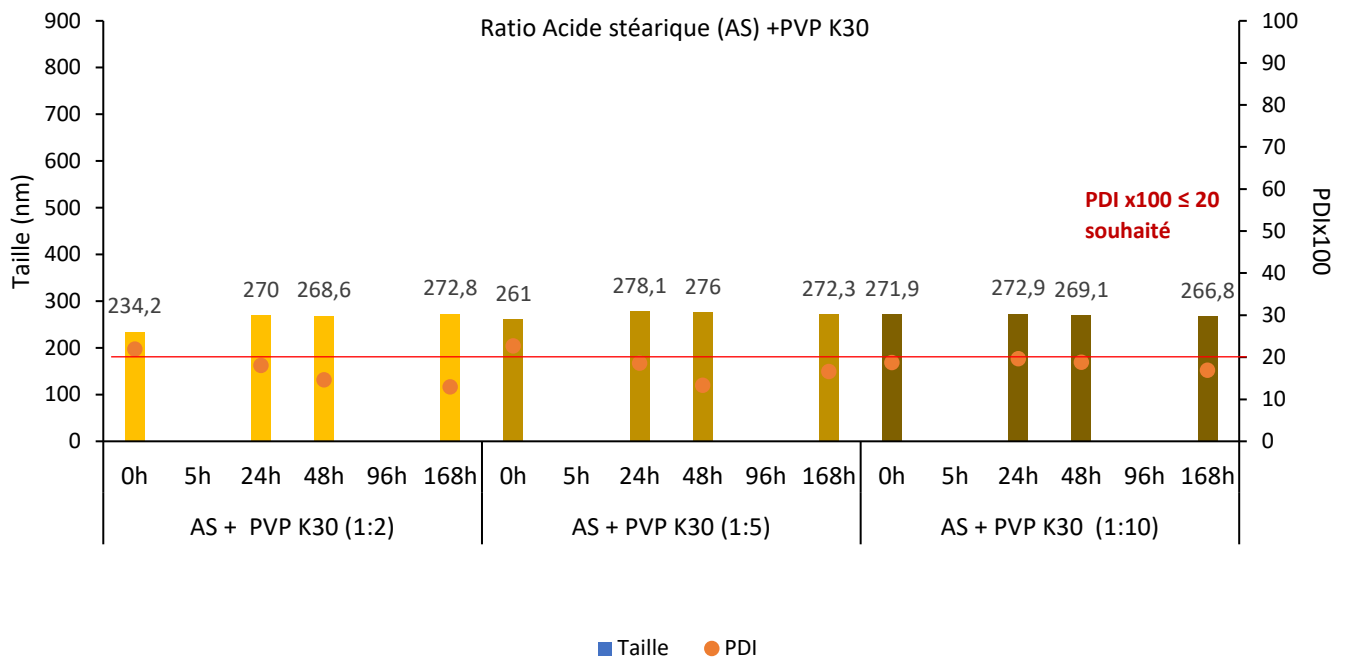


Graphique représentant le potentiel Zeta en fonction du temps et du polymère utilisé

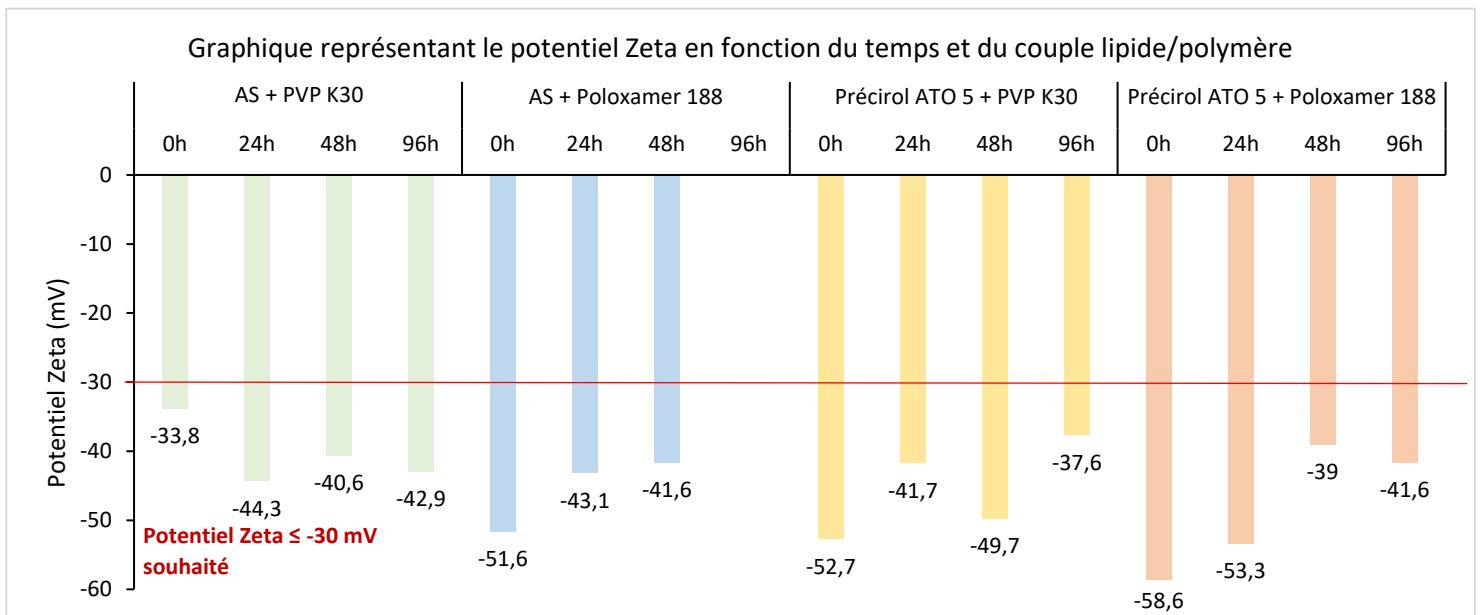
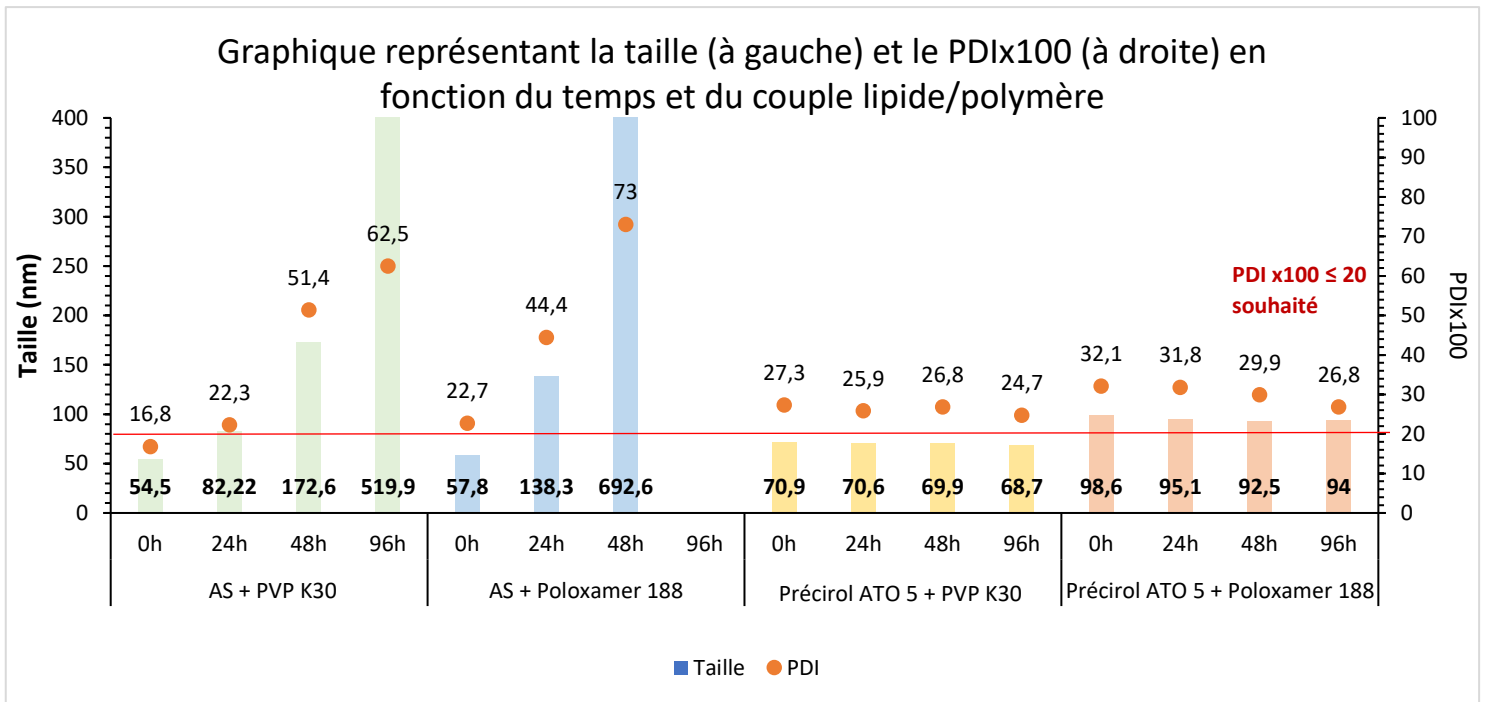


Changement du ratio lipide / polymère

Graphiques représentant la taille (à gauche) et le PDIx100 (à droite) en fonction du temps et du ratio lipide/polymère

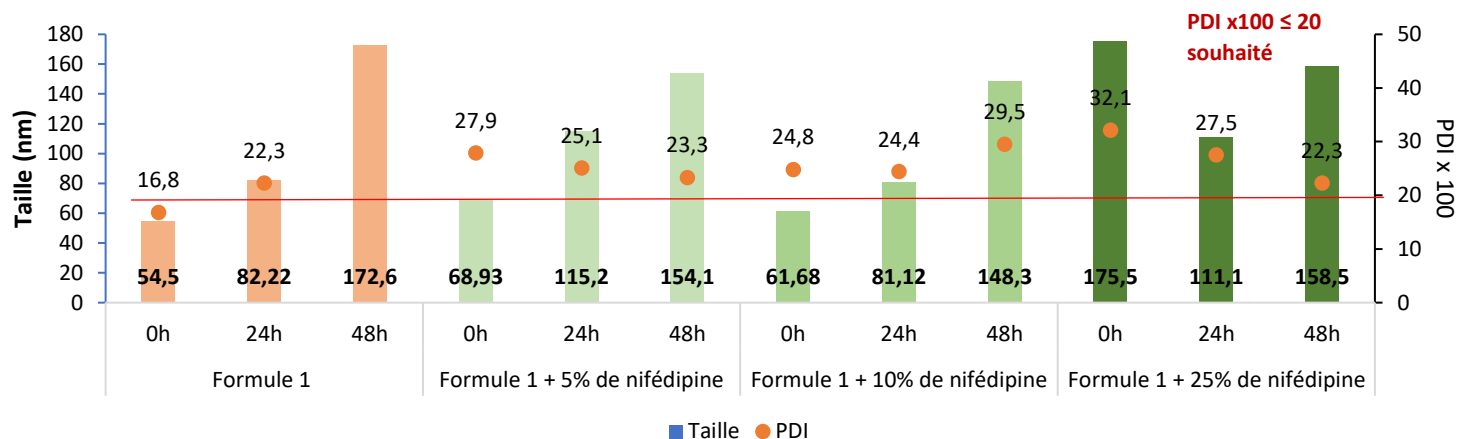


Changement du couple lipide / polymère

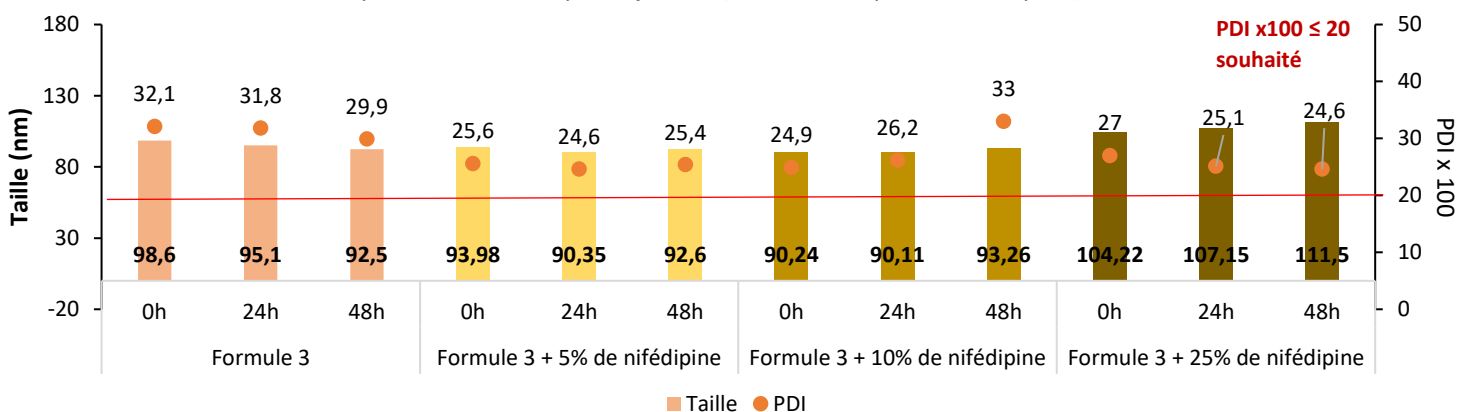


Annexe 3 : Graphiques représentant les résultats obtenus pour l'ajout de la nifédipine dans les formules optimisées

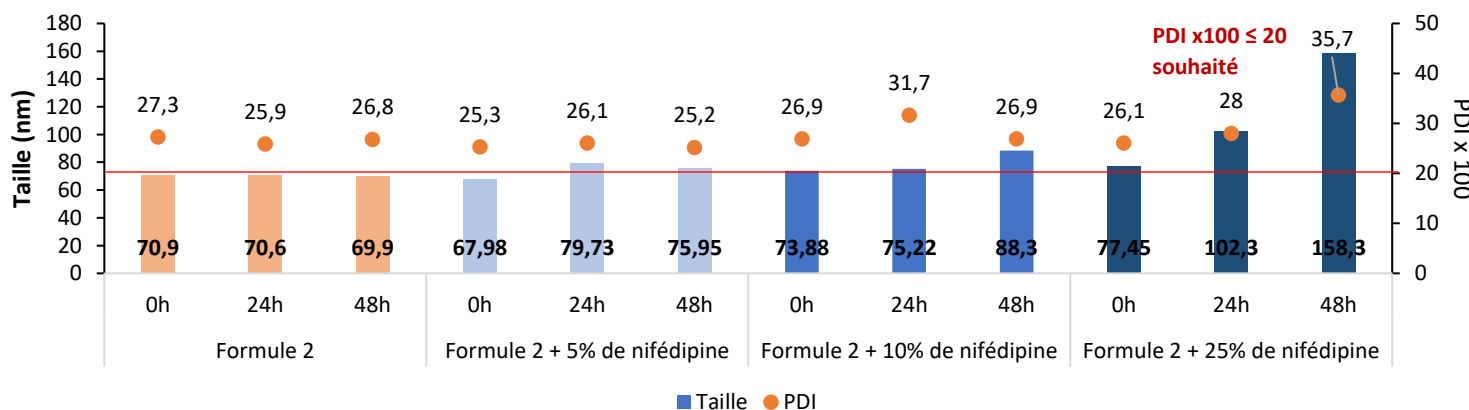
Graphique représentant la formule 1 (AS + PVP VA) en fonction du temps et de la quantité de nifédipine ajoutée (en % de la quantité de lipide)



Graphique représentant la formule 3 (Précirol ATO 5 + Poloxamer 188) en fonction du temps et de la quantité de nifédipine ajoutée (en % de la quantité de lipide)



Graphique représentant la formule 2 (Précirol ATO 5 + PVP VA) en fonction du temps et de la quantité de nifédipine ajoutée (en % de la quantité de lipide)



Bibliographie

- [1] S. Kalepu et V. Nekkanti, «Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects,» *Acta Pharmaceutica Sinica B*, pp. 442-453, 2015.
- [2] A. K. Gaikwad, «Transdermal drug delivery system: Formulation aspects and evaluation,» *Comprehensive Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, pp. 1-10, 2013.
- [3] S. Wiedersberg et R. H. Guy, «Transdermal Drug Delivery: 30+ Years of War and Still Fighting!,» *Journal of Controlled Release*, vol. 190, pp. 150-156, 2014.
- [4] P. Moutet, *Assemblage dirigé de nanoparticules colloïdales par nanoxérographie : développement et application à la réalisation de marquages sécurisés*, Micro et nanotechnologies/Microélectronique INSA de Toulouse, 2014.
- [5] P. Castagnos, *Vesicules Catanioniques : Design et Mécanismes de Délivrance de Principes Actifs*, Toulouse, 2011.
- [6] C. J. Martinez Rivas, M. Tarhini, W. Badri, K. Miladi, H. Greige-Gerges, Q. A. Nazari, S. A. Galindo Rodriguez, R. A. Roman, H. Fessi et A. Elaissari, «Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery,» *International Journal of Pharmaceutics*, 2017.
- [7] A. Paul, J. Kolarsick, BS, M. A. Kolarsick, MSN, ARHP-C, C. Goodwin, APRN-BC et FNP, «Anatomy and Physiology of the Skin,» *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, pp. 203-213, 2011.
- [8] S. H. Hussain, B. Limthongkul et T. R Humphreys, «The Biochemical Properties of the Skin,» *Dermatologic Surgery*, pp. 193-203, 2013.
- [9] «Anatomie fonctionnelle de la peau,» [En ligne]. Available: <https://microbiologiemedicale.fr/peau-anatomie/>.
- [10] H. Yousef, M. Alhaji et S. Sharma, «Anatomy, Skin (Integument), Epidermis,» Janvier 2022. [En ligne]. [Accès le 2023].
- [11] H.-M. Sheu, S.-C. Chao, T.-W. Wong, J. Y.-Y. Lee et J.-C. Tsai, «Human skin surface lipid film: an ultrastructural study and interaction with corneocytes and intercellular lipid lamellae of the stratum corneum,» *British Journal of Dermatology*, pp. 385-391, 1999.
- [12] C. Callewaert, J. Lambert et T. Van de Wiele, «Towards a bacterial treatment for armpit malodour,» *Experimental Dermatology*, vol. 26, pp. 288-391, 2017.
- [13] K. Sato et F. Sato, «Sweat secretion by human axillary apoeccrine sweat gland in vitro,» *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 252, pp. R181-R187, 1987.
- [14] K. Wilke, S. Biel, T. Schmidt-Rose et al, «Differentiation of human glands with immunohistochemical markers on cryosections,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, 2003.

- [15] K. Wilke, F. Keil, K. Wittern et al, «Immunolabelling is essential for the differentiation of human axillary apoeccrine glands,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 123, 2004.
- [16] K. Wilke, A. Martin, L. Terstegen et S. Biel, «A short history of sweat gland biology,» *International Journal of Cosmetic Science*, vol. 29, pp. 169-179, 2007.
- [17] K. Saga, «Histochemical and Immunohistochemical Markers for Human Eccrine and Apocrine Sweat Glands: An Aid for Histopathologic Differentiation of Sweat Gland Tumors,» *The Society for Investigative Dermatology*, 2001.
- [18] B. Dréno, «Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes,» chez *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 2009, pp. 247-251.
- [19] J. Wiechers, «The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs,» *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, 1989.
- [20] E. Kimura, Y. Kawano, H. Todo, Y. Ikarashi et K. Sugibayashi, «Measurement of Skin Permeation/Penetration of Nanoparticles for Their Safety Evaluation,» *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 35, pp. 1476-1486, 2012.
- [21] S. Supe et P. Takudage, «Methods for evaluating penetration of drug into the skin : A review,» *Skin Research and Technology*, vol. 27, pp. 299-308, 2021.
- [22] N. Dayan, «Pathways for Skin Penetration,» *Cosmetics & Toiletries magazine*, vol. 120, 2005.
- [23] M. Boer, E. Duchnik, R. Maleszka et M. Marchlewicz, «Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function,» *Postepy Dermatologii i Alergologii*, pp. 1-5, Février 2016.
- [24] M. E. Lane, «Skin penetration enhancers,» *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 12-21, 2013.
- [25] A. Georgel, *Pénétration transcutanée des substances actives : application en dermocosmétologie*, Sciences Pharmaceutiques, 2008.
- [26] C. Twarog, *Particules Janus pour des applications industrielles : stabilités et incorporation de principes actifs*, Sciences Pharmaceutiques, 2017.
- [27] R. Pereira, S. Silva, M. Pinheiro, S. Reis et M. L. d. Vale, «Current Status of Amino Acid-Based Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery,» *Membranes*, vol. 11, 2011.
- [28] J.-L. Lefaix, J. Lombardo et D. Delacroix, «Mesure in vivo de la contamination cutanée provoquée par une solution radioactive,» *Radioprotection*, vol. 31, pp. 247-271, 1996.
- [29] A. C. Williams, «Topical and Transdermal Drug Delivery,» chez *Aulton's Pharmaceutics : The Design and Manufacture of Medicines*, 2018.
- [30] A. Feurtet, *Des formes topiques classiques aux formes transdermiques : formulation et procédés*, Sciences Pharmaceutiques, 2006.

- [31] I. Alam, N. Alam, V. Singh, S. Alam, S. Ali, T. Anwer et M. M. Safhi, «Type, Preparation and Evaluation of Transdermal Patch : a Review,» *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, vol. 2, pp. 2199-2233, 2013.
- [32] H. Benson et A. Watkinson, *Topical and Transdermal Drug Delivery : Principles and Practice*, Wiley, 2012.
- [33] T. Hatanaka, «Skin Metabolism of Chemicals,» chez *Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds*, 2017, pp. 67-76.
- [34] H. Patel, D. Trivedi, A. Bhandari et D. Shah, «Penetration enhancers for transdermal drug delivery system: A review,» *IJPI's Journal of Pharmaceutics and Cosmetology*, vol. 1, 2011.
- [35] H. A. Benson, «Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques,» *Current Drug Delivery*, vol. 2, pp. 23-33, 2005.
- [36] J. Twist et J. Zatz , «Characterization of solvent-enhanced permeation through a skin model membrane.,» *Journal of The Society of Cosmetic Chemists*, vol. 39, pp. 324-324, 1988.
- [37] V. Patidar, D. Sharma, D. Maliwal et V. Chatap, «Penetration Enhancement Techniques for Transdermal Drug Delivery System,» *Research Journal of Pharmaceutics and Technologies*, vol. 1, pp. 28-33, 2009.
- [38] J. Frelichowska, *Émulsions stabilisées par des particules solides: études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée*, Université Claude Bernard - Lyon I, 2009.
- [39] D. Ramadan, M. McCrudden, A. Courtenay et R. Donnelly, «Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications,» *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 12, pp. 758-791, 2022.
- [40] H. Xueqing et H. Huaming, «A review of cosmetic skin delivery,» *Journal of Cosmetic Dermatology*, pp. 1-11, 2021.
- [41] D. Ramadan, M. T. McCrudden, A. J. Courtenay et R. F. Donnelly, «Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications,» *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 12, pp. 758-791, 2022.
- [42] V. M. Meidan, M. C. Bonner et B. B. Michniak, «Transfollicular drug delivery—Is it a reality?,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 306, pp. 1-14, 2005.
- [43] J. Tsai, L. Shen, H. Sheu et C. Lu, «Tape stripping and sodium dodecyl sulfate treatment increase the molecular weight cutoff of polyethylene glycol penetration across murine skin,» *Archives of dermatological research*, vol. 295, pp. 169-174, 2003.
- [44] D. Morrow, P. McCarron, A. Woolfson et R. Donnelly, «Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery,» *The Open Drug Delivery Journal*, vol. 1, pp. 36-59, 2007.
- [45] U. Garg et K. Jain, «Dermal and Transdermal Drug Delivery through Vesicles and Particles: Preparation and Application,» *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 12, pp. 45-57, 2022.

- [46] A. Schwengber, H. J. Prado, D. A. Zilli, P. R. Bonelli et A. L. Cukierman, «Carbon nanotubes buckypapers for potential transdermal drug delivery,» *Materials Science and Engineering*, vol. C, pp. 7-13, 2015.
- [47] N. Mishra, A. K. Goyal, K. Khatri, B. Vaidya, R. Paliwal, S. Rai, A. Mehta, S. Tiwari, S. Vyas et S. P. Vyas, «Biodegradable Polymer Based Particulate Carrier(s) for the Delivery of Proteins and Peptides,» *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, pp. 240-251, 2008.
- [48] S. Jain, V. Jain et S. Mahajan, «Lipid Based Vesicular Drug Delivery Systems,» *Advances in Pharmaceutics*, vol. 2014, pp. 1-12, 2012.
- [49] R. Müller, S. Maaben, H. Weyhers, F. Specht et J. Lucks, «Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles,» *International journal of pharmaceutics*, vol. 138, pp. 85-94, 1996.
- [50] K. Manjunath, J. Suresh Reddy et V. Venkateswarlu, «Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems,» *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, vol. 27, pp. 127-144, 2005.
- [51] D. Roux, «Colloïdes,» [En ligne]. Available: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/colloides/>. [Accès le 2023].
- [52] A. Zeb, S. Tabassam Arif, M. Malik, F. Shah, F. Ud Din, O. Salman Qureshi, E.-S. Lee, G.-Y. Lee et J.-K. Kim, «Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin,» *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 49, pp. 485-517, 2019.
- [53] O. Uchechi, J. D.N. Ogbonna et A. A. Attama, «Novel technologies for dermal and transdermal application,» chez *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, Ali Demir Sezer, 2014.
- [54] S. N. Kale et S. L. Deore, «Emulsion Micro emulsion and Nano emulsion : A Review,» *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 8, pp. 39-47, 2017.
- [55] L. Moradi, S. Javanmardi, S. Sadat Abolmaali et S. Mohammadi-Samani, «Passive Enhancement of Transdermal Drug Delivery: Lipid-Based Nanocarriers as Emerging Technology Platform,» *Trends in Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, pp. 25-40, 2019.
- [56] Académie Nationale de Pharmacie, «Microémulsion,» 15 Janvier 2016. [En ligne]. Available: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Micro%C3%A9mulsion>. [Accès le Mars 2023].
- [57] P. Rajpoot, K. Pathak et V. Bali, «Therapeutic Applications of Nanoemulsion Based Drug Delivery Systems: A Review of Patents in Last Two Decades,» *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, vol. 5, pp. 163-172, 2011.
- [58] H. Benson, J. Grice, Y. Mohammed, S. Namjoshi et M. Roberts, «Topical and Transdermal Drug Delivery : From Simple Potions to Smart Technologies,» *Current Drug Delivery*, vol. 16, pp. 44-460, 2019.
- [59] R. Müller, M. Radtke et S. Wissing, «Solip lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, pp. 131-155, 2002.

- [60] M. Üner, «Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems,» *Pharmazie*, vol. 61, pp. 375-386, 2006.
- [61] H. Hajjali, *Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polysaccharide : étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol*, Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2015.
- [62] K.-P. Wilhelm, G. Freitag et H.-H. Wolff, «Surfactant-induced skin irritation and skin repair,» *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 30, pp. 944-949, 1994.
- [63] M. Üner et G. Yener, «Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2, pp. 289-300, 2007.
- [64] R. Yang, R. Gao, F. Li, H. He et X. Tang, «The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process,» *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 37, pp. 139-148, 2011.
- [65] N. Yadav, S. Khatak et U. Vir Singh Sara, «Solid lipid nanoparticles - a review,» *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 5, 2013.
- [66] W. Mehnert et K. Mäder, «Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001.
- [67] S. Khaleel Basha, R. Dhandayuthabani, M. Syed Muzammil et V. Sugantha Kumari, «Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery,» *Materials Today : Proceedings*, vol. 36, pp. 313-324, 2020.
- [68] A. Garud, D. Singh et N. Garud, «Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications,» *International Current Pharmaceutical Journal*, vol. 1, pp. 384-393, 2012.
- [69] S. Khairnar, P. Pagare, A. Thakre, A. Rajeevan Nambiar, V. Junnuthula, M. Cheripell Abraham, P. Kolimi, D. Nyavanandi et S. Dyawanapelly, «Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles,» *Pharmaceutics*, vol. 14, 2022.
- [70] Z. Loh, A. Samantha et P. Heng, «Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs,» *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 19, 2015.
- [71] R. Parhi et P. Suresh, «Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles-A Review,» *Current Drug Discovery Technologies*, vol. 9, pp. 2-16, 2012.
- [72] R. Awasthi, B. Bhushan et G. T. Kulkarni, «Chapter 9 - Concepts of nanotechnology in nanomedicine: From discovery to applications,» chez *Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems*, 2020, pp. 171-209.
- [73] P. Ganesan et D. Narayanasamy, «Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery.,» *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 6, pp. 37-56, 2017.

- [74] K. Manjunath, J. Suresh Reddy et V. Venkateswarlu, «Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems,» *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, vol. 27, pp. 1-20, 2005.
- [75] A. Krishna Sailaja, P. Amareshwar et P. Chakravarty, «Formulation of solid lipid nanoparticles and their applications.,» *Current Pharma Research*, vol. 1, pp. 197-203, 2011.
- [76] K. Trivedi Sastri, G. Venkata Radha, S. Pidikiti et P. Vajjhala, «Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies,» *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 10, pp. 126-141, 2020.
- [77] Y. Mirchandani, V. B. Patravale et S. Brijesh, «Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs,» *Journal of Controlled Release*, vol. 335, pp. 457-464, 2021.
- [78] E. Subroto, R. Andoyo, R. Indarto, E. Wulandari et E. Fadhillah Nadhirah Wadhiah, «Preparation of Solid Lipid Nanoparticle-Ferrous Sulfate by Double Emulsion Method Based on Fat Rich in Monolaurin and Stearic Acid,» *Nanomaterials*, vol. 12, 2022.
- [79] Y. Duan, A. Dhar, C. Patel, M. Khimani, S. Neogi, P. Sharma, N. Siva Kumar et R. L. Vekariya, «A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems,» *RSC Advances*, vol. 10, pp. 26777-26791, 2020.
- [80] M. Schubert et C. Müller-Goymann, «Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - evaluation of the method and process parameters,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, October 2002.
- [81] J. Bernard, «Extraction par le CO₂ supercritique,» [En ligne]. Available: <http://processs.free.fr/Pages/VersionWeb.php?page=1850#menuright>. [Accès le 2023].
- [82] Z. Akbari, M. Amanlou, J. Karimi-Sabet, A. Golestani et M. Shariaty Niassar, «Application of Supercritical Fluid Technology for Preparation of Drug Loaded Solid Lipid Nanoparticles,» *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 16, pp. 13-33, 2020.
- [83] I. Espirito Santo, A. Sao Pedro, R. Fialho et E. Cabral-Albuquerque, «Characteristics of lipid micro- and nanoparticles based on supercritical formation for potential pharmaceutical application,» *Nanoscale Research Letters*, vol. 8, 2013.
- [84] E. Wolska, «Fine powder of lipid microparticles – spray drying process development and optimisation,» *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 64, 2021.
- [85] V. Mishra, K. K. Bansal, A. Verma, N. Yadav, S. Thakur, K. Sudhakar et J. M. Rosenholm, «Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems,» *Pharmaceutics*, vol. 10, 2018.
- [86] M. Jones, «An example of Dynamic Light Scattering,» 30 Mai 2010. [En ligne]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DLS.svg>. [Accès le Janvier 2023].
- [87] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier et Y. Chevalier, «Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane,» *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, February 2012.

- [88] H. M. Abdel-Mageed, A. E. Abd El Aziz, S. A. Mohamed et N. Z. AbuelEzz, «The tiny big world of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: an updated review,» *Journal of Microencapsulation*, 2022.
- [89] B. Sjöström et B. Bergenstahl, «Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesterolyl acetate,» *International Journal of pharmaceutics*, 1992.
- [90] K. Westesen et B. Siekmann, «Investigation on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions,» *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 1996.
- [91] G. Vizseralek, S. Berko, G. Toth, R. Balogh, M. Budai-Szucs, E. Csanyi, B. Sinko et K. Takacs-Novak, «Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using skin PAMPAmethod,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, May 2015.
- [92] T. Massias, S. de Paiva Lacerda, J. Resende de Azevedo, J.-J. Letourneau, P. Dos Santos, M.-A. Bolzinger et F. Espitalier, «A proof-of-concept study of coupled supercritical CO₂-assisted processes to produce solid self-assembled drug delivery systems (S-SADDs),» *Journal of Crystal Growth*, 2023.
- [93] S. Liu et S. P. Armes, «Recent advances in the synthesis of polymeric surfactants,» *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 6, pp. 249-256, 2001.
- [94] K. Grodowska et A. Parczewski, «Organic solvents in the pharmaceutical industry (review),» *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, vol. 67, pp. 3-12, 2010.
- [95] M. A. Schubert, M. Harms et C. C. Muller-Goymann, «Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin,» *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, pp. 226-236, 2006.
- [96] E. M. Sorkin, S. Clissold et R. N. Brogden, «Nifedipine,» *Drugs*, vol. 30, pp. 182-274, 1985.
- [97] G. Amidon, H. Lennernas, V. Shah et J. Crison, «A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability,» . *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 12, pp. 413-420, 1995.
- [98] B. Le Neindre et P. Cancouet, «PVP VA / Copolymer,» 2011. [En ligne]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/cosmetiques-ingredients-42664210/liste-des-polymeres-synthetiques-utilises-en-cosmetique-j2191/pvp-va-copolymer-j2191formniv10065.html>. [Accès le 2023].
- [99] «Polyvinylpyrrolidone,» [En ligne]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sial/81420>. [Accès le 2023].
- [100] «Poloxamer 188,» [En ligne]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/poloxamer-188?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=poloxamer%20188&type=product>. [Accès le 2023].
- [101] «SoluPlus,» [En ligne]. Available: <https://pharma.basf.com/products/soluplus>. [Accès le 2023].

- [102] M. Danaei, M. Dehghankhold et S. Ataei, «Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems,» *Pharmaceutics*, 2018.
- [103] R. H. Muller, K. Mader et S. Gohla, «Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 50, pp. 161-177, 2000.
- [104] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo et I. Harding, «Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential,» *Journal of Physical Science*, vol. 25, pp. 59-75, 2014.
- [105] E. Lepeltier, C. Bourgaux et P. Couvreur, «Nanoprecipitation and the "Ouzo effect" : Application to drug delivery devices,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 86-97, 2013.
- [106] S. K. Balavandy, K. Shameli, D. R. B. A. Biak et Z. Z. Abidin, «Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method,» *Chemistry Central Journal*, 2014.
- [107] W. Huang et C. Zhang, «Tuning the size of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation,» *Biotechnology Journal*, 2018.
- [108] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo et I. Harding, «Composition and Structure,» chez *Lipid Nanoparticles : Production, Characterization and Stability*, Springer briefs in pharmaceutical science and drug development, 2015, pp. 11-12.
- [109] S. Songkro, «An overview of skin penetration enhancers: penetration enhancing activity, skin irritation potential and mechanism of action,» *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2009.
- [110] «Polymère : qu'est ce que c'est?,» *Futura Sciences*.
- [111] X. Y. Mu, «Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery,» *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016.
- [112] Z. Cui et M. Houweling, «Phosphatidylcholine and cell death,» *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002.
- [113] VIDAL, «Complément alimentaire : Phosphatidylcholine,» 18 Aout 2014. [En ligne]. Available: <https://www.vidal.fr/parapharmacie/complements-alimentaires/phosphatidylcholine-lecithine.html>. [Accès le 1 Décembre 2022].
- [114] P. Van Hoogevest et A. Fahr, «Phospholipids in Cosmetic Carriers,» chez *Nanocosmetics*, 2019, pp. 95-140.
- [115] M. Schubert et C. Muller-Goymann, «Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier.,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 77-86, 2005.
- [116] Y. Rui, G. Renchao, L. Fang, H. Haibing et T. Xing, «The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process,» *Drug and Development and Industrial Pharmacy*, pp. 139-148, 2011.

- [117] R. A. Kallaf, H. F. Salem et A. Abdelbary, «5-Fluorouracil shell-enriched solid lipid nanoparticles (SLN) for effective skin carcinoma treatment,» *Drug Delivery*, vol. 23, pp. 3452-3460, 2016.
- [118] M. Gallarate, M. Trotta, L. Battaglia et D. Chirio, «Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation,» *Journal of Microencapsulation*, vol. 26, pp. 394-402, 2009.
- [119] «Nifédipine,» 5 Aout 2016. [En ligne]. Available: <http://resimede.info/glossaire/nifedipine/>. [Accès le Décembre 2022].
- [120] S. Daneshmand, S. Golmohammadzadeh, M. Jaafari, J. Movaffagh, M. Rezaee, A. Sahebkar et B. Malaekheh-Nikouei, «Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization,» *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017.
- [121] V. Torchilin, «Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery,» *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 13, pp. 813-827, 2014.
- [122] E. Souto et R. Muller, «Lipid nanoparticles : effect on bioavailability and pharmacokinetic changes,» *The Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 197, pp. 115-141, 2008.
- [123] M. Joshi et V. Patravale, «Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 315, pp. 150-154, 2006.
- [124] S. Wissing, O. Kayser et R. Muller, «Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery,» *Advanced Drug Delivery*, vol. 56, pp. 1257-1272, 2004.
- [125] J. Barichello, M. Morishita, K. Takayama et T. Nagai, «Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method,» *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 25, pp. 471-476, 1999.
- [126] P. Kaur et T. Garg, «In-ivo absorption, metabolism, and excretion of solid lipid nanoparticles : a review,» *Current Drug Metabolism*, vol. 17, pp. 547-557, 2016.
- [127] C. Pouton et C. Porter, «Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration : materials, methods, and strategies.,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 625-637, 2008.
- [128] S. Doktorovova, E. Souto et A. Silva, «Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data.,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 87, pp. 1-18, 2014.
- [129] A. Beloqui, M. Solinis, A. Rodriguez-Gascon, A. Almeida et V. Preat, «Nanostructured lipid carriers : promising drug delivery systems for future clinics.,» *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine.*, vol. 12, pp. 143-161, 2016.
- [130] H. Kim et K. Park, «Application of nanotechnology in drug delivery,» *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, pp. 1-36, 2010.
- [131] I. Gosh, S. Bose, R. Vippagunta et F. Harmon, «Nanoparticles in drug delivery : recent advances and challenges,» *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 37, pp. 935-947, 2011.

- [132] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman et R. Blumenthal, «Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers : from concepts to clinic,» *Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 26, pp. 523-580, 2009.
- [133] S. Parveen, R. Misra et S. Sahoo, «Nanoparticles : a boon to drug delivery therapeutics, diagnostics and imaging,» *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 8, pp. 147-166, 2012.
- [134] A. Silva, E. Gonzalez-Mira, M. Garcia, M. Egea, J. Fonseca, R. Silva et D. Ferreira, «Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound.,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 86, pp. 158-165, 2011.

ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné (e) Dos Santos Philomène

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21303766

N° Thèse : 47

Nom et Prénom : Dos Santos Philomène

Sujet : Utilisation des systèmes nano-colloïdaux par voie transdermique : le cas des nanoparticules lipidiques solides

Tours, le : 06/09/23

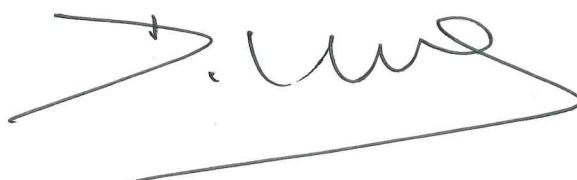
Le(s) Directeur(s) de Thèse :



**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



DOS SANTOS Philomène

N° 47

TITRE DE LA THÈSE

Utilisation des systèmes nano-colloïdaux par voie transdermique : le cas des nanoparticules lipidiques solides

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les systèmes nano-colloïdaux sont des suspensions nanométriques pouvant être utilisées dans le transport et l'encapsulation des principes actifs notamment lorsque ces derniers sont sensibles (à la lumière, à l'oxydation etc. .) ou peu solubles dans l'eau. Il existe de nombreux systèmes nano-colloïdaux pour le transport des principes actifs, ces systèmes sont décrits dans cette thèse en portant une attention particulière aux nanoparticules lipidiques solides (SLN).

Dans cette thèse, nous avons étudié les nanoparticules lipidiques solides (SLN) comme système de délivrance des médicaments, en mettant l'accent sur les techniques de préparation, les méthodes de caractérisation, les paramètres influençant la taille et la stabilité des SLN. Une proposition de méthode de préparation par nanoprécipitation et de caractérisation des SLN est décrite dans la deuxième partie de ce travail.

Les SLN sont d'intérêt croissant en raison de leurs avantages, tels que la capacité à améliorer la solubilité des médicaments hydrophobes, la protection contre la dégradation chimique et enzymatique, et la possibilité de cibler spécifiquement les sites d'action des médicaments. De plus, les NLS présentent une toxicité réduite et des effets secondaires limités par rapport aux autres systèmes de délivrance de médicaments.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Systèmes nano-colloïdaux, nanoparticules lipidiques solides, voie transdermique, nanoprécipitation

JURY

Président : Stéphanie David - MCU, Pharmacien, HDR (Université de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas)

Membres :

Véronique Moreau – Pharmacien, Loches (37)

Emilie Munnier- PR- Pharmacien, Directrice de thèse (Université de Tours, UFR Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas)

Jacqueline Resende de Azevedo – MCU (Université Claude Bernard Lyon 1, LAGEP : Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique)

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE 5 juillet 2023, Université de Tours, Faculté de pharmacie (37)