

Développement de suspensions liposomales pour l'administration d'une substance médicamenteuse difficilement formulable

Christopher Thorne

▶ **To cite this version:**

Christopher Thorne. Développement de suspensions liposomales pour l'administration d'une substance médicamenteuse difficilement formulable. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01247777

HAL Id: dumas-01247777

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01247777

Submitted on 17 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier
GRENOBLE
PHARMACIE

SICD1
Bibliothèques
de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015 N°

DEVELOPPEMENT DE SUSPENSIONS LIPOSOMALES POUR L'ADMINISTRATION D'UNE SUBSTANCE MEDICAMENTEUSE DIFFICILEMENT FORMULABLE

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Christopher Thorne

Né(e) le : 30/07/1988 à : Grenoble

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 07/12/2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Pr. Denis WOUESSIDJEWE

Membres :

Dr. Annabelle GEZE

Dr. Luc CHOISNARD

Pr. Véronique ROSILIO

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ABBREVIATIONS:

AFM : Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscope)

A_m : Aire moléculaire moyenne

A_{Onset} : Aire de l'onset

Apaf-1: Apoptotic peptidase activating factor 1

BAM : Microscope à Angle de Brewster (Brewster Angle Microscope)

Bax : Bcl-2–associated X protein

Bêta-Lapachone : b-Lap

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

Ca^{2+}: Ion Calcium

Chol: Cholestérol

DSC: Calorimétrie Différentielle à Balayage (Differential Scanning Calorimetry)

DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine

DLS : Diffusion Dynamique de la Lumière (Dynamic Light Scattering)

IP3R : Inositol 1,4, 5-triphosphate

EE : Efficacité d'encapsulation

EPR : Effet de perméabilité et de rétention (Enhanced Permeability and Retention effect)

Rpm : Rotation Par Minute

g : Unité d'accélération

M_M : Masse molaire

G : Phase gaz

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)

HPb-CD : Hydroxypropyl-b-Cyclodextrine

CD : Cyclodextrine

PEG : polyoxyéthylèneglycol

DSPE-PEG 2000 :1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]

ADN : Acide Désoxyribonucléique

NQO1 : NAD(P)H Dehydrogenase (quinone) 1

T_m : Température de transition de phase (gel-liquide) - principale

T_{crit} : Température critique

$T_{collaps}$: Température de collapse

T_g : Température de transition vitreuse

PALS: Analyse de la Phase de la Lumière Diffusée (Phase Analysis Light Scattering)

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PP : Paramètre d'empilement (Packing parameter)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Tampon Phosphate (Phosphate Buffer Saline)

ROS : Espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

pKa : Constante d'acidité

PDI : Indice de Polydispersité

Π : Pression de surface

K : Module de compressibilité

LC : Liquide condensé

LE : Liquide expansé

LUV : Vésicule Unilamellaire Large (Large Unilamellar Vesicle)

MTM : Mesure Manométrique de la Température (Manometric temperature Measurement)

MLV : Vésicule multilamellaire (Multilamellar Vesicle)

RE : Réticulum Endoplasmique

PS : Phase solide

SUV : Petite Vésicule Unilamellaire (Small Unilamellar Vesicle)

SA : Stéarylamine

TDLAS : Spectroscopie d'Absorption par Diode Laser Accordable (Tunable Diode Laser Absorption spectroscopy)

UV : Ultraviolet

ΔV : Potentiel de surface

λ : Longueur d'onde

ζ: Potentiel zêta

γ□ □Tension superficielle du liquide

°C : Degrés Celsius

$\Delta A^{Excès}$: Aire moléculaire d'excès

ΔH : Variation d'enthalpie

$\Delta G^{Excès}$: Energie libre d'excès (Energie de Gibbs)

FIGURES ET TABLEAUX :

Figure N°1 : Représentation schématique de la localisation de la b-Lap au sein des liposomes,

Figure N°2 : Schéma du devenir in vivo des liposomes après injection intraveineuse

Figure N°3 : Schéma de l'évolution des liposomes avec leurs index thérapeutique associé.

Figure N°4 : Mécanisme de la b-Lap au niveau de la cellule cancéreuse

Figure N°5: Bilan du mécanisme de l'apoptose induit par la bêta-lapachone

Figure N°6 : Organisation moléculaire des assemblage lipidique

Figure N°7 : Schéma d'une molécule de phopholipide

Figure N°8 : Molécule de stéarylamine ($C_{18}H_{39}N$) M_M = 249,509 g/mol – pKa = 10,6

Figure N°9 : Schéma des différentes transitions de phase des phospholipides

Figure N°10 : Molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$) M_M = 386,6 g/mol

Figure N°11 : Procédé de préparation des liposomes par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique.

Figure N°12 : Représentation de l'équipement d'un lyophilisateur typique

Figure N°13 : Diagramme de phase d'état de l'eau

Figure N°14 : Phénomène de surfusion. ΔT = Degrés de surfusion ; Point de Schaefer = Début de la nucléation.

Figure N°15 : Formation de petits cristaux lors de l'étape de congélation à une vitesse ralentie

Figure N°16 : Formation de gros cristaux, anguleux qui occupent 80-90% du volume

Figure N°17 : Déplacement du front de sublimation lors du processus de séchage

Figure N°18 : Transfert de matière au cours de l'étape de sublimation

Figure N°19 : Diagramme d'un cycle de lyophilisation

Figure N°20 : Méthode de la plaque de Wilhelmy.

Figure N°21: Balance de Langmuir

Figure N°22 : Isothermes de compression $\pi = f(A)$.

Figure 23 : Représentation schématique des étapes de préparation de l'échantillon

Figure 24 : Changements de tension superficielle provoqués par les dépôts de solution de b-lap à la surface du tampon. Chaque numéro indique un dépôt.

Figure 25 : Changements de tension superficielle provoqués par les dépôts de solution de b-lap à la surface du tampon saturé de b-Lap. Chaque numéro indique un dépôt

Figure 26 : Isothermes de compression $\pi = f(A)$ du Lipoid E80 et de son mélange avec la b-Lap déposée sur l'eau.

Figure N° 27 : ΔA^{Exc} et le ΔG^{Exc} du mélange: Lipoïd E80-Chol-SA (7:2:1) étalé sur tampon PBS

Figure N° 28 : Module de compressibilité latéral-sous phase tampon PBS

Figure N° 29 : Variation du ΔA^{Exc} et du ΔG^{Ex} en fonction de la pression : Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap 3,5%

Figure N° 30 : Variation du ΔA^{Exc} et du ΔG^{Ex} en fonction de la pression : Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap 50%

Figure N° 31 : Isothermes de compression $\pi = f(A)$ du mélange : Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1)

Figure N° 32: Isothermes de compression $\pi = f(A)$ du mélange : Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-bêta-Lapachone (3,5%)

Figure N° 33: Isothermes de compression $\pi = f(A)$ montrant l'effet de DSPE-PEG_{2000} sur le mélange de lipides étalé à l'interface air/tampon.

Figure N° 34: Isothermes de compression $\pi = f(A)$ montrant l'effet de DSPE-PEG_{2000} et de la b-Lap sur le mélange de lipides étalé à l'interface air/tampon.

Figure 35 : Techniques de caractérisation des liposomes

Figure 36 : Etude de taille des liposomes formulés

Figure 37 : Etude du potentiel de surface des liposomes formulés

Figure 38 : Etude de la stabilité en taille des liposomes au cours du temps

Figure 39 : Image AFM d'une bicouche lipidique de Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7 :2 :1) – 0,5mM.

Figure 40 : Coupe schématique supposée d'une bicouche comportant un domaine liquide condensé, résultant de l'enrichissement de domaines de lipoïd E80 par du cholestérol

Figure 41 : Image AFM d'une bicouche de Lipoïd E80-Chol-SA (7:2:1) - 1 mM

Figure 42 : Image AFM d'une bicouche Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap 3,5% - 1 mM

Figure 43 : Spectres d'émission (bleu) et d'excitation (rouge) d'une solution de bêta-Lapachone dans l'éthanol

Figure 44: « Mind Map »

Figure 45 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la bêta-Lapachone en solution dans l'éthanol

Figure 46: Déroulement des étapes du cycle de lyophilisation

Figure 47: Distinction entre la température de nucléation et degré de surfusion

Figure 48: Formation des cristaux de glace

Figure 49: Cinétique de formation des cristaux non contrôlé : Nucléation hétérogène entre flacons

Figure 50: Cinétique contrôlée de formation des cristaux: Nucléation homogène entre flacons

Figure 51: Technologie FreezeBooster^{TM} brevetée par Millrock

Figure 52: Méthode de nucléation contrôlée par l'injection de cristaux de glace

Figure 53: Technologie ControlLyo^{TM} brevetée par Praxair

Figure 54 : Phénomène de « collapse »

Figure 55: Aperçu des différentes étapes du procédé de lyophilisation avec respectivement chacune de leurs propriétés physiques et les outils utilisés

Figure N°56 : Liste non exhaustive des excipients utilisés pour la formulation de produits lyophilisés

Tableau 1 : Composition du système étudié par [*Calvacanti et al. 2011*]

Tableau 2 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bêta-Lapachone

Tableau 3 : Liste des produits solides et liquides utilisés

Tableau 4 : Récapitulatif des mesures effectuées pour les mélanges binaires étalés sur l'eau pure. K_{Max} : Module de compressibilité maximal. ΔV_{Max} : Potentiel de surface maximal de la monocouche.

Tableau 5 : Valeurs caractéristiques des mélanges de lipides avec et sans b-Lap, étalés sur tampon PBS.

Tableau 6: Température de transition de phase ou de fusion des différents composants des liposomes

Tableau 7 : Récapitulatif des mesures d'efficacité et de taux d'encapsulation

REMERCIEMENTS:

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble du jury, Pr D. Wouessidjewe, Pr A. Gèze, Pr L. Choisnard et Pr V. Rosilio d'avoir accepté d'encadrer ma thèse et d'en être rapporteur. La version finale de ce mémoire a bénéficié de leur lecture et de leurs remarques précieuses. Je les remercie également d'avoir assisté à la présentation de ce travail, particulièrement Véronique Rosilio qui s'est déplacée depuis Paris.

Je voudrais remercier de nouveau Mme Véronique Rosilio, responsable de l'équipe 1 « Physico Chimie des surfaces » à l'UMR 8612 Paris 11, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer mon stage de Master 2, et de m'avoir accueilli dans son équipe. Ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa grande disponibilité et son écoute tout au long du stage m'ont été très précieuses et je lui adresse ma gratitude.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Ali Makky, Jean-Philippe Michel et David Chapron, membres de l'équipe 1, ainsi qu'à Athéna Kasselouri pour leur intérêt à l'égard de ma recherche, leur grande disponibilité, leur aide et leur gentillesse. Leurs remarques m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle.

Pour finir je tiens également à remercier Rabeï Mohammedi, Hélène Chacun, Sylviane Lesieur, Claudie Bourgaux et Stéphanie Denis pour l'aide apportée lors de la mise en place d'expériences.

Pour leur soutien permanent et leur aide, aussi bien matérielle que morale, je remercie chaudement, mes parents Laurence et Nicholas ainsi que ma sœur Eva, qui m'a permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions.

SOMMAIRE

I. Introduction 12

II. Problématique 14

III. Contexte du sujet et état de l'art 16

III.1. Nanomédicaments pour le traitement du cancer 16

III.2. Bêta-lapachone 18

III.2.1 Propriétés 18

III.2.2 Mécanismes d'action 19

III.3. Les Liposomes 21

III.3.1 Définition 21

III.3.2 Morphologie 21

III.3.3 Composition 22

III.3.3.1 Phospholipides 22

III.3.3.2 Lipides sensibles à la température 23

III.3.3.3 Cholestérol 25

III.3.3.4 Les polymères "PEGylés" 25

III.3.4 Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation de solvant 26

III.4. Lyophilisation des suspensions colloïdales 27

III.4.1 Principe de la lyophilisation 27

III.4.2 Le lyophilisateur 28

III.4.3 Etapes de la lyophilisation 29

III.4.3.1 La congélation 29

III.4.3.2 La sublimation 32

III.4.3.2 La dessiccation secondaire 35

III.4.4 Cycle de lyophilisation 35

III.4.5 Importance de la formulation 36

IV. Matériels et méthodes 38

IV.1. Matières premières mises en oeuvre 38

IV.2. Formulation et caractérisation des liposomes 38

IV.2.1 Formation des liposomes 38

IV.2.2 Distribution de taille 39
IV.2.3 Potentiel zêta (ζ) 39
IV.2.4 Analyse interfaciale des lipides : 40
IV.2.4.1 Tensiomètre (tensiomètre K11) 40
IV.2.4.2 Balance de Langmuir 40
IV.2.5 Analyse du thermogramme des liposomes : DSC 43
IV.2.6 Méthodes de dosage 43
IV.2.6.1 Dosage de la bêta-Lapachone : contrôle du taux d'encapsulation 43
IV.2.6.2 Dosage de la phosphatidylcholine 44
IV.2.7 Analyse de la morphologie des liposomes : microscope à force atomique 45
IV.2.8 Spectrométrie de fluorescence 46
V. Résultats et discussion 47
V.1. Caractérisation de la bêta-Lapachone 47
V.1.1 Tensiométrie 47
V.1.2 Balance de Langmuir 48
V.2. Analyse des mélanges binaires lipides-b-Lap (3,5 et 50%) 49
V.3. Analyse des mélanges ternaires en présence de b-Lap 50
V.4. Analyse des mélanges lipides-PEG-b-Lap 55
V.5. Etude sur la bicouche : formation de liposomes 56
V.5.1 Etude de la distribution de la taille et du potentiel zêta 57
V.5.1.1 Analyse granulométrique 57
V.5.1.2 Etude du potentiel zêta 58
V.5.1.3 Etude de stabilité 58
V.5.2 Microscope à force atomique 59
V.5.3 Etude du comportement thermique des liposomes 61
V.5.4 Etude de fluorescence par spectrométrie 62
V.5.5 Dosage : contrôle du taux d'encapsulation 65
V.6. Procédé de lyophilisation de la suspension liposomale de b-Lap 67
V.6.1 Enjeu Industriel du procédé 67
V.6.2 Les phases critiques du processus de lyophilisation 68
V.6.2.1 Solidification totale du produit: 70
V.6.2.2 Durée du cycle de lyophilisation 70
V.6.2.3. Homogénéité des lots lyophilisés 73

V.6.2.4 Phénomène d'effondrement « collapse » 77
V.6.2.5 Phénomène de « croutage » 78
V.6.3 Choix de formulation 81
VI. Conclusion et perspectives 86
VII. Références bibliographiques 87

I. Introduction

La nanotechnologie est apparue comme l'un des domaines les plus prometteurs de la recherche biomédicale au cours des dernières décennies. De récents progrès ont rendu possible la création de systèmes spécifiques permettant d'acheminer une substance active et de la délivrer au niveau de son site d'action, améliorant ainsi son efficacité thérapeutique et diminuant sa toxicité systémique.

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à des liposomes, vésicules sphériques de taille submicronique, composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques concentriques qui peuvent être décorées de groupements fonctionnels afin de les guider vers un site biologique bien défini. Les liposomes ont reçu beaucoup d'attention au cours des 35 dernières années en tant que supports pharmaceutiques à haut potentiel. Ils sont davantage développés que les nanoparticules en tant que formes galéniques, mais aussi couramment utilisés en biologie comme modèle membranaires car composés de la même matière que les membranes cellulaires. Aujourd'hui, plusieurs formulations de liposomes sont commercialisées telles que Ambisome®, Daunoxome® ou encore Myocet® (poudres de suspension de liposomes administrées par perfusion intraveineuse) ; D'autres sont encore à différents stades d'essais cliniques.

La bêta-Lapachone (b-Lap) est une substance très prometteuse qui a montré des résultats encourageants en tant qu'agent anticancéreux. Néanmoins, elle présente des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques problématiques dont une faible solubilité, un faible indice thérapeutique, un manque de spécificité, des effets indésirables, une fragilité et une accessibilité difficile au site d'action, rendant son administration délicate. Une stratégie pour surmonter ces difficultés est l'utilisation de systèmes transporteurs tels que les liposomes qui peuvent permettre de solubiliser la b-Lap et la protéger jusqu'à sa délivrance.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier le mécanisme d'incorporation de la b-Lap dans des liposomes et proposer des pistes pour la formulation de liposomes concentrés et stables contenant cette substance.

Un des inconvénients majeurs de ces systèmes en suspension est leur instabilité à la fois chimique et physique. La lyophilisation est une méthode couramment utilisée, qui s'impose

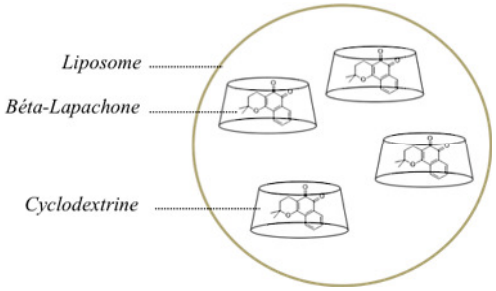
comme la plus intéressante pour parvenir à la stabilité au long terme des liposomes. Cependant il reste complexe, exigeant et il nécessite des compétences techniques, scientifiques et un grand “savoir faire”.

Le second objectif de ce projet est d’étudier les différents aspects du procédé de lyophilisation de vecteurs colloïdaux et de comprendre ses enjeux, notamment ce qui permettra dans le futur d’avoir un gain de productivité tout en garantissant l'amélioration de la qualité des produits lyophilisés dans un contexte économique, social, écologique et réglementaire de plus en plus exigeant.

II. Problématique

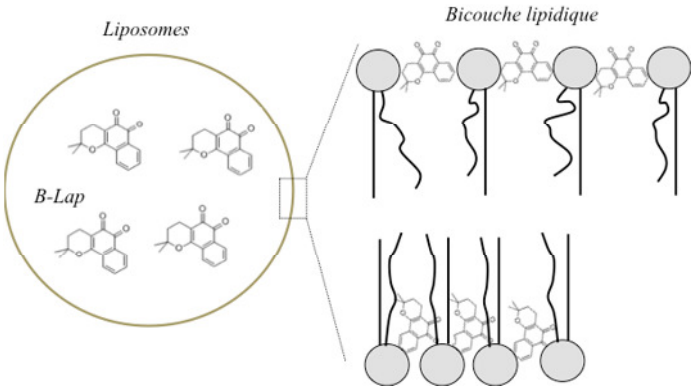
Le point de départ de ce projet de recherche est l'article intitulé : *The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes. A physicochemical evaluation and molecular modelling approach* par [*Calvacanti et al. 2011*]. Dans cette publication, les auteurs présentent deux modèles de liposomes, l'un basé sur l'encapsulation de complexes b-Lap-cyclodextrines pour augmenter la solubilité de la b-Lap au niveau du cœur aqueux, le second encapsulant directement la b-Lap seule, en la mélangeant dès le départ avec les lipides (Figure 1). Aucune différence significative n'est clairement mise en évidence entre les deux formulations, notamment en ce qui concerne l'efficacité d'encapsulation (EE) qui est de 97,48 +/- 0,02% pour les liposomes sans cyclodextrines (CD) et de 96,84 +/- 0,03% pour ceux qui en contiennent. Nous nous sommes intéressés aux phénomènes pouvant expliquer une efficacité d'encapsulation de la b-Lap supérieure à 97%, avec des liposomes seuls.

Travaux antérieurs :



Complexation de la b-Lap dans les CD et localisation dans le cœur aqueux des liposomes.

Projet de l'étude :



Incorporation supposée de la b-Lap dans la paroi des liposomes.

Figure N°1 : représentation schématique de la localisation de la b-Lap au sein des liposomes, d'après les travaux de *[Calvacanti et al. 2011]*

Dans l'article, peu d'informations sont données sur les raisons pour lesquelles les auteurs préfèrent la formulation avec le complexe CD-b-Lap. De plus ils n'expliquent pas où se situe la b-Lap dans le liposome (cœur aqueux ? bicouches lipidiques ?) ni comment elle se libère.

Cette étude a pour objectif de répondre à ces questions. Il a comporté plusieurs étapes:

1. La vérification de la prise en charge effective de la b-Lap par les liposomes ;

2. La détermination de sa localisation et la compréhension de son mécanisme d'interaction avec les différents lipides de la formule ;
3. Une tentative d'augmentation du taux d'encapsulation de la b-Lap ;
4. Enfin, l'ajout de phospholipides PEGylés aux liposomes, pour une meilleure conservation et efficacité *in vivo.*

[*Calvacanti et al.* 2011] ont étudié le système décrit dans le tableau 1.

% de b-Lap par rapport aux lipides	Concentration molaire de mélange Lipoïd E80-Cholestérol-Stéarylamine (7:2 :1)	Concentration de b-Lap
3,5%	117,6 mM	1 mg/ml

Tableau 1 : Composition du système étudié par [*Calvacanti et al. 2011*]

Nous sommes partis de cette formulation pour réaliser nos propres travaux.

Ces systèmes colloïdaux ont fait l'objet de recherches intensives ces dernières années et font désormais partie des systèmes de choix pour l'encapsulation de nouvelles molécules thérapeutiques.
Cependant ces systèmes restent encore contestés en raison de leur instabilité physique et chimique dans les dispersions aqueuses. En conséquence de nombreuses méthodes de stabilisation de ces systèmes ont été étudiées. La lyophilisation est celle principalement utilisée pour prolonger la durée de vie des suspensions liposomales et en particulier pour ceux encapsulant une substance thermosensible.
Néanmoins les liposomes restent des systèmes fragiles susceptibles d'être endommagés lorsque soumis à un tel procédé. La protection de l'intégrité de la bicouche lipidique reste donc un challenge de première importance. La maîtrise des paramètres critiques du procédé de lyophilisation et des paramètres de formulation, sont autant d'éléments clés à optimiser pour assurer une bonne efficacité d'encapsulation en fin de procédé.

III. Contexte du sujet et état de l'art

Dans cette première partie, nous présenterons le contexte et l'état de l'art qui ont guidé ce travail de recherche.

III.1. Nanomédicaments pour le traitement du cancer

Le cancer touche chaque année 14 millions de personnes dans le monde. Cette incidence pourrait augmenter de 70 % au cours des deux prochaines décennies. Plus de 8 millions de personnes en meurent, ce qui représente environ 13 % de la mortalité mondiale [*OMS Cancer Février 2015*]. Le cancer est par conséquent un problème majeur de santé dans le monde. En France, avec environ 150 000 décès par an, il représente la première cause de mortalité [*UniCancer en France 2012*]. Ces chiffres montrent l'ampleur des dégâts, et on comprend pourquoi le traitement des cancers suscite une grande attention de la part des chercheurs.

Les méthodes thérapeutiques actuelles sont souvent peu efficaces, toxiques, très contraignantes et généralisées au corps entier (radiothérapie, chimiothérapie). Il est donc impératif de trouver de nouveaux moyens de lutter contre ce réel problème de santé. La nanotechnologies a connue une avancée majeure et peut apporter des solutions intéressantes. En effet, grâce aux nano-vecteurs, une substance active peut être directement acheminée jusqu'à la tumeur sans altérer les organes sains. L'utilisation des nanotechnologies s'avère donc très prometteuse pour le traitement du cancer.

Les liposomes sans modification de surface sont qualifiés de vecteurs de *première génération*. Lors de leur administration par voie intraveineuse, ils se concentrent essentiellement au niveau des tissus du système réticulo-endothélial, c'est-à-dire principalement dans le foie (au niveau des cellules de Kupffer). Ce phénomène est essentiellement dû au fait qu'ils présentent une surface spécifique considérable, à laquelle viennent s'adsorber de nombreuses protéines plasmatiques (opsonines), qui sont par la suite reconnues sélectivement par les macrophages du foie. Ces derniers viennent alors interagir à leur tour avec les nano vecteurs : ceci explique pourquoi les nano vecteurs de 1^{e} génération se concentrent rapidement au niveau hépatique.

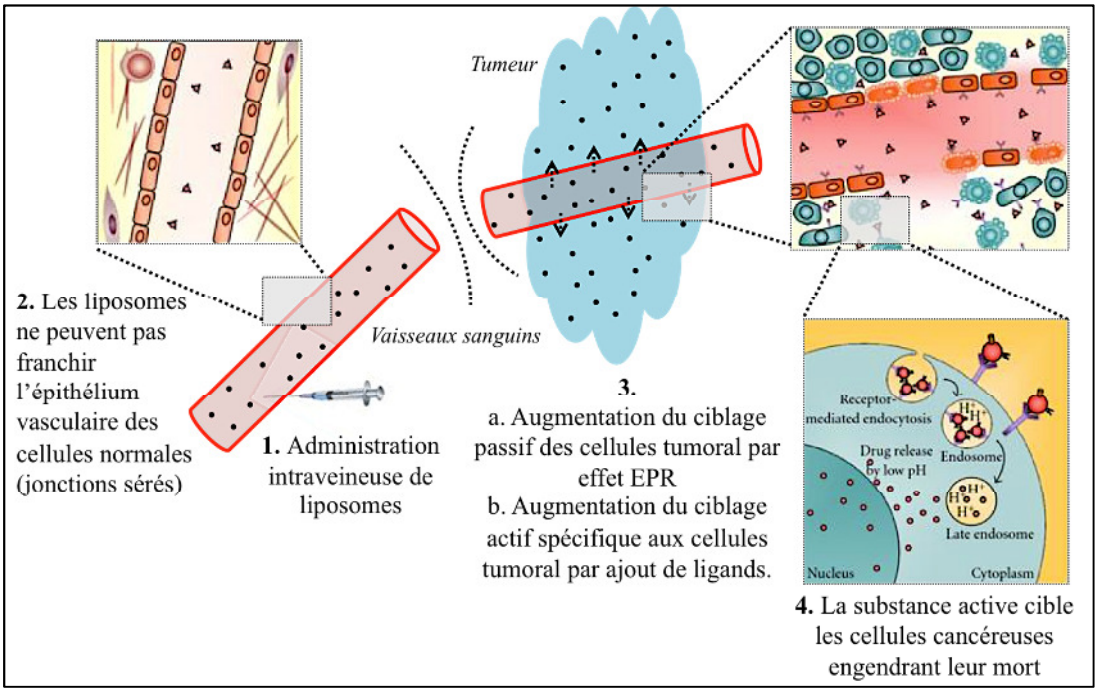


Figure N°2 : Schéma du devenir in vivo des liposomes après injection intraveineuse d'après [*Wu et al 2010*]

Pour contourner ce ciblage au niveau hépatique, la surface des nano vecteurs a été « décorée » par des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles, des polyoxyéthylène glycols, capables de repousser ces opsonines par un mécanisme stérique. On a ainsi obtenu des nano-vecteurs de *deuxième génération*, dits « PEGylés » ou furtifs. Ces nano-vecteurs persistent plus longtemps dans la circulation sanguine, ce qui leur permet d'atteindre d'autres tissus que le foie et d'être plus efficaces. Au voisinage d'une tumeur, l'endothélium vasculaire est hautement perméable comparé aux jonctions intercellulaires serrées des tissus sains. Il se produit donc un ciblage passif au niveau de la tumeur. Cet effet est appelé effet EPR pour Enhanced Permeability and Retention effect (Figure 2).

La figure 3 illustre les différentes phases d'évolution des liposomes. Lors de ce projet la caractérisation de l'encapsulation de la b-Lap a été réalisée pour des liposomes de 1ère et 2ème génération.

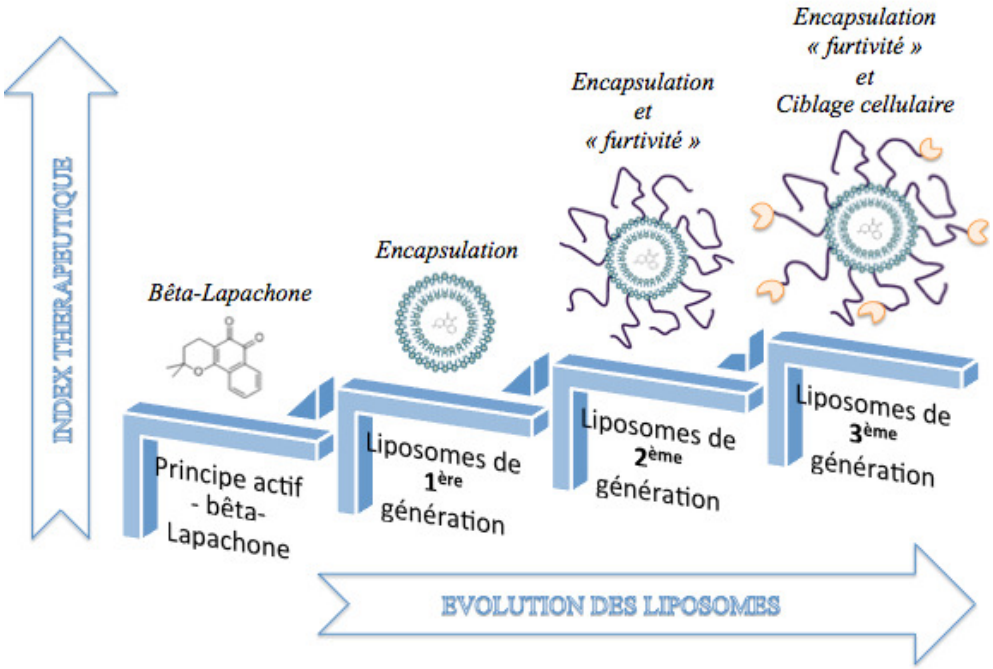


Figure N°3 : Schéma de l'évolution des liposomes avec leur index thérapeutique associé. La première génération comprend une simple encapsulation du médicament. La seconde génération encapsule le principe actif en placant un polymère à la surface du liposome de façon à ce qu'il ne soit pas reconnu par l'organisme. Enfin la dernière génération dispose d'un ciblage actif (les ligands).

III.2. Bêta-lapachone

III.2.1 Propriétés

La b-Lap (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho [1,2-b]- pyran-5,6-dione) est une naphtoquinone naturellement présente dans l'écorce du Lapacho (*Tabebuia avellanedae*) arbre originaire des forêts tropicales d'Amérique du Sud. Ses caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques sont résumées dans le tableau 2:

Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques	Références	
Molécule hydrophobe : XLOGP3 = 2,2	Site GuideChem	
Instable à la lumière	[*Cunha-Filhoa et al 2011*]	
Masse molaire : 242,27 g/mol	-	
Température de fusion : 128°C	[*Cavalcanti et al 2011*]	Formule brute : $C_{15}H_{14}O$
Solubilité dans l'eau à 25°C: 0,16 mM (0,038mg/mL)	[*Nasongkla et al 2003*]	
Fluorescente à 436 nm après excitation à 330 nm	[*Nasongkla et al 2003*]	

Absorbe dans l'UV (λmax : 256 nm)	[*Cavalcanti et al 2011*]	
Coefficient. d'absorption : $2{,}643.10^4$ +/- 4,32 cm^{-1}.L.mol	[*Cavalcanti et al 2011*]	
Concentration thérapeutique efficace 10-20 µM soit 2,4 mg/L	[*Cavalcanti et al 2011*]	

Tableau 2 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques et biologiques de la bêta-Lapachone

III.2.2 Mécanismes d'action

La b-Lap est une molécule thérapeutique qui, une fois purifiée, possède de nombreuses propriétés parmi lesquelles une activité anti-cancéreuse. Elle cible notamment la topoisomérase I, enzyme qui contrôle la structure topologique de l'ADN [*Chau et al. 1997*]. Le rôle de la b-Lap n'est pas encore tout à fait clair bien que plusieurs études aient montré sa capacité à induire la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses de la prostate, du poumon, du pancréas et du sein.

La b-Lap pénètre dans la cellule cancéreuse sous sa forme oxydée, et est activée une fois réduite par l'enzyme NQO1 (flavoprotéine surexprimée dans une variété de cancers humains [*E. Blanco et al. 2007*]. Cette forme réduite étant instable, de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont formées. Il s'en suit une attaque de l'ADN entrainant un stress cellulaire capable d'activer la protéine p53 (facteur de transcription régulant certaines fonctions cellulaires importantes comme la mitose ou la mort cellulaire programmée). Celle-ci va directement contrôler le mécanisme apoptotique en activant, en autres, l'expression du gène Bax [*J.I. Lee et al. 2006*] (Figure 4).

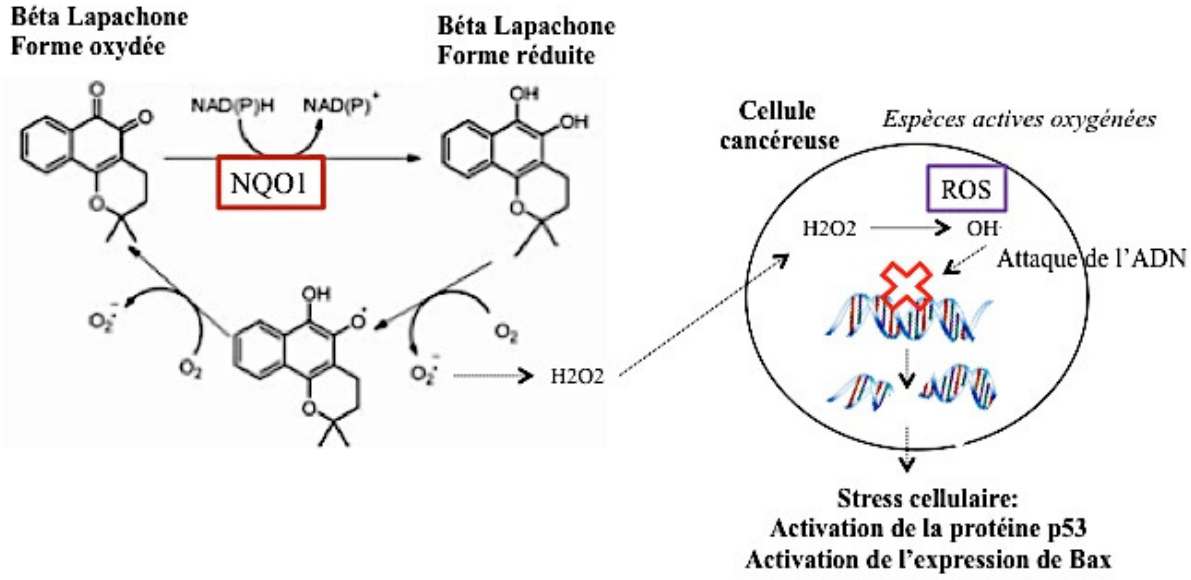


Figure N°4 : Mécanisme de la b-Lap au niveau de la cellule cancéreuse

En se dimérisant, la protéine Bax entraîne le relargage du calcium intracellulaire du réticulum endoplasmique (RE) en interagissant avec les domaines cytosoliques des canaux calciques sous contrôle du récepteur de l'inositol 1,4, 5-triphosphate (IP3R) : ce relargage induit le mécanisme de l'apoptose *via* de multiples effets sur la mitochondrie dont sa perméabilisation et le relargage du cytochrome C. Il permet également l'activation des calpaïnes, protéines Ca^{2+} dépendantes, qui peuvent à leur tour activer, par protéolyse, la caspase 12 qui médie l'apoptose. Bax provoque aussi la perforation des membranes mitochondriales et la libération du cytochrome C. Cette libération est un événement central dans le processus apoptotique intrinsèque. En se liant à Apaf-1, le cytochrome C présent dans le cytosol crée un complexe nommé apoptosome qui permet l'activation de la pro-caspase-9 en caspase-9. Il se forme ensuite un complexe apoptosome + caspase 9 qui induit l'hydrolyse de l'ADN et la protéolyse de nombreuses protéines (dont la caspase-3) [*K.E. Choï et al. 2007*]. C'est ainsi que la chaîne des caspases est activée et entraîne la mort cellulaire (Figure 5).

La surconsommation de l'enzyme NQO1 entraine une déplétion en NADH/NADP et en ATP. Ceci est à l'origine d'un relargage du calcium intracellulaire, activant également la voie des calpaïnes. L'ensemble de ce programme conduit à l'apoptose.

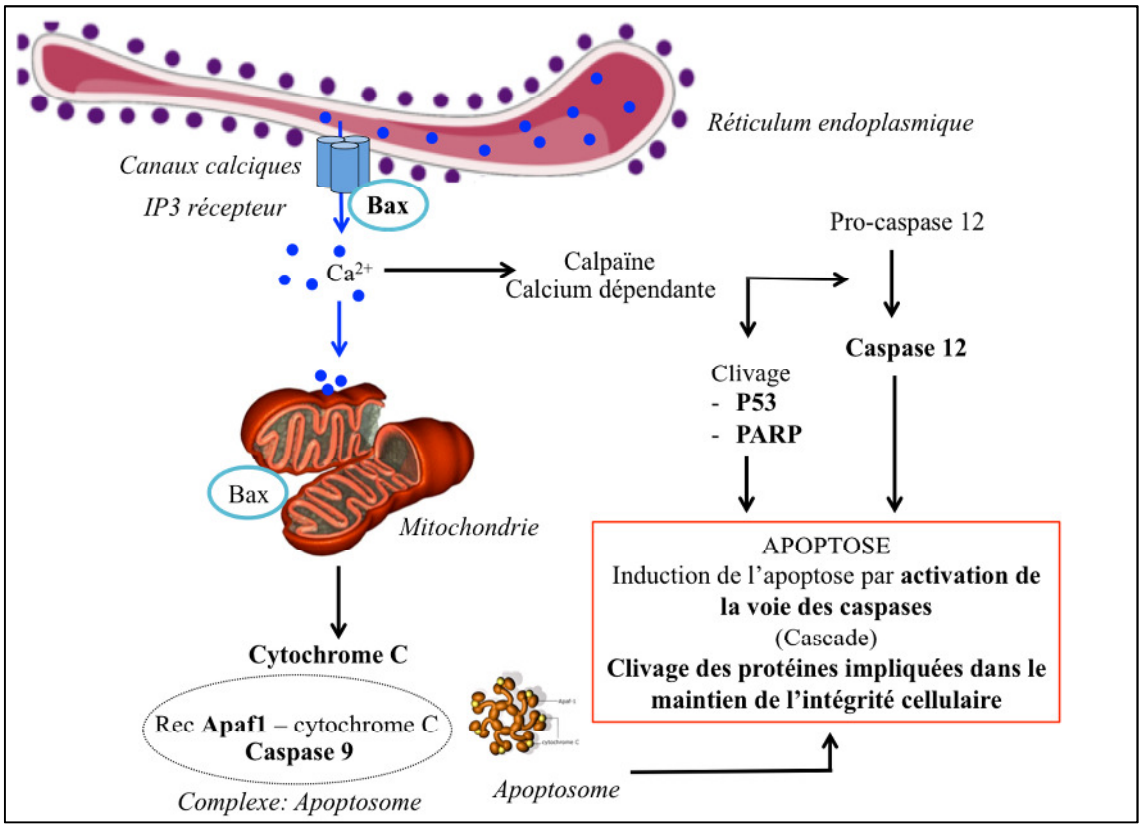


Figure N°5: Bilan du mécanisme de l'apoptose induit par la bêta-lapachone

III.3. Les Liposomes

III.3.1 Définition

Un liposome est défini comme une vésicule sphérique dans laquelle une cavité interne aqueuse est délimitée par une bicouche lipidique [*Bangham et Horne 1964*]. Le terme liposome est dérivé de deux mots grecs, « lipides » qui signifie *la graisse* et « soma » signifiant *le corps*. Les liposomes sont de plus en plus utilisés en médecine et cosmétique comme supports de composés biologiquement actifs (médicament anticancéreux, vaccin, enzyme, hormone ou encore matériel génétique). Leur efficacité en tant que système de délivrance de médicaments dépend de leurs paramètres physico-chimiques tels que leur composition, leur taille, leur polydispersité, leur potentiel zêta, ainsi que leur capacité d'encapsulation.

III.3.2 Morphologie

Les liposomes sont des systèmes constitués majoritairement de molécules amphiphiles bicaténaires (deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire) tels que les phospholipides qui s'auto-assemblent spontanément dans l'eau. Le paramètre d'empilement (PP « Packing parameter ») permet de rendre compte de l'arrangement des lipides et de prédire les structures formées en milieu aqueux [*J.N Israelachvili 1976*] (figure 6).

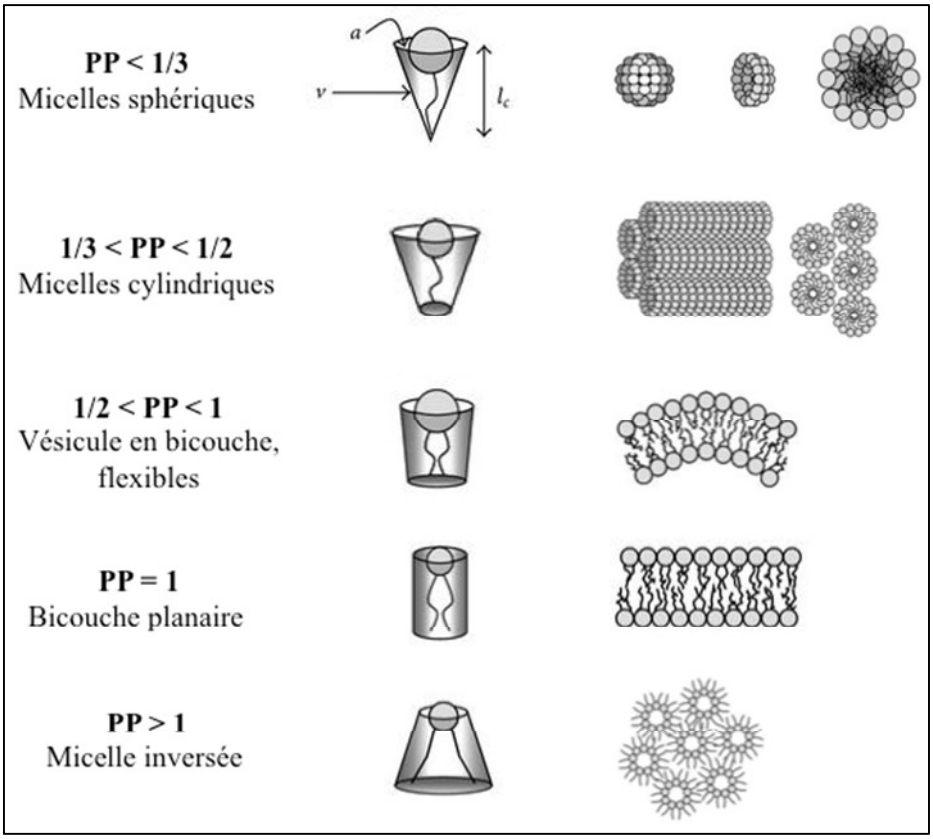


Figure N°6 : Organisation moléculaire des assemblages lipidiques d'après [BD A. Balazs & WT. Godbey, *2010*]

Il est exprimé comme le rapport liant le volume de la chaîne hydrophobe (V), sa longueur critique (L_c) et l'aire optimale du groupement polaire (a):

$$PP = \frac{V}{a \,.\, L_c} \qquad \text{(Equation 1)}$$

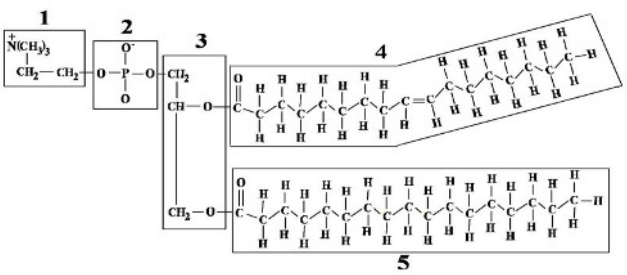
Les paramètres d'empilement critique préférés pour la formation de vésicules sont compris entre 0,5 et 1. D'après l'étude de Kumar [*Kumar 1991*], l'organisation supramoléculaire la plus intéressante correspondrait à PP compris entre 0,74 et 1. Mais la variation de certains paramètres (pH, température du milieu) peut entraîner un changement de conformation vers PP >> 1 et mener à des structures inverses.

III.3.3 Composition

III.3.3.1 Phospholipides

Les phospholipides sont des composants ubiquitaires des membranes biologiques. Ceux entrant dans la composition des liposomes sont soit des glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithine d'œuf ou de soja) ou synthétique, saturés ou insaturés, soit des sphingolipides (sphingomyélines). Les phospholipides naturels sont disponibles à différents degrés de pureté. Ils sont hétérogènes (longueur des chaînes lipidiques, degré d'insaturation) et leur utilisation peut être limitée par des problèmes de stabilité chimique (peroxydation, dégradation enzymatique). Les dérivés synthétiques sont d'une grande pureté, stables et de composition bien définie. Les phospholipides pouvant former des vésicules portent deux chaînes hydrocarbonées (généralement de 14 à 18 atomes de carbone) qui peuvent être de même longueur ou, pour les phospholipides dits mixtes, de longueur différente [*Weinstein et Leserman, 1984*]. Ces chaines peuvent être toutes deux saturées ou insaturées, ou encore l'une saturée et l'autre insaturée (phospholipides hybride, comme la 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC).

Ces molécules sont structurées de la façon suivante : sur un squelette glycérol commun sont substituées deux chaines aliphatiques et une tête polaire constituée d'un groupement phosphate, lui-même substitué par des groupements polaires variables (Figure 5).



Formule développée d'une phosphatidylcholine (environ 770 g/mol) typique :

1. choline

2. phosphate

3. glycérol

4. acide gras insaturé en C2 du résidu glycérol

5. acide gras saturé en C1 du résidu glycérol

Figure N°7 : Schéma d'une molécule de phopholipide

L'addition de lipides chargés positivement (5 à 20 moles %) ou négativement, permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles [*Weinstein et Leserman, 1984*]. En effet, elle confère un potentiel de surface suffisamment élevé pour produire des effets de répulsion électrostatique entre les vésicules. Il en résulte un accroissement des espaces entre les liposomes, mais aussi, pour les vésicules multilamellaires un espacement entre les bicouches. Les liposomes décrits par *Calvacanti et al (2011)* sont chargés positivement du fait de la présence de la stéarylamine.

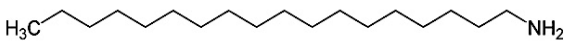


Figure N°8 : Molécule de stéarylamine ($C_{18}H_{39}N$) M_M = 249,509 g/mol – pKa = 10,6

III.3.3.2 Lipides sensibles à la température

Les phospholipides ont un comportement thermotrope. En fonction de la température, on distingue plusieurs phases (figure 7)

- Une phase cristalline *Lc*, à très basse température. Les molécules sont dans un état ordonné. La diffusion transversale des lipides y est quasi-inexistante.
- Une phase gel *Lβ*. Les interactions de van der Waals entre les chaînes d'acides gras sont optimisées et la diffusion translationnelle est très faible.
- Une phase fluide *Lα* à plus haute température. La structure est bidimensionnellement fluide, le niveau d'entropie des chaînes d'acide gras et de diffusion translationnelle sont élevée.

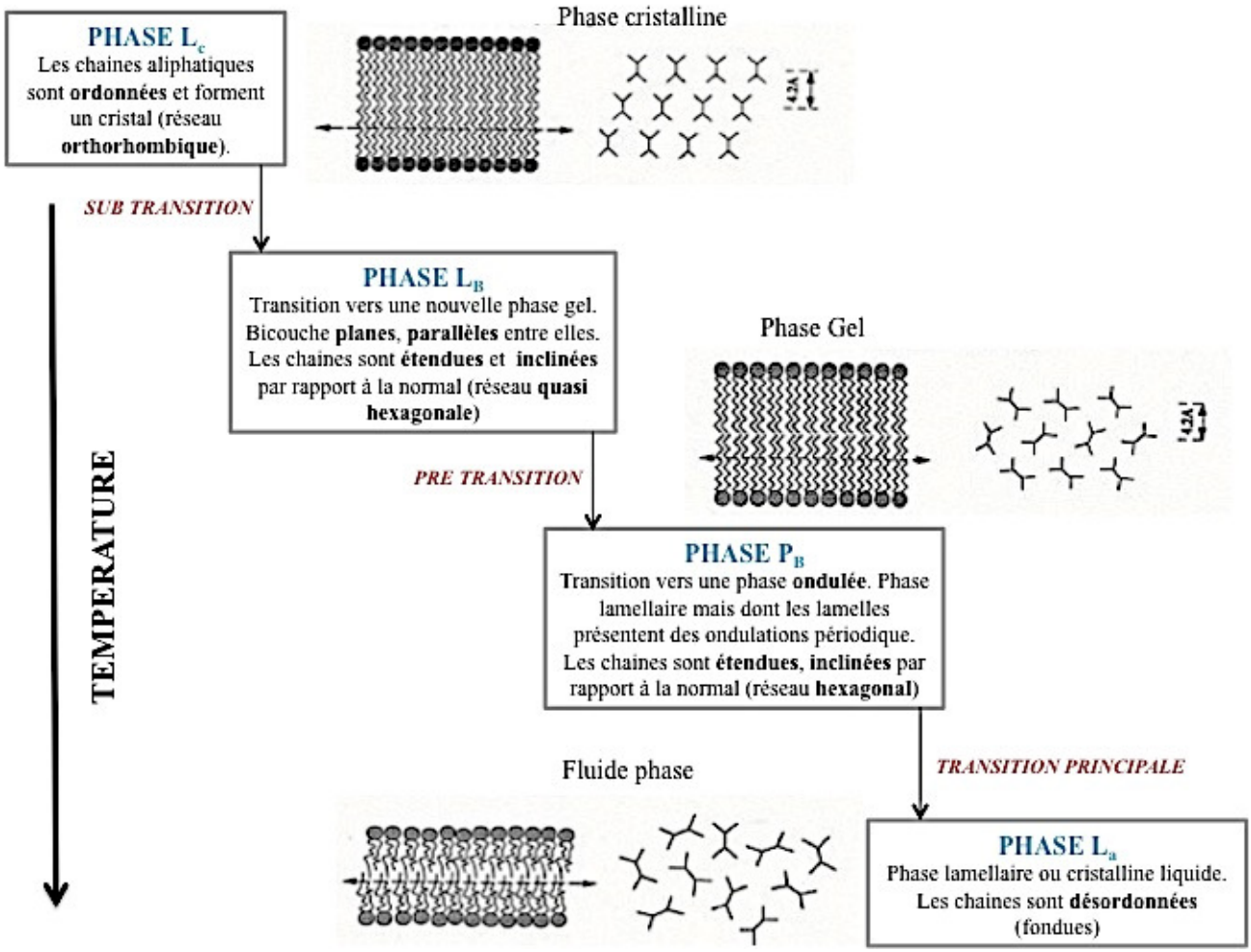


Figure N°9 : Schéma des différentes transitions de phase des phospholipides d'après [*C.Scomparin, 2009*]

La température de transition entre la phase gel Lβ et la phase fluide Lα est appelée température de transition principale gel-fluide (T_m). Elle rend compte de la quantité d'énergie qu'il faut fournir pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. Cette cohésion est assurée par des liaisons de faible énergie tant au niveau des chaînes hydrophobes (interactions de van der Waals) que des parties polaires (liaisons hydrogènes, attractions électrostatiques). La température de transition T_m varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras, ainsi que de la nature du groupement polaire. Pour les mélanges de lipides miscibles, elle est intermédiaire entre celles des lipides purs.

Le phénomène de transition de phase est important à prendre en considération dans l'application de liposomes pour l'administration de médicaments, en raison du fait que la perméabilité des bicouches augmente avec la fluidité de celle-ci et que les substances hydrophobes insérées dans la membrane sont susceptibles de l'affecter.

III.3.3.3 Cholestérol

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % molaire dans la formulation).

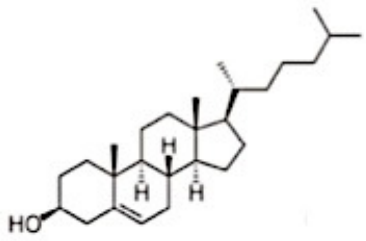


Figure N°10 : Molécule de cholestérol ($C_{27}H_{46}O$) M_M = 386,6 g/mol

Le cholestérol (M_M = 386,6 g/mol) exerce une grande influence sur les propriétés des bicouches lipidiques des liposomes, il a un impact sur leur fluidité et par conséquent sur leur perméabilité, sur leur rigidité et donc sur la stabilité du liposome. Il s'insère dans les bicouches avec sa partie hydrophobe parallèle aux chaines hydrocarbonées et son groupe hydroxyle au niveau de la partie polaire des phospholipides [*Yeagle, 1985*].

La température de transition de phase du mélange des lipides dans les liposomes est diminuée mais non éliminée par l'addition de cholestérol. Les travaux montrent que l'addition de cholestérol à des concentrations molaires supérieures à 20% conduit à la suppression de la pré-transition et à une diminution de la température de transition principale. Le pic endothermique s'élargit et l'aire sous la courbe diminue, ce qui traduit une diminution de la chaleur de transition. De plus, les transitions de phases principales ne sont plus détectables pour des concentrations supérieures ou égales à 50% de cholestérol. Cette concentration représente la concentration maximale de cholestérol pouvant être incorporée avant que la séparation de phase ne se produise [*Vist et al, 1990*].

III.3.3.4 Les polymères « PEGylés »

Les polymères, et plus particulièrement le polyéthylène glycol (PEG), sont utilisés dans la formulation de liposomes dans le but d'augmenter leur caractère furtif vis à vis du système de défense biologique.

Le copolymère DSPE-PEG_{2000} (Polyéthylène glycol-Di-Stearoyl Phosphatidyl Ethanolamine) a été utilisé pour cette étude. C'est un polymère (copolymère) amphiphile constitué d'une partie hydrophobe (DSPE) et d'une partie hydrophile (PEG). Il est très largement utilisé dans la préparation des liposomes, notamment lorsque les groupes terminaux du PEG peuvent être activés et liés à divers ligands de ciblage, ce qui prolonge le temps de circulation, améliore la biodisponibilité, réduit les effets secondaires indésirables et favorise le ciblage de cellules

spécifiques. La teneur en DSPE-PEG_{2000} généralement utilisée, est de l'ordre de 5% molaire [*O. Tirosh, 1998*] et peut affecter dans certains cas la taille du liposome (l'incorporation de quantités croissantes de DSPE-PEG_{2000} réduit la taille des liposomes) [*W. Rongrong et al, 2012*].

III.3.4 Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation de solvant

Les méthodes de préparation des liposomes sont multiples. Celle utilisée dans notre projet est l'hydratation du film lipidique après évaporation du solvant organique utilisé pour former la solution. Cette méthode a été décrite par [*Bangham et al 1965*] (figure 11). Elle consiste à évaporer une solution organique de phospholipides jusqu'à la formation d'un film sec sur la paroi du ballon, puis à hydrater ce film à une température supérieure à la température de transition de phase (T_m) des phospholipides. Le film phospholipidique gonfle au contact de la solution aqueuse, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules multilamellaires (MLV). Le diamètre des vésicules obtenu par cette méthode est très grand, de l'ordre de quelques micromètres, et la distribution de taille est très hétérogène. Les techniques d'homogénéisation telles que les ultrasons, l'extrusion ou la microfluidisation permettent de réduire la taille et l'hétérogénéité des vésicules pour obtenir des vésicules unilamellaires petite (SUV) ou grande (LUV).

Les substances actives sont généralement encapsulées au cours du procédé de fabrication des liposomes par encapsulation passive [*M. Mougin-Degraef, 2004*] dans la phase au sein de laquelle elles sont les plus solubles.

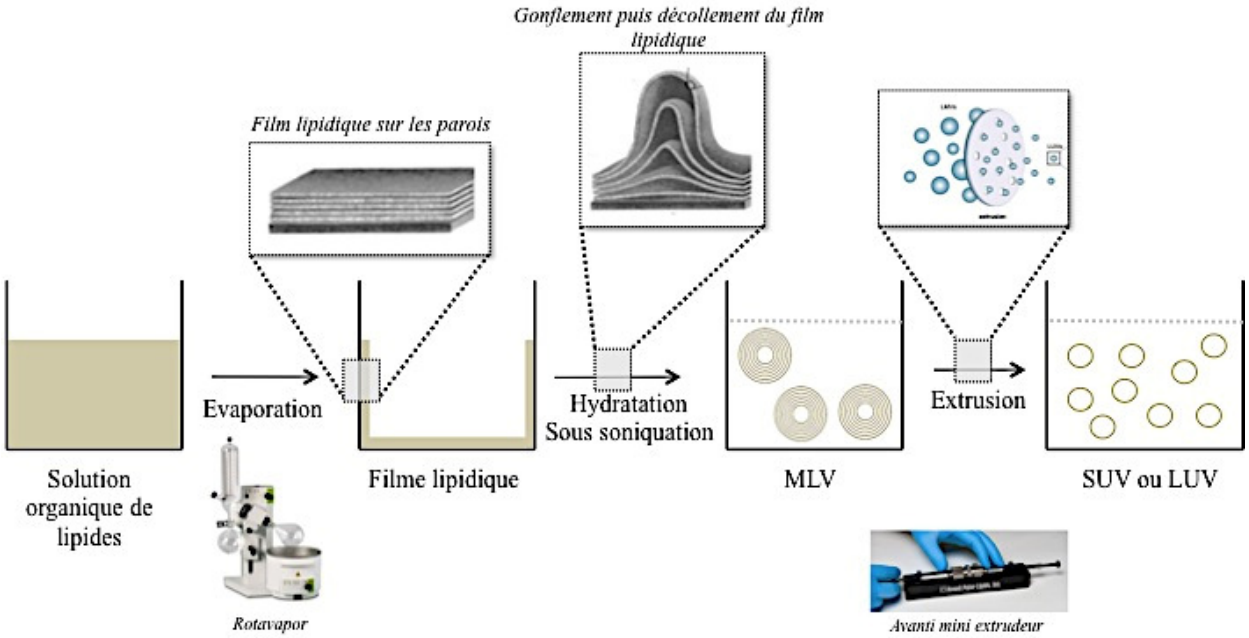


Figure N°11 : Procédé de préparation des liposomes par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique.

III.4. Lyophilisation des suspensions colloïdales

III.4.1 Principe de la lyophilisation

La lyophilisation est un procédé discontinu, lent, mis au service de l'industrie pharmaceutique depuis 1930 pour améliorer la conservation d'un produit [*Costantino.H et Pikal.M 2004*]. Cette technique, a été inventée en 1906 par les français Arsène d'Arsonval et F. Bordas au laboratoire de biophysique du collège de France à Paris [*Rossi Bruno 2004*]. C'est une opération de déshydratation à basse pression et basse température qui consiste en l'élimination progressive de l'eau par sublimation (passage direct d'un corps de l'état solide à l'état gazeux, sans passage par l'état liquide) de la forme pharmaceutique préalablement solidifiée par congélation.

L'intérêt de la lyophilisation est que le produit ne contient plus d'eau. Cette absence d'eau permet sa conservation et sa stabilité dans le long terme. Cela empêche également le développement de germes. A la différence des techniques à froid la lyophilisation ne dégrade pas les propriétés du produit et conserve la forme finale (volume, aspect). C'est donc une technique de choix pour la protection du PA (basse pression, basse température, absence de phase liquide), pour la conservation des substances thermosensibles, sensibles à l'hydrolyse ou à l'oxydation. De plus un lyophilisat a la particularité de se reconstituer rapidement par simple ajout d'eau, juste avant utilisation.

Toutefois la lyophilisation reste un procédé long (24 à 100h), exigeant (dénaturation possible du produit) et très couteux puisque 1500 à 2500 kWh d'énergie sont nécessaires à l'élimination d'une tonne d'eau [*Saclier Mathieu 2009*]. Il est donc inutile de vouloir lyophiliser un produit qui est parfaitement stable en solution et que l'on peut présenter sous forme d'ampoules injectables classiques. De plus un produit lyophilisé ne peut être stérilisé dans le récipient final, ce qui oblige à installer des lignes de production aseptiques.

Ainsi le système étudié dans ces travaux, à la fois instable en suspension avec une molécules active thermosensible à fort pouvoir ajouté, est un excellent candidat pour ce type de procédé. Par la suite les grands principes seront détaillés. Compte tenue de l'importance de cette technologie pour notre système les voix d'optimisation industriels et l'importance de la formulation seront traités plus loin dans la partie discussion.

III.4.2 Le lyophilisateur

Il existe plusieurs dispositifs pour la lyophilisation, mais la grande majorité est conçue sur cette base (figure 12).

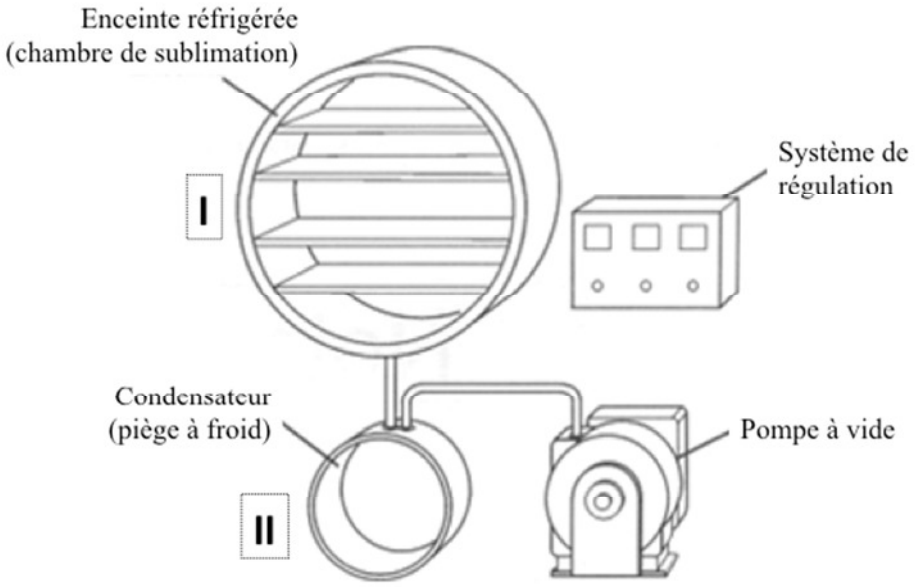


Figure N°12 : Représentation de l'équipement d'un lyophilisateur typique [*Institut Canadien de Conservation*]. En I : l'enceinte réfrigérée et en II : le condensateur.

Les quatre principaux composants sont, l'enceinte réfrigérée (chambre de sublimation), le condensateur (piège à froid), la pompe à vide et le système de régulation.

La chambre de lyophilisation possède des plateaux à température contrôlée par un fluide caloporteur (sublimation) ou réfrigérant (congélation). Le condensateur permet de séparer et

piéger les vapeurs d'eau extraites du produit lyophilisé lors de la sublimation. Une pompe à vide est nécessaire afin d'assurer le vide dans tout le système.

Plusieurs variables opératoires, température des plateaux, durée de refroidissement, pression de la chambre, sont à définir pour assurer la bonne propriété d'usage du lyophilisat après lyophilisation (porosité, aspect, propriétés). Cet aspect sera développé ultérieurement.

III.4.3 Etapes de la lyophilisation

Le diagramme température/pression de l'eau présente un point particulier : le point triple. Autour de ce point triple, l'eau peut exister à l'état solide, liquide ou gazeux, et en faisant varier la température et la pression, on fait passer l'eau d'un état à un autre.

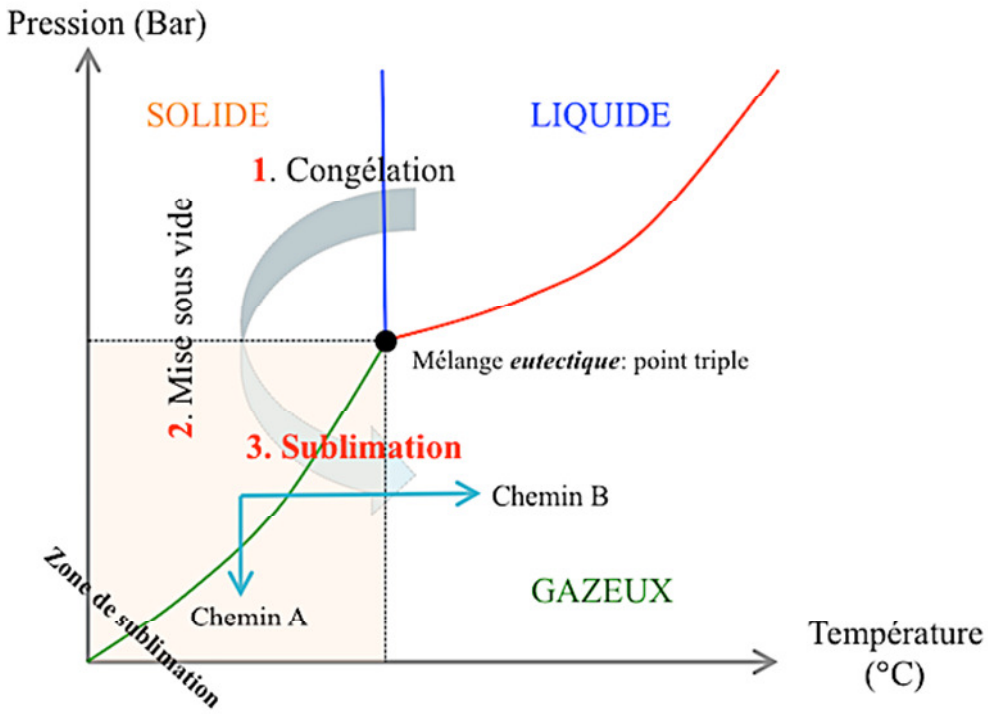


Figure N°13 : Diagramme de phase d'état de l'eau

Pendant le procédé de lyophilisation, trois étapes principales et successives entrainent le changement d'état de l'eau qui passe de l'état liquide, solide à vapeur.

III.4.3.1 La congélation

La congélation est la phase la plus critique du cycle de lyophilisation, elle conditionne l'aspect final du produit. Elle consiste à diminuer la température de celui-ci à une valeur comprise entre -10 °C et -80 °C, de façon à transformer l'eau liquide sous forme de glace. Le

produit est ainsi totalement solidifié, sous forme cristalline ou amorphe. Il est donc nécessaire de toujours se placer en dessous de la température de transition vitreuse T_g, pour les produits ayant une composante amorphe ou en dessous de la température $T_{eutectique}$, pour les produits ayant une composante eutectique [*Document pédagogique interne: L. Choisnard 2013*] et [*W. Abdelwahed et al, 2006*].

Pendant cette étape un phénomènes pouvant entrainer un retard de la nucléation de l'eau peut survenir : la surfusion.

Le point de surfusion (encore appelé « point de limite de surfusion » ou « point d'abaissement cryoscopique), est la température à laquelle les cristaux de glace apparaissent dans le milieu liquide d'origine. Le palier à 0°C de la solidification thermodynamique de la solution disparaît donc, et le produit reste liquide jusqu'à une température négative pouvant aller jusqu'à -10°C. C'est ce que l'on appelle la surfusion, c'est-à-dire que l'on se situe dans un état métastable de la matière dans lequel un liquide dont la température est sous le point de solidification demeure à l'état liquide au lieu de passer à l'état solide (figure 14). On appelle degrés de surfusion la différence entre la température de congélation thermodynamique (0°C) et la température du début de la nucléation (T_c) ou point de Schaefer.

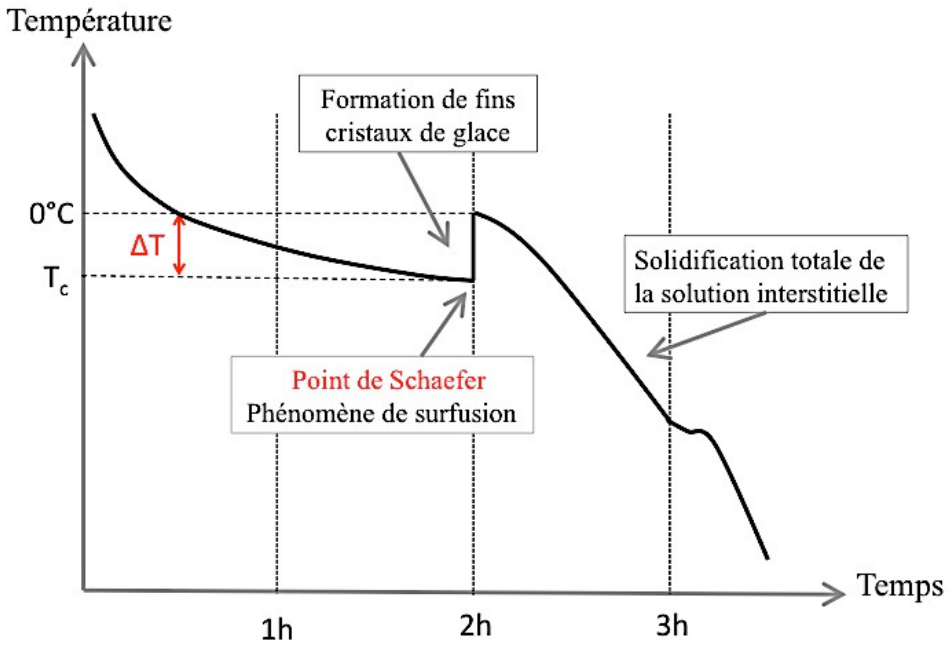


Figure N°14 : Phénomène de surfusion. ΔT = Degrés de surfusion ; Point de Schaefer = Début de la nucléation.

Brusquement (au point de Schaefer), la température remonte vers 0°C, ce qui correspond à la formation de manière spontanée à de très nombreux cristaux dans toute la masse du produit (nucléation homogène). Lors de l'étape de croissance des cristaux, il y a une consommation d'énergie calorique rapide.

Un paramètre très important à maitriser lors de cette étape est la vitesse de congélation. Ce paramètre va déterminer la morphologie des cristaux formés et par conséquent la taille des pores du lyophilisat empruntés par la vapeur d'eau au moment de l'étape de sublimation. Cette phase est donc essentielle, car elle doit garantir que le produit à lyophiliser ne sera pas altéré.

De manière générale la taille des cristaux est inversement proportionnelle à la vitesse de congélation [*Pikal, Michael J, 2011*]. Ceci a une conséquence directe sur l'étape suivante : la sublimation. En effet, une vitesse de congélation rapide (degré de surfusion élevé) va entrainer la formation d'un grand nombre de petits cristaux et par conséquent une faible porosité (figure 15). Cette faible porosité va entrainer de fortes contraintes de diffusion de la vapeur d'eau dans les pores et donc conduira à des temps de sublimation très importants.

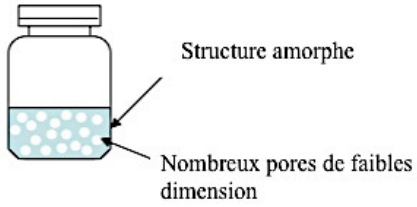


Figure N°15 : Formation de petits cristaux lors de l'étape de congélation à une vitesse ralentie [Document *pédagogique* interne : *La lyophilisation V.Rosilio, 2014*]

A l'inverse une vitesse de congélation lente (faible degré de surfusion) va entrainer la formation de gros cristaux de glace et par conséquent de gros pores (figure 16). Cette grande porosité va entrainer une faible contrainte de diffusion de la vapeur d'eau dans les pores entrainant un temps de sublimation très court. La surface spécifique des pores du lyophilisat est également réduite diminuant la vitesse de réhydratation de ce dernier [*Document pédagogique interne L. Choisnard 2013*]. De plus la formation de gros cristaux peut nuire à l'intégrité de la double couche lipidique des liposomes résultant en une structure désordonnée impactant par conséquent sur l'encapsulation de la substance active [*Chen et al. 2010*].

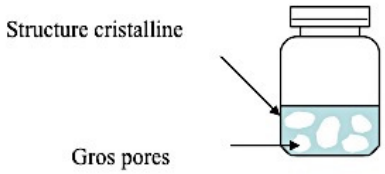


Figure N°16 : Formation de gros cristaux, anguleux qui occupent 80-90% du volume [*Document pédagogique interne* : *La lyophilisation V.Rosilio, 2014*]

Il faut donc trouver un compromis entre la vitesse de congélation, le temps de sublimation (le plus court possible pour diminuer les coûts opératoire) et la réhydratation du produit lyophilisé (la plus rapide possible).

III.4.3.2 La sublimation

La Phase de sublimation ou dessiccation primaire, consiste à extraire l'eau dite libre qui est sous forme de glace. Sous un vide (pouvant varier fortement d'un produit à l'autre, de 5 µbar à 500 µbar) [*GR. Nireesha et al. 2013*] permettant de passer sous le point triple, on apporte de la chaleur au produit (chemin B figure 13, pression constante) ou bien on diminue davantage la pression (chemin A figure 13, température constante), afin que la glace se sublime.

Cette étape nécessite environ 600 Kcal.g^{-1} d'eau (chaleur latente de vaporisation L_v). Il faut donc apporter cette énergie au produit en faisant attention à ne pas entraîner la fusion du produit. Cette énergie est apportée par un fluide caloporteur circulant dans les étagères où sont posés les flacons de produits (figure 12).

Au cours de la sublimation, les molécules d'eau qui s'échappent traversent donc une couche de produit déjà sec (contrainte de diffusion), sur laquelle certaines molécules vont s'adsorber. Le front de sublimation progresse donc du haut vers le bas (figure 17, 18).

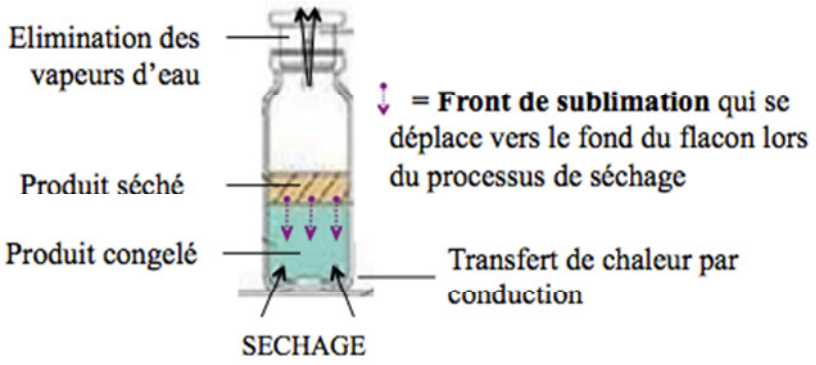


Figure N°17 : Déplacement du front de sublimation lors du processus de séchage

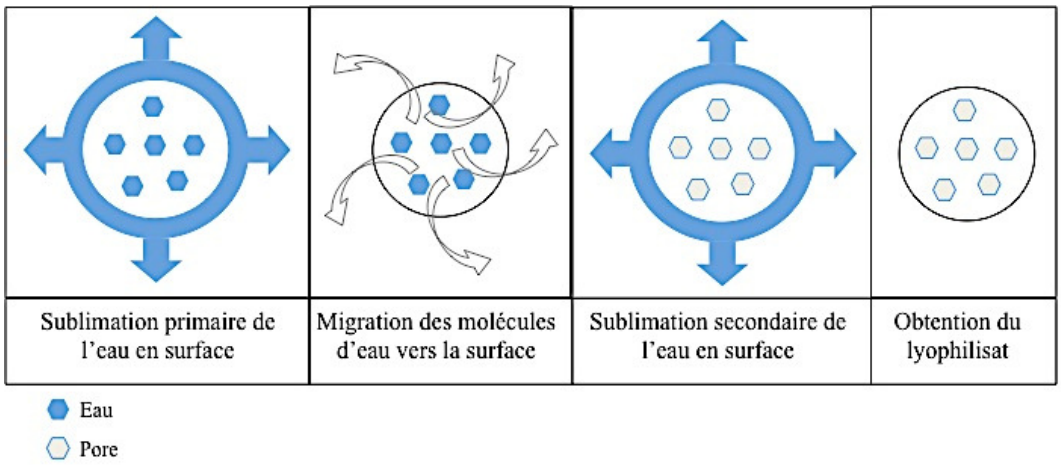


Figure N°18 : Transfert de matière au cours de l'étape de sublimation d'après [*Grugier, Jérome, 2013*]

Pendant cette étape le transfert de matière se produit à l'intérieur du produit mais également de la périphérie du produit vers l'enceinte de lyophilisateur.

A l'intérieur du produit le transfert de matière se fait du cœur vers la périphérie qui est imposée par la loi de Fick [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*] ; [M. *Marin et F. René, 2000*] :

$$\frac{d_m}{d_t} = \frac{D_{Kn}}{x} \times A \times (P_f - P_s) \quad \text{(Equation 2)}$$

D_{Kn} = Coefficient de diffusion relatif aux nombre de Knudsen ($m^2.s^{-1}$)

P_f = Pression partielle de la vapeur d'eau au front de sublimation (P_a)

P_s = Pression partielle de la vapeur d'eau à la surface externe du produit = Pression partielle dans l'enceinte du lyophilisateur (P_a)

A = Surface d'échange du front de sublimation (m^2)

x = Epaisseur de la couche sèche de produit (m)

Ensuite il y a un transfert de la vapeur d'eau de la surface du produit à l'enceinte d'après l'équation [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*] ; [*M. Marin et F. René, 2000*] :

$$\frac{d_m}{d_t} = K \times A \times (P_s - P_{enceinte}) \quad \text{(Equation 3)}$$

$P_{enceinte}$ = Pression partielle de la vapeur d'eau dans l'enceinte (P_a)

P_s = Pression partielle de la vapeur d'eau à la surface externe du produit (P_a)

A = Surface d'échange à la surface du produit (m^2)

K = Constante de diffusion de la vapeur d'eau dans la couche de diffusion (m)

D’après ces équations on s’aperçoit que les points importants à considérer sont la pression et la température (présente à la fois dans le condensateur et l’enceinte réfrigérée), ainsi que la température du produit.
En effet en ce qui concerne la pression du lyophilisateur, la sublimation est possible dès lors que la pression du condensateur (II) est inférieure à la pression de la chambre (I), permettant la migration de la vapeur d’eau vers le condensateur ou elle est captée. La déshydratation du produit se poursuit ainsi en continu.
La température du produit et celle de lyophilisateur joue également un rôle fondamental. L'eau sous n'importe quelle forme présente une certaine tension de vapeur ou pression partielle qui est directement proportionnelle à sa température. Or La sublimation ne peut intervenir que si la pression partielle des molécules d'eau présentes dans l'atmosphère environnante ($P_{enceinte}$) est inférieure à la tension de vapeur de la glace du produit (P_s), équation 3 [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*]. Il est donc important d’éliminer les molécules d'eau au fur et à mesure de leur formation par pompage (piégeage) sur une surface refroidie de température inférieure à celle du produit (figure 12). Par conséquent la température dans le condensateur doit donc être inférieur à la température de l’enceinte réfrigérée.

Un second impact de la température du produit est sur le flux de sublimation à l’intérieur du lyophilisateur. Le produit ne doit pas être à une température trop basse pendant la sublimation car la tension de vapeur au-dessus du produit diminue avec la température. Plus la différence est importante avec la pression de l’enceinte, plus le pompage des molécules d'eau est efficace (équation 3) réduisant le cycle de sublimation. Un flux de vapeur trop élevé peut emporter avec lui le produit que l’on cherche à lyophiliser. De plus un cycle trop court laissera trop d’eau dans le produit, ce qui pourra le dégrader lors de la dessiccation secondaire.
A l’inverse il ne faut pas trop remonter la température du produit afin que la température de sublimation reste en dessous de la température de fusion du produit. De plus un cycle trop long peut dégrader certaines molécules actives. Il faut donc connaître précisément la température de solidification du produit pour que l’on puisse travailler à 5 ou 10°C en dessous de cette température.
A l’issue de l’étape de sublimation, la plupart des produits présentent une humidité résiduelle de l’ordre de 5 à 7% [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*].

Notons au passage que la chaleur utilisée pour la sublimation est principalement apportée par radiation (la plus efficace) ou conduction avec les étagères contenant le fluide caloporteur (limitée à la surface de contact).

III.4.3.2 La dessiccation secondaire

La dessiccation secondaire consiste à enlever l'eau adsorbée (eau liée) du produit par désorption, car des molécules d'eau restent piégées en surface. L'objectif est de réduire l'humidité résiduelle à un niveau de l'ordre de 3 à 1 % pour augmenter la durée de conservation à long terme [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*]. C'est une étape délicate, car poussée trop loin, elle peut dénaturer le produit. Dans cette étape, le vide est poussé jusqu'à environ 5 µbar. On maintient ou on augmente la température du produit (jusqu'à des valeurs positives) pour arracher les molécules (température au dessus de la température de fusion du produit). À la fin du cycle, le produit est sec à 97 % ou plus.

III.4.4 Cycle de lyophilisation

Les procédés de lyophilisation se caractérisent par de multiples périodes et notamment de longues périodes de stabilisation tel que le refroidissement de l'enceinte. Il faut s'assurer que le produit soit complètement « solide » avant de lancer le processus de mise sous vide.

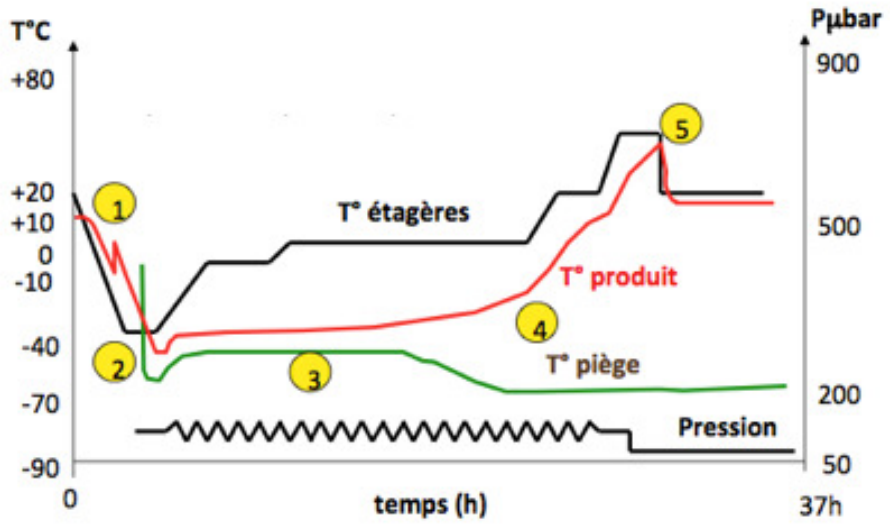


Figure N°19 : Diagramme d'un cycle de lyophilisation : (1) zone de surfusion des produits (2) refroidissement des produits lors de la mise sous vide (l'évaporation débute, la sublimation commence par utiliser l'énergie du produit lui-même) (3) phase de sublimation (la température du piège remonte car même si la puissance frigorifique du piège est maximale, la condensation de la vapeur d'eau nécessite de l'énergie) (4) la température des produits augmente rapidement car tous les cristaux de glace ont disparus (c'est le décrochage) (5) dessiccation secondaire (température la plus élevée possible, pression basse) [*Document pédagogique interne* : *La lyophilisation V.Rosilio, 2014*]

C’est une situation typique où l’intervention de l’opérateur est nécessaire pour visualiser et confirmer que le produit et l'installation sont prêts pour la mise sous vide. La phase critique est la chauffe où la rampe de montée en température qui doit être suffisamment lente pour ne pas endommager le produit. Durant cette étape le vide est maintenu constant pour avoir des conditions très stables. La rampe de température doit être arrêtée si le vide augmente trop, car cela signifie que l’eau se sublime trop rapidement.

A la fin de la rampe de séchage primaire la vanne d’isolement de l’enceinte se ferme pour une durée déterminée. Un test d’élévation de pression (PRT) est effectué. Si le produit est sec, le vide est maintenu ; si la pression s’élève plus que la normale, le produit n’est pas complètement sec. Dans ce cas, la vanne d’isolement est alors ré-ouverte jusqu’au prochain test (PRT).

Après ce test (PRT), le séchage secondaire est effectué, pour garantir une lyophilisation parfaite. Les produits sont portés à la température ambiante ou juste légèrement au-dessus.

Pour ce type d’application, le système de contrôle commande doit fournir une excellente Interface Homme Machine, il doit être d’une grande souplesse et disposer d’un contrôle fiable et précis pour chaque phase de lyophilisation. Il doit posséder les caractéristiques suivantes :

- Régulation de température précise avec gestion des rampes et paliers (maintien du profil suivant la mesure de pression)
- Contrôle séquentiel de la température, du vide et de la réfrigération, à la fois pour la lyophilisation et la stérilisation.
- Stratégies de sécurité pour protéger les produits en cas de défaillance de l’installation
- Pour l’opérateur, un affichage clair des paramètres clés du process et des états
- Enregistrement des données pour analyse et rapports

III.4.5 Importance de la formulation

A la fin du processus de lyophilisation le lyophilisat obtenu est extrêmement hygroscopique, les flacons sont refermés directement dans le lyophilisateur. En effet, le départ de l’eau du produit laisse une place vide. On obtient donc un produit amorphe, qui est poreux. Le choix des bons excipients permet donc de compenser une trop grosse perte de masse à cause du départ de l’eau et avoir un gâteau de lyophilisat appréciable. Il y a ainsi ajout d’un agent de charge (lactose, tréhalose) et le processus de lyophilisation n’entraîne pas de diminution du volume [*B. Addo et F. Kofi, 2014*]. L’eau peut donc reprendre facilement sa place dans la structure moléculaire poreuse. La plupart des composés lyophilisés sont donc très hygroscopiques et se réhydratent très rapidement. La reconstitution du produit est également

un facteur important. L'ajout de charge ne doit également pas interagir avec le produit et doit être compatible avec la formulation d'un produit injectable : isotonie, pH, absence de particule. Des excipients tels que le mannitol, le saccharose, la glycine, glycérol, et du chlorure de sodium sont de bons ajusteurs de tonicité.

IV. Matériels et méthodes

IV.1. Matières premières mises en oeuvre

Les produits utilisés lors de ce projet sont résumés dans le tableau 3:

Nom du composé	Fournisseur	M_M (g/mol)	Propriétés
Bêta-lapachone	Université fédérale de Pernanbucco à Récife (Brésil)	242,27	Substance active
Stéarylamine	Sigma-Aldrich	249,51	Lipide chargé (T_m = 50-52°C)
Cholestérol	Sigma-Aldrich	386,60	Lipide (T_m = 147-150°C)
Lipoïd E80	Lipoïde	762	Lipides (T_m = -2°C)
DSPE-PEG_{2000}	Avanti-Polar	2788,790	Lipide (T_m = 74°C)-polymère
NaCl	Sigma-Aldrich	58,42	Tampon
KCl	Aldrich	74,62	Tampon
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich	141,96	Tampon
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich	136,08	Tampon
Méthanol	Carlo Erba	32,04	Solvant
Ethanol absolue	Sigma-Aldrich	46,07	Solvant
Chloroforme	Sigma-Aldrich	119,38	Solvant
Eau milliQ	Millipore	-	Solvant

Tableau 3 : Liste des produits solides et liquides utilisés [*Site Avanti® Polar Lipids, inc*]

IV.2. Formulation et caractérisation des liposomes

IV.2.1 Formation des liposomes

La concentration de lipides utilisée par [*Calvacanti et al. 2011*] étant trop élevée (117,6 mM) pour une étude physico-chimique, et inadaptée à la préparation de liposomes à l'aide du mini-extrudeur du laboratoire, il a été décidé de travailler avec une concentration en lipides de 10 mM. Les liposomes sont constitués d'un mélange Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7 :2 :1 en mole) dissous dans un mélange méthanol-chloroforme (3:1). L'évaporation de celui-ci est réalisée sous pression réduite (rotavapor) pendant 2h. Un film lipidique blanchâtre se forme. La réhydratation du film est effectuée à température ambiante par une solution

tampon PBS (2mL) en présence de billes de verre (2mm) et la suspension est ensuite soniquée dans un bain de sonication (2 à 3 minutes à 25°C). Une fois les MLV formées, deux techniques ont été utilisées pour réduire la taille et/ou diminuer le nombre de bicouches :

- Le mini-extrudeur (Avanti Polar) force la suspension liposomale à travers des membranes de polycarbonate de diamètres de pores 400 puis 200 nm, à 50°C (10 fois par diamètre de pore) afin d'obtenir des vésicules unilamellaires d'environ 200 nm de diamètre.
- Une sonde à ultrasons directement plongée dans la suspension liposomale qui apporte l'énergie nécessaire à la réduction du diamètre des liposomes. Les conditions expérimentales utilisées (temps de sonication de 15 secondes, puissance de 150 W et une fréquence de 20 Hz) permettent d'obtenir des vésicules multilamellaires d'environ 800 nm de diamètre.

La b-Lap étant hydrophobe, elle est incorporée dès le départ dans la phase organique

IV.2.2 Distribution de taille

La taille et la distribution de taille des liposomes est mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). C'est une technique indirecte d'analyse spectroscopique non destructive permettant de déterminer la taille de particules de 1 à 500 nm de diamètre environ, en suspension dans un liquide. Le mouvement brownien des particules ou molécules en suspension à analyser engendre la diffusion de la lumière laser à différentes intensités. L'analyse des fluctuations d'intensité permet d'obtenir la vitesse du mouvement brownien et, à l'aide de la relation de Stokes-Einstein, de déterminer la taille des particules. Un grand inconvénient de cette technique est son incapacité à mesurer la taille des particules sur des dispersions concentrées [*Ma et al 2000*]. Pour l'étude de taille de nos suspensions liposomales, l'échantillon à analyser a dû être dilué, dans une solution tampon PBS, à une concentration de 1 mM.

IV.2.3 Potentiel zêta (ζ)

Le potentiel zêta (ou potentiel électrocinétique) représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. Il correspond à la différence de potentiel entre la couche dense de Stern et le liquide. Le potentiel électrocinétique des liposomes est déterminé à l'aide du Zetasizer Nano de Malvern. Un champ électrique est appliqué sur la dispersion de vésicules qui se déplacent ensuite à une vitesse liée à leur potentiel zêta. Cette vitesse est mesurée au moyen d'un procédé appelé Phase Analysis Light Scattering (PALS). Il permet de calculer la mobilité électro-

phorétique et, à partir de là, le potentiel zêta ζ (mV). Les liposomes formulés lors de l'étude sont en suspension dans une solution tampon phosphate PBS (0,2 M). En raison des ions présents en solution, il n'est pas possible de mesurer directement le potentiel zêta. Il est nécessaire au préalable de diluer la suspension de liposomes dans une solution de glucose (0,28 mol/L) qui possède la même force osmotique que le tampon afin que les liposomes soient sous les mêmes contraintes.

IV.2.4 Analyse interfaciale des lipides :

IV.2.4.1 Tensiomètre (tensiomètre K11)

Le tensiomètre K11 Krüss permet de mesurer des tensions superficielles par la méthode de Wilhelmy. Dans cette méthode, une lame de platine de périmètre L, est happée par la surface du liquide à étudier. Il s'exerce sur cette lame une force verticale dirigée vers le bas, résultante du poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle du liquide (γ□□□La balance mesure la force qu'elle doit fournir pour compenser l'effet du poids et de la force capillaire. La sensibilité des mesures est de 0,1 mN/m.

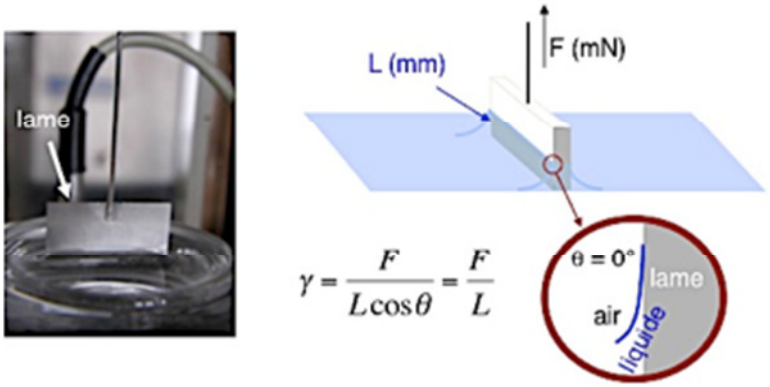


Figure N°20 : Méthode de la plaque de Wilhelmy. D'après [*Document pédagogique interne* : *Méthodes de caractérisation des interfaces V.Rosilio, 2014*]

Les mesures sont effectuées à température constante (21°C +/- 1°C), à l'équilibre. La surface de liquide étudiée est une solution de tampon PBS (20°C) sur laquelle on dépose de petits volumes de solution de b-Lap dans un mélange de solvant chloroforme/méthanol (9 :1).

IV.2.4.2 Balance de Langmuir

La balance de Langmuir permet d'étudier le comportement de tensioactifs insolubles sous l'effet d'une compression dynamique (figure 21).

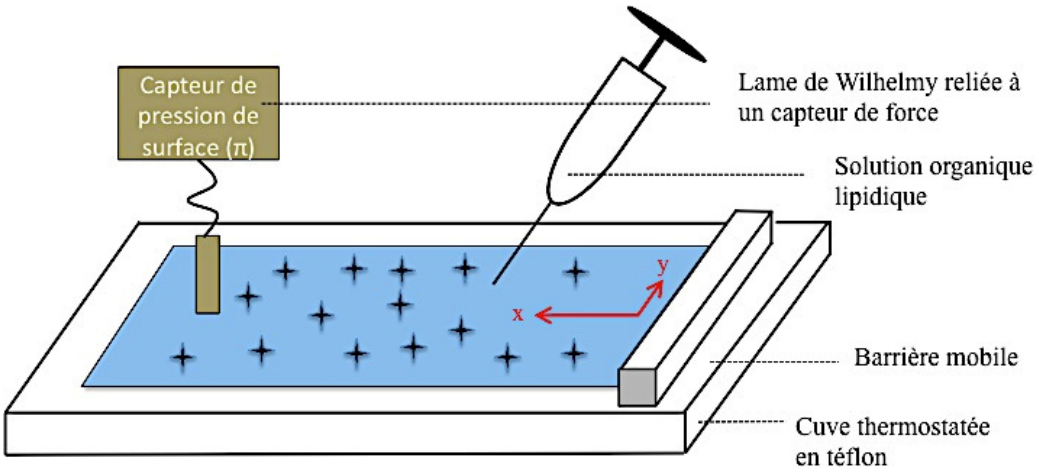


Figure N°21 : Balance de Langmuir, avec la barrière se déplaçant selon l'axe des x
217,2 cm^2 (22,5 cm de long 9,7 cm de large)

La cuve (217,2 cm^2) est remplie d'une solution aqueuse (eau milliQ ou tampon PBS 0,2M) à la surface de laquelle est étalée une monocouche lipidique. La barrière située à l'une des extrémités de la cuve permet de comprimer, à une vitesse de 6,4 $Å^2$/molécule/minute, les molécules qui vont progressivement s'organiser jusqu'à former une monocouche condensée. La pression de surface ($\pi = \gamma_0 - \gamma$, avec γ_0 la tension superficielle mesurée avant l'étalement de la monocouche) est mesurée tout au long de la compression grâce à un capteur de force qui fonctionne sur le même principe que le tensiomètre. On enregistre ainsi des isothermes pression-aire $\pi = f(A)$, caractéristiques des monocouches étudiées. Ces mesures sont effectuées à température constante (21°C +/- 1°C) et la sensibilité est de 0,1 mN/m.

Le schéma de l'isotherme de compression présenté dans la Figure 22, permet de mettre en évidence plusieurs phases lors de la compression du film lipidique. En effet, en comprimant la monocouche, les molécules passent successivement d'un état liquide gazeux (G), dans lequel les molécules n'interagissent pas entre elles, à une phase liquide expansée (LE) puis liquide condensée (LC). A plus haute densité, on atteint l'état solide (S) et si on continue la compression, la monocouche s'effondre (collapse). Les molécules forment des multicouches ou se solubilisent dans la sous-phase. La pression correspondante est la pression de compression maximale du film de Langmuir (ou pression de collapse). L'aire de collapse renseigne sur l'aire minimale que peuvent occuper les molécules en étant les plus ordonnées possible. L'aire moyenne donne une information sur l'aire occupée spontanément par les phospholipides, les chaines restant dans un état désorganisé.

Le module de compressibilité latéral est obtenu à partir de l'équation $K = - A \, d\pi/dA$. Ce paramètre renseigne sur la rigidité de la monocouche. Etat gazeux : $K < 12,5$ mN/m ; Etat

liquide : 13 < K < 100 mN/m ; Etat liquide condensé : 100 < K < 200 mN/m ; Etat solide : K > 250 mN/m.

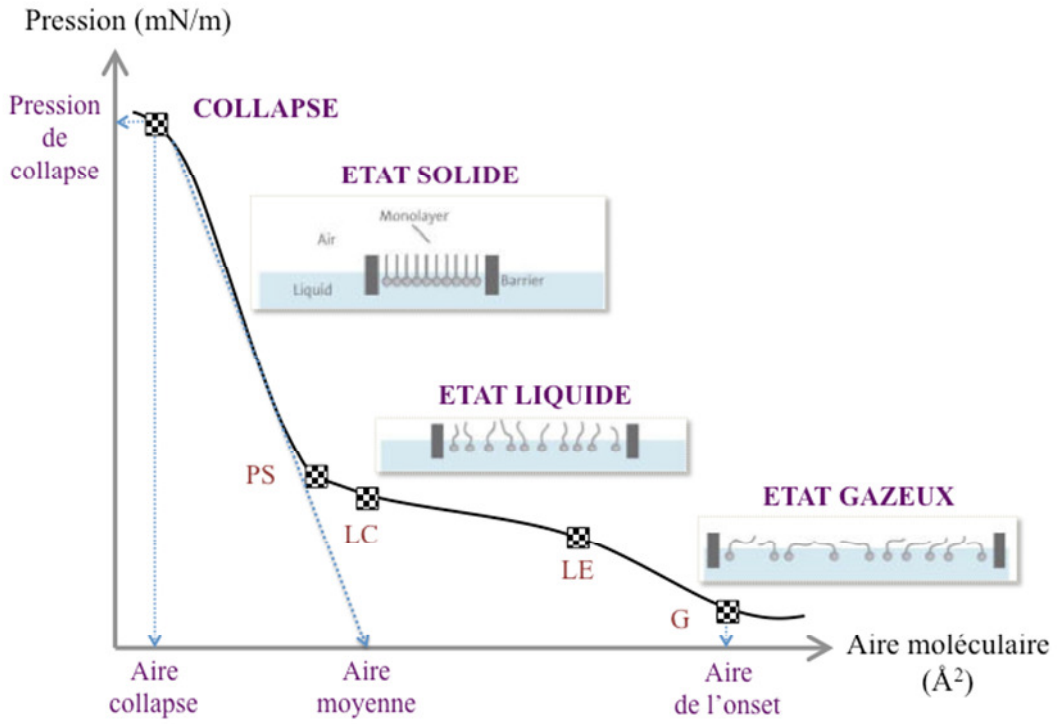


Figure N°22 : Isothermes de compression $\pi = f(A)$.

Il est possible d'étudier les interactions entre les composants de mélanges lipide-lipide ou lipide-substance active déposés à l'interface [*Nascimento Filho et al 2010*]. La miscibilité des constituants dans le film et les interactions intermoléculaires sont évaluées par la règle d'additivité des aires et l'énergie libre d'excès du mélange :

$$\mathbf{\Delta A^{Excès} = A_{12}^{Expérimentale} - A_{12}^{Théorique}} \quad \text{(Equation 4)}$$

$$\text{Avec } \mathbf{A_{12}^{Théorique} = X_1A_1 + X_2A_2} \text{ (loi d'additivité)}$$

À une pression de surface donnée, A_{12}, A_1 et A_2 sont respectivement les aires moléculaires du mélange et celles des constituants purs 1 et 2 tandis que X_1 et X_2 sont les fractions molaires de ces constituants. Lorsqu'un mélange est conforme à la règle d'additivité, ses constituants ne sont pas nécessairement miscibles. Ils peuvent former des phases séparées. En revanche, toute déviation par rapport à cette loi est la preuve de la miscibilité et de l'existence d'interaction entre les molécules, favorables ou défavorables. Si $\Delta A^{Excès} < 0$ la monocouche est plus condensée, en raison d'une meilleure organisation géométrique ou d'une attraction entre les molécules. Si $\Delta A^{Excès} > 0$ la monocouche est plus expansée en raison d'un empêchement

stérique ou d'une répulsion entre les molécules.

Afin de quantifier l'interaction entre les espèces moléculaires en surface on évalue l'énergie libre d'excès du mélange dans le système binaire à l'interface eau/air et à partir de l'équation :

$$\Delta G^{\pi}_{Excès} = \int_0^{\pi} (A_{12}^{Exp} - X_1 A_1 - X_2 A_2)\, d\pi \quad \text{(Equation 5)}$$

L'énergie libre d'excès permet de qualifier et quantifier les interactions :

- Si $\Delta G^{\pi}_{Excès} < 0$ l'interaction est favorable (interactions attractives)
- Si $\Delta G^{\pi}_{Excès} > 0$ l'interaction est défavorable (interactions répulsives)

IV.2.5 Analyse du thermogramme des liposomes : DSC

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permet de détecter les transitions endothermiques et exothermiques des solides et des liquides. Elle rend compte de l'influence éventuelle, sur la transition d'un mélange lipidique, de l'ajout d'un autre composant (cholestérol, stéarylamine ou b-lap). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre DSC Diamond (Perkin Elmer) étalonnée avec de l'acide laurique. Les échantillons, environ 10 mg réhydratés avec 80% en masse de tampon PBS, sont placés dans des capsules en aluminium fermées hermétiquement. Le cycle de chauffage utilisé est le suivant : un refroidissement à -5°C/min jusqu'à -12°C, un maintien pendant 1 min à -12°C puis un chauffage à 5°C/min jusque 25°C et un maintien pendant 1 min à 25°C. Le cycle complet a été renouvelé une fois.

IV.2.6 Méthodes de dosage

IV.2.6.1 Dosage de la bêta-Lapachone : contrôle du taux d'encapsulation

L'HPLC (Chromatographie Liquide Haute Pression, Kontron Automated Isocratic system) en phase inverse a été utilisée pour réaliser le dosage de la b-Lap dans les liposomes. Cette analyse consiste à injecter 20 µL d'une solution de b-Lap qui est entraînée, à un débit de 1ml/minute, par une phase mobile (méthanol/eau 65-35%) dans une colonne chromatographique Kromasil C_{18} (150 x 4,6 x 5 mm). Les substances éluées sont identifiées au moyen d'un détecteur UV/visible (à 253 nm) [*Marcilio.S, 2013*]. Le taux d'encapsulation est déterminé après séparation des liposomes du milieu aqueux par ultracentrifugation (Beckman Coulter, Rotor 70lti à une vitesse de 40000 tr/min ou 109760*g* pendant une heure à 4°C). La quantité de b-Lap contenue dans les liposomes est dosée après dissolution dans

l'éthanol; la quantité de b-Lap non encapsulée dans la phase externe peut également être dosée après une étape de dilution du surnageant dans l'éthanol afin de se rapprocher de la polarité de la phase mobile et ainsi faciliter son élution. Une gamme étalon est préalablement préparée à partir d'une solution mère de b-Lap dans l'éthanol. Des aliquots prélevés de la solution-mère sont dilués dans l'éthanol pour obtenir par HPLC (logiciel : chroma Système 2000), une gamme de solutions de b-Lap de concentrations allant de 0,5 x 10^{-6} à 10^{-5} M. L'efficacité d'encapsulation est décrite comme le rapport entre la quantité de b-Lap initialement introduite dans la formule (theoretical b-Lap_{Amount}) et la quantité incorporée dans les liposomes (measured b-Lap_{Amount}), suivant la formule ci-dessous.

$$\%\ \text{de b} - \text{Lap} = \frac{\text{Measured b}-\text{Lap}_{\text{Amount}}}{\text{Theoretical b}-\text{Lap}_{\text{Amount}}} \times 100 \quad \text{(Equation 6)}$$

Dans la mesure du possible, il est préférable de rapporter le pourcentage d'encapsulation à la quantité de lipides.

Le dosage a également été réalisé par spectrophotométrie UV-Visible (CARY 300 Bio UV-Visible Spectrophotomètre) en faisant varier la longueur d'onde entre 600 et 400 nm pour obtenir un spectre. Une gamme étalon d'une solution de b-Lap dans l'éthanol a été préparée avec des concentrations variant entre 10^{-5} et 9 x 10^{-5} M.

IV.2.6.2 Dosage de la phosphatidylcholine

Le dosage des lipides est essentiel afin de ramener la quantité de b-Lap dosée à celle des lipides présents dans la formule développée. Le kit de dosage des lipides (*Phospholipid Assay Kit*) commercialisé par Sigma Aldrich permet de réaliser le dosage direct de la choline. Le dosage a été effectué en utilisant une plaque de 96 puits. La plaque a été remplie avec 20 µl de l'échantillon et 80 µl du réactif de coloration. La plaque a ensuite été incubée à température ambiante pendant 30 minutes avant de mesurer l'absorbance à 570 nm par un lecteur de plaque. Les résultats sont directement proportionnels à la concentration de phospholipides dans l'échantillon. Tous les échantillons et les étalons ont été préparés et évalués en double exemplaire. La gamme linéaire de détection utilisée est de 3 à 200 µM. L'équation utilisée pour déterminer la concentration de lipide est la suivante :

$$\text{Concentration en PC} = \frac{\text{Absorbance}_{\,Echantillon} - \text{Absorbance}_{\text{Blanc}}}{\text{pente de la droite étalon}} \quad \text{(Equation 7)}$$

La phosphatidylcholine est présente en très grande majorité dans le système étudié. Nous avons considéré que toute perte de ce phospholipide lors de la fabrication est du même ordre de grandeur pour les autres lipides présents dans la formulation.

IV.2.7 Analyse de la morphologie des liposomes : microscope à force atomique.

Le microscope à force atomique (AFM) permet d'étudier les surfaces non conductrices de courant à l'aide d'un appareil mesurant les forces d'interaction entre une pointe portée par un levier (cantilever) et les molécules à la surface de l'échantillon. La détection du relief se fait à l'aide d'un rayon laser réfléchi sur le levier qui supporte la pointe. L'AFM peut être utilisé selon différents modes. Le mode contact intermittent ou *tapping* ainsi que le mode *hyperdrive* ont été retenus pour nos expériences. Dans ces modes, le levier est mis en oscillation à une fréquence donnée d'une centaine de kHz et à une amplitude fixe. L'échantillon exerce alors une force d'attraction (de type van der Waals) de courte portée sur le levier et la pointe, ce qui modifie l'amplitude de l'oscillation. Elle est maintenue constante par déplacement de la hauteur z de l'échantillon. Un faisceau laser issu d'une diode laser permet de détecter la déflexion de la pointe. Lors du balayage de la surface par la pointe, le signal lumineux est recueilli par un photodétecteur et un système informatique permet de convertir le signal en une image.

Cette technique permet à la fois d'imager et de déterminer les propriétés viscoélastiques des structures qui sont déposées sur la surface solide. Ainsi si la b-Lap est insérée dans les bicouches, elle modifiera la morphologie et les propriétés viscoélastiques du système.
Un ml de la suspension liposomiale est déposé sur une surface de mica fraîchement clivée à l'aide de scotch pour obtenir une surface propre et homogène. L'adsorption et la rupture des liposomes à la surface du mica sont spontanées car le mica chargé négativement possède une affinité avec les vésicules chargées positivement. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la surface est rincée une dizaine de fois avec du tampon PBS afin d'éliminer les liposomes non adsorbés.
Les images ont été prises avec une pointe triangulaire de 20 nm de rayon pour le mode hyperdrive et de raideur 40 N/m. La fréquence de résonance est de 150 KHz. Les images sont enregistrées avec un appareil JPK (BioMat^{TM} Workstation) et analysées avec le logiciel KSV (NanoWizard Control).

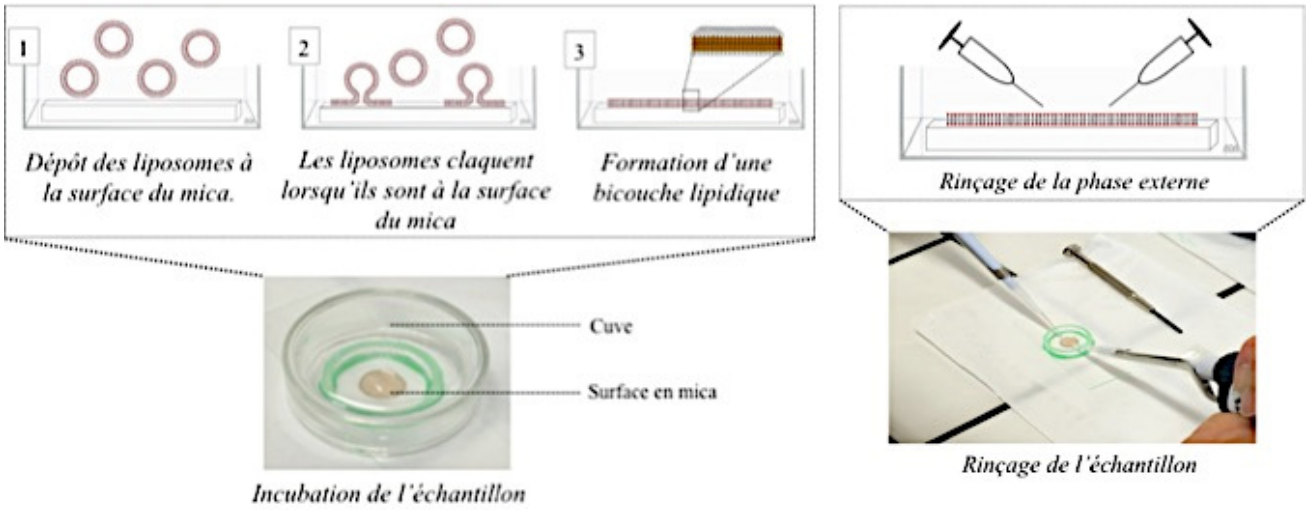


Figure 23 : Représentation schématique des étapes de préparation de l'échantillon

IV.2.8 Spectrométrie de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre (PERKIN ELMER Luminescence Spectromètre LS 50 B couplé au logiciel FL WinLab version 4.00.02). Le signal de fluorescence est mesuré à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et à une longueur d'onde d'émission de 436 nm [*N. Nasongkla, 2003*]. Les fentes d'émission et d'excitation sont réglées à 5 nm. Les spectres d'émission et d'excitation sont enregistrés après balayage des longueurs d'ondes dans l'intervalle 340-600 nm, en mesurant l'intensité de fluorescence.

V. Résultats et discussion

V.1. Caractérisation de la bêta-Lapachone

V.1.1 Tensiométrie

La tensiométrie nous a permis d'obtenir une première information sur les propriétés tensioactives de la b-lap. Une série de mesures a consisté à déposer, à intervalles réguliers, un certain volume de solution de b-Lap (au total 28µL) à la surface du tampon PBS. Le dépôt de la solution a tout d'abord entrainé une diminution de la tension superficielle, puis systématiquement, un retour progressif à la valeur initiale (Figure 24). Nous en avons déduit que la b-Lap ne se place pas à l'interface et migre vers la sous-phase où elle se solubilise.

Ce résultat indique que la b-Lap est peu, ou pas, tensioactive. Il est à noter que la concentration de la b-Lap dans le volume de tampon est très inférieure à la limite de solubilité. Il n'est donc pas surprenant que la substance se dissolve.

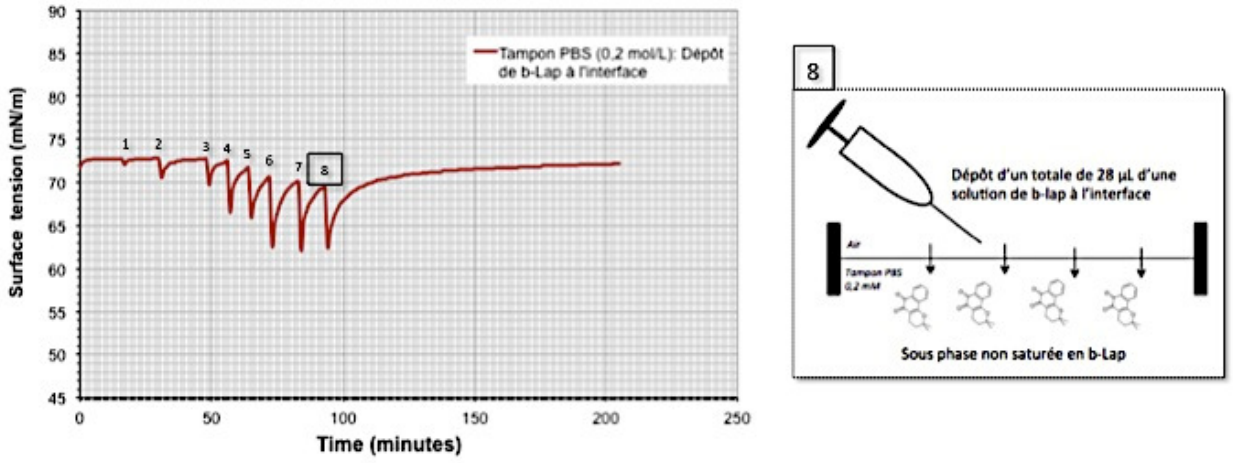


Figure 24 : Changements de tension superficielle provoqués par les dépôts de solution de b-lap à la surface du tampon. Chaque numéro indique un dépôt.

En revanche, si on sature la sous-phase de b-Lap, on observe bien un abaissement de la tension superficielle. Avec un dépôt de 48 µL, on obtient une diminution de 12 mN/m, au-delà de laquelle il n'y a plus d'abaissement, même lorsqu'on ajoute davantage de substance à l'interface (Figure 25). La b-Lap a donc un faible effet tensioactif.

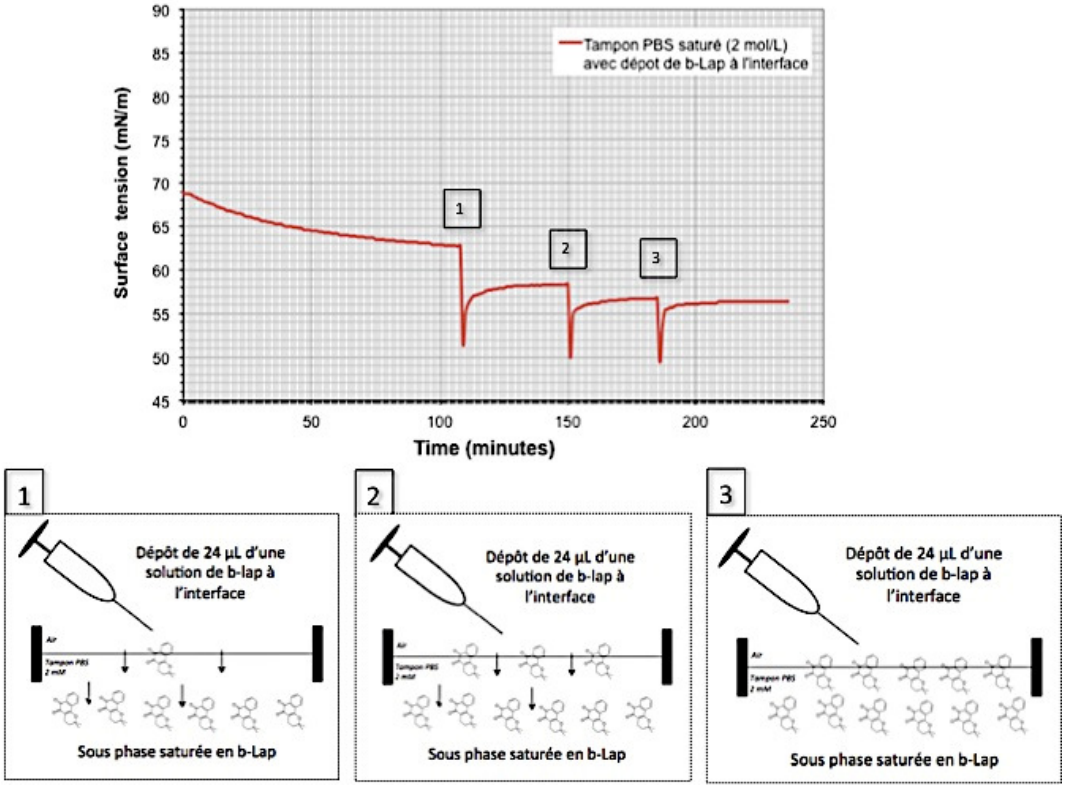


Figure 25 : Changements de tension superficielle provoqués par les dépôts de solution de b-lap à la surface du tampon saturé de b-Lap. Chaque numéro indique un dépôt.

L'objectif des études réalisées avec la balance de Langmuir est d'analyser l'interaction de la b-Lap avec les monocouches de lipides et en particulier, de déterminer si la présence de lipide favorise la rétention de la b-Lap à l'interface.

V.1.2 Balance de Langmuir

Une première série de mesures a été consacrée à l'étude des mélanges binaires lipide-b-Lap afin de déterminer le rôle des différents constituants de la monocouche ainsi que celui de la b-Lap sur les différents lipides utilisés pour la formulation. Dans un deuxième temps, nous avons analysé les mélanges complexes étudiés par [*Cavalcanti et al. 2011*] ainsi que l'effet de l'ajout de DSPE-PEG_{2000} à la formulation. Avec cette technique il n'est pas toujours possible de démontrer la présence de la b-Lap à l'interface, lorsqu'elle est étalée seule à l'interface. Aucun changement de la pression de surface n'est observé. Il se produit le même phénomène que pour les mesures de tensiométrie, c'est à dire que la b-Lap se solubilise dans la sous-phase au moment du dépôt.

V.2. Analyse des mélanges binaires lipides-b-Lap (3,5 et 50%)

L'effet de la b-Lap sur les caractéristiques des monocouches de chacun de ces lipides de la formule est présenté dans le tableau 4.

Mélanges binaires	$A_{Collapse}$ ($Å^2$)	$A_{Moyenne}$ ($Å^2$)	$\Pi_{Collapse}$ (mN/m)	K_{Max} (mN/m)	ΔV_{Max} (mV)
Lipoïd E80 pur	58,0*	82,7	38,0	105,0	305,6
Lipoïd – b-Lap (1 :1)	26,0	38,0	40,0	116,0	441,4
Cholestérol (Chol)	40,4*	43,0	40,2	1171,0	475,8
Chol – b-Lap (1 :1)	20,21	22,3	42,6	666,0	340,6
Stéarylamine (SA)	14,0*	17,0	57,0	550,2	851,3
SA – b-Lap (1 :1)	6,5	8,5	58	385,0	863,3

Tableau 4 : Récapitulatif des mesures effectuées pour les mélanges binaires étalés sur l'eau pure. K_{Max} : Module de compressibilité maximal. ΔV_{Max} : Potentiel de surface maximal de la monocouche.

* Valeurs expérimentales confirmée par les travaux de [*E.Guzmàn et al, 2013*] et [*D.Korner et al, 1994*]

Ces résultats nous montrent que l'aire de collapse est réduite de moitié pour les trois mélanges binaires en présence de b-Lap. Ceci est cohérent avec la présence de seulement 50% de lipide dans le mélange. En effet, comme l'aire mesurée est égale à l'inverse de la densité superficielle des molécules et que le nombre total de molécules étalées est toujours le même, on ne voit donc pas la b-Lap à l'interface. A titre d'exemple, l'isotherme du Lipoïd E80 et du mélange binaire Lipoïd E80-b-Lap (1:1) sont présentées dans la figure 26.

On remarque toutefois une légère élévation de la pression de collapse pour le mélange et, plus intéressant, une modification du module de compressibilité en présence de la b-Lap (tableau 4). Celle-ci a une influence sur la rigidité de la monocouche. Elle tend à structurer la monocouche de Lipoïd E80. En revanche, en mélange avec le cholestérol et la stéarylamine elle a tendance à désorganiser leurs monocouches. On retrouve un peu avec la b-Lap les propriétés du cholestérol. Willy Chollet qui avait déjà étudié l'interaction entre la b-Lap et la DPPC pendant son stage de M2 (2012) avait déjà remarqué ce phénomène.

Ces expériences montrent donc que la b-Lap modifie les caractéristiques physiques d'une monocouche lipidique, et qu'elle peut avoir un impact différent en fonction du lipide avec lequel elle interagit. Les valeurs de potentiel de surface, déterminées à l'aide d'une électrode

vibrante (KSV) et qui donnent des informations sur l'orientation des chaînes hydrocarbonées, nous montrent que la b-Lap a également un impact sur l'orientation du moment dipolaire des phospholipides. Ces valeurs varient dans le même sens que le module de compressibilité pour le Lipoïd E80 et le cholestérol. En revanche, l'effet de b-Lap sur le potentiel de surface est plus difficile à analyser avec la stéarylamine, car dans le cas de ce lipide, le potentiel de surface est contrôlé par la charge portée par le lipide.

Au final, ces expériences ne permettent pas de déceler une affinité plus importante de la b-Lap pour un lipide plutôt qu'un autre.

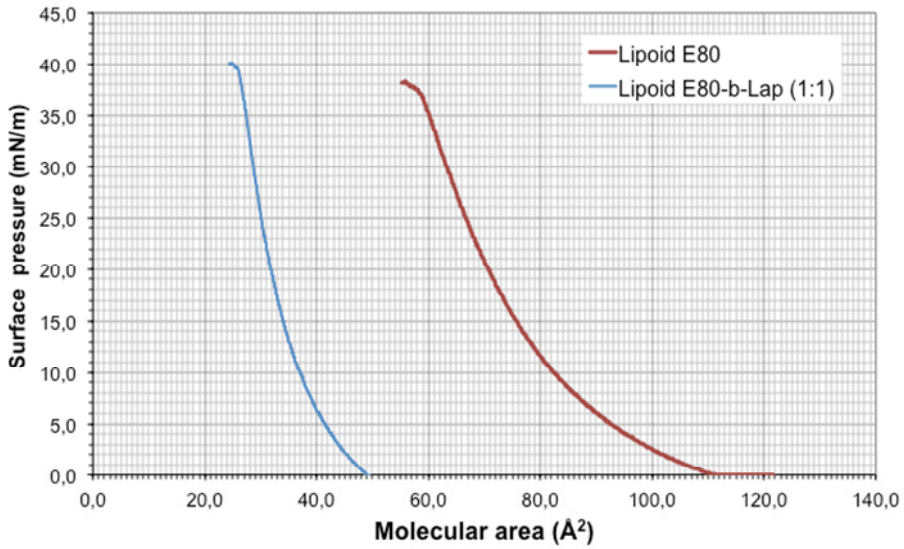


Figure 26 : Isothermes de compression $\pi = f(A)$ du Lipoid E80 et de son mélange avec la b-Lap déposée sur l'eau.

V.3. Analyse des mélanges ternaires en présence de b-Lap

Avant d'étudier l'interaction de la b-Lap avec le mélange ternaire Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1), nous avons voulu vérifier la pertinence du choix de ces lipides. En présence de Lipoïd E80, le cholestérol se place entre les chaines oléiques (insaturées) et les oriente plus verticalement par rapport au plan de l'interface air/eau. Ce phénomène attendu est démontré par le module de compressibilité qui est multiplié par un facteur 2 (105 – 201 mN/m, résultats non présentés) ; le cholestérol rend donc la couche plus rigide (on s'oriente vers un état solide > 250 mN/m) en sa présence.

L'intérêt de la stéarylamine est d'apporter une charge globale positive aux liposomes pour minimiser l'effet des forces attractives de van der Waals. La figure 27 montre les résultats des calculs de l'aire d'excès et de l'énergie libre d'excès du mélange Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1) et nous permettent de mettre en évidence des interactions ainsi que de les

quantifier. *Remarque : La pression la plus intéressante à considérer est 30 mN/m. Autour de 30 mN/m les monocouches ont les mêmes propriétés de condensation des lipides que dans les bicouches. Donc les résultats obtenus en monocouche à cette valeur de pression peuvent être utilisés pour prédire l'état des bicouches. Dans notre cas la valeur à 30mN/m correspond à la valeur maximale du module de compressibilité.*

Les valeurs négatives de l'aire d'excès nous indiquent que la présence du cholestérol et de la stéarylamine dans la monocouche de lipoïd E80 favorisent l'état condensé. De plus les valeurs négatives de l'énergie libre d'excès montrent que les interactions entre les trois constituants sont de nature attractive, ce qui doit augmenter la résistance des liposomes. Nous sommes donc en présence d'un mélange favorable. Ces résultats justifient le choix de la formulation.

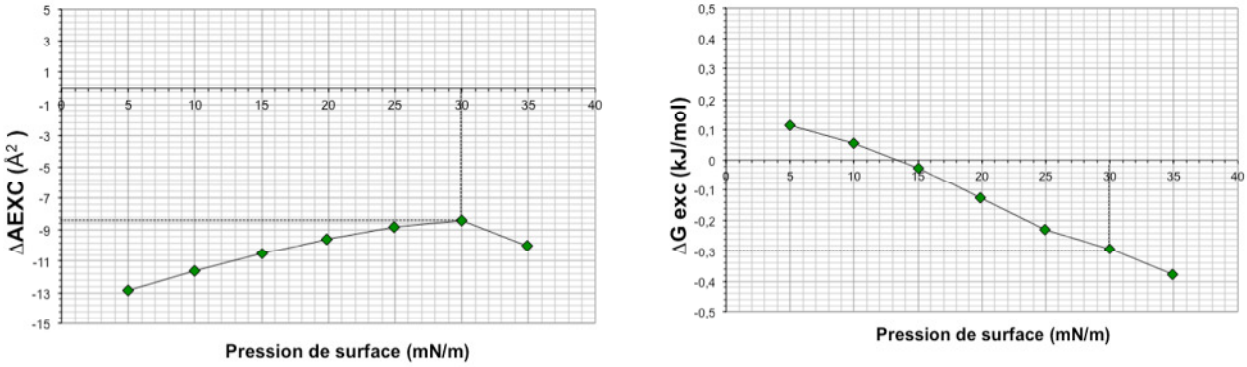


Figure N° 27 : ΔA^{Exc} et le ΔG^{Exc} du mélange: Lipoïd E80-Chol-SA (7:2:1) étalé sur tampon PBS

Si l'on s'intéresse à présent à l'influence de la b-Lap sur ce mélange ternaire, on peut observer que certaines propriétés de la monocouche sont modifiées. Les résultats sont résumés dans le tableau 5. Des analyses du mélange ternaire avec b-Lap à 3,5% ou 50% ont été réalisées. La concentration 3,5% (mole de b-Lap/mol de lipide) correspond à celle de la b-Lap dans les liposomes de [*Calvacanti et al. 2011*].

Mélanges ternaire	$A_{Collapse}$ (Å²)	$A_{Moyenne}$ (Å²)	$\Pi_{Collapse}$ (mN/m)	K_{Max} (mN/m)
Lipoïd E80 - Chol - SA (7 :2 :1)	42,0	59,0	43,0	123,4
Lipoïd E80 - Chol - SA - b-lap 3,5%	41,2	58,2	42,5	129,4
Lipoïd E80 - Chol - SA - b-lap 50%	20,7	28,8	45,0	138,2

Tableau 5 : Valeurs caractéristiques des mélanges de lipides avec et sans b-Lap, étalés sur tampon PBS.

Tout d'abord, on retrouve une aire de collapse qui est diminuée de moitié en présence de 50% de b-Lap. D'après la loi d'additivité des aires, on ne voit donc toujours pas la substance à l'interface. La figure 28 montre la variation des modules de compressibilité en fonction de la pression. Nous avons comparé les valeurs maximales à 30 mN/m. Les modules de compressibilité sont plus élevés en présence de b-Lap et cet effet s'accentue lorsque la proportion de la substance augmente. Dans le système étudié, la b-Lap se positionne avec les composants du mélange avec lesquels elle « s'entend » le mieux ce qui augmente l'état général d'organisation des chaines lipidiques dans la monocouche. Comme c'est le lipoïd E80 qui est présent en plus grande proportion et que la b-Lap augmente l'état d'organisation de ce phospholipide, il est possible que ce soit l'effet prépondérant ici. Les valeurs du module de compressibilité sont comprises entre 100 et 250 mN/m, l'état liquide-condensé est donc maintenu et donc un degré d'organisation suffisant pour maintenir l'intégrité des vésicules.

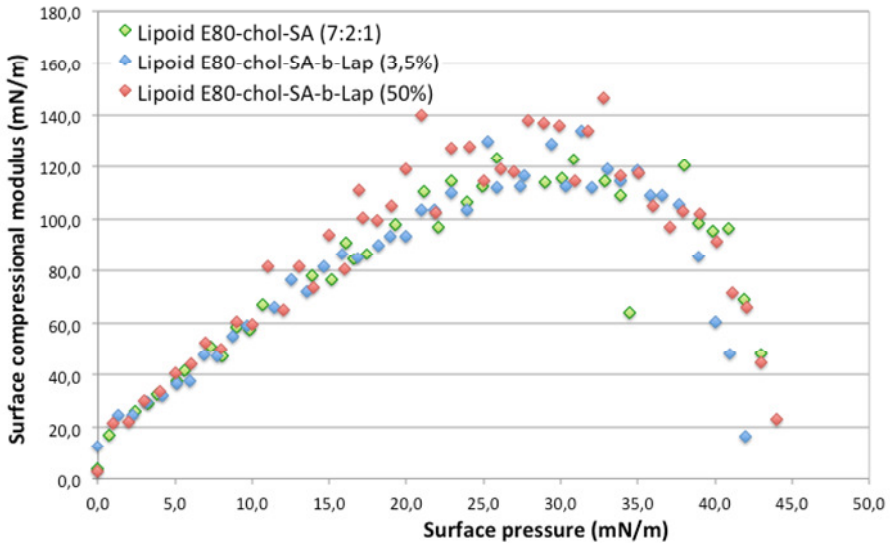


Figure N° 28 : Module de compressibilité latéral-sous phase tampon PBS

A partir des isothermes obtenus précédemment, il est possible de calculer l'aire et l'énergie libre d'excès. Les valeurs obtenues en fonction de la pression sont présentées dans les figures 29 et 30. A 3,5% de b-Lap, toutes les $\Delta A^{Exc} > 0$. On a une déviation positive par rapport à la règle d'additivité des aires moyennes par molécule. Ceci confirme que la b-Lap modifie légèrement l'organisation du mélange de lipides et ce dans un sens plutôt défavorable, d'un point de vue géométrique ou énergétique. Les valeurs de ΔG^{Exc} sont quasi-nulles. Il y a apparemment moins d'interactions entre les constituants du mélange en présence de b-Lap.

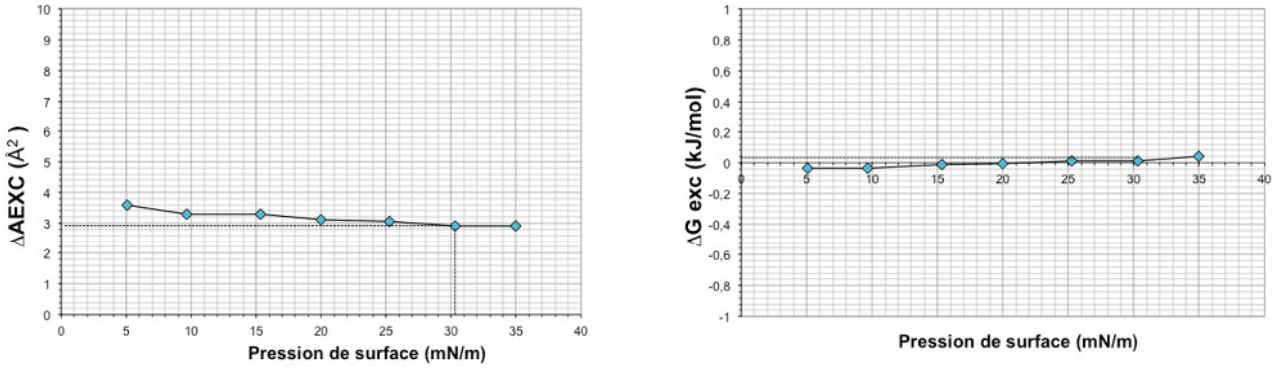


Figure N° 29 : Variation du ΔA^{Exc} et du ΔG^{Ex} en fonction de la pression : Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap 3,5%

Si l'on augmente la quantité de b-Lap dans le mélange jusqu'à 50% la valeur des ΔA^{Exc} se rapproche davantage de 0. Les valeurs de ΔG^{Exc} négatives témoignent que l'interaction dans ce cas est beaucoup plutôt favorable, car b-Lap se distribue sans doute dans les différents domaines (Lipoid E80 mais aussi cholesterol et stearylamine).

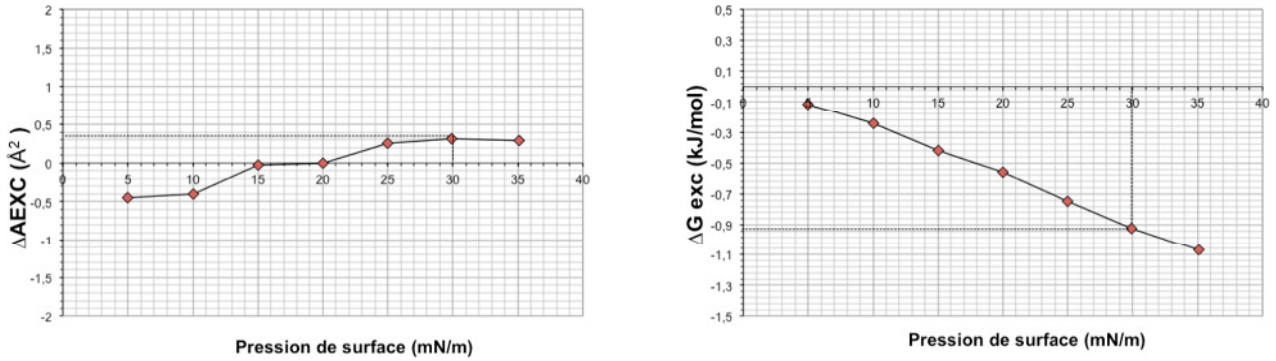


Figure N° 30 : Variation du ΔA^{Exc} et du ΔG^{Ex} en fonction de la pression : Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap 50%

Des cycles de compression/expansion ont été réalisés sur les monocouches de Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1) avec et sans b-Lap (3,5%) (Figure 31). Lors de ces expériences la monocouche est comprimée jusqu'à 32 mN/m (suffisamment loin du collapse), puis expansée, et finalement comprimée à nouveau jusqu'au collapse du film. Les courbes bleues et vertes correspondent respectivement aux première et deuxième compressions. Les courbes oranges correspondent à la phase d'expansion. Le cycle obtenu avec une monocouche de Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1), montre une quasi-superposition des isothermes : l'hystérésis est quasi-nulle et la seconde compression est identique à la première.

Lorsque le mélange contient la b-Lap, même à seulement 3,5%, le comportement est complètement différent. On observe une forte hystérésis qui montre que la monocouche ne se réétale pas du tout de la même façon. La b-Lap a altéré les interactions entre les trois

composants du mélange de lipides et ceci influe sur la 2e compression, dont le profil est différent de la première (Figure 32). Il existe une différence significative entre les pentes des deux isothermes de compression (bleu et vert). Le profil de la 2e compression, moins pentu que celui de la 1e, laisse penser que le module de compressibilité est plus faible. La pression de collapse l'est également. La monocouche a été fortement désorganisée par le réétalement.

Ceci confirme que la b-Lap modifie les interactions entre les composants du mélange lipidique. Elle est donc bien présente dans la monocouche.

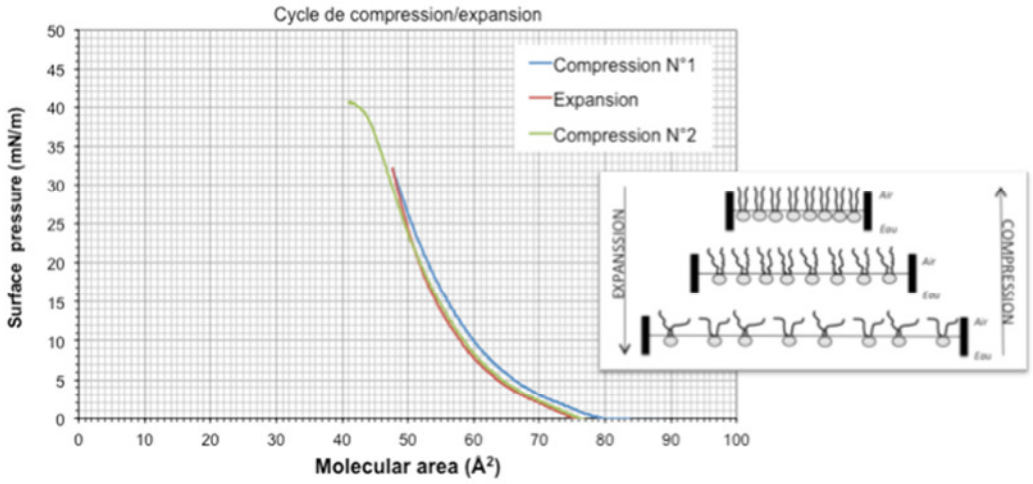


Figure N° 31 : Isothermes de compression π = f (A) du mélange : Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1)

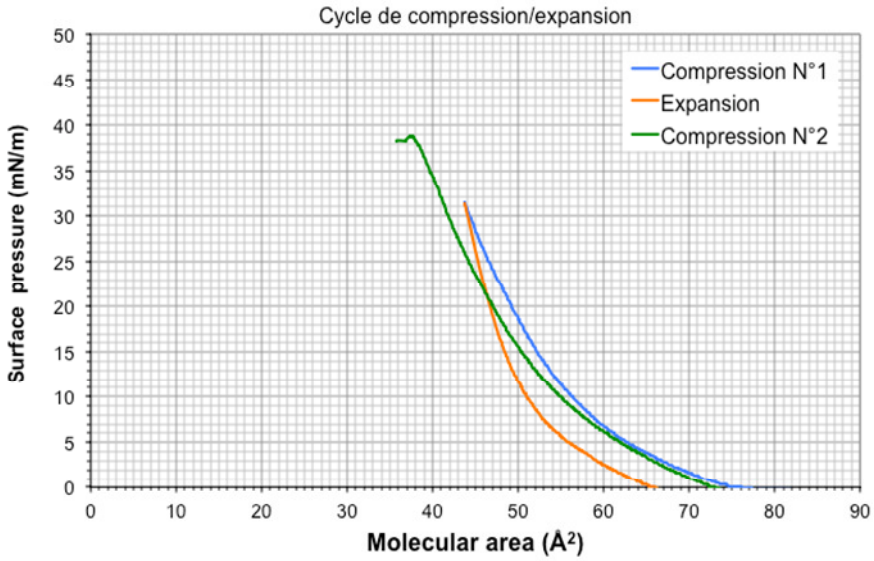


Figure N° 32: Isothermes de compression π = f (A) du mélange : Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-bêta-Lapachone (3,5%)

V.4. Analyse des mélanges lipides-PEG-b-Lap

Nous avons réalisé des mesures de pression superficielle sur une monocouche constituée de DSPE-PEG_{2000}. Les isothermes des différents mélanges montrent clairement l'effet du PEG aux grandes aires (Figure 33). Le PEG est légèrement tensioactif et s'adsorbe à l'interface [*Malzert et al. 1995, Xu et al. 2001*]. Sous l'effet de la compression, il est entrainé dans la sous-phase, probablement en conformation pelote avant d'adopter une conformation brosse aux petites aires, ce qui permet d'atteindre une aire au collapse voisine de celle d'une molécule de DSPE non modifiée [*Xu et al. 2001*].

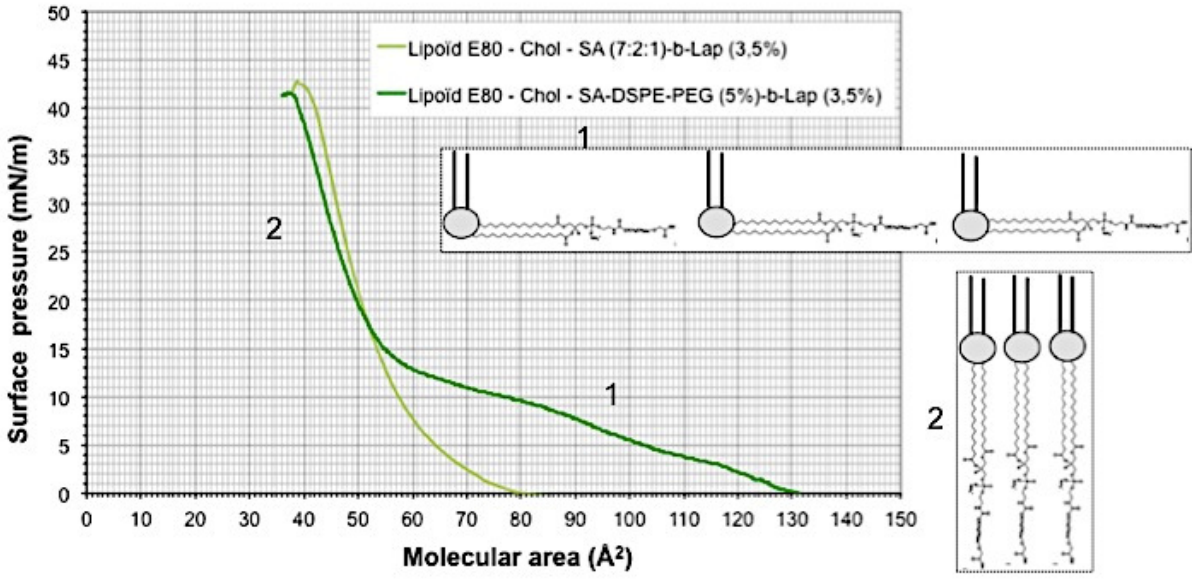


Figure N° 33: Isothermes de compression $\pi = f(A)$ montrant l'effet de DSPE-PEG_{2000} sur le mélange de lipides étalé à l'interface air/tampon.

La b-Lap ne semble pas influer sur la phase liquid-expansée et liquide-condensée. En revanche, elle exerce toujours un effet sur la phase solide, en condensant davantage la monocouche. En effet, à partir d'une pression de 15 mN/m, l'allure est modifiée avec une différence de pente entre l'échantillon avec et sans b-Lap. Ceci suggère que la présence du PEG ne modifie pas la localisation de la b-lap (Figure 34).

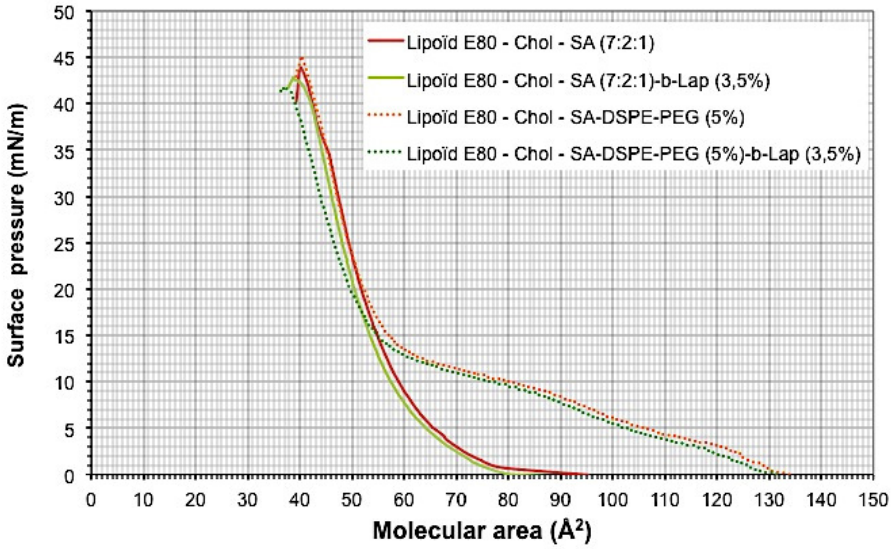


Figure N° 34: Isothermes de compression π = f (A) montrant l'effet de DSPE-PEG_{2000} et de la b-Lap sur le mélange de lipides étalé à l'interface air/tampon.

V.5. Etude sur la bicouche : formation de liposomes

Le modèle de la bicouche reflète l'identité structurale de la membrane cellulaire, dont la majeure partie est constituée par des lipides. Théoriquement, la bicouche représente deux fois la monocouche lipidique, telle qu'on peut l'obtenir à l'interface air/eau.

Les différentes caractérisations que nous avons réalisées sur les liposomes sont résumées sur le diagramme de la figure 35.

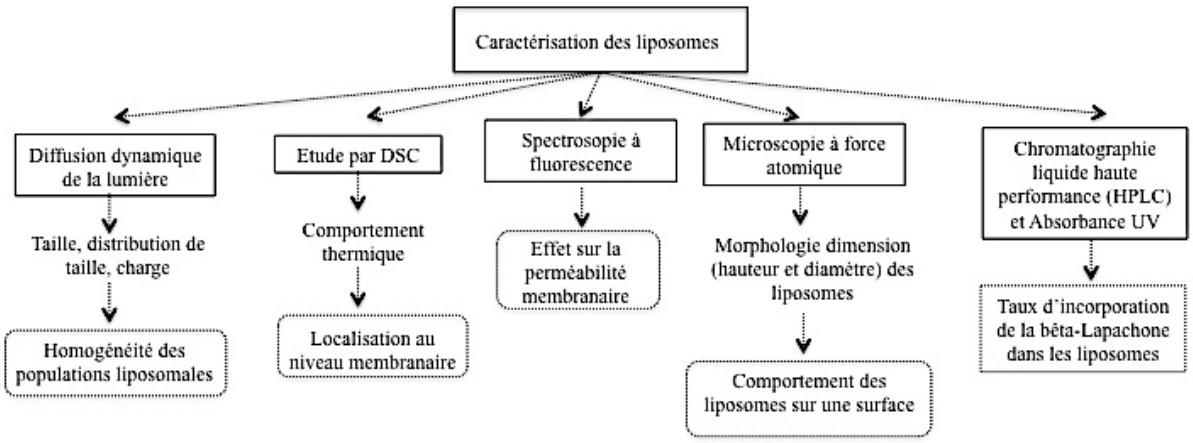


Figure N°35 : Techniques de caractérisation des liposomes

V.5.1 Etude de la distribution de la taille et du potentiel zêta

V.5.1.1 Analyse granulométrique

La technique d'extrusion est utilisée dans le but d'obtenir des tailles de liposomes proches de celles des pores des membranes utilisées [*M.J Hope 1985*]. La taille moyenne des liposomes dépend de la composition en phospholipides. Dans les conditions d'extrusion choisies, nous avons obtenu des vésicules ayant un diamètre moyen de 180-200 nm (Figure 36). Les valeurs de PDI obtenues pour les différentes préparations de liposomes sont proches de 0,1. Ce paramètre adimensionnel décrit le profil de distribution. Ces valeurs strictement inférieures à 1 signifient que les suspensions liposomales sont homogènes et monodisperses. Il n'y a pas de différence significative entre les différentes formulations. Ceci indique que l'encapsulation de la b-Lap ou l'incorporation du DSPE-PEG_{2000} n'affectent pas la taille des liposomes.

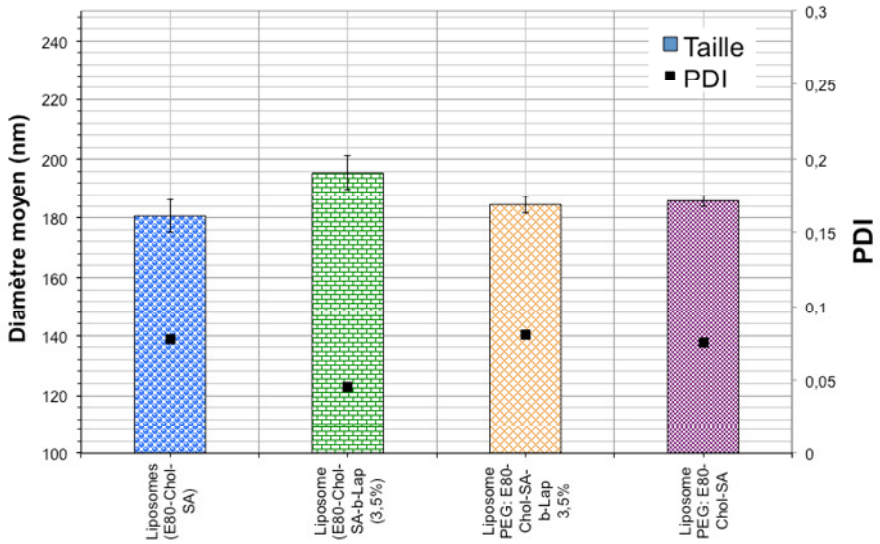


Figure N°36 : Etude de taille des liposomes formulés (écart type entre 3 à 10 valeurs de tailles suivant les échantillons)

Il est à noter que [*Cavalcanti et al. 2011*] ont également obtenu avec une sonde à ultrasons des liposomes de diamètre moyen compris entre 180 à 200 nm avec une moyenne de 195,5 +/- 5,7 nm. En utilisant la même technique mais sur une durée plus courte, nous avons obtenu des MLV avec un diamètre moyen de 836 +/- 68 nm et un PDI de 0,4. Notre objectif était de multiplier les couches lipidiques pour encapsuler davantage de b-Lap.

V.5.1.2 Etude du potentiel zêta

Nous n'avons observé aucune différence de potentiel ζ entre les liposomes contenant la b-Lap et ceux n'en contenant pas (valeurs comprises entre +25 et +35 mV, figure 37). Cette substance n'affecte pas la charge de surface des liposomes.

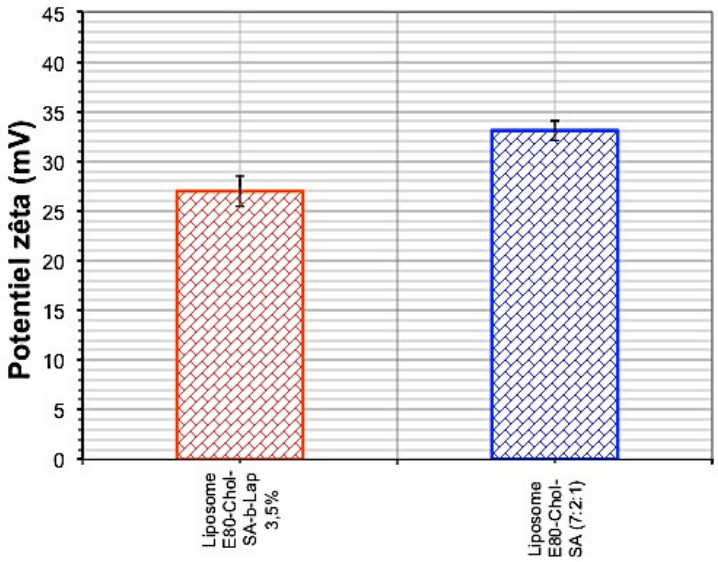


Figure N°37 : Etude du potentiel de surface des liposomes formulés (écart type entre 3 à 6 valeurs de potentiel de surface suivant les échantillons)

V.5.1.3 Etude de stabilité

La stabilité des liposomes est un paramètre-clé pour la conservation des préparations. Les suspensions liposomales ont été conservées à +4°C, à l'abri de la lumière. La stabilité des liposomes sous-entend la stabilité physique et chimique et la stabilité d'encapsulation.

La stabilité physique de la suspension liposomale correspond à l'absence de sédimentation ou d'agglomération lors du vieillissement, elle peut être évaluée par des contrôles de distribution de tailles qui doivent rester inchangées durant le stockage. Des études de DLS ont été menées sur une cinquantaine de jours (Figure 38). Elles ne montrent pas de variation au-delà de 60 jours. La stabilité chimique permet de s'assurer de la non dégradation des phospholipides. Elle peut être suivie par une mesure de la modification du pH. Après 50 jours, les pH des suspensions liposomales avec et sans b-Lap sont respectivement égaux à 7,34 et 7,38. Ceci confirme qu'il n'y a pas de dégradation des phospholipides ou bien de la substance active au cours du temps.

Les études de la stabilité des suspensions liposomales n'ont pas pu être effectuées. Nous n'avons pas pu vérifier que la charge des liposomes en b-Lap n'évolue pas au cours du temps

de stockage ni qu'il n'y avait pas de dégradation de la b-Lap encapsulée. En effet les mesures d'absorption réalisées sur les culots de centrifugation n'ont pas fourni de spectres exploitables.

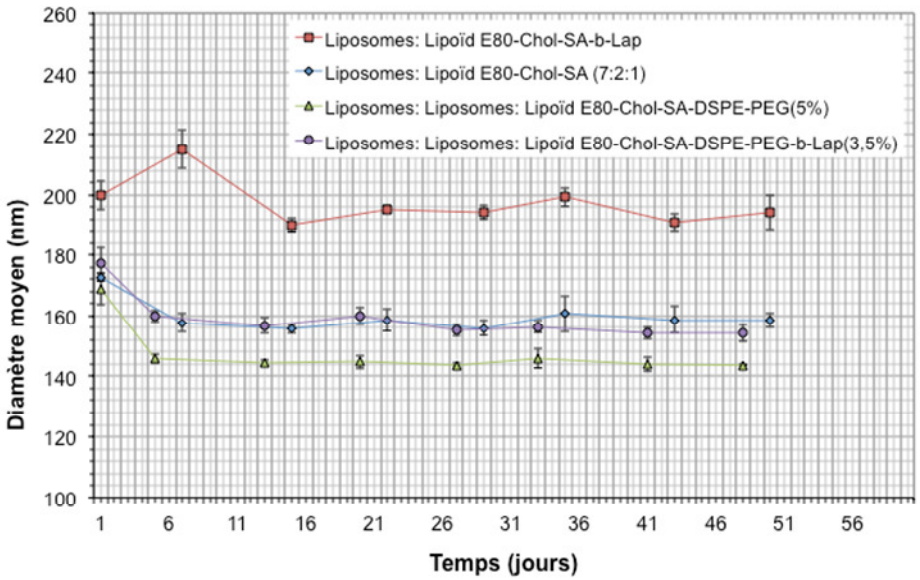


Figure N°38 : Etude de la stabilité en taille des liposomes au cours du temps

V.5.2 Microscope à force atomique

L'AFM a été utilisée pour examiner l'effet de la b-Lap sur la morphologie et les dimensions de la bicouche lipidique avec et sans PEG. Plusieurs zones de la surface ont été imagées avec des dimensions allant de 1µm à 500 nm (Figure 39).

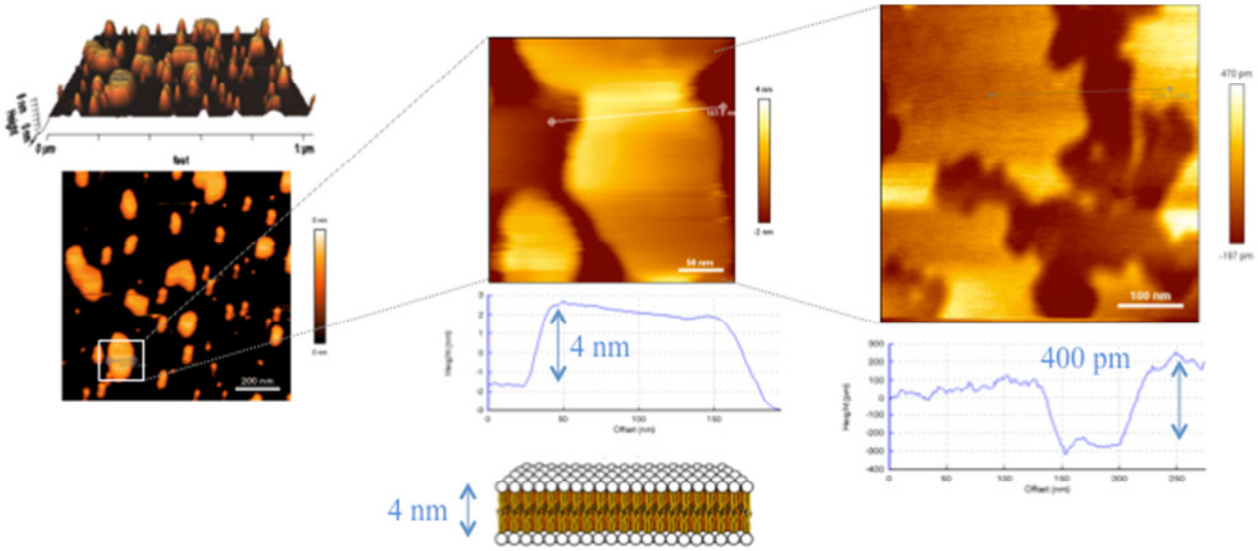


Figure N°39 : Image AFM d'une bicouche lipidique de Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7 :2 :1) – 0,5mM. Les échelles sont : à gauche 200 nm, au centre 50 nm et à droite 100 nm

L'image de gauche révèle la présence de patchs de bicouche lipidique de 4 nm d'épaisseur, en accord avec les dimensions attendues. L'image de droite montre la présence de domaines de l'ordre de 400 pm. Les zones sombres correspondent à des domaines liquides-expansés et les zone claires à des domaines liquides-condensés. Ce mélange lipidique ternaire est structuré en domaines. Y a-t-il des domaines enrichis en cholestérol et donc plus structurés ? La stéarylamine chargée positivement joue-t-elle un rôle dans la formation de ces domaines ?
Dans la figure 40, nous proposons une représentation schématique de l'arrangement supposé des différents lipides au niveau de la double-couche lipidique. L'existence de la phase condensée peut être due à l'existence de domaines de Lipoïd E80 enrichis en cholestérol, qui forceraient les chaines phospholipidiques insaturées à s'ordonner, ceci aboutissant à un épaississement de la bicouche. Une telle interprétation serait cohérente avec le rôle structurant bien connu du cholestérol sur les chaines insaturées [*McIntosh, 1978*].

D'autres études [*Keith J. Stine and David T. Stratmann, 1992*] montrent la coexistence de domaines liquide expansé (LE) et liquide condensé (LC) pour une monocouche de stéarylamine.

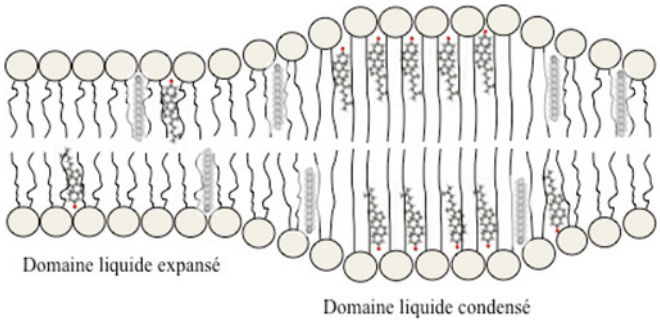


Figure N°40 : Coupe schématique supposée d'une bicouche comportant un domaine liquide condensé, résultant de l'enrichissement de domaines de lipoïd E80 par du cholestérol.

Les analyses par AFM ne nous ont pas permis d'apporter de réponses claires à ces questions. De plus, le microscope à l'angle de Brewster (BAM) qui est une technique permettant l'observation directe de films monomoléculaires à l'échelle microscopique n'a pas permis de visualiser ces domaines trop petits pour être détectable à une résolution de l'ordre du micromètre.
Des images AFM ont été réalisées avec un mélange plus concentré en lipides (1 mM) afin d'obtenir des patchs plus larges de bicouches et visualiser l'impact éventuel de la b-Lap sur ces domaines. Dans les images AFM des figures 41 (sans b-Lap) et 42 (avec b-Lap), nous

constatons la présence de domaines dans les deux échantillons. Toutefois une légère différence d'organisation des domaines semble exister entre ces deux échantillons, mais ils sont différemment structurés en présence de b-Lap. Ces résultats seraient donc en accord avec les précédents, confirmant la présence de la b-Lap dans la bicouche lipidique du mélange ternaire.

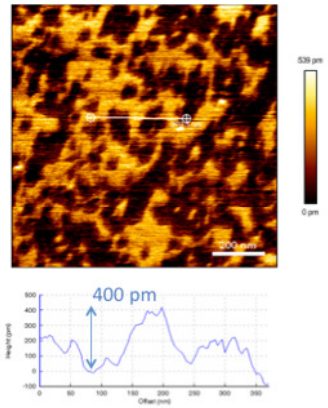


Figure N°41 : Image AFM d'une bicouche de Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1) - 1 mM

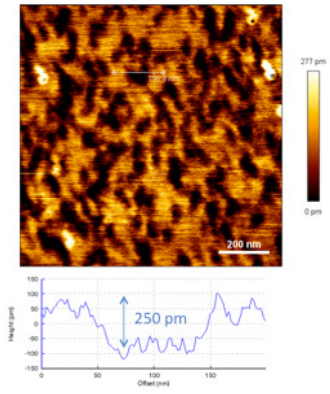


Figure N°42 : Image AFM d'une bicouche Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-b-Lap 3,5% - 1 mM

Il est à noter que le système Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-DSPE-PEG_{2000}(5%) avec et sans b-Lap a été étudié en parallèle. Hormis le fait que les domaines observés ont des hauteurs légèrement supérieures (de l'ordre de 700 pm, comme attendus en présence de PEG), les observations ont mené à la même conclusion.

V.5.3 Etude du comportement thermique des liposomes

L'objectif de cette étude était de montrer l'impact de l'incorporation de la b-Lap sur les propriétés thermotropes du mélange lipidique et de préciser sa localisation au niveau de la bicouche. En effet, les molécules interagissant avec les chaînes hydrocarbonées des lipides conduisent à un changement au niveau de la température et de la quantité d'énergie absorbée au cours de la transition, alors que les molécules interagissant avec les têtes polaires entrainent la disparition ou le déplacement du pic de pré-transition.

Le comportement thermique des bicouches lipidiques a été étudié par calorimétrie à balayage différentiel. Les propriétés thermiques des différents constituants des liposomes sont résumées dans le tableau 6.

Lipides	Transitions de phase T_m /point de fusion (°C)
Phosphatidylcholine d'œuf POPC	- 2
Stéarylamine	+ 50-52
Cholestérol	+ 147-150

Tableau 6: Température de transition de phase ou de fusion des différents composants des liposomes

Malheureusement les thermogrammes des mélanges n'ont montré la présence d'aucune transition de phase. Ceci peut s'expliquer par la concentration trop élevée du cholestérol dans le mélange induisant la formation d'une seconde monophase dans laquelle les chaînes alkyles sont ordonnées, mais ne s'organisent pas dans une conformation *trans*, le cholestérol jouant le rôle d'impureté [*CRC Press: New York, 1993*]. Il n'est donc pas possible de démontrer, pour cette composition lipidique, l'impact de la b-Lap sur le comportement thermique des lipides.

Néanmoins, les expériences de [*W. Chollet 2012*] sur différents ratios de DPPC (dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)/b-Lap ont montré qu'en présence de b-Lap, on observe la disparition de la pré-transition, une diminution de la température de l'onset et de la transition principale, un élargissement du pic de transition principale et une diminution de la variation d'enthalpie associée à cette transition. Ces observations indiquent bien l'existence d'interactions entre la DPPC et la b-Lap au niveau des têtes polaires, mais aussi au niveau des chaines hydrocarbonées. Bien que la molécule ne modifie pas l'aire moléculaire des mélanges, la b-lap s'insère, au moins partiellement, dans les feuillets d'une bicouche.

V.5.4 Etude de fluorescence par spectrométrie

La b-Lap possède des propriétés fluorescentes. Excitée à 330 nm, elle émet à 436 nm (figure 43).

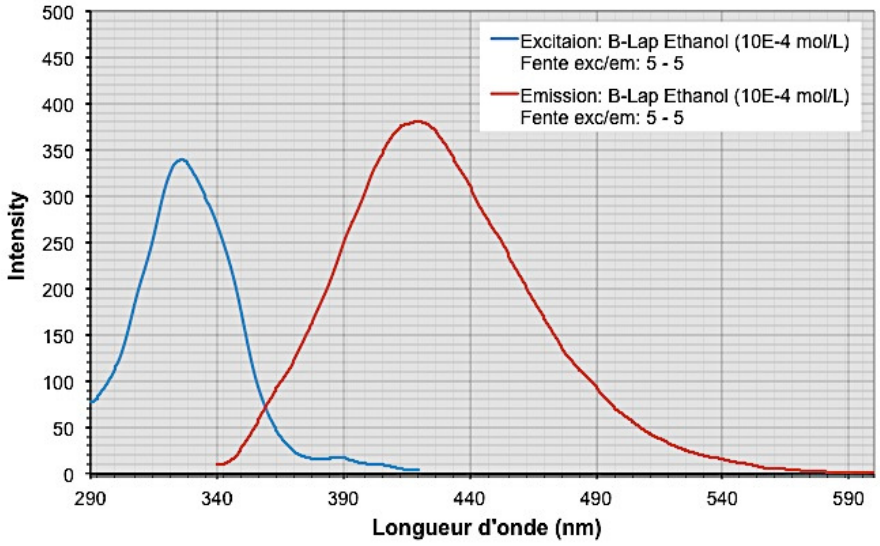


Figure N°43 : Spectres d'émission (bleu) et d'excitation (rouge) d'une solution de bêta-Lapachone dans l'éthanol

Cette propriété devait nous permettre de quantifier la b-Lap, d'analyser les interactions avec la bicouche lipidique ainsi que d'étudier la cinétique de libération. Malheureusement, nous avons eu des difficultés à obtenir des spectres d'excitation et d'émission reproductibles. Nous avons essayé de répertorier les raisons possibles de cette non-reproductibilité. Le problème le plus souvent rencontré est une intensité de signal trop faible. Inversement, nous avons aussi observé des intensités de fluorescence trop élevées qui saturaient le système de détection par photomultiplicateur. Nous avons listé nos observations, hypothèses d'explication et contrôles à effectuer dans un « Mind Map » (Figure 44).

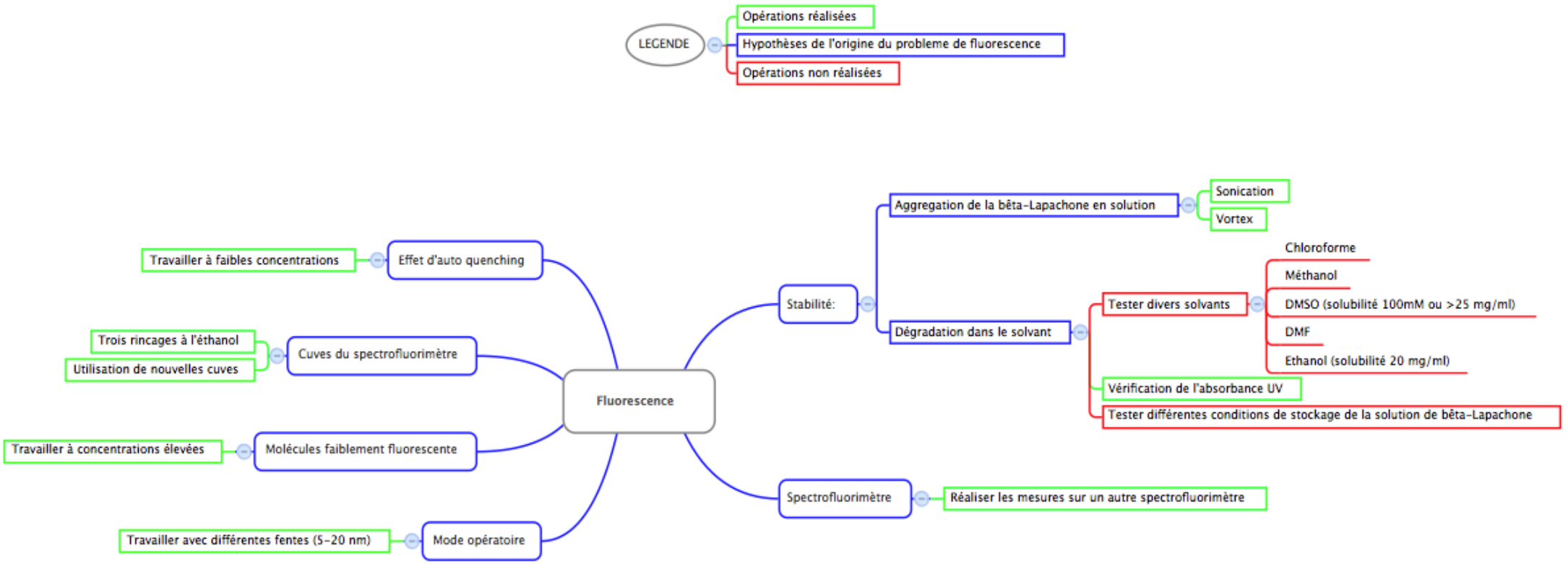


Figure N°44: « Mind Map » : En bleu : Les propositions des raisons pour lesquelles les études de fluorescence n'ont pas fonctionnées. En vert: Les opérations qui ont été réalisées. En rouge : Les opérations restant à réaliser

V.5.5 Dosage : contrôle du taux d'encapsulation

Nous avons montré précédemment que la b-Lap est bien présente au niveau de la double-couche lipidique. Pendant la préparation des liposomes, elle se dissout dans le solvant organique avec les phospholipides. Pendant la phase de réhydratation, elle reste majoritairement localisée dans la région hydrophobe de la bicouche. Nous avons voulu quantifier l'efficacité d'encapsulation (EE) de la b-Lap, et donc la proportion de la molécule thérapeutique associée aux liposomes par rapport à la quantité initialement présente.

Dans un premier temps nous avons analysé les travaux de [*Calvacanti et al. 2011*] qui ont estimé l'EE à partir de la quantification par absorbance UV de la b-Lap non encapsulée (surnageant après ultracentrifugation). Cependant nous avons constaté deux limites à cette approche. Tout d'abord, l'EE est estimé à partir d'un dosage indirect, et dans leur démarche les auteurs ne prennent pas en compte la concentration de lipides utilisés. Nous avons donc préféré doser directement la quantité de b-lap réellement encapsulée. Nous avons donc opté pour l'HPLC, permettant de déterminer la quantité de b-Lap dans le culot après ultracentrifugation. De plus nous avons pris en compte la quantité de lipides utilisés et ainsi calculé le taux d'encapsulation, car il existe une relation directe entre le nombre de liposomes formés et la capacité d'encapsulation de la suspension.

Pour la méthode par HPLC nous avons déterminé la droite d'étalonnage (figure 45) utilisée pour la détermination du l'EE et du taux d'encapsulation (tableau 7).

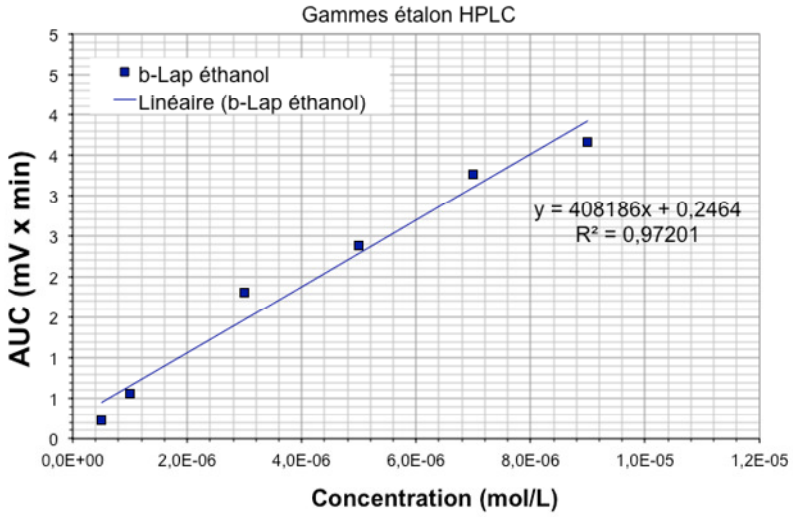


Figure N°45 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la bêta-Lapachone en solution dans l'éthanol

Lots de liposomes étudiés Echantillons		Efficacité d'encapsulation (%)	Taux d'encapsulation (mol/mol de phospholipides) (%)
Lipoïd E80-Chol-SA-b-Lap (3,5%)	Extrusion	1,56 +/- 0,87	0,15
	Sans extrusion	1,43	0,14
	Ultrasons	5,10	0,49
[*Cavalcanti et al, 2011*]		97,48*	3,42**

Tableau 7 : Récapitulatif des mesures d'efficacité et de taux d'encapsulation

** Mesure déduite du dosage de b-Lap dans le surnageant. **Si l'on considère qu'il n'y a aucune perte de lipides durant le procédé de fabrication des liposomes, ce qui n'a pas été mesuré par [Calvacanti et al].*

D'après notre méthode de dosage l'EE varie de 1,56% à 5,10% en fonction de la méthode de fabrication des liposomes (avec ou sans extrusion, ultrasons), ce qui est très inférieur aux 97% indiqués par [*Cavalcanti et al, 2011*]. Nous avons par la suite introduit la notion de taux d'encapsulation afin de bénéficier d'une comparaison plus juste. Le taux d'encapsulation mesuré est de 0,15 % à 0,49% (en fonction de la méthode). Le taux d'encapsulation calculé à partir des données de [*Cavalcanti et al, 2011*] serait de 3,42%. Le taux d'encapsulation exprimé en mole de b-Lap par mole de phospholipides permet de se rendre compte que les résultats de l'étude de [*Cavalcanti et al, 2011*] ne sont pas si prometteurs. En effet, ils obtiennent une importante efficacité d'encapsulation de la b-Lap (supérieure à 97%), mais cela est dû à une concentration très élevée en lipides par rapport à la concentration initiale en b-Lap. Il n'est donc pas possible de généraliser cette efficacité pour tous les systèmes. La concentration en lipides a donc un impact très important sur l'efficacité d'encapsulation.

On peut également noter une augmentation significative du taux d'encapsulation de la b-Lap en mol/mol de phospholipides lorsque les liposomes (MLV) sont formulés par ultrasons avec une taille importante de l'ordre de 800 nm (Taux d'encapsulation = 0,49%). Il est donc possible d'augmenter le taux d'encapsulation en augmentant le nombre de bicouches lipidiques. Or sans extrusion, le taux est plus faible. Ceci conforterait les résultats obtenus lors des études en monocouches et AFM qui montrent que la b-Lap s'insère préférentiellement au niveau des bicouches lipidiques.

V.6. Procédé de lyophilisation de la suspension liposomale de b-Lap

V.6.1 Enjeu Industriel du procédé

La lyophilisation est un procédé largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour les médicaments, les vaccins, les anticorps et d'autres matériaux biologiques. Comme expliqué section III.4 ou les bases de la lyophilisation ont été présentés, la lyophilisation est une étape importante de la fabrication largement utilisée pour augmenter la stabilité de produits pharmaceutiques et biologiques. Développé dans les années 1930 [*Costantino.H et Pikal.M 2004*] le procédé de lyophilisation est aujourd'hui encore le seul procédé à disposition pour conserver des produits instables à l'état liquide tel que les suspensions liposomales. Les produits lyophilisés sont largement acceptés dans le commerce en raison des avantages qu'ils procurent (conservation de substances fragiles en procurant une stabilité chimique, physique et biologique par inhibition des voies de dégradations qui se produisent en présence d'humidité, stockage plus facile, conservation de la forme, meilleure solubilisation, conservation d'une grande variété de produits). Par conséquent ils sont destinés à connaître dans les années à venir un développement croissant. Plus d'un nouveau médicament sur deux mis sur le marché sera lyophilise [*D. Sierakowki, 2013*].

Malgré ces avantages incontestables, la lyophilisation reste un procédé couteux, complexe, exigeant, qui nécessite de nombreuses compétences techniques, scientifiques, la connaissance des procédés, produits et composants. En effet les nombreux paramètres du procédé tout au long des étapes de lyophilisation en font un processus où la transposition, de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle ou commerciale par l'échelle pilote est difficile à mettre en œuvre avec des dossiers d'enregistrement toujours plus complexes qui fixeront les procédés sur le long terme.

Parallèlement au développement des technologies, les installations de lyophilisation ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies [*D. Sierakowki, 2013*] permettant l'optimisation de la productivité et surtout l'amélioration du niveau de l'efficacité, reproductibilité et qualité des produits lyophilisés. Cette étape d'optimisation est primordiale car elle procure trois principaux avantages commerciaux :

- Le gain financier: Un cycle de lyophilisation optimale utilise uniquement l'énergie et le temps requis, réduisant le temps de traitement et augmentant le débit du produit.

- L'excellence du produit: un produit bien séché présente une longue durée de vie et une activité maximale lors de la réhydratation.
- La qualité et l'assurance réglementaire: La cohérence de l'ensemble des lots est assurée et les soumissions réglementaires sont accomplies avec l'enregistrement des données du cycle de lyophilisation.

Cette opération d'optimisation du cycle de lyophilisation se focalise principalement sur l'étape de Recherche et Développement du procédé. Ce service de R&D étudie la mise au point des paramètres de lyophilisation en identifiant et contrôlant les étapes critiques du cycle de lyophilisation. Cela consiste également en l'étude et la recherche de la meilleure formule avec les excipients les plus adaptés tel que les cryoprotecteurs pour les molécules les plus fragiles. Pour mener à bien le développement d'un procédé de lyophilisation s'en suit l'étape de pré-développement industriel des lyophilisateurs pilotes pour mettre au point et valider les paramètres de lyophilisation en vue d'une production industrielle et définir ainsi un protocole de lyophilisation. Pour finir, on retrouve l'étape de développement et de production industrielle pour le développement à grande échelle des produits lyophilisés. Toutes ces étapes sont exécutées dans le strict respect du cahier des charges et des procédures. Des dossiers de lots sont remis à la demande en fin d'opération.

V.6.2 Les phases critiques du processus de lyophilisation

Ce procédé est fortement recommandé pour les suspensions liposomales pour lesquelles la faible teneur en humidité est essentielle pour la conservation du produit et le maintien de la stérilité. Le séchage étant effectué à des températures très basses, la dégradation thermique de la suspension liposomale de b-Lap peut être évitée, à l'inverse des techniques de séchage classiques.

Néanmoins, la conception, le développement, le contrôle, l'optimisation et la mise à l'échelle industrielle du processus de lyophilisation pour la formulation d'une suspension injectable liposomale de b-Lap a ses défis. L'objectif fondamental de la lyophilisation est de conférer des caractéristiques souhaitables au produit, telles que la stabilité à long terme, un faible temps de reconstitution, le maintien de ses caractéristiques physico-chimiques lors de la reconstitution (taux d'encapsulation, taille des liposomes) et une élégante apparence du produit fini. Pour s'assurer que le produit est de qualité requise, il est crucial d'être en mesure de définir les étapes critiques, de les contrôler et de fournir la répétabilité des cycles de lyophilisation.

Chaque formulation a des caractéristiques différentes de lyophilisation et, par conséquent, des exigences de traitements différents. Pour s'assurer que les cycles soient à la fois robustes et efficaces, ils doivent être faits sur mesure pour chaque formulation. En effet la nature de la formulation détermine:

- Le temps et la température nécessaires pour obtenir une congélation totale du produit
- La vitesse et la température de nucléation
- La pression de la chambre pour mener à bien le séchage primaire et secondaire
- Le flacon à utiliser
- La conception et construction de l'équipement de lyophilisation

On peut s'apercevoir que le temps est un paramètre crucial qui intervient à chaque étape du cycle de lyophilisation. Parce que le temps est assimilé à la productivité, la formulation affecte non seulement le processus de séchage et l'équipement, mais également le coût de fabrication. Par conséquent quand le temps de traitement augmente, la rentabilité diminue.
En effet, si le cycle n'est pas adapté à la formulation cela peut conduire à une sécheresse non désirée, à une réduction de la stabilité pendant le stockage, à la réduction de l'activité lors de la réhydratation et à des coûts élevés.

Nous allons donc passer en revue les points critiques du procédé de lyophilisation qui est un procédé de séchage complexe se déroulant en trois étapes principales: la congélation, le séchage primaire et le séchage secondaire (figure 46), chacune proposant ses propres défis.

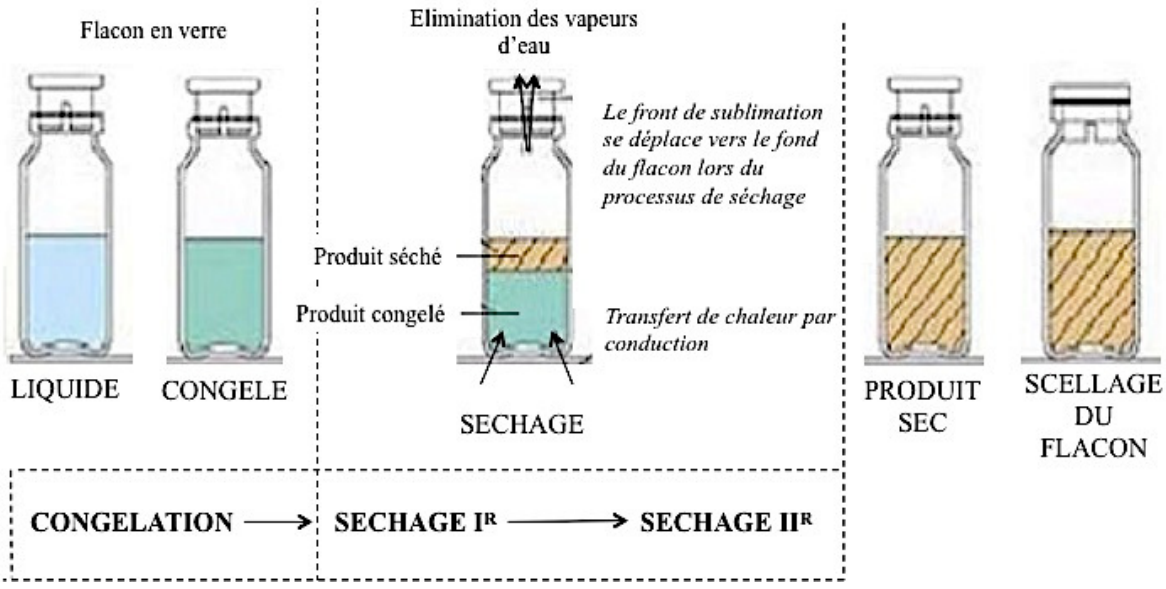


Figure N°46 : Déroulement des étapes du cycle de lyophilisation

L'étape de congélation est l'une des étapes les plus importantes de la lyophilisation, car elle détermine la texture de la matière congelée et, par conséquent, les caractéristiques morphologiques finales du matériau lyophilisé et sa stabilité. De nombreux paramètres sont à contrôler lors de cette étape. D'autres paramètres sont également à maîtriser lors des étapes suivantes pour mener à bien le procédé de lyophilisation.

V.6.2.1 Solidification totale du produit:

Le première élément à vérifier pendant la phase de congélation est de s'assurer que le produit est refroidi en dessous de sa température critique (T_{crit}) pour être sûr qu'il est complètement congelé afin de réaliser la dessiccation primaire. Chaque formulation a une T_{crit} différente qui est affectée par la combinaison et la proportion des éléments qu'il contient (solvants, excipients, ingrédient actif). Il est donc très important de réaliser un travail en amont afin de déterminer la T_{crit} pour chaque formulation. Le fait de connaître la T_{crit} permet non seulement de s'assurer que la T_{crit} est obtenue lors de la congélation, mais signifie également que l'énergie n'est pas gaspillée en prenant une température inférieure à celle requise. Les techniques les plus utilisées pour déterminer la T_{crit} sont la DSC et la FDM (Freeze-Drying Microscopy).

V.6.2.2 Durée du cycle de lyophilisation

La durée du cycle de lyophilisation a des répercutions immédiates sur les coûts du procédé. Son optimisation est donc essentielle et consiste à se concentrer principalement sur la réduction du temps de l'étape de séchage primaire, puisqu'elle représente habituellement la plus longue étape du cycle de lyophilisation.

Le paramètre clé qui permet d'estimer le degré d'optimisation de la durée du cycle, et plus particulièrement la durée du séchage primaire, est la température de nucléation et par conséquent le degré de surfusion (figure 47). Son contrôle permet donc d'apporter une solution à ce qui est peut-être le plus gros problème de mise à l'échelle industrielle du procédé de lyophilisation.

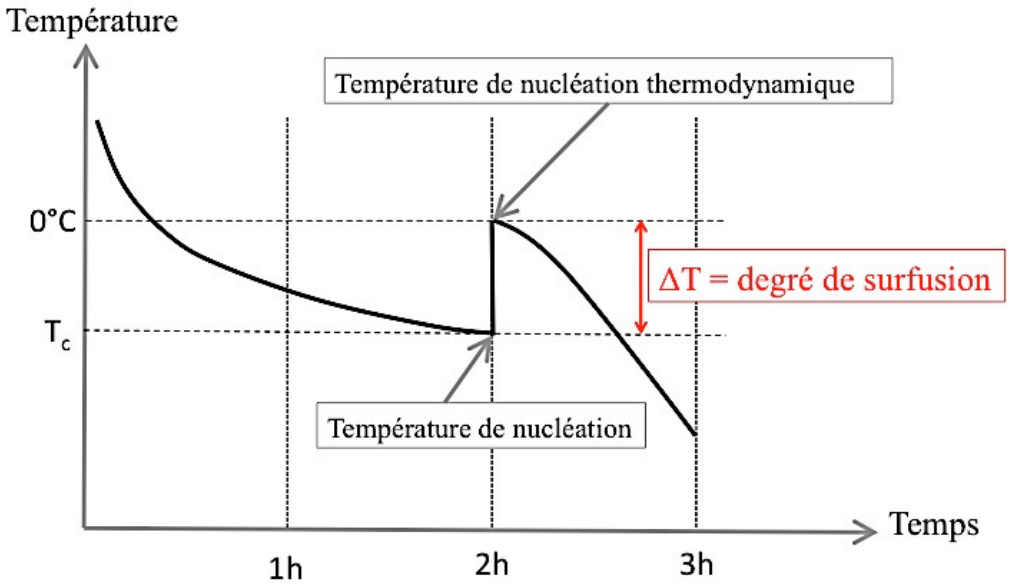


Figure N°47 : Distinction entre la température de nucléation et degré de surfusion.
Graphique montrant l'évolution de la température d'un flacon lors de la congélation. Le degré de nucléation est la différence de température entre la température de nucléation thermodynamique et la température de l'apparition de la congélation.

La température de nucléation, et donc le degré de surfusion, est d'une réelle importance pour la suite du cycle car cela va déterminer le nombre de noyaux de glace formés pendant l'étape de nucléation et par conséquent le nombre et la taille des cristaux de glace dans le matériau congelé. Des températures de nucléation élevées (ou bien un degré de surfusion faible) sont plutôt recommandées car elles génèrent un plus petit nombre de noyaux et de plus grands cristaux de glace qui déterminent à leur tour la taille des pores empruntés par la vapeur d'eau au sein du réseau poreux de la matrice lyophilisée au moment de l'étape de sublimation [*R. Geidobler et G. Winter, 2013*] (figure 48). Ces pores plus grands peuvent réduire considérablement la résistance de transfert de masse du gâteau. Par conséquent, le cycle de séchage est plus court ainsi que le temps de reconstitution avec l'amélioration des caractéristiques du produit fini. Des études antérieures ont démontré que pour chaque augmentation de 1°C à la température de nucléation, le temps de séchage primaire peut être réduit de près de 3 à 4% [*JA. Searles et al. 2001*]

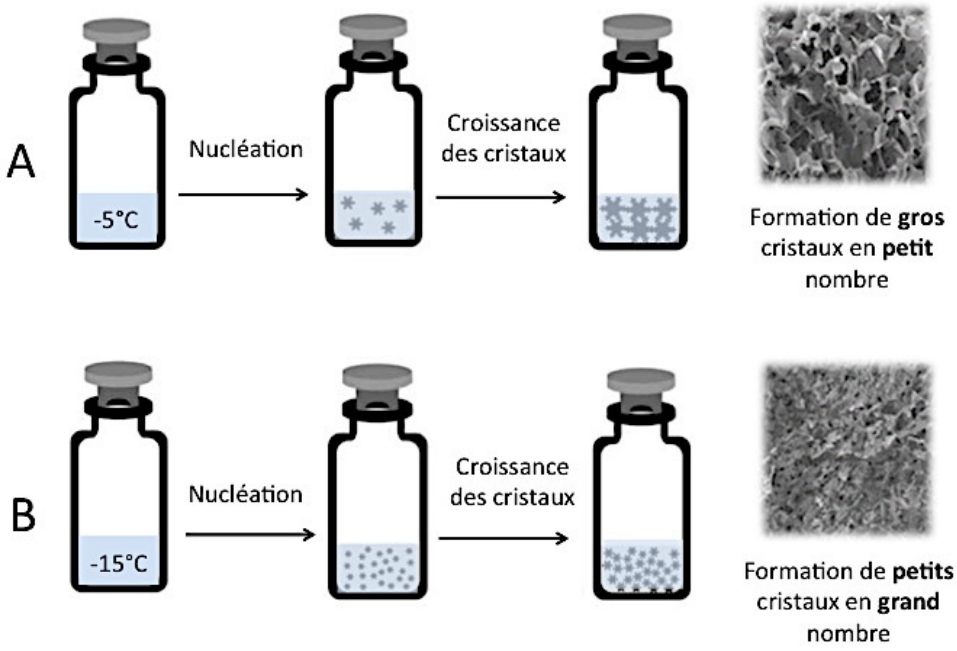


Figure N°48 : Formation des cristaux de glace. En A : Température de nucléation élevée (petit degré de surfusion) En B : Faible température de nucléation (degré de surfusion élevé) d'après sublimation [*R. Geidobler et G. Winter, 2013*]

Par la suite il est important d'optimiser cette durée de sublimation. En effet un temps de séchage primaire insuffisant peut provoquer l'effondrement du produit ou bien le faire fondre en raison d'une progression prématurée à l'étape de séchage secondaire, alors qu'un temps de séchage primaire trop important a pour conséquent une durée de cycle de lyophilisation inutilement longue.

Plusieurs techniques sont maintenant disponibles pour marquer la fin du séchage primaire. Le MTM (Manometric Temperature Measurement), TDLAS (Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy), et la spectroscopie d'émission à plasma (Lyotrack). Ce sont des exemples mais malheureusement, peu d'entre elles peuvent être facilement appliquées à une plus grande échelle. Une technique plus récente, le manomètre de Pirani (jauge de Pirani), peu coûteuse et fiable est utilisée pour déterminer la fin du séchage primaire à la fois sur un lyophilisateur de laboratoire et de production à grande échelle. C'est un instrument de précision basé sur la conductivité thermique du gaz, il est étalonné avec de l'azote. La pression Pirani diminue fortement vers la fin du séchage en réponse à une diminution de la vapeur d'eau dans la phase gazeuse (la composition du gaz passe de la vapeur d'eau à l'azote), ce qui permet de détecter la fin de cette étape. Cette technique est encore à l'étude pour une utilisation régulière de bonnes pratiques de fabrication (BPF).

V.6.2.3. Homogénéité des lots lyophilisés

Il est reconnu depuis longtemps que l'un des objectifs les plus importants au cours de l'étape de congélation est de produire un lot homogène, qui est un défi en raison de la nature stochastique de la nucléation (figure 49). En effet les flacons peuvent entrainer la nucléation sur une large plage de températures et de temps, rendant impossible l'obtention d'une uniformité entre eux.

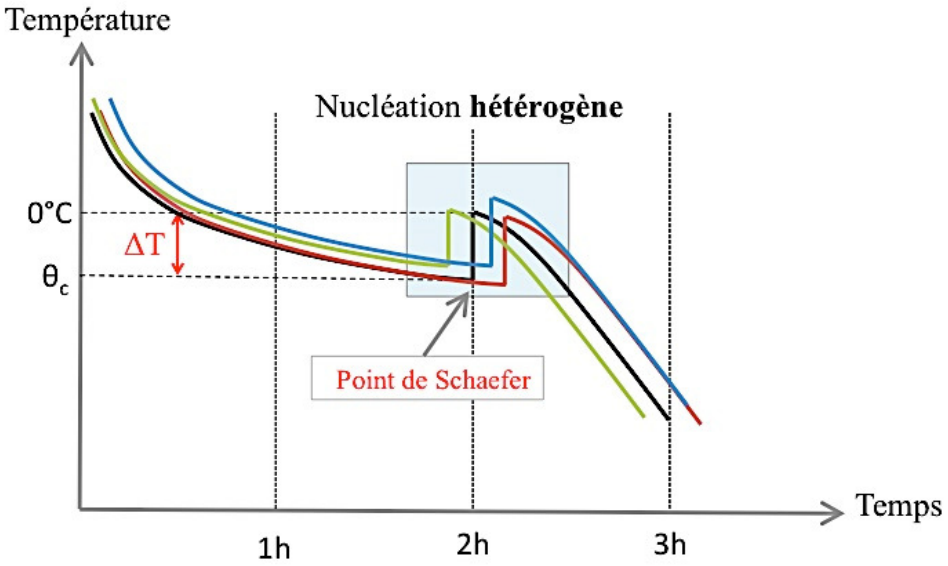


Figure N°49 : Cinétique de formation des cristaux non contrôlés : Nucléation stochastique (hétérogène) entre les flacons.

Ce phénomène sera d'autant plus accentué lors de la transposition d'échelle. En effet à grande échelle les flacons sont en plus grand nombre. Le refroidissement se fait donc de manière aléatoire en fonction de leur emplacement. De plus pour la lyophilisation des formulations pharmaceutiques, le degré de surfusion est normalement plus élevé (température de nucléation plus faible) à l'échelle industrielle qu'à l'échelle laboratoire en raison des conditions BPF à mettre en place générant des conditions propres avec un minimum d'agents de nucléation. La température de nucléation en laboratoire se situe généralement aux alentours de -20°C, tandis que les Industries Pharmaceutiques révèlent que la température de nucléation dans des environnements de production BPF peut aller jusqu'à -30°C ou plus. Cette différence peut avoir un effet significatif sur le processus de séchage et la morphologie du produit fini, car elle influe sur la structure de la glace. Tout cela conduit à l'allongement des cycles de production, à des propriétés différentes du produit lyophilisé et va donc nuire à la qualité du produit. Peu importe comment ont été conçus les contrôles du processus, l'uniformité entre les flacons est impossible à réaliser en l'absence de nucléation contrôlée.

Pour surmonter une telle hétérogénéité, le processus « d'annealing » est couramment utilisé. Cette technique consiste à maintenir, avant séchage, le produit pendant un certain temps en dessous de la température de congélation (cristallisation) mais au dessus de la température de transition vitreuse (T_g) (caractéristique du passage de l'état liquide visqueux à un état solide amorphe rigide). L'objectif est de favoriser la solidification totale sous forme cristalline au détriment de la forme amorphe et ainsi former une structure de glace plus favorable [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*], [*W. Abdelwahed et al, 2006*]. De plus cette méthode aboutit à la formation de gros cristaux de glace au détriment des plus petits, et contribue également à réduire la variabilité du temps de séchage. Néanmoins ce processus est long et par conséquent le bénéfice potentiel d'une réduction du temps de séchage peut entraîner peu ou pas de réduction globale du temps du cycle. Malheureusement cette technique ne permet pas de contrôler la cinétique de formation des cristaux.

D'autres approches ont ainsi été envisagées tel que le prétraitement des flacons, le traitement par ultrasons, ou encore l'utilisation d'additifs, mais celles-ci ont été jugées inefficaces ou difficilement transposables à l'échelle industrielle.
Actuellement les deux principales techniques offrant la possibilité de réaliser une étape de nucléation contrôlée à l'échelle commerciale sont : [*A. Siew 2013*] et [*R. Geidobler et G. Winter, 2013*]:

- **Le brouillard glacé** (la technologie **FreezeBooster** de Millrock et la technologie **Veriseq® de Linde**)
- La **dépressurisation** (la technologie **ControlLyo™**, développée par Praxair).

Ces techniques ont comme objectif commun de créer un seul et même point de départ pour le processus de congélation (figure 50).

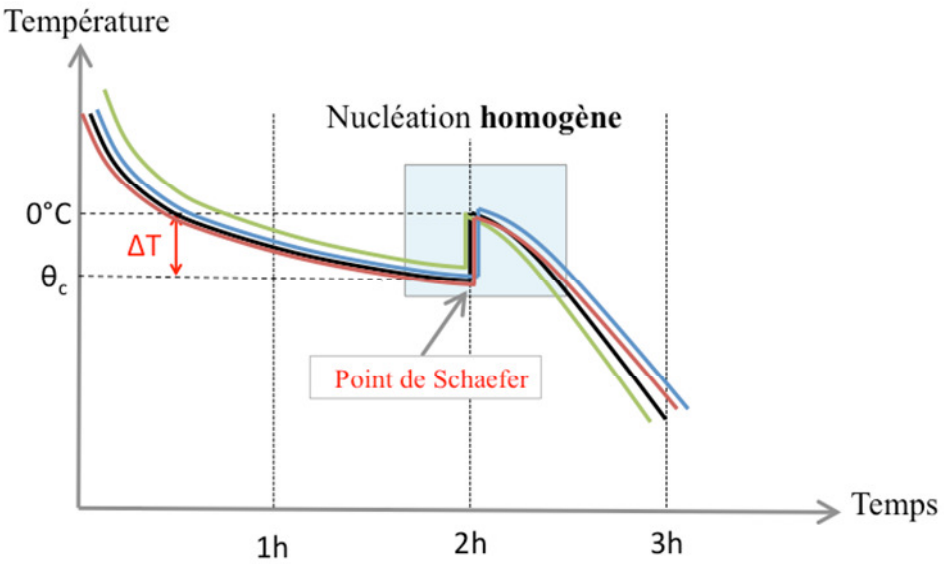


Figure N°50 : Cinétique contrôlée de formation des cristaux: Nucléation homogène entre flacons

Nous allons passer en revue rapidement chacune de ces techniques où la nucléation est donc induite soit par l'ensemencement des flacons par des cristaux de glace ou par dépressurisation de la chambre du lyophilisateur.

La nucléation contrôlée par la technologie FreezeBooster™ brevetée par Millrock (figure 51), généralement combinée avec la technologie AccuFlux™, consiste tout d'abord à refroidir la chambre du lyophilisateur à la température désirée en dessous du point de congélation thermodynamique. Ensuite la réduction de la pression de la chambre crée un volume prédéterminé de gel condensé à l'intérieur du condenseur qui se transforme rapidement en cristaux de glace suite à la turbulence de gaz créée par l'ouverture de l'orifice de vapeur dans la chambre maintenue à une pression inférieure à celle du condenseur. Cette injection de cristaux de glace permet une nucléation uniforme et rapide du produit dans les différentes zones de la chambre de lyophilisation.



Figure N°51 : Technologie FreezeBooster™ brevetée par Millrock, d'après le site *Millrock technology*

La technologie de nucléation VERISEQ® consiste également en la formation d'une dispersion microscopique uniforme de cristaux de glace (ou brouillard glacé). Les flacons

sont d'abord refroidis à la température désirée en dessous du point de congélation d'équilibre et la pression est réduite. De l'azote gazeux froid est ensuite introduit (par l'intermédiaire d'un échangeur de chaleur liquide de l'azote) dans la chambre. Ce gaz humide forme un brouillard glacé, qui est forcé dans les flacons et entraine la cristallisation de la glace par l'intermédiaire de sites de nucléation autour desquels des cristaux de glace se forment pendant la nucléation [*J. Brower et al. 2015*] (figure 52).

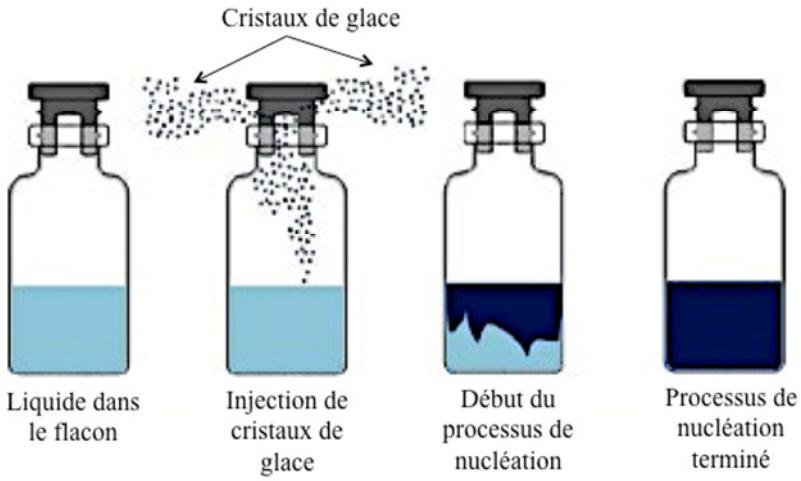


Figure N°52 : Méthode de nucléation contrôlée par l'injection de cristaux de glace d'après le site [*IMA Pharma*]

Ce processus induit donc la nucléation par l'introduction de cristaux de glace sous forme de brouillard glacé, et permet quatre résultats significatifs: une réduction du temps de traitement, une réduction de la variation entre les flacons, une plus grande maîtrise du processus de lyophilisation et une réduction du temps de reconstitution

La technique de nucléation par dépressurisation ControLyo™ utilisée par Praxair (figure 53), implique la réduction de la température du produit dans tous les flacons à une valeur de nucléation choisie, suivie d'une mise sous pression de la chambre de séchage par congélation d'un gaz inerte tel que l'azote ou l'argon. Lorsque l'équilibre thermique a été atteint, la pression en excès est libérée rapidement (dépressurisation rapide, environ 3 secondes), ce qui initie le phénomène de nucléation en provoquant la formation de cristaux de glace au sommet de la solution se propageant dans le flacon en une fraction de secondes (nucléation immédiate). On maintient



Figure N°53 : Technologie ControlLyo™ brevetée par Praxair, d'après le site *SP Scientific*

par la suite la température à la valeur de nucléation pour favoriser la croissance des cristaux de glace et limiter la formation de la nucléation secondaire à des températures plus faibles. Le mécanisme n'est cependant pas encore entièrement compris. Il a été spéculé deux explications à ce phénomène. La première explication est que le gaz dans la chambre subit une expansion pendant la dépressurisation tout en se refroidissant. Le gaz ainsi froid en contact de la surface du liquide métastable dans le flacon peut ainsi induire la nucléation. La seconde explication est que la dépressurisation peut provoquer l'évaporation locale d'un peu de liquide de surface résultant en un refroidissement du produit pouvant déclencher la nucléation. Quel que soit le mécanisme, la procédure a déjà démontré une bonne efficacité à toutes les échelles de production des lyophilisateurs. Les utilisateurs de la technologie ControLyo^{TM} ont rapporté jusqu'à 40% de réduction des temps de cycle [*A. Siew 2013*].

Ces technologies de nucléation contrôlées offrent donc de nombreux avantages qui comprennent :

- La taille des cristaux de glace : Augmentation significative de la taille moyenne des pores, qui, à son tour, réduit la résistance à l'écoulement de vapeur d'eau et, par conséquent, le temps de séchage primaire.
- L'aspect du produit : Amélioration de l'aspect visuel du produit final (élimination du craquage de gâteau ou de la formation de la couronne). Plus grande qualité et uniformité du produit.
- Réduction du temps de traitement et donc des coûts
- Bonne homogénéité entre les flacons
- Une plus grande maîtrise du processus de lyophilisation
- Réduction du temps de reconstitution

V.6.2.4 Phénomène d'effondrement « collapse »

Tout au long de l'étape de sublimation la température du produit doit être maîtrisée et maintenue en-dessous de la température critique (T_{crit}) afin d'assurer l'apparence du produit et principalement d'éviter son effondrement (« collapse ») (figure 54).

En effet l'effondrement ou « collapse » est le défaut le plus grave que l'on peut obtenir suite au procédé de lyophilisation, résultant en une durée de vie et une stabilité du produit réduite, une diminution de l'activité du produit, une mauvaise reconstitution et donc le rejet du produit pour des raisons de « présentation » commerciales.

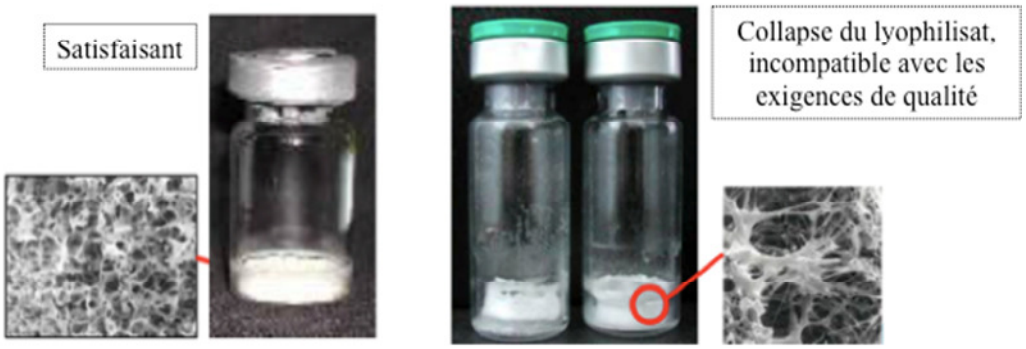


Figure N°54 : Phénomène de « collapse » [*Document pédagogique interne* : *La lyophilisation V.Rosilio, 2014*]

Ce phénomène ne se produit qu'après sublimation de la glace lorsqu'il reste une composante amorphe importante. En effet à la fin de la dessiccation primaire la température du produit remonte au-dessus d'une température critique, température de collapse ($T_{collapse}$), en général proche de T_g, et la composante amorphe passe d'un état vitreux à un état fondu plus fluide. Il y a effondrement du lyophilisat sous son propre poids avec réhydratation possible du produit sec. Pour éviter ce phénomène, il est essentiel de maintenir la température de dessiccation primaire de 5 à 10°C en-dessous de la $T_{collapse}$. Cela diminue par conséquent la cinétique de sublimation ce qui augmente la durée de séchage [*Document pédagogique interne* : *L. Choisnard 2013*] et [*R. Geidobler et G. Winter, 2013*]. En outre, la qualité du produit est fortement influencée par l'historique thermique du produit au cours du processus de préparation de l'échantillon. Par conséquent, il est essentiel de suivre et de contrôler la température du produit. Des sondes ont été développées à cet effet tel que les thermocouples, les détecteurs de température à résistance (RTD) et les systèmes d'interrogation à distance (TEMPRIS) [*B. Wang & T. McCoy, 2015*].

Il est également possible de contrôler ce phénomène en favorisant la solidification totale du produit sous forme cristalline au détriment de la forme amorphe par la technique vue précédemment, la technique dite « d'annealing ». Pour finir il est possible de rajouter des agents anti-collapses (glucose, dextran, maltose, gelatin…) qui agissent en augmentant la température de collapse du produit [*A. Baheti et al. 2010*].

V.6.2.5 Phénomène de « croutage »

Lors de l'étape de sublimation il est également important d'éviter le phénomène de croutage. Il peut être soit à l'origine de la croissance de cristaux après nucléation avec diffusion de molécules d'eau du liquide interstitiel vers les cristaux (déshydratation du liquide interstitiel),

soit à l'origine de la mobilité des cristaux qui diminue au fur et à mesure de leur croissance. Le liquide interstitiel concentré est comprimé et expulsé vers la surface avec obtention d'une croûte en surface après dessiccation primaire. Le croûtage peut constituer une barrière à l'évacuation de la vapeur au début de l'étape de sublimation, ralentissant la sublimation. Afin d'éviter ce phénomène et limiter la formation de zones liquides sur-concentrées en soluté, il est préférable de limiter la taille des cristaux de glace en favorisant une congélation rapide, ou bien favoriser l'apparition d'un état amorphe défavorable à la croissance cristalline en utilisant un cryoprotecteur. Le choix du cryoprotecteur (glucose, lactose, sorbitol, mannitol, tréhalose…) est réalisé en connaissant la température de transition vitreuse qui permet de se placer dans les conditions opératoires de formation d'amorphes [*A. Baheti et al. 2010*].

Définir et contrôler les paramètres critiques du procédé est essentiel pour atteindre les objectifs permettant de mener à bien le procédé de lyophilisation. Comme il a été décrit dans la section ci-dessus, de nombreuses techniques sont utilisées pour surveiller et contrôler ces paramètres. Les points critiques du procédé sont résumés figure 55.

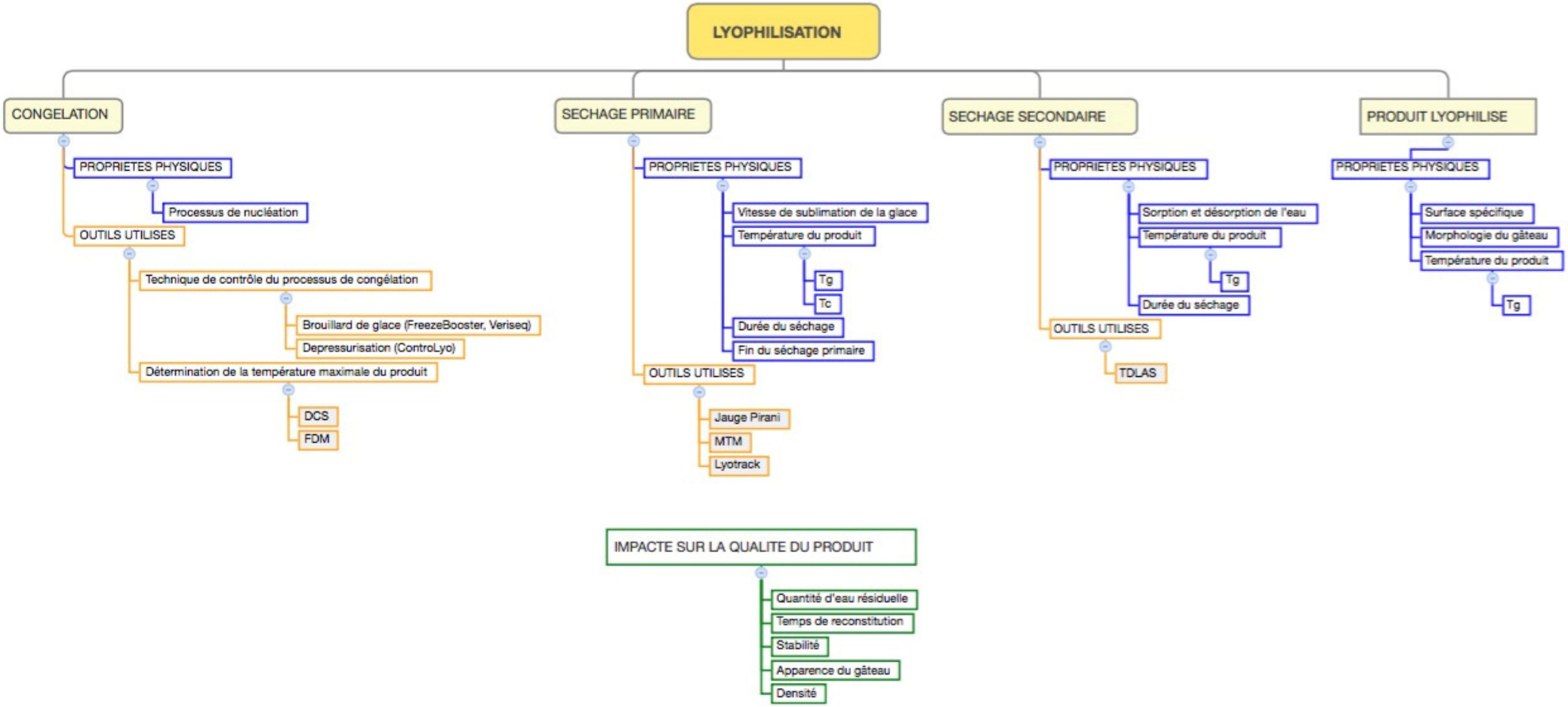


Figure N°55 : Aperçu des différentes étapes du procédé de lyophilisation avec respectivement chacune de leurs propriétés physiques et les outils utilisés

V.6.3 Choix de formulation

L'objectif de la formulation d'un produit à lyophiliser est de sélectionner quantitativement et qualitativement les bons excipients afin d'assurer la stabilité et l'efficacité du produit fini.
Des études spécifiques doivent être menées pour sélectionner les bons excipients. Les familles d'excipients les plus utilisées sont les agents de charge, les solutions tampons, les agents de tonicité ou encore les agents conservateurs et les agents anti-collapse (Figure 56). [*Frank Kofi Bedu-Addo, 2004*].

Lors de la congélation, des dommages peuvent se produire, notamment avec des produits labiles tels que les liposomes. Les contraintes de congélation perturbent la bicouche des liposomes et par conséquent la stabilité de la suspension liposomale. De plus l'élimination de la couche d'hydratation des liposomes au cours du séchage en l'absence d'un cryoprotecteur approprié peut provoquer la fusion des liposomes.
Les disaccharides sont des cryoprotecteurs qui se sont avérés être très efficaces dans la stabilisation des liposomes pendant la lyophilisation [*J.L Holovatis & J.P Acker, 2007*].
Le tréhalose en est un exemple et a été choisi pour le développement de la suspension liposomale de b-Lap.
Le Tréhalose est un sucre non réducteur qui a une température de transition vitreuse élevée (plus élevée que les autres disaccharides). Cette propriété combinée avec ses autres caractéristiques physico-chimiques, stabilité (il est stable à faible pH, à température élevée, il ne s'hydrolyse pas), hygroscopicité, montre que le tréhalose est un ingrédient idéal pour protéger les liposomes notamment contre le problème de croutage.

L'action protectrice de ce sucre relève probablement de deux mécanismes conjoints d'action [*M. Nakagaki et al, 1992*], [*Chene et al, 2010*] : d'une part « le remplacement de l'eau » par la capacité des groupements hydroxyle du tréhalose à interagir physiquement (liaisons hydrogène) avec les résidus polaires des membranes ; d'autre part la possibilité de former un liquide extrêmement visqueux (mécanisme de vitrification) ralentissant les réactions chimiques ce qui permet la stabilité et la quiescence des systèmes vivants [*Crowe et al, 1998*].

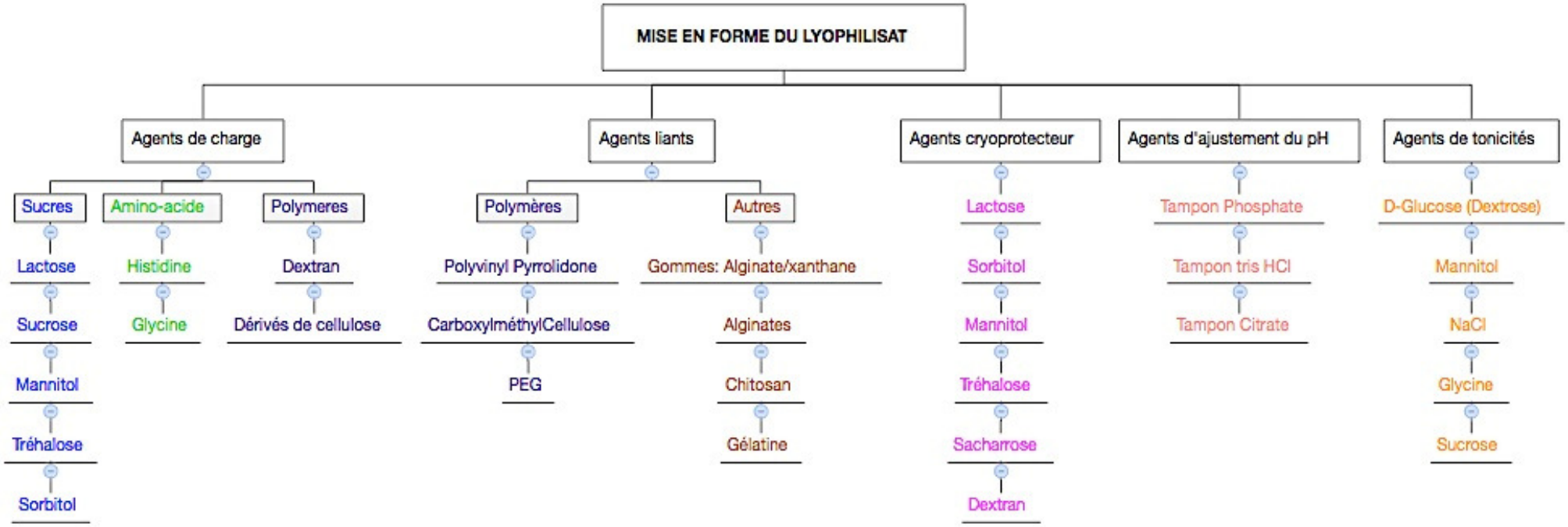


Figure N°56 : Liste non exhaustive des excipients utilisés pour la formulation de produits lyophilisés d'après [*Document pédagogique interne*: *Luc Choisnard 2013*]

De plus plusieurs travaux dont ceux de [*A. Parise et al, 2015*] et [*W. Abdelwahed et al, 2006*] ont montré une efficacité plus importante du tréhalose dans la stabilisation du liposome lyophilisé ainsi que dans la conservation de ces propriétés physico-chimiques au long terme. Ceci serait dû à sa plus faible hygroscopicité, sa plus grande flexibilité de former des liaisons hydrogène, sa faible réactivité chimique et enfin de sa T_g plus élevée.

Le phénomène de collapse, problématique de formulation présentée précédemment, peut être diminué par l'utilisation d'agent anti-collapse. Cette famille d'excipients va entrainer une augmentation globale de la température de collapse du produit, évitant ainsi son effondrement. De plus son rôle est double car il permet parallèlement de diminuer le temps de dessiccation primaire.

La suspension liposomale de b-Lap étudiée dans ces travaux est une préparation à usage parentéral. Celle-ci doit être isotonique afin d'éviter d'endommager les tissus. Il est donc nécessaire d'ajouter un agent d'ajustement de tonicité. Cependant il s'avère que la grande majorité de cette famille d'excipients possède une température de collapse faible, augmentant le risque de collapse du produit et le temps de séchage primaire de manière significative. Il est possible afin de contourner cela d'ajouter cet agent de tonicité lors de la reconstitution du produit.

En ce qui concerne les solutions tampons, elles sont requises dans les formulations pharmaceutiques pour stabiliser le pH. Dans le développement de formulations lyophilisées, le choix du tampon peut être critique. Il dépend du profil de stabilité de la molécule active aux différents pH. Ainsi le pH de stabilité maximale du médicament doit être connu et maintenu. Un bon agent tampon ne doit pas être volatil, et doit avoir une température de collapse et de transition vitreuse importante. Il arrive que des modifications de pH surviennent au cours de l'étape de congélation. C'est notamment le cas du tampon phosphate, où seul l'acide cristallise lors de l'étape de congélation, provoquant une diminution du pH ; Une bonne approche consiste à utiliser de faibles concentrations du tampon ou bien d'utiliser des agents limitant la cristallisation de l'acide tel que le sucrose ou la Mannitol [*Document pédagogique interne : L. Choisnard 2013*].

Comme l'on peut s'apercevoir dans la figure 56 certains excipients peuvent remplir plusieurs fonctions. C'est le cas du dextran qui a un rôle d'agent de charge et d'agent cryoprotecteur. Il fait également parti des excipients qui sont utilisés pour augmenter la température de collapse du produit limitant ainsi le phénomène de collapse.

A noter que de nombreuses études ont déjà été menées pour identifier les excipients les plus adéquats. Une liste des excipients utilisés dans la formulation de produits lyophilisés commercialisés aux Etats-Unis a été créée sur la base du « *Physician Desk Reference* » (PDR) et le « *Handbook on Injectable Drugs* ». Des informations sur les quantités recommandées de divers excipients ont également été fournies, basées sur des indications figurant dans le « *Inactive Ingredient Guide* » (IIG).

VI. Conclusion et perspectives

La bêta-lapachone (b-Lap) est une molécule anti-cancéreuse dont les applications sont limitées en raison de ses propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques défavorables. Lors de ces travaux nous avons étudié la faisabilité d'une formulation sous la forme de liposomes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux travaux réalisés par [*Cavalcanti et al, 2011*], et avons confronté nos résultats. Nous avons montré que le système Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1) de [*Cavalcanti et al, 2011*] est un mélange favorisant la stabilité des liposomes. Les images AFM de la bicouche lipidique de ce système révèlent la présence de domaines lipidiques de différentes hauteurs, de l'ordre de la centaine de picomètres. De plus, nos travaux confirment les résultats précédents selon lesquels la b-Lap a un faible pouvoir tensioactif. Lorsqu'elle est intégrée aux mélanges Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine (7:2:1) ou bien Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-DSPE-PEG_{2000}, disposés en monocouche, elle ne modifie pas l'aire des lipides. En revanche, le module de compressibilité est modifié, indiquant l'effet de b-Lap sur l'organisation des constituants de la bicouche. Les cycles de compression/expansion confirment ces observations. La b-Lap est bien encapsulée dans les liposomes, vraisemblablement au niveau des bicouches. D'autre part, les résultats du dosage montrent une différence importante au niveau de l'efficacité et du taux d'encapsulation de la b-Lap dans les liposomes par rapport au système décrit par [*Cavalcanti et al, 2011*]. Cette efficacité d'encapsulation, nettement supérieure à la nôtre, est attribuée à la très forte concentration en lipides utilisée dans leur système. En outre, la différence observée en terme de taux d'encapsulation, est reliée aux méthodes de mesures mises en œuvre : nous avons réalisé un dosage direct après ultracentrifugation alors que [*Cavalcanti et al, 2011*] ont choisi le dosage indirect dans le surnageant.

De nombreuses perspectives de recherche s'ouvrent à l'issue de ce mémoire, pour progresser dans la compréhension du système Lipoïd E80-cholestérol-stéarylamine-DSPE-PEG_{2000}-b-Lap. Nous pouvons apporter des informations supplémentaires sur l'insertion de la b-Lap dans la bicouche à l'aide de deux techniques d'analyses en intégrant des études de rayons X à petits et grands angles et en poursuivant les études de fluorescence. Il est également possible d'apporter des informations sur les propriétés viscoélastiques du système en réalisant des études de microbalance à cristal de quartz dans un système microfluidique. Il serait également intéressant de différencier la quantité de b-Lap incorporée au niveau de la membrane à celle se trouvant au niveau du cœur aqueux. En effet, malgré la faible solubilité aqueuse de la b-lap (0,16 mM), une certaine quantité pourrait être solubilisée dans le cœur aqueux des liposomes. Enfin, un des challenges pour conserver les préparations de liposomes repose sur leur lyophilisation ultérieure, comme en témoigne la littérature. Dans ce cadre, il sera judicieux d'étudier notamment l'impact du cryoprotecteur, le tréhalose, utilisé par [*Cavalcanti et al, 2011*].

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 13/11/2015

LE DOYEN

Pr. Christophe RIBUOT
Directeur UFR Pharmacie
Université Joseph Fourier

Pr. Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Dépt. de Pharmacochimie Moléculaire - DPM
UMR 5063 - Pharmacotechnie
Pr. D. WOUESSIDJEWE
Bât E André Rassat
301, avenue de la Chimie - BP 53
38041 GRENOBLE Cedex 9

Pr. Denis WOUESSIDJEWE

VI. Références bibliographiques

Abdelwahed, W, G Degobert, S Stainmesse, and H Fessi. "Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations☆." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, no. 15 (December 30, 2006): 1688–1713.

Baheti, Ankit, Lokesh Kumar, and Arvind Kumar Bansal. "Excipients Used in Lyophilization of Small Molecules." *Journal of Excipients and Food Chemicals* 1, no. 1 (2010): 41–54.

Balazs, Daniel A, and WT Godbey. "Liposomes for Use in Gene Delivery." *Hindawi Publishing Corporation*, Journal of Drug Delivery, 2011 (2010).

Bedu-Addo, Frank Kofi. "Desired Characteristics of a Lyophilized Product," Pharmaceutical technology, 2004.

Blanco, Elvin, Erik A. Bey, Ying Dong, Brent D. Weinberg, Damon M. Sutton, David A. Boothman, and Jinming Gao. "B-Lapachone-Containing PEG–PLA Polymer Micelles as Novel Nanotherapeutics against NQO1-Overexpressing Tumor Cells." *Journal of Controlled Release* 122 (October 2007) 365–74.

Brower, Joseph, Ron Lee, Eugene Wexler, Steven Finley, Monica Caldwell, and Peter Studer. "New Developments in Controlled Nucleation: Commercializing VERISEQ® Nucleation Technology." In *Lyophilized Biologics and Vaccines*, edited by Dushyant Varshney and Manmohan Singh, 73–90. New York, NY: Springer New York, 2015.

Cavalcanti, Isabella M.F., Elisângela A.M. Mendonça, Mariane C.B. Lira, Sara B. Honrato, Celso A. Camara, Rosa V.S. Amorim, Josué Mendes Filho. "The Encapsulation of B-Lapachone in 2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complex into Liposomes: A Physicochemical Evaluation and Molecular Modeling Approach." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, (October 2011): 332–40.

Cevc, G. Phospholipids Handbook; CRC Press: New York, 1993

Chau, Yat-Pang, Shine-Gwo Shiah, Ming-Jaw Don, and Min-Liang Kuo. “Involvement of Hydrogen Peroxide in Topoisomerase Inhibitor B-Lapachone-Induced Apoptosis and Differentiation in Human Leukemia Cells.” *Free Radical Biology and Medicine* 24 (1998) 660–70.

Chen, Chengjun, Dandan Han, Cuifang Cai, and Xing Tang. “An Overview of Liposome Lyophilization and Its Future Potential.” *Journal of Controlled Release* 142, no. 3 (March 2010): 299–311.

Choi, Eun K., Kaoru Terai, In-Mi Ji, Yeon H. Kook, Kyung H. Park, Eun T. Oh, Robert J. Griffin, “Upregulation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase by Radiation Potentiates the Effect of Bioreductive B-Lapachone on Cancer Cells.” *Neoplasia* 9, (August 2007) 634–42.

Chollet W., Stage de fin d’étude : Etude des mécansimes d’intéraction des liposomes avec des substances actives, des sels et des sachharides, UMR CNRS 8612 ; août 2012

Costanino, Henry R, and Michael J. Pikal. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. AAPS PRESS, 2004.

Crowe, JH, JF Carpenter, and LM Crowe. “The Role of Vitrification in Anhydrobiosis.” *Annual Review of Physiology 60*, (1998) 73–103.

Cunha-Filho, Marcílio S. S., Ramón Martínez-Pacheco, and Mariana Landin. “Effect of Storage Conditions on the Stability of B-Lapachone in Solid State and in Solution: B-Lapachone Stability Studies.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65, (June 2013) 798–806.

Filho, Jadilson M. Nascimento, Celso P. de Melo, Nereide S. Santos-Magalhães, Véronique Rosilio, Maria A.M. Maciel, and Cesar A.S. Andrade. “Thermodynamic Investigation of Mixed Monolayers of Trans-Dehydrocrotonin and Phospholipids.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 358, (2010) 42–49.

Geidobler, R, and G Winter. “Controlled Ice Nucleation in the Field of Freeze-Drying: Fundamentals and Technology Review.” In *Fundamentals and Technology Review, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013.

Guidechem : http://www.guidechem.com/reference/dic-483812.html

Guzmán, Eduardo, Libero Liggieri, Eva Santini, Michele Ferrari, and Francesca Ravera. "Mixed DPPC–cholesterol Langmuir Monolayers in Presence of Hydrophilic Silica Nanoparticles." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105 (May 2013) 284–93.

Holovati, J.L., and J.P. Acker. "Spectrophotometric Measurement of Intraliposomal Trehalose." *Cryobiology* 55, no. 2 (October 2007): 98–107.

Hope, M.J., M.B. Bally, G Webb, and P.R. Cullis. "Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure. Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential." *Biochimica et Biophysica Acta 812* (1985) 55-65

IMA Pharma « Research & Development new horizons in freeze drying» http://www.ima-pharma.com/Page/EN/Products-P575/Product_Insights-L872/Lyophilization_Process-D889/Ice_Fog_Nucleation-M895.html

Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, and Barry W. Ninham. "Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72 (1976) 1525–68.

Grugier, Jérome. "La Lyophilisation et les enjeux pour les métiers de La Santé." La vague 36 Technologie/Process, (2013).

Korner, D, S Benita, G Albrecht, and A Baszkin. "Surface Properties of Mixed Phospholipid-Stearylamine Monolayers and Their Interaction with a Non-Ionic Surfactant (Poloxamer)." *Colloids and Surface B: Biointerfaces 3*, (1994) 101-109.

Kumar, V. V. "Complementary Molecular Shapes and Additivity of the Packing Parameter of Lipids." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, no. 2 (1991) 444–48.

Lee, J. I., D. Y. Choi, H. S. Chung, H. G. Seo, H. J. Woo, B. T. Choi, and Y. H. Choi. "Beta-Lapachone Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Bladder Cancer Cells by Modulation of Bcl-2 Family and Activation of Caspases." *Exp Oncol* 28, (2006) 30–35.

Luc Choisnard 2013. Séchage par lyophilisation. Principes et Appareillages.

Lyophilisation des artefacts archéologiques - Notes de l'Intitut Canadien de Conservation 4/2 https://www.cci-icc.gc.ca/resources-ressources/ccinotesicc/4-2-fra.aspx

Malzert, A., F. Boury, P. Saulnier, J. P. Benoît, and J. E. Proust. "Interfacial Properties of a PEG2000–PLA50 Diblock Copolymer at the Air/Water Interface." *Langmuir* 17, (2001) 7837–41.

Marin, Michèle, and Frédéric René. "Lyophilisation." *Techniques de l'Ingénieur, Traité Agroalimentaire* Doc. F 3 240 (2000): 9.

McIntosh, Thomas J. "The Effect of Cholesterol on the Structure of Phosphatidylcholine Bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 513, (1978) 43–58.

Mougin-Degraef, Marie. "Les Liposomes : Aspects Technologiques et Pharmaceutiques. Radiomarquage Des Liposomes Pour Le Ciblage En Radioimmunothérapie." Université de Nantes Faculté de Pharmacie, 2004.

Nakagaki, M, H Nagase, and H Ueda. "Stabilization of the Lamellar Structure of Phosphatidylcholine by Complex Formation with Trehalose*." *Elsevier Science Publishers B V, Amsterdam*, Journal of Membrane Science, 73 (1992): 173–80.

Nasongkla, Norased, Andy F. Wiedmann, Andrew Bruening, Meghan Beman, Dale Ray, William G. Bornmann, David A. Boothman, and Jinming Gao. "Enhancement of Solubility and Bioavailability of B-Lapachone Using Cyclodextrin Inclusion Complexes." *Pharmaceutical Research* 20 (2003) 1626–33.

Nireesha, G. R., L. Divya, C. Sowmya, N. Venkateshan, M. Niranjan Babu, and V. Lavakumar. "Lyophilization/Freeze Drying-An Review '." *Inter J Novel Trends in Pharm Sci* 3, no. 4 (2013): 87–98.

OMS Cancer Février 2015 : http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/

Ough, Matthew, Anne Lewis, Erik A. Bey, Jinming Gao, Justine M. Ritchie, William Bornmann, David A. Boothman, Larry W. Oberley, and Joseph J. Cullen. "Efficacy of Beta-Lapachone in Pancreatic Cancer Treatment: Exploiting the Novel, Therapeutic Target NQO1." *Cancer Biology & Therapy* 4, (January 2005) 102–9.

Parise, Amelia, Andrea Milelli, Vincenzo Tumiatti, Anna Minarini, Paolo Neviani, and Guendalina Zuccari. "Preparation, Characterization and *in Vitro* Evaluation of Sterically Stabilized Liposome Containing a Naphthalenediimide Derivative as Anticancer Agent." *Drug Delivery* 22, no. 5 (July 4, 2015): 590–97.

Pikal, Michael J. "Characterization and Control of Physical Quality Factors During Freez-Drying." In *Modern Drying Technology*, Evangelos Tsotas, Arun S. Mujumdar., 3:430, 2011.

Rand, R. P., and V. A. Parsegian. "Hydration Forces between Phospholipid Bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 988, (1989) 351–76.

Reinicke, Kathryn E., and David A. Boothman. "Developing a Beta-Lapachone Prodrug for Therapy Against NQ01-Overexpressing Breast Cancers." DTIC Document, 2006. http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA450260.

Rosilio .V, Cours Master 2, 2014 : Méthodes de caractérisation des interfaces, Thermodynamique des interfaces

Rossi, Bruno. "La Lyophilisation En Laboratoire F." *Isher Scientific Labosi*, no. N°84 (January 2004).

Saclier, Mathieu. "Contrôle Par Ultrasons de La Nucléation de Glace Lors de La Congélation En Flacons: Modélisation de La Cinétique de Nucléation et Caractérisation Expérimentale Des Cristaux." Université Claude Bernard-Lyon I, 2009.

Scomparin, Carole. "Dynamique Des Bicouches Lipidiques Supportées." Université de la Méditerranée-Aix-Marseille II, 2007.

Searles, JA, JF Carpenter, and TW Randolph. "The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature-Controlled Shelf." *Journal Pharmaceutic Science*, 2001.

Sierakowski, Dominique. "Ce Qui Compte Dans La Lyophilisation." *Technologie/Process*, 2013, La Vague AP3 edition.

Siew, Adeline. "Controlling Ice Nucleation During the Freezing Step of Lyophilization. Lyophilization Technologies for Controlled Nucleation," 2013, Pharmaceutical Technology edition.

Stine, Keith J, and David T Stratmann. "Fluorescence Microscopy Study of Langmuir Monolayers of Stearylamine." *Langmuir*, (1992) 2509-2514.

Tardat-Henry, M, and J.P Beaudry. *Chimie Des Eaux*. Les éditions le Griffon d'argile. 2 ème édition, 1992.

Taylor, Kevin M.G., and Rita M. Morris. "Thermal Analysis of Phase Transition Behaviour in Liposomes." *Thermochimica Acta 248*, (1995) 289-301

Tirosh, Oren, Yechezkel Barenholz, Jehoshua Katzhendler, and Aba Priev. "Hydration of Polyethylene Glycol-Grafted Liposomes." *Biophysical Journal* 74, no. 3 (1998): 1371–79.

Unicancer en France 2012, Les chiffres du cancer en France : http://www.unicancer.fr/le-groupe-unicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france

Valois M., Stage de fin d'étude : Etude du comportement interfaciale d'une substance active hydrophobe en mélange avec des lipides, UMR CNRS 8612 ; août 2011

Vist, Margus R., and James H. Davis. "Phase Equilibria of Cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: Deuterium Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry." *Biochemistry* 29, (1990) 451–64.

Wang, Bingquan (Stuart), and Timothy McCoy. *Lyophilized Biologics and Vaccines. Chapter: Advances in Process Analytical Technology in Freeze-Drying*. p157–178, 2015.

Weinstein, John N., and Lee D. Leserman. "Liposomes as Drug Carriers in Cancer Chimiotherapy." *Pharmac. Ther.* 24 (1984) 207 to 233.

Wu, Han-Chung, and De-Kuan Chang. "Peptide-Mediated Liposomal Drug Delivery System Targeting Tumor Blood Vessels in Anticancer Therapy." *Journal of Oncology* (2010): 1–8.

Xiao, Renzhong, Rongrong Wang, Zhaowu Zeng, Lili Xu, and Junjie Wang. "Application of Poly(ethylene Glycol)– Distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG) Block Copolymers and Their Derivatives as Nanomaterials in Drug Delivery." *International Journal of Nanomedicine*, August 2012, 4185.

Xu, Zhong, Nolan B. Holland, and Roger E. Marchant. "Conformations of Short-Chain Poly(ethylene Oxide) Lipopolymers at the Air−Water Interface: A Combined Film Balance and Surface Tension Study." *Langmuir* 17, (January 2001) 377–83.

Yeagle, Philip L. "Cholesterol and the Cell Membrane," Biochimica et Biophysica Acta 822, (1985) 267–287.

Faculté de Pharmacie,

Université Joseph Fourier Grenoble I.



Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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 ».

CHRISTOPHER THORNE

DEVELOPPEMENT DE SUSPENSIONS LIPOSOMALES POUR L'ADMINISTRATION D'UNE SUBSTANCE MEDICAMENTEUSE DIFFICILEMENT FORMULABLE

RESUME :

Ce mémoire aborde le problème du développement d'une suspension liposomale de bêta-Lapachone, substance thérapeutique difficilement formulable en raison de sa faible solubilité.
L'enjeu était de confronter nos résultats avec ceux de la publication de *Calvacanti et al. [2011*], notamment en ce qui concerne l'efficacité d'encapsulation de la bêta-lapachone (> 97%) dans des liposomes, et d'apporter de nouveaux éléments de réponse quant à la détermination et la compréhension de sa localisation au sein de ce système transporteur. A cette fin, nous avons utilisé plusieurs méthodes et techniques complémentaires. Dans un premier temps, l'étude de monocouches a permis d'analyser l'interaction moléculaire de la bêta-Lapachone avec les lipides et dans un second temps, celle de bicouches a permis de caractériser les changements induits par la molécule au sein de la matrice liposomale.
Les résultats montrent que la bêta-lapachone s'insère bien au niveau de la bicouche des liposomes, mais que l'efficacité d'encapsulation est bien moindre que celle indiquée par les études *Calvacanti et al*.
Pour finir, une partie est consacrée à l'étude des différents aspects du procédé de lyophilisation notamment en ce qui concerne les points critiques et les enjeux industriels de celui-ci.

LES MOTS CLES : bêta-Lapachone, liposome, monocouche, POPC, cholesterol, stearylamine, lyophilisation.

ADRESSE : *[Données personnelles retirées de la version diffusée]*

FILIERE : Industrie

CHRISTOPHER THORNE

DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL SUSPENSIONS FOR THE ADMINISTRATION OF A DIFFICULT TO FORMULATE DRUG

RESUME:

This thesis addresses the problem of developing a liposomal suspension of beta-lapachone, a therapeutic substance that is difficult to formulate because of its low solubility.
The challenge was to compare the results obtained with those of Cavalcanti et al. [2011], in particular with regard to the encapsulation efficiency of beta-lapachone (> 97%) in liposomes, and to provide some possible answers concerning the determination and understanding of its location within this carrier system. To this end, we used several complementary methods and techniques. Initially, studies of monolayers were used to analyse the molecular interaction of beta-lapachone with lipids and secondly, studies on bilayers allowed to characterize the changes induced by the molecule in the liposomal matrix.
The results show that beta-lapachone fits well at the bilayer liposomes, but the encapsulation efficiency is much lower than that indicated by Cavalcanti et al.
Finally these results are placed into the context of the lyophilisation process, and in particular regarding the critical issues and the Industrial challenges.

KEY WORDS: bêta-Lapachone, liposome, monolayer, POPC, cholesterol, stearylamine, freeze-drying.

ADRESSE : *[Données personnelles retirées de la version diffusée]*

FILIERE : Industrie