



HAL
open science

Nanomédicaments et voie orale, formulation basse énergie de nanocapsules lipidiques

Laura Hervieu

► **To cite this version:**

Laura Hervieu. Nanomédicaments et voie orale, formulation basse énergie de nanocapsules lipidiques. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03467269

HAL Id: dumas-03467269

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03467269>

Submitted on 6 Dec 2021

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.



THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Nanomédicaments et voie orale, formulation basse énergie de nanocapsules lipidiques

Présentée par
Laura HERVIEU

**Soutenue publiquement le 06 juillet 2021
devant le jury composé de**

Pr Anne-Sophie VOISIN-CHIRET	Professeur des universités, Université de Caen, Normandie	Président du jury
Dr Anne-Claire GROO	Maitre de conférences, Université de Caen, Normandie	Co-directrice

Thèse dirigée par Dr Guillaume Lefebvre ; Maitre de conférences, Université d'Angers

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick	Pharmacie officinale
RICHARD Estelle	Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

Je remercie le Pr Patrick Saulnier pour son bon accueil au sein de son unité de recherche pour mon stage de master 2.

Je tiens à remercier vivement le Dr Guillaume Lefebvre, le Dr Marie Bonnin et le Pr Brice Calvignac pour m'avoir intégrée dans leur équipe. Je les remercie pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur implication et la présence dont ils ont fait preuve malgré des conditions de stage exceptionnelles.

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes croisées au laboratoire MINT pour leur accueil chaleureux. Je remercie Nolwenn Lautram pour son aide dans notre projet et son dynamisme. Je remercie également Jaspe, garante de la bonne intégration des étudiants partageant le bureau du 2^{ème} étage, pour les petites attentions qu'elle a eues pour chacun de nous et pour les nombreuses pâtisseries apportées.

Je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser au cours des différents stages en laboratoire de recherche durant mon cursus en pharmacie. A commencer par les équipes du CERMN où j'ai eu le plaisir d'effectuer plusieurs stages. Plus particulièrement au Pr Dallemagne, directeur du laboratoire et au Pr Rochais pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer leur équipe de recherche, ainsi qu'au Pr Aurélie Malzert-Fréon et au Dr Anne-Claire Groo pour la confiance qu'elles m'ont accordée, leur soutien à différentes étapes de mon cursus et leurs très nombreux conseils. Je remercie également Songuigama Coulibaly, Thomas Adnet et Line Seguy pour m'avoir initiée à la chimie thérapeutique et à la galénique, pour leur gentillesse, leur patience et leurs précieux conseils.

Je remercie également les équipes du laboratoire Bioticla et plus particulièrement Laurent Poulain, Dr Marie Villedieu, Dr Monique N'Diaye et Romane Florent.

A toutes les personnes non citées mais croisées dans les laboratoires, pour leur accueil toujours chaleureux et leur bonne humeur. Ces stages ont conforté mon choix d'orientation professionnelle et vos nombreux conseils m'ont permis d'être là où je suis aujourd'hui.

Enfin, je souhaite remercier le Pr Anne-Sophie Voisin Chiret, le Dr Guillaume Lefebvre et le Dr Anne-Claire Groo de me faire l'honneur de participer à ce jury et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Sommaire

Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Nanomédicaments : généralités	2
III.	La voie orale.....	6
	1) Avantages et inconvénients de la voie orale	6
	2) Composition et barrières du tractus gastro-intestinal	7
	3) Intérêt des nanomédecines pour une administration orale	9
	4) Les milieux biomimétiques	12
IV.	Les nanoémulsions et les nanocapsules lipidiques	18
	1) Les nanoémulsions : généralités.....	18
	2) Méthodes de formulation	20
	3) Les nanocapsules lipidiques (NCLs).....	22
V.	Procédés basse énergie : les inversions de phase	23
	1) Inversions de phase.....	23
	2) Généralités sur les microémulsions	29
	3) Inversion de phase en température (PIT).....	31
	4) Inversion de phase en composition (PIC).....	33
	5) Approche Sub-PIT et Sup-PIC	34
VI.	Méthodes de caractérisation	39
	1) Diffusion dynamique de la lumière	40
	2) Cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM)	41
	3) Diffusion des rayons X aux petits angles	42
	4) Fractionnement d'écoulement de champ	43
	5) Conductimétrie	43
	6) Tensiométrie.....	46
	7) Rhéologie	47
VII.	Le bêta-carotène	50
VIII.	Matériels et méthodes	56
	1) Matériels.....	56
	2) Mesure de solubilité du β -carotène dans le Labrafac [®] par dosage spectroscopique ..	56
	3) Mesure de fluorescence du β -carotène.....	57
	4) Formulation des nanocapsules lipidiques	58
	5) Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	60
	6) Tensiométrie.....	60
	7) Rhéologie	62

8) Conductimétrie	63
9) Préparation du milieu simulé FeSSIF	63
10) Séparation des NCLs du milieu FeSSIF	64
IX. Résultat.....	65
1) Mesure de solubilité du β -carotène dans le Labrafac [®] par dosage spectroscopique ..	65
2) Mesure de fluorescence.....	67
3) Formulation de nanocapsules lipidiques	68
4) Tensiométrie	69
5) Rhéologie	72
6) Conductimétrie	75
7) Séparation des NCLs du milieu FeSSIF.....	76
X. Discussion.....	79
XI. Conclusion	87
Bibliographie	88
Table des Annexes.....	97

Liste des abréviations

A4F : fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique

ADME : absorption, distribution, métabolisme, élimination

AP-1 : activateur protéine 1

ARNm : acide ribonucléique messager

ATBC : alpha-tocopherol bêta-carotène cancer prevention study

BCS : système de classification biopharmaceutique

CaCl₂ : chlorure de calcium

CARET : bêta-carotène and retinol efficacy trial

CMC : concentration micellaire critique

CPS : coups par seconde

Cryo-TEM : cryo-microscopie électronique à transmission

Da : dalton

Dil : 1,1' - dioctadecyl - 3, 3, 3',3' - tetramethylindocarbocyanine perchlorate

DLS : diffusion dynamique de la lumière

E/H : eau dans huile

E/H/E : eau dans huile dans eau

FaHIF : fasted human intestinal fluid

FaSSGF : fasted state simulated gastric fluid

FaSSIF : fasted state simulated intestinal fluid

FeSSGF : fed state simulated gastric fluid

FeSSIF : fed state simulated intestinal fluid

g/mol : gramme par mole

GRAS : generally recognized as safe

H/E : huile dans eau

H/E/H : huile dans eau dans huile

HCl : acide chlorhydrique

HLB : balance hydrophile/lipophile

HLD : déviation hydrophile/lipophile

Hz : Hertz

IC_{95%} : intervalle de confiance à 95%

kHz : kilohertz

MALLS : diffusion de la lumière laser à angle multiple

mbar : millibar

ME : microémulsion

mg_{βC}/g_L : milligramme de β-carotène par gramme de Labrafac®

mg/L = milligramme par litre

mM : millimolaire

mN/m : millinewton par mètre

mOsm/kg : milliosmole par kg

MPa : mégapascal

mS/cm : millisiemens par centimètre

NaCl : chlorure de sodium

NE : nanoémulsion

NHI : national health institute (USA)

nm : nanomètre
OR : Odds ratio
Pa : Pascal
Pa*s : Pascal seconde
PDI : indice de polydispersité
PEG : polyéthylène glycol
pH : potentiel hydrogène
PIC : inversion de phase en composition
PIT : inversion de phase en température
POE : poly(oxyde d'éthylène)
R² : coefficient de corrélation
RAR β : récepteur de l'acide rétinoïque β
rpm : rotation par minute
RR : risque relatif
SAXS : diffusion de rayons X aux petits angles
SGF : simulated gastric fluid
SIF : simulated intestinal fluid
SOR : ratio tensioactif – huile
SOWR : ratio tensioactif – huile - eau
SpKR : ratio Span[®] – Kolliphor[®]
Tcd : cold dilution temperature
U/mL : unité par millilitre
ZIP : zone d'inversion de phase
 β C : bêta-carotène
 λ max : longueur d'onde maximale
 μ g/g : microgramme par gramme
 μ g β C/g_L : microgramme de β -carotène par gramme de Labrafac[®]
 μ m : micromètre
 μ N/m : micronewton par mètre
 μ S/cm : microsiemens par centimètre

Listes des Figures et des Tableaux

Figure 1: Classification BCS.....	11
Figure 2: Différents types d'émulsion.(13)	19
Figure 3: Structure et composition de nanocapsule lipidique.(61).....	23
Figure 4: Formation de nanoémulsion par la méthode PIT. Adaptée de Solans <i>et al.</i> (69).....	25
Figure 5: Formation de nanoémulsion par la méthode PIC.(69).....	25
Figure 6: Diagramme de formulation.(70)	26
Figure 7: Classification de Winsor. Adapté de Dhoot <i>et al.</i> (77)	31
Figure 8: Procédé d'inversion de phase en température. (Figure issue d'un rapport interne) (61).....	32
Figure 9: Etats d'un système huile/eau/tensioactifs en procédé sub-PIT.(68)	36
Figure 10: Etats d'un système huile/eau/tensioactifs en procédé sup-PIC.(68).....	38
Figure 11: Procédé d'inversion de phase en composition selon K. Roger. (Figure issue d'un rapport interne).....	39
Figure 12: Mesure de conductivité en fonction de la température.(62).....	44
Figure 13: Mesure de conductivité en fonction de la température et à différente concentration en NaCl. (62).....	45
Figure 14: Mesure de conductivité en fonction de la température, à différentes concentrations en tensioactif.(48).....	45
Figure 15: Mesure de conductivité selon la fraction volumique d'eau. La courbe correspond au modèle de Bruggeman.(80)	46
Figure 16: Évolution de la tension interfaciale en fonction de la HLD.(94)	47
Figure 17: Viscosité et taille de gouttelettes en fonction de la HLD.(76)	48
Figure 18: Mesures de viscosité et de conductivité en fonction de la température.(76)	48
Figure 19: Mesures de viscosité et de conductivité en fonction de la fraction volumique d'eau.(98)	49
Figure 20: Mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique d'eau dans des émulsions formées à partir de 3 huiles A, B et C.(95).....	50
Figure 21: Structure du bêta-carotène	51
Figure 22: Fonctionnement du fluorimètre	58
Figure 23: Spectre des solutions de β -carotène + Labrafac [®] . A: Spectre des points de gamme [β C] = 2 à 7 μ g β C/g _L . B: Spectre des solutions de β -carotène à 10 et 60 mg β C/g _L diluées au 1/10 000ème.	65
Figure 24: Courbe d'étalonnage d'une solution de β -carotène + Labrafac [®] , 460 nm (moyenne des 3 mesures de l'appareil, écart-type confondus avec les points)	66
Figure 25: Solution de β -carotène + EtOH 0,5 mg/L. A: Spectre d'émission; B: Spectre d'excitation.	67
Figure 26: Structure des NCLs chargées en β -carotène	68
Figure 27: Graphiques représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor [®] et l'air. A : moyenne et écart-type sur 5 mesures (sans temps d'attente) ; B : moyenne et écart-type sur 20 mesures (en cinétique)	70
Figure 28: Graphiques représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor [®] et du Labrafac [®] en goutte pendante. A: moyenne et écart-type sur 5 mesures (sans temps d'attente) ; B: moyenne et écart-type sur 20 mesures (en cinétique)	71
Figure 29: Graphique représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor [®] et du Labrafac [®] en goutte montante. Moyenne et écart-type sur 5 mesures (temps attente d'environ 5 minutes)	71
Figure 30: Mesure de tension interfaciale d'une solution PIT 50 dans du Labrafac [®] . Moyenne et écart-type sur 5 mesures (sauf mesure à 70°C). Mesure en cinétique, 30 minutes	72

Figure 31: Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement constante (50 s^{-1}). Moyenne et écart-type de 10 mesures.....	73
Figure 32: Mesures en oscillation	75
Figure 33: Mesures de conductivité à différentes fractions d'eau.....	75
Figure 34: Evolution du PDI en fonction du SOR et du SpKR (moyenne et écart-types sur 3 mesures).(65).....	81
Figure 35: Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement proche de 0 et mesures de conductivité.	84
Tableau 1: Composition des milieux gastriques (25),(28),(40),(41),(42)	14
Tableau 2: Composition des milieux intestinaux (25),(28),(42),(43)	14
Tableau 3: Valeurs des ratios SOR et SpKR	58
Tableau 4: Composition des NCLs en protocole PIT.	59
Tableau 5: Composition des NCLs en protocole PIC.....	60
Tableau 6: Absorbance des solutions de β -carotène à 10 et 60 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ (moyenne des 3 mesures de l'appareil \pm écart-type).....	66
Tableau 7: Caractéristiques granulométriques des NCLs blanches 50 nm en procédé PIC et PIT (moyenne \pm écart-type sur 3 mesures de l'appareil).....	69
Tableau 8: Caractéristiques granulométriques des NCLs blanches 100 nm en procédé PIC et PIT (moyenne \pm écart-type sur 3 mesures de l'appareil).....	69
Tableau 9: Caractéristiques granulométriques du milieu FeSSIF avant ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	76
Tableau 10: Caractéristiques granulométriques du milieu FeSSIF après ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	77
Tableau 11: Caractéristiques granulométriques de la suspension B avant ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	77
Tableau 12: Caractéristiques granulométriques de la suspension B après ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	77
Tableau 13: Caractéristiques granulométriques de la suspension A avant ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	78
Tableau 14: Caractéristiques granulométriques de la suspension A après ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).	78

I. Introduction

Cette thèse porte sur les nanomédecines ainsi que l'administration par voie orale, et d'une manière plus spécifique sur la formulation de nanocapsules lipidiques en procédé basse énergie. La première partie de cette thèse (chapitres II à VII) consistera en une revue bibliographique avec notamment une revue des différentes nanomédecines disponibles sur le marché à l'heure actuelle. Nous nous intéresserons ensuite à la voie orale et aux milieux biomimétiques.

Dans un troisième temps, nous nous focaliserons sur les nanocapsules lipidiques, leur structure et les différentes méthodes de formulation, avant d'étudier plus en détails les procédés basse énergie. Une partie sera, de ce fait, dédiée à la compréhension des procédés d'inversion de phase en température et en composition.

Puis nous passerons en revue différentes méthodes de caractérisation des procédés d'inversion de phase en composition et en température, avec notamment des techniques utilisées dans la partie expérimentale comme la diffusion dynamique de la lumière, la conductimétrie, la tensiométrie et la rhéologie ; mais aussi des techniques évoquées dans la littérature (cryo-microscopie électronique à transmission, diffusion des rayons X aux petits angles ou fractionnement d'écoulement de champ).

Enfin, nous évoquerons le β -carotène, molécule modèle dans le cadre du projet de recherche qui fait l'objet de cette thèse.

Dans une seconde partie (chapitre VIII à X), nous aborderons une partie expérimentale avec la formulation de nanocapsules lipidiques par deux procédés basse énergie et des essais préliminaires à l'encapsulation de la molécule modèle (β -carotène).

Nous évoquerons également les méthodes de caractérisation de ces procédés basse énergie dans le but d'en comprendre les mécanismes.

Enfin, nous réaliserons une étude préalable à l'évaluation de la stabilité des nanocapsules lipidiques dans des milieux biomimétiques.

II. Nanomédicaments : généralités

Les nanotechnologies sont définies aux Etats-Unis comme suit : « un matériau ou produit final conçu pour avoir au moins une dimension externe, une structure interne ou une surface dans la plage nanométrique (1 à 100 nm environ) ; ou un matériau ou produit final conçu pour présenter des propriétés ou des phénomènes, y compris des propriétés physiques, chimiques ou des effets biologiques, attribuables à sa (ses) dimension(s) même si cette (ces) dimension(s) sont en dehors de la plage nanométrique, jusqu'à 1 μm (1 000 nm) ». (1), (2)

En France, un nanomatériau est défini de la manière suivante : « un matériau naturel, fortuit ou manufacturé contenant des particules à l'état non lié ou sous forme d'agrégat ou d'agglomérat et dans lequel, pour au moins 50% des particules de la distribution en taille, une ou plusieurs dimensions externes sont dans la gamme de taille 1 – 100 nm. Dans des cas spécifiques et lorsque cela est justifié par des préoccupations environnementales, pour la santé, la sécurité ou la compétitivité, le seuil de distribution en taille de 50% peut être remplacé par un seuil compris entre 1 et 50%. » (2), (3)

Les nanotechnologies trouvent des applications dans des domaines très divers comme le traitement de l'eau, l'industrie textile, les batteries haute performance, la biologie ou encore la médecine. (4) La nanomédecine est un domaine issu de l'association des nanotechnologies au monde médical. (5) Il s'agit donc de mettre à profit les nanotechnologies afin d'optimiser les caractéristiques des principes actifs et excipients composant les médicaments. (6) Les termes nanomédecine et nanomédicament peuvent être utilisés pour nommer des applications préventives ou curatives basées sur les nanotechnologies. L'institut national de la santé (NHI, USA), considère la nanomédecine comme un domaine de la nanotechnologie, impliquant une action médicale à l'échelle moléculaire dans le but de guérir une maladie ou de réparer des lésions tissulaires (os, muscles, nerfs). (2) La nanomédecine est un terme vaste, regroupant divers types de formulations. Celles-ci peuvent être séparées en 2 groupes : les nanocristaux de principes actifs et les nanovecteurs encapsulant un principe actif. (6) Le terme nanovecteur fait référence à un système de libération de dimension nanométrique, agissant sur la biodistribution ou l'absorption du principe actif selon les propriétés physicochimiques (taille des particules, structure de surface) du nanovecteur. Dans ce deuxième groupe, nous pouvons citer les dendrimères, les

nanoémulsions, les micelles, les liposomes, les nanoparticules lipidiques, polymériques(7), métalliques ou à base de protéines(4) et les virosomes(8).

L'encapsulation d'une molécule dans un nanovecteur permet sa protection envers un risque de dégradation. Si ces vecteurs ne font l'objet d'aucune modification de leur surface, alors ils sont qualifiés de vecteurs de 1^{ère} génération. Ces vecteurs seront facilement reconnus par les macrophages et s'accumuleront dans le foie. Ils trouvent donc leur principal intérêt dans un ciblage hépatique, ce qui restreint leur utilité pour nombre d'autres pathologies. Ainsi, des nanovecteurs de 2^{ème} génération ont été développés. Il s'agit là de modifier la surface du vecteur en y ajoutant des polymères hydrophiles, créant une répulsion stérique, qui empêchera leur reconnaissance par les opsonines et par conséquent la prise en charge des nanovecteurs par les macrophages. Ces nanovecteurs de deuxième génération peuvent également être qualifiés de furtifs de par leur circulation plus longue dans le compartiment sanguin. Ils ont donc la possibilité d'atteindre d'autres organes que le foie. Le polymère le plus utilisé dans ce but est le polyéthylène glycol (PEG), donnant le nom de « nanovecteur PEGylé ». Toutefois, si ces nanovecteurs de 2^{ème} génération peuvent permettre une accumulation dans certains organes, leur principale limite réside dans leur difficulté à entrer dans les cellules. C'est là l'objectif des nanovecteurs de 3^{ème} génération qui possèdent, quant à eux, des ligands spécifiques des récepteurs cellulaires à leur surface. Leur utilité première est le ciblage de cellules tumorales dans le but de libérer des principes actifs au sein même de ces cellules et d'agir sur des cibles intracellulaires. L'une des méthodes de fonctionnalisation consiste en l'utilisation, à nouveau, des molécules de PEG, mais cette fois-ci en tant qu'intermédiaire à la fixation de ligand sur la surface du nanovecteur.(9)

Les nouvelles propriétés du nanovecteur vont impacter les paramètres pharmacocinétiques à savoir l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination (aussi notés ADME).(10)

Ce sont ces paramètres qui déterminent la quantité de principe actif qui atteint le site d'action souhaité ainsi que le temps qu'il va passer dans l'organisme. Soit, en d'autres termes, le devenir du médicament. L'étape de distribution dépendra essentiellement de la capacité du principe actif à se lier aux protéines et à traverser les membranes. Enfin, le procédé de métabolisation aura pour but de rendre les molécules plus hydrosolubles afin de faciliter leur élimination, également qualifiée de clairance.

Cependant, la première étape est la plus limitante, car avant toute absorption, il est nécessaire que le principe actif soit sous forme solubilisée.(11)

Selon les règles de Lipinski prédisant une bonne absorption d'une molécule (moins de 5 groupes donneurs de liaisons hydrogène et 10 accepteurs, un poids moléculaire inférieur à 500 Da et un coefficient de partition inférieur à 5)(12), les molécules actives tendent à être insolubles dans l'eau. Le nombre de principes actifs n'aboutissant pas à un développement de médicament en raison d'un problème de solubilité serait même estimé à 40%.(13) Cela rend leur usage en clinique par des formulations classiques difficile. Les nanovecteurs agissent également sur les autres caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du principe actif, notamment en diminuant la dégradation et la clairance et permettent la modification des propriétés physicochimiques. Ils peuvent entraîner une augmentation de la demi-vie.

Le principal intérêt des nanomédicaments est dans le cas de molécules hautement toxiques et/ou faiblement solubles, comme, par exemple, l'amphotéricine B et le paclitaxel(5). Ils offrent toutefois divers autres avantages. En effet, ils peuvent entraîner une diminution de la dose et/ou de la fréquence d'administration. Ils améliorent l'efficacité clinique. Ils diminuent la toxicité systémique et réduisent donc les effets indésirables offrant ainsi une meilleure sécurité. Enfin ils peuvent permettre le ciblage à l'échelle tissulaire ou moléculaire comme évoqué avec les vecteurs de 2^{ème} et 3^{ème} génération.(4),(5),(7),(8)

Il est à noter que les nanovecteurs ont la possibilité d'être modifiés et donc de s'adapter aux besoins sans qu'il soit nécessaire de retravailler la formulation dans son intégralité. Il est alors possible de développer un autre médicament par simple changement du principe actif.(14)

Ces dernières années ont vu l'émergence de la médecine personnalisée, notamment grâce à des avancées dans les domaines de la génétique et de la protéomique.(4) Les possibilités offertes par les nanotechnologies ont été démontrées par la récente pandémie du COVID-19. C'est grâce aux nanotechnologies qu'un vaccin a pu être disponible sur le marché en un temps record. En effet, les industries Pfizer – BioNTech ainsi que Moderna – NIAID ont commercialisé des vaccins à base de nanoparticules lipidiques. Ces dernières ont permis l'encapsulation d'ARN messenger (ARNm) capable d'encoder une protéine et de favoriser la production d'anticorps par la cellule hôte. Ces vaccins sont ainsi les premiers vaccins dits de 3^{ème} génération à obtenir une autorisation de mise sur le marché.(15) Le nanovecteur remplit ici plusieurs rôles : il

sert au transport de l'ARNm et le protège de la dégradation enzymatique mais il peut également servir d'adjuvant.(16)

Actuellement, le marché pharmaceutique mondial compterait une cinquantaine de formulations en nanomédecine(5),(14) dont 3 ayant reçu une approbation récente (au cours des 3 dernières années) (Vyxeos®, Onpattro® et Hensify®). En 2020, le nombre de nanomédecines en essai clinique serait estimé à plus de 400, toutes phases confondues. Cependant, malgré un nombre d'études et de publications important, les nouveaux nanomédicaments arrivent lentement sur le marché avec un taux de réussite des nanomédecines en développement clinique estimé à 6%, ce qui est toutefois meilleur que le taux obtenu pour les anticancéreux (3,4%).(14) Parmi ces nanomédicaments, nous retrouvons, entre autres, des indications dans la prise en charge de cancers, la substitution en fer, l'anesthésie, les infections fongiques, la dégénérescence maculaire ou encore des maladies génétiques. Des agents d'imagerie sont également présents. En ce qui concerne les formulations, les plus représentées sont les liposomes et les nanocristaux, en plus des nanoparticules protéiques, métalliques ou des nanoémulsions.(14) Une liste des nanomédicaments actuellement disponibles sur le marché est établie dans le **Tableau-A 1** (en annexe). La première nanothérapie commercialisée fut la doxorubicine, un anticancéreux. Elle a reçu son autorisation de mise sur le marché en 1995, pour une formulation liposomale.(5) La majorité des nanomédicaments actuellement sur le marché sont administrés par voie parentérale.(8)

Un nanocristal désigne un principe actif sous forme cristalline ayant au moins une dimension inférieure à 100 nm.(2),(4) Les nanocristaux sont une classe particulière de médicaments, car ils sont composés uniquement d'un principe actif peu soluble dans l'eau, sans aucun excipient ni nanovecteur associés. Ils reposent sur le fait que l'augmentation de la surface accroît la vitesse de dissolution (Loi de Noyes et Whitney). En effet, si la solubilité de saturation dépend de la nature chimique du matériau, du milieu de dissolution et de la température, en dessous d'un seuil de 1 µm la taille de la particule doit également être prise en compte. Pour les particules inférieures à 1 µm, la solubilité augmente avec la diminution de la taille. Par conséquent, les nanocristaux ont une solubilité accrue, ce qui permet une plus grande absorption par diffusion passive(17), et une meilleure biodisponibilité.(4) Un exemple de nanocristaux est l'aprépitant, commercialisé sous le nom de Emend®, approuvé par la FDA en 2003 et

indiqué dans le traitement des nausées et vomissements des chimiothérapies. Cette forme orale présente une meilleure solubilité dans l'eau et donc une meilleure absorption dans le tractus gastro-intestinal d'où une meilleure biodisponibilité.(4)

Ce sont toutefois les formulations liposomales qui rencontrent le plus de succès. En effet, parmi les soumissions à la FDA (Food and Drug Administration, USA), les liposomes sont la catégorie majoritaire (35%).(6) Ils ont été développés dans le but de surmonter les effets indésirables de nombreuses molécules conventionnelles. C'est le cas de la doxorubicine (nom commercial Doxil®), approuvée par la FDA en 1995 et utilisée dans le traitement du cancer ovarien ou du sarcome de Kaposi. Dans cette formulation, la doxorubicine est encapsulée dans des liposomes unilamellaires, recouvert par du PEG.(4)

De nombreuses contraintes doivent être prises en compte au cours du développement des nanomédecines. En effet, il y a encore un manque de directives claires du point de vue du contrôle qualité, de la sécurité et de la réglementation. Il est également nécessaire de s'assurer de la bonne séparation des nanoparticules souhaitées des autres nano-objets potentiellement formés, tout comme de la reproductibilité entre les différents lots, en particulier la distribution en taille, la charge, la porosité, la masse des nanoparticules, et la possibilité d'un changement d'échelle de la formulation. Les nanomédecines ont des coûts de production élevés, entraînant une réticence des industries à investir. Les connaissances sur leurs interactions avec les cellules vivantes sont encore lacunaires. De plus, les nanoparticules souffrent d'une image négative dans les médias.(8)

III.La voie orale

1) Avantages et inconvénients de la voie orale

La voie orale est la voie d'administration privilégiée pour la plupart des médicaments, du fait de sa simplicité. Elle permet une meilleure observance, en particulier dans le cas des maladies chroniques, une auto-administration et une flexibilité du dosage (adaptabilité). Les coûts de production s'en trouvent réduits car les médicaments destinés à la voie orale ne nécessitent pas de conditions stériles.(18) C'est une voie

sans douleur, présentant peu de risque de réaction du système immunitaire. La prise est facile, et la molécule bénéficie d'une large distribution.(19) La majorité (84%) des 50 produits pharmaceutiques les plus vendus sur le marché européen et aux Etats-Unis sont administrés par voie orale.(20)

Beaucoup de molécules potentiellement actives, découvertes après étape de screening, ont une faible biodisponibilité rendant impossible leur administration par voie orale. Cela est due à leurs caractéristiques physico-chimiques (manque de stabilité, dégradation rapide due à l'acidité ou aux enzymes, faible solubilité), qui peuvent aussi être couplées à une faible perméabilité résultant à une mauvaise absorption.(21) S'ajoute à cela une importante variabilité sur les plans inter et intra individuels.

2) Composition et barrières du tractus gastro-intestinal

En cas d'administration par voie orale, le nanomédicament est d'abord en contact avec la muqueuse buccale, première possibilité d'absorption avec accès à la circulation sanguine. Puis il accède au tractus gastro-intestinal, avec premièrement l'estomac. Le milieu gastrique est agressif car ses sécrétions sont acides et contiennent des enzymes. Il arrivera ensuite dans l'intestin grêle, divisé en différentes parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon avant de terminer dans le colon.(22) L'épithélium intestinal est destiné à l'absorption. Il est d'ailleurs composé de villosités, qui accroissent sa surface d'absorption jusqu'à 300-400 m².(23)

Ce tractus se compose de différents types cellulaires. Le majoritaire est l'entérocyte, présentant des villosités dont le but est d'accroître la surface d'échange. Il existe également les cellules de Paneth, les cellules caliciformes responsables de la sécrétion de mucus, représentant 10 à 20% des cellules du tractus gastro-intestinal ainsi que les cellules M, très minoritaires (seulement 1%), formant les plaques de Peyer et donnant un accès facilité à la lymphe.(22),(23) Ces cellules sont liées par des jonctions serrées.(24)

La concentration en sels biliaires est bien plus faible dans l'estomac que dans l'intestin. L'osmolarité gastrique est d'environ 191 – 200 mOsm/kg et entre 200 et 300 mOsm/kg dans l'intestin. Parmi les principaux ions présents au niveau gastrique, nous retrouvons le sodium (70 mM) et le potassium (15 mM) représentant les cations

(chargés positivement) ; ainsi que le chlore (100 mM) en tant qu'anion (chargé négativement).(25)

Une fois dans le tractus gastro-intestinal, les principes actifs vont être confrontés à de nombreuses barrières, notamment le pH qui, à jeun, est compris entre 1,5 et 1,9 dans l'estomac. Il subit de nombreuses variations en fonction de la localisation : le pH est de 1,5 à 4 dans l'estomac ; de 5,5 dans le duodénum, de 6 dans le jéjunum, entre 7,2 et 8 dans l'iléon et enfin de 6,5 dans le colon.(26)

Il est à noter également la présence d'enzymes digestives comme la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ou encore la lipase gastrique ; mais aussi de sels biliaires jouant le rôle de tensioactif et permettant l'absorption des acides gras et du cholestérol. Ces éléments vont interagir avec les nanoparticules et peuvent aboutir à une déstabilisation voire à une dégradation de la charge des nanoparticules.(26)

De plus, toutes les cellules sont recouvertes de mucus, sécrétés par les cellules caliciformes. Il est sécrété en continu afin de protéger l'épithélium des pathogènes et des particules étrangères en les capturant et les éliminant. Il s'agit d'un hydrogel, composé de protéines, en particulier de la mucine, de carbohydrates, de lipides, de sels, d'anticorps, de bactéries et de débris cellulaires.(23) Il est composé de 2 couches, l'une fortement adhérente et la seconde plus fluide. Tout comme le pH, l'épaisseur du mucus varie tout au long du tractus gastro-intestinal.(24) Ainsi, l'épaisseur du mucus est de $274 \pm 41 \mu\text{m}$ dans l'estomac, de $170 \pm 38 \mu\text{m}$ dans le duodénum, de $123 \pm 4 \mu\text{m}$ dans le jéjunum, de $480 \pm 47 \mu\text{m}$ dans l'iléon et de $830 \pm 110 \mu\text{m}$ dans le colon.(26) Ce mucus peut être responsable d'un blocage des molécules actives qui sont alors dans l'impossibilité de traverser la couche de cellules épithéliales. En effet, le mucus contient des pores de 200 à 400 nm de diamètre environ pouvant empêcher la diffusion des nanoparticules. Ce mucus contient également des acides aminés comme la thréonine, la proline et la sérine, responsables de la charge négative de l'épithélium du tractus gastro-intestinal. Ainsi, la diffusion des molécules et / ou nanoparticules est dépendante de leur charge. Les molécules et / ou nanoparticules neutres diffuseront à travers le mucus plus facilement que celles positivement chargées, qui seront retenues par des interactions électrostatiques.(27) Toutefois le mucus est plus fin au niveau des plaques de Peyer, composé des cellules M, les rendant plus accessibles.(24)

S'ajoute à toutes ces barrières un effet de premier passage hépatique à la suite d'une administration orale, pouvant être responsable d'une dégradation précoce du principe actif.(21)

Les formulations destinées à la voie orale vont devoir faire face à plusieurs barrières : une barrière chimique (dégradation chimique et enzymatique dans la lumière intestinale), une barrière physique (mucoadhésion, faible diffusion ou une complexation), une barrière biologique (un faible transport passif à travers l'épithélium, l'absence de transport actif, des pompes d'efflux comme la Pgp ou encore la métabolisation par les cytochromes).(22) Il en résulte une faible stabilité de molécules dans le tractus gastro-intestinal, une faible solubilité ainsi qu'une faible biodisponibilité, accrue par la barrière muqueuse pouvant empêcher l'absorption.(23)

En ce qui concerne les produits faiblement solubles, de nombreux facteurs influencent leur solubilisation comme le pH, la capacité tampon, la force ionique et la présence de tensioactif ou de l'alimentation. A l'état à jeun, les composés faiblement solubles et non ionisables ont une solubilisation lente et donc incomplète dans l'estomac. Le temps de résidence gastrique est allongé à l'état nourri.(20) Ainsi, pour les composés hydrophobes, l'étape de solubilisation est souvent limitante du processus d'absorption de par leur faible solubilité aqueuse. La sécrétion de sels biliaires par le système gastro-intestinal est importante dans la solubilisation des aliments gras, notamment via la formation de micelles. C'est le même mécanisme, permettant la solubilisation des aliments, qui permet également la solubilisation des molécules médicamenteuses lipophiles et donc leur absorption.(28)

3) Intérêt des nanomédecines pour une administration orale

C'est dans le but de compenser ces limites que les nanoformulations sont développées. En effet, les nanoformulations ont des propriétés physicochimiques différentes des médicaments conventionnels, leurs conférant de nombreux avantages.(29) Premièrement, une encapsulation du principe actif le protège de la dégradation prématurée due d'une part à l'acidité du milieu gastro-intestinal et d'autre part à son activité enzymatique.(23) Si les principales limites à une administration orale d'un principe actif sont un défaut de solubilité ou de perméabilité, les nanoformulations, en présentant ce dernier sous forme finement dispersé, améliorent grandement sa cinétique de dissolution et favorisent son absorption par la muqueuse intestinale.(21)

De plus le principe actif peut ensuite être libéré de manière contrôlée aussi bien sur un plan spatial (par ciblage) que temporel (action prolongée).(23) En effet, les nanovecteurs permettent un transport efficace à travers les capillaires et l'endothélium lymphatique, une durée de circulation plus longue ainsi qu'une plus haute concentration. Ils sont également capables de se lier aux composés endogènes, comme les protéines. Ils peuvent entraîner une plus forte accumulation dans les tissus cibles, tout en réduisant le risque d'inflammation, de réponse immunitaire et le stress oxydatif dans les tissus. Les nanoformulations impactent positivement les propriétés pharmacocinétiques des principes actifs. Ils permettent également une meilleure biodisponibilité ainsi qu'une demi-vie plus longue, permettant une diminution de la fréquence d'administration et/ou de la dose. Ils offrent une meilleure biocompatibilité ainsi qu'une meilleure sécurité. Il en découle alors une diminution de la toxicité. Les nanovecteurs peuvent permettre un développement plus rapide de nouveaux médicaments, avec de larges gammes thérapeutiques.(29)

La classification BCS (Biopharmaceutics Classification Systems), créée en 1995, range les molécules dans 4 catégories selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité membranaire (**Figure 1**). Une molécule à la fois hautement perméable (dont la fraction absorbée est \geq à 90%) et hautement soluble appartient à la classe I, en revanche elle appartient à la classe II si elle n'est que faiblement soluble. Une molécule peu perméable (dont la fraction absorbée est inférieure à 90%) fait partie de la classe III si sa solubilité est élevée ou de la classe IV si cette dernière est faible.(30) Les nanoformulations pour une administration orale trouvent un intérêt essentiellement pour les principes actifs de classe II et IV de la classification BCS. Ces nanoformulations améliorent la solubilité apparente du principe actif, le protègent en cas de fragilité et augmentent l'internalisation dans les entérocytes.(22)

<p>Classe I</p> <p>Hautement soluble</p> <p>Hautement perméable</p>	<p>Classe II</p> <p>Faiblement soluble</p> <p>Hautement perméable</p>
<p>Classe III</p> <p>Hautement soluble</p> <p>Faiblement perméable</p>	<p>Classe IV</p> <p>Faiblement soluble</p> <p>Faiblement perméable</p>

Figure 1: Classification BCS

Comme les lipides sont fortement présents dans le tractus gastro-intestinal, les nanoformulations lipidiques présentent un intérêt pour l'administration orale, notamment en augmentant la solubilité et la biodisponibilité du principe actif encapsulé. Cependant, comparé à des systèmes polymériques, ils peuvent être moins stables.(23) Les formulations à base de lipides sont un atout car peu ou pas toxiques, compatibles avec les prérequis liés à un usage pharmaceutique, à savoir des matériaux biocompatibles, ne déclenchant pas de réaction toxique, immunogène ou inflammatoire, et devant être rapidement éliminés pour éviter toute accumulation.(21)

Nous pouvons illustrer ces avantages avec l'exemple du paclitaxel. Il s'agit d'un anticancéreux dont l'usage par voie orale est impossible en raison d'une biodisponibilité inférieure à 10%, causée par une très faible solubilité aqueuse (< 0,03 mg/mL) et d'une affinité pour les cytochromes P450 ainsi que pour la pompe d'efflux P-gp.(31) Cette molécule appartient donc à la classe IV de la classification BCS.(32) L'étude menée par Peltier *et al.*(31) permet de montrer qu'après administration orale de nanocapsules lipidiques (NCLs) chargées en paclitaxel, la concentration plasmatique maximale obtenue est de 368 ± 326 ng/mL contre 103 ± 82 ng/mL pour le paclitaxel administré seul. De plus, il est à noter que les concentrations plasmatiques en paclitaxel obtenues après une administration seule étaient inférieures à la concentration thérapeutique chez 4 des 6 animaux étudiés. En revanche, en cas d'encapsulation au sein de NCLs, la concentration plasmatique atteignait les valeurs thérapeutiques chez 7 des 8 animaux étudiés. Ces meilleurs résultats peuvent être attribués à l'inhibition de la pompe d'efflux P-gp, probablement due à la présence de Kolliphor® HS 15 dans la formulation des NCLs, excipients connus pour être un inhibiteur de cette pompe d'efflux.(33) De plus, la formulation lipidique peut être à

l'origine d'une dissolution facilitée, ainsi que d'une favorisation du transport par voie lymphatique.(31) L'encapsulation de paclitaxel dans des NCLs permet également une amélioration de sa diffusion à travers le mucus.(32)

Etant donné l'impact de la formulation sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des molécules, il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination des nanoformulations. La distribution subit d'importantes variations entre la forme libre et nanoencapsulée d'une même molécule.(34) Une fois administré, il existe différentes possibilités pour le nanovecteur : il peut être absorbé et rejoindre intact la circulation systémique ; il peut fusionner avec la paroi du tractus gastro-intestinal et permettre l'absorption de son contenu uniquement ; ou il peut libérer son contenu directement dans le tractus gastro-intestinal.(35) Le mécanisme d'absorption dépend de plusieurs paramètres comme la solubilisation, la perméabilité passive, l'activité des enzymes métaboliques et l'affinité pour les transporteurs.(34) Si le nanovecteur n'est pas absorbé dans l'estomac, alors celui-ci rejoindra l'intestin où, là encore, soit le principe actif sera relargué pour permettre une absorption intestinale, soit le nanovecteur sera absorbé avec sa charge. En cas d'absorption, le nanovecteur traversera la lamina propria avant de traverser les cellules endothéliales lui permettant de gagner la circulation sanguine. Là encore, le principe actif peut être libéré dans la circulation ou bien le nanovecteur rejoindra des cellules cibles ou il libèrera sa charge.(24)

4) Les milieux biomimétiques

Pour la continuité du développement des nanomédecines, il est nécessaire de s'assurer de leur stabilité. Pour cela, des milieux biomimétiques sont utilisés, avec pour objectif de reproduire les conditions que le nanomédicament rencontrera lors de son administration.(22) Ces études de stabilité consistent en la mise en contact de la nanoformulation avec des milieux reproduisant le plus fidèlement possible la physiologie des états à jeun et nourri. Ainsi, pour affirmer d'une bonne stabilité, la taille moyenne ainsi que l'indice de polydispersité ne doivent pas évoluer de manière significative sur des cinétiques pouvant aller jusqu'à 6 heures. L'analyse de la taille et de l'indice de polydispersité peut se faire par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*). Il est également nécessaire de vérifier la charge en principe actif qui doit rester de l'ordre de 90% de la charge initiale.(22) La principale

difficulté de ces analyses réside dans le fait que les milieux biomimétiques utilisés contiennent des nano-objets de types micelles. Les micelles sont le produit de l'auto-assemblage de molécules amphiphiles en des agrégats sphériques pour former une dispersion colloïdale.(36) Il est nécessaire d'être capable de différencier les NCLs des autres nano-objets présents afin d'en assurer le suivi. C'est pourquoi les parties suivantes consistent en une analyse bibliographique de la composition des milieux choisis ainsi qu'à leur caractérisation.

Il existe plusieurs catégories de milieux biomimétiques : le niveau 0 tient compte uniquement du pH ; le niveau 1 considère la capacité tampon et distingue les états à jeun et nourri ; le niveau 2 prend également en compte les composants biliaries et lipidiques et certains produits de digestion ; enfin, le niveau 3 prend en compte la présence de protéines et d'enzymes ainsi que la viscosité.(37),(38) Les niveaux 0 et 1 sont surtout utiles pour les produits hydrophiles, avec une forte solubilité et essentiellement pour des essais de dissolution. Cela s'explique par le fait que les sels biliaries n'ont qu'un faible impact sur la dissolution des composés hydrophiles. Les milieux de niveau 2 sont pertinents pour les composés faiblement solubles, et pour des modélisations de pharmacocinétique basées sur la physiologie. Ils sont utiles essentiellement pour les molécules lipophiles et pour les administrations en post-prandial. Les milieux de niveau 3 trouvent un intérêt dans les formulations à base de lipides pouvant subir une digestion même à l'état à jeun.(38)

Le choix du milieu est essentiel car il impacte la lipolyse. Les formulations lipidiques sont particulièrement sensibles aux sels biliaries et à la pancréatine (aux enzymes pancréatiques).(37)

A l'heure actuelle, il existe 4 milieux disposant d'une bonne représentativité des liquides gastriques et intestinaux : le milieu gastrique à jeun ou FaSSGF (fasted state simulated gastric fluid), le milieu gastrique nourri ou FeSSGF (fed state simulated gastric fluid), le milieu intestinal à jeun ou FaSSIF (fasted state simulated intestinal fluid) ainsi que le milieu intestinal nourri ou FeSSIF (fed state simulated intestinal fluid). Si ces milieux sont continuellement mis à jour en fonction des données physiologiques, ils restent toutefois simplifiés. En effet, ils ne comportent qu'un seul sel biliaire, le taurocholate de sodium, et de la lécithine représentant l'ensemble des phospholipides. Ces composants sont présents dans le FaSSIF et le FeSSIF à faible ou forte concentration respectivement pour un meilleur reflet des conditions à jeun ou

nourri.(39) Les compositions de ces milieux sont disponibles dans les **Tableaux 1 et 2**.

Tableau 1: Composition des milieux gastriques (25),(28),(40),(41),(42)

	Données in vivo gastrique		SGF _{SLS}	SGF _{Triton}	FaSSGF	FeSSGF
	A jeun	Nourri				
<i>Pepsine (mg/ml)</i>	0,8		3,2	3,2	0,1	
<i>Lauryl sulfate de sodium (% m/v)</i>			0,25			
<i>Triton X 100 (% m/v)</i>				0,1		
<i>NaTc (sels biliaires)</i>	≈ 80 μM	0,051 – 0,31 mM			80 μM	
<i>Lécithine (phospholipides) (μM)</i>		22			20	
<i>NaCl (mM)</i>	68 ± 29		34,2	34,2	34,2	237,02
<i>Acide acétique (mM)</i>						17,12
<i>Acétate de sodium (mM)</i>						29,75
<i>Lait / tampon</i>						1:1
<i>pH</i>	1,4 – 2,1	4,5 – 6,7	1,2	1,2	1,6	5
<i>Osmolalité (mOsmole/kg)</i>	191-200		180,5 ± 3,6	157,7 ± 2,9	120,7 ± 2,5	400 ± 10

Tableau 2: Composition des milieux intestinaux (25),(28),(42),(43)

	Données in vivo intestinales		SIF	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF-V2
	A jeun	Nourri					
<i>NaTc (mM)</i>	4,4	12,1		3	3	15	10
<i>Lécithine (mM)</i>	0,9	4,1		0,75	0,2	3,75	2
<i>Phosphate de sodium dibasique (mM)</i>				28,65			
<i>NaCl (mM)</i>				105,85	68,62	173,0	125,5
<i>Acide maléique (mM)</i>					19,12		55,02
<i>NaOH (mM)</i>			0,896 g/L	8,7	34,8	101	81,65
<i>Glycéryl monooléate (mM)</i>	0,14	2,8					5
<i>Sodium oléate (mM)</i>	0,64	6,7					0,8
<i>CaCl₂ (mM)</i>							5
<i>Pancréatine (UI/mL)</i>							100
<i>Acide acétique (mM)</i>						144	
<i>Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄)</i>			6,805 g/L				
<i>pH</i>	6,5	6,0	6,8	6,5	6,5	5,0	5,8
<i>Osmolalité (mOsmol/kg)</i>	200-300		114	270 ± 10	180 ± 10	635 ± 10	390 ± 10

a) Le FaSSGF

Le milieu le plus simple utilisé est le SGF (pour simulated gastric fluid). Il s'agit d'une solution chlorhydrique, dont le pH est de 1,2 (inférieure à la valeur physiologique). Il peut contenir de la pepsine à hauteur de 3,2 mg/mL. Par la suite, ce milieu a été amélioré par l'ajout de tensioactifs synthétiques, notamment du lauryl sulfate de sodium(44) ou du Triton-X(45). Cela a permis de réduire la tension interfaciale du milieu et de se rapprocher des valeurs physiologiques.(20)

Cependant, le SGF n'est pas assez représentatif des conditions physiologiques, par manque de certaines substances présentes en conditions physiologiques ou présentes à des concentrations non cohérentes comme la pepsine, impactant la dissolution, présente à 3,2 mg/mL dans le SGF et réduite à 0,1 mg/mL dans le FaSSGF. De plus, ils contiennent des tensioactifs artificiels, non physiologiques.(25) Ce milieu est donc considéré comme surévaluant la solubilisation du milieu gastrique.(40) Il y a donc un objectif de créer un milieu reflétant plus fidèlement la physiologie.

Le FaSSGF a été développé par Vertzoni *et al.*(25) en 2005, en se basant sur des données physiologiques. Il en résulte un milieu de pH 1,6 avec des concentrations physiologiques de pepsine, de sels biliaires et de lécithine.(20)

b) Le FeSSGF

Pour simuler l'état nourri de l'estomac, le lait est utilisé comme milieu de dissolution. La principale limite dans la simulation du milieu gastrique postprandial est son évolution tout au long du processus de digestion. L'une des solutions est d'ajouter périodiquement une solution acide de pepsine dans le lait. Il est également possible de développer plusieurs milieux, chacun correspondant à une période de la digestion, en l'occurrence tôt, intermédiaire et tardif. Il existe cependant un milieu, le FeSSGF, correspondant à l'étape intermédiaire, considéré comme le plus représentatif.(40) Le FeSSGF consiste en du lait avec un tampon blanc. Le pH est de 5,0, ajusté grâce à une solution de HCl 0,1N. Pour mimer plus précisément la digestion, il faut y ajouter, toutes les 15 minutes, une solution d'acide chlorhydrique contenant de la pepsine.(20)

c) Le FaSSIF

Le premier milieu mimant l'intestin est le SIF (simulated intestinal fluid) dont le pH est de 6,8. Néanmoins il ne convient pas aux études de corrélation *in vitro* / *in vivo* notamment par l'absence de distinction entre l'état nourri et l'état à jeun et par conséquent l'absence de prise en compte de l'effet de l'alimentation sur le mécanisme d'absorption.(20)

Le milieu FaSSIF, pour fasted state simulated intestinal fluid, est un milieu intestinal à jeun.(40) Son pH est de 6,5, il contient du taurocholate de sodium ainsi que des phospholipides. Par la suite, Jantratid *et al.*(40) ont mis à jour ce milieu en diminuant la lécithine de 0,75 mM à 0,2 mM et en remplaçant le tampon phosphate par un tampon maléate. L'osmolalité est également inférieure, en accord avec les données *in vivo*. C'est de cette manière qu'est apparu le FaSSIF-V2.(20),(40)

d) Le FeSSIF

Tout comme les fluides gastriques, les fluides intestinaux changent de composition au fil de la digestion. Le FeSSIF a un pH de 5. Si la quantité de taurocholate de sodium et de phospholipides est supérieure dans le FeSSIF comparée au FaSSIF, leur ratio est identique (4:1).(20) Le milieu FeSSIF peut contenir de la pancréatine, de manière facultative, en association avec du CaCl₂ (5 mM) afin de favoriser la lipolyse. Le processus de solubilisation est influencé par la présence de micelles mixtes et également par les produits de la lipolyse, à l'état nourri.(40) Le milieu FeSSIF contient des quantités de sels biliaires moindre qu'en *in vivo*. De plus il ne contient pas de produits de lipolyse, impliqués dans l'amélioration de la solubilité des molécules faiblement solubles.(40) Le milieu FeSSIF a été actualisé par Jantratid *et al.*(40) (FeSSIF-V2) avec notamment la présence de produits de lipolyse : le glyceryl monooléate et l'oléate de sodium, afin de complexifier le milieu et prendre en compte la digestion lipidique.(20),(39) Il est également possible d'ajouter de la lipase pancréatique afin de mimer la digestion lipidique.(40)

Les fluides intestinaux ont une plus grande capacité de solubilisation du fait de la présence de tensioactif endogène. En effet, les fluides intestinaux sont constitués en majeure partie d'eau mais également de sels biliaires, de phospholipides, de cholestérol qui font d'eux des solutions colloïdales, structures optimisant l'absorption. Il y a

plusieurs types d'agrégats formés par les sels biliaires : des structures colloïdales contenant uniquement des sels biliaires, des micelles mixtes avec des phospholipides ou encore leur intégration dans des vésicules. Ces différentes structures augmentent la solubilité des composés hydrophobes. Plusieurs auteurs se sont intéressés à la caractérisation de ces nano-objets.

Elvang *et al.*(28) se sont intéressés aux fluides intestinaux humains. Des analyses en diffusion de lumière laser à angle multiple (MALLS) ont montré la présence de 4 populations de nano-objets. Les populations les plus volumineuses sont de l'ordre de 50 et 200 nm. La plus petite fraction est, quant à elle, inférieure à 20 nm. Les analyses MALLS, couplées à des analyses par fractionnement d'écoulement de champ par écoulement asymétrique (A4F) sur le FaHIF (fasted human intestinal fluid) ont permis de repérer différentes conformations : des micelles de cholate, des micelles mixtes cholate et phospholipides et des vésicules de phospholipides.

En ce qui concerne le milieu FaSSIF, Elvang *et al.*(28) détectent des nanoparticules d'une taille entre 15 et 40 nm. Elles sont considérées comme étant probablement des micelles mixtes, c'est-à-dire composées de phospholipides et de taurocholate. Grâce à des analyses au microscope électronique, Clulow *et al.*(39) retrouvent également des micelles d'une quarantaine de nanomètres au sein du FaSSIF. Des analyses complémentaires en cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM) et en SAXS (diffusion de rayons X aux petits angles) ont permis de confirmer la nature lipidique de ces particules. Enfin, les analyses DLS de Nielsen *et al.*(46) montrent des micelles au sein du FaSSIF d'une taille de l'ordre de $57,2 \pm 2,2$ nm. À la suite d'une variation du pH de ce milieu, dans un intervalle de 5 à 6,5, il n'en résulte aucune modification significative des tailles des micelles, avec une mesure de $54,7 \pm 2,7$ nm pour le milieu FaSSIF. Ces résultats indiquent que la taille moyenne des particules n'est pas affectée par une variation du pH.

Enfin, dans le cas du milieu FeSSIF, les fractogrammes obtenus en A4F réalisés par Elvang *et al.*(28) montrent la présence de 2 pics correspondant à 2 populations de particules, l'une autour de 30 à 70 nm et l'autre vers 90-210 nm. Le premier pic représenterait des micelles mixtes alors que le deuxième serait soit des micelles mixtes d'une plus grande taille, soit des vésicules de phospholipides. Cependant, ce même milieu analysé en Cryo-TEM ne laissait supposer la présence que d'une seule population de particules au sein du FeSSIF, en l'occurrence des micelles. Le groupe

de particules plus larges, représentant les vésicules doit être présent en quantité significativement plus faible.

Les analyses DLS de Nielsen *et al.*(46) montrent que les micelles mixtes ont une taille de 5,8 nm (3 mesures) dans le milieu FeSSIF, soit près de 10 fois plus petites que dans le milieu FaSSIF. Cette différence de taille est liée à la concentration en monomère libre des sels biliaires, plus élevée dans le milieu FaSSIF. À la suite d'une variation du pH du milieu FeSSIF (entre 5 et 6,5), la taille des micelles est mesurée à $5,4 \pm 0,5$ nm. Tout comme pour le FaSSIF, la taille moyenne des particules est indépendante du pH et n'est liée qu'à la concentration en phospholipides et sels biliaires du milieu. Des analyses en SAXS sur le FeSSIF ont montré que des micelles sont formées ainsi que des agrégats plus larges, probablement des vésicules bicouches. Au sein du FeSSIF-V2, la lécithine ayant été remplacée par de l'oléate de glycéryl et de l'oléate de sodium, mimant la digestion des lipides. Cela aboutit au gonflement des micelles.(39)

IV. Les nanoémulsions et les nanocapsules lipidiques

1) Les nanoémulsions : généralités

Les émulsions sont des systèmes liquide/liquide composés d'au moins deux fluides non miscibles dont l'un, appelé la phase dispersée ou phase interne, est dispersé dans l'autre, qualifié de phase dispersante, continue ou externe. Plus précisément, Mc Clements *et al.*(47) définit une nanoémulsion (NE) huile dans eau comme « une dispersion colloïdale thermodynamiquement instable consistant en deux liquides immiscibles, avec un liquide dispersé en petites gouttelettes sphériques (rayon < 100 nm) dans l'autre liquide ». Les NEs sont d'aspect translucide.(48) Ce sont des systèmes instables. Toutefois, elles peuvent être stabilisées par des molécules dites amphiphiles, c'est-à-dire ayant à la fois une affinité pour l'eau et pour l'huile. Ces molécules vont pouvoir se placer aux interfaces entre les différentes phases dans le but de diminuer la tension interfaciale, et donc de réduire la quantité d'énergie à fournir pour la fragmentation de la phase dispersée.(13) C'est de ce rôle que provient leur nom de tensioactif.(49) Les tensioactifs auront aussi pour rôle de stabiliser les émulsions grâce à différents types de répulsions (électrostatiques ou stériques) entre les gouttelettes de phase dispersée.

Il convient de distinguer deux cas de figures, selon la nature de la phase dispersante : s'il s'agit de la phase aqueuse, alors nous parlerons d'émulsion directe ou émulsion huile dans eau, notée H/E(50). Dans le cas contraire, c'est une émulsion inverse ou émulsion eau dans huile, notée E/H.(49) Ces deux cas (E/H ou H/E) sont des émulsions dites simples, mais il existe également des émulsions dites multiples (par exemple H/E/H ou E/H/E), comme illustré dans la **Figure 2.**(13)

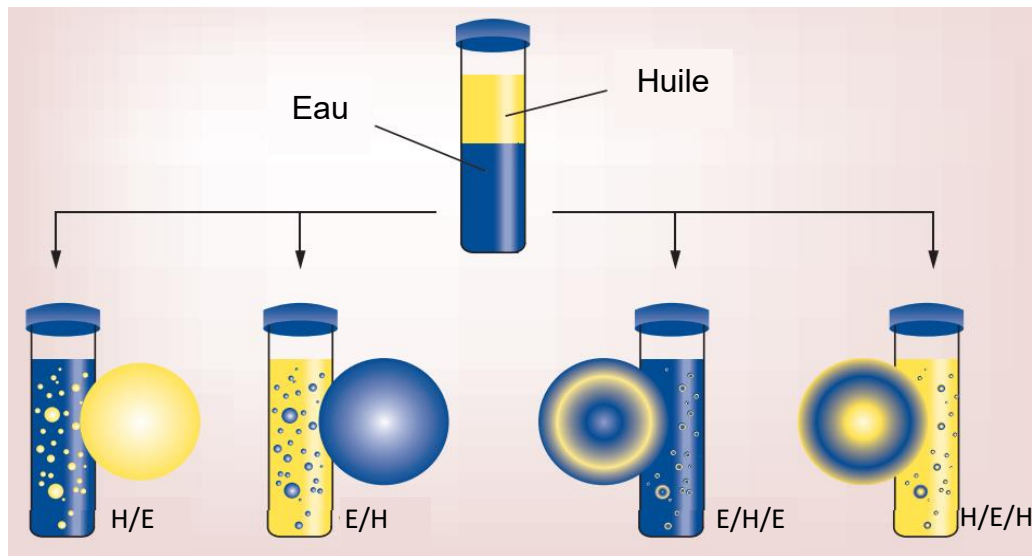


Figure 2: Différents types d'émulsion.(13)

Les NEs ne sont pas des systèmes considérés comme stables thermodynamiquement. Elles auront ainsi toujours tendance à évoluer dans le sens de la séparation des phases.(47) Elles peuvent cependant être considérées comme cinétiquement stables. En effet, il est possible de favoriser la stabilité de la NE par des barrières énergétiques qui ralentiront sa déstabilisation.(47) Bien qu'il n'y ait pas de seuil précisément défini pour séparer les NEs des macroémulsions, elles ont généralement une taille inférieure à 100 nm.(3),(13) Cette limite de taille permet de prévenir des phénomènes de floculation et de coalescence (définis par la suite). Ainsi, elles se déstabilisent suffisamment lentement pour être considérées comme cinétiquement stables (classiquement de l'ordre de plusieurs mois voire années) en suspension. Elles possèdent des avantages qui ont suscité l'intérêt de différentes industries, notamment alimentaire, biomédicale, ou encore cosmétique.(51)

Il existe plusieurs phénomènes d'instabilité des émulsions :(51)

- Le crémage : lorsque la densité des gouttelettes dispersées est inférieure à celle de la phase dispersante, la séparation de phase de l'émulsion aboutira au

crémage de la phase interne c'est-à-dire à sa migration au niveau supérieur de l'échantillon.(52)

- La sédimentation : à l'inverse du crémage, si la phase interne des gouttelettes est plus dense que la phase continue, alors la séparation de phase entrainera cette phase interne vers le bas de l'échantillon.(52) Une NE avec des gouttelettes de plus petites tailles auront une meilleure stabilité et donc une vitesse de séparation de phase plus lente.(13) La sédimentation et le crémage sont des phénomènes dits gravitationnels. Les NEs étant caractérisées par des gouttelettes de petites tailles, leur mouvement brownien dominera sur la force gravitationnelle. Ainsi, ces 2 phénomènes de déstabilisation ne sont pas prédominants pour ces formulations.(47)
- La coalescence : procédé dans lequel les gouttelettes entrent en collision, entraînant leur fusion. Ce procédé est évitable par la conservation d'une répulsion entre les gouttelettes.(13)
- La floculation : agrégation d'au moins deux gouttelettes en amas sous l'action de forces attractives.(13)
- Le mûrissement d'Ostwald : il s'agit de la diffusion du contenu des petites gouttelettes vers les plus grosses, via la phase continue. Ainsi, les plus grosses gouttelettes vont augmenter en taille, au détriment des plus petites.(53) C'est un phénomène régi par la pression de Laplace. La forte pression de Laplace au niveau des petites gouttelettes entraîne la diffusion de leur contenu vers les plus grosses gouttelettes possédant une plus faible pression.(13) Ce phénomène peut être favorisé par la présence de tensioactifs en excès. En effet, dans ce cas les tensioactifs adopteraient une conformation sous forme de micelles permettant le transport de la phase dispersée.(54) En revanche, il peut être limité par l'utilisation dans la formulation, d'une phase dispersée avec une très faible solubilité dans la phase dispersante(53), ainsi que par une distribution en taille étroite (échantillon monodisperse).

Parmi ces différents mécanismes, la principale source de déstabilisation des nanoémulsions est le mûrissement d'Ostwald.(54),(55)

2) Méthodes de formulation

Nous pouvons distinguer 2 catégories de procédés pour la formulation de NEs :

- Les méthodes d'émulsification haute énergie, qui nécessitent un homogénéiseur haute pression, un générateur d'ultrasons, ou encore, une agitation à fort cisaillement(52). Leur inconvénient principal, en plus d'être énergivore, est qu'elles peuvent entraîner la dégradation du principe actif.
 - L'homogénéiseur haute pression : consiste en l'action simultanée de forces de cisaillement, de phénomènes de turbulence et de cavitation. La formulation est pompée puis forcée à traverser une valve selon un écoulement rapide. Elle est soumise à de fortes pressions (50-250 MPa).(13),(56) L'écoulement et la viscosité du fluide ainsi que la pression au sein de l'homogénéiseur détermineront la taille des gouttelettes.(52)
 - Le générateur d'ultrasons : génère des ondes sonores à hautes fréquences (20-100 kHz)(13), libérant de l'énergie suite à la cavitation de bulles. Cependant, ce procédé peut conduire à la formation de radicaux à partir des molécules d'eau et dégrader les tensioactifs.(52)
 - L'agitation à fort cisaillement : action d'une force centrifuge visant à disperser l'émulsion.(52) Des appareillages de types rotor/stator sont utilisés comme l'Omni-mixerpsy® ou l'Ultraturaxpsy®.(57)
 - Le microfluidiseur : il s'agit d'une méthode proche de l'homogénéiseur haute pression. Ici, les fluides non miscibles sont mis en contact dans des microcanaux et sous haute pression. Ils vont s'impacter à haute vitesse, créant des phénomènes de cavitation, de contrainte d'impact et de déformation de cisaillement, aboutissant à une nano-émulsification.(52),(56)
 - La méthode des membranes : formation de gouttelettes plus petites à partir d'une émulsion grossière extrudée à travers une membrane aux pores très fins. Cette méthode peut aussi être appelée ultrafiltration. (52), (56)
- Les méthodes d'émulsification basse énergie, aussi qualifiées de physico-chimiques, et qui se basent sur les interactions intermoléculaires des excipients au lieu d'être dépendante de la géométrie d'un équipement. Elles ne nécessitent que très peu d'énergie. L'émulsification spontanée et les inversions de phase font partie de cette catégorie.(48) L'émulsification spontanée consiste en la formation d'une nanoémulsion par mélange d'une phase huileuse et d'une phase aqueuse. La phase huileuse contient généralement un tensioactif hydrophile et/ou solvant miscible dans l'eau. Le composant miscible dans l'eau

va diffuser de la phase huileuse vers la phase aqueuse au moment de la mise en contact. Cette méthode est largement utilisée dans la formulation de SEDDS (Self-Emulsifying Drug Delivery Systems) ou SNEDDS (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems).(58)

Les mécanismes d'inversion de phase seront détaillés ultérieurement.

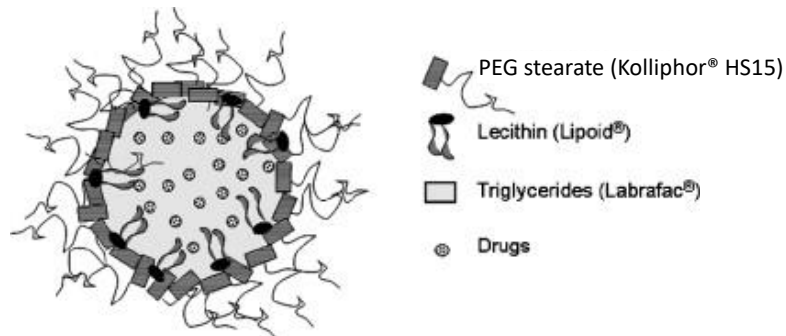
Aujourd'hui ces méthodes sont principalement mises en œuvre à l'aide de procédés dits « batchs ». Leur principal inconvénient est une maîtrise difficile de l'ensemble des conditions opératoires au moment de la formulation, pouvant amener un défaut de reproductibilité. Dans ce contexte, la microfluidique présente un grand intérêt car il s'agit d'un procédé continu. Par ailleurs la microfluidique présente un double avantage : une parfaite maîtrise des conditions de mélange/dispersion d'une part, (comparativement à un procédé « batch ») et par conséquent un meilleur contrôle des propriétés physico-chimiques (homogénéité en taille et donc réduction de la polydispersité, forme, propriété de surface et taux d'encapsulation). D'autre part, la production en continue facilite la transposition à l'échelle industrielle. Ces avantages sont d'importance pour des nanoformulations à usage pharmaceutique.(59)

Ces méthodes peuvent former 2 types de nano-objets : des nanoémulsions si l'interface est fluide ou des nanocapsules si celle-ci est rigide.(60) On parle alors de structure cœur-couronne. Dans la suite de cette thèse nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanocapsules lipidiques ainsi qu'aux procédés basse énergie d'inversion de phase.

3) Les nanocapsules lipidiques (NCLs)

Les NCLs sont des nanocapsules lipidiques. Elles possèdent un cœur huileux liquide et une coque de tensioactifs dynamiquement « bloquée ». Elles sont formulées selon un procédé d'inversion de phase.(60) Le cœur lipophile des NCLs formulées dans cette thèse contient du Labrafac® WL1349 (mélange de triglycérides à chaînes moyennes, acide caprique (C8) et caprylique (C10)). Elles comportent également deux tensioactifs non ioniques formant la coque : le Kolliphor® HS15 tout d'abord, tensioactif hydrophile issu du mélange d'hydroxystéarate de macrogol 15 (70%) et de PEG 660 libre (30%) ; ainsi que du Span® 80 (monooléate de sorbitane). Après formulation par inversion de phase en composition ou en température (procédés décrits dans le chapitre suivant), des NCLs dispersées en phase aqueuse composée d'eau ultra-pure

sont obtenues. Dans le cas de l'inversion de phase en température, cette eau est enrichie en NaCl afin de permettre l'ajustement de la zone d'inversion de phase (notée ZIP, détaillée ultérieurement).(60) Ces NCLs sont représentées en **Figure 3**.



Le diamètre moyen des NCLs obtenues varie entre 20 et 120 nm. Un lien est établi entre le diamètre moyen et la quantité de tensioactif utilisé(62), plus précisément le ratio tensioactif/huile, noté SOR pour surfactant-oil ratio en anglais.(63) Ces nanovecteurs sont destinés à encapsuler des principes actifs lipophiles dans leur cœur lipidique, ou éventuellement des principes actifs amphiphiles au sein de la coque de tensioactifs.

V. Procédés basse énergie : les inversions de phase

1) Inversions de phase

Comme précisé précédemment, il existe deux catégories de méthode de formulation des NCLs. Dans le cas des procédés haute énergie, les gouttelettes sont « cassées » en gouttelettes plus petites grâce à l'application d'une force de déformation. Cependant, plus la taille de gouttelettes souhaitée est petite, plus la surface de contact entre les phases sera grande et plus la quantité d'énergie à apporter au système sera importante, condition défavorable à la transposition à l'échelle industrielle.(64) De plus les méthodes haute énergie ne sont pas recommandées pour l'encapsulation de molécules fragiles telles que les peptides, les protéines, ou encore les acides nucléiques, souvent utilisées en médecine, car cela entraînerait la perte de leur activité.(52) Il est donc nécessaire de mettre au point d'autres modes de production. C'est dans ce contexte que les inversions de phase ont été étudiées.

Le terme inversion de phase est apparu en 1921, par Parson et Wilson.(49) Il en existe deux types, l'inversion de phase en température (notée PIT) et l'inversion de phase en composition (notée PIC). Selon la règle de Bancroft : « le sens d'une émulsion dépend de la solubilité du tensioactif. La phase continue est la phase dans laquelle le tensioactif est le plus soluble ».(60) Dans chacun des deux procédés PIT et PIC, l'inversion du sens de l'émulsion est provoquée par l'inversion de la courbure spontanée des tensioactifs.(65) Ce qui différencie ces deux procédés, c'est l'évènement qui mène à cette inversion de courbure.

Classiquement, les procédés de nanoémulsification par inversion de phase sont obtenus avec des tensioactifs non ioniques possédant un groupe poly(oxyde d'éthylène) POE aussi appelé polyéthylène glycol (PEG).(48) Dans les deux cas (PIT et PIC) l'inversion de la courbure spontanée de l'interface eau/huile est causée soit par la rupture, soit par l'apparition de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau de la phase aqueuse et le groupement POE du tensioactif (la tête hydrophile).(66) Selon le procédé choisi, la formation ou la rupture de ces liaisons hydrogène peut se faire soit par contrôle de la température (procédé PIT), soit par contrôle de la quantité d'eau dans le système (procédé PIC). Les tensioactifs oxyéthylénés sont solubles dans l'eau, cependant l'eau est un moins bon solvant à haute température. Un changement de température induit un changement de conformation préférée à l'équilibre de la tête hydrophile de ce type de tensioactif. De plus, le sel peut modifier drastiquement l'hydratation de la tête hydrophile.(67) Pour ce qui est de l'ajout d'eau, cela va permettre un gonflement de la partie hydrophile et un changement de la courbure.(68) Cette inversion passe par une structure de transition pour laquelle la courbure spontanée est nulle. Cette structure a un rôle crucial dans la formation des NEs/NCLs. Les **Figures 4 et 5** représentent l'évolution des courbures, respectivement pour les procédés PIT et PIC.

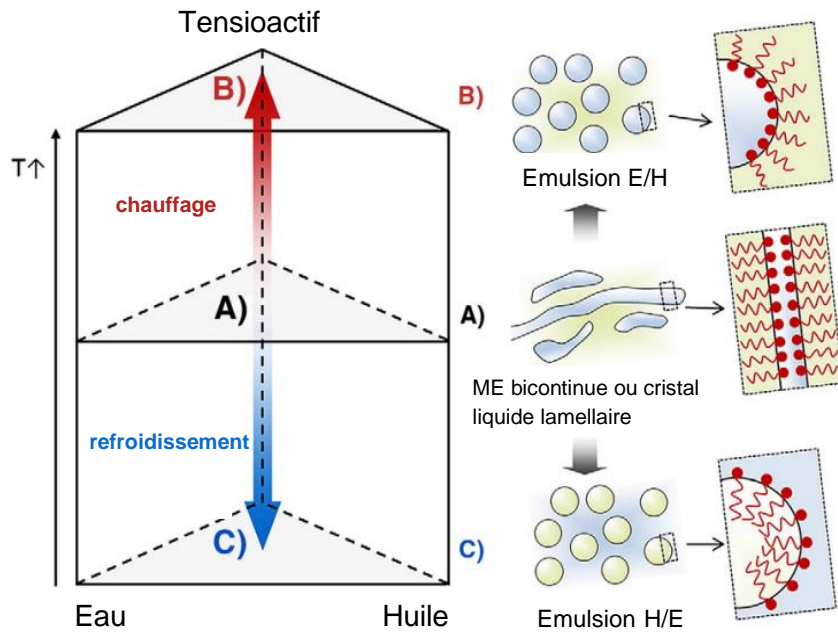


Figure 4: Formation de nanoémulsion par la méthode PIT. Adaptée de Solans et al.(69)

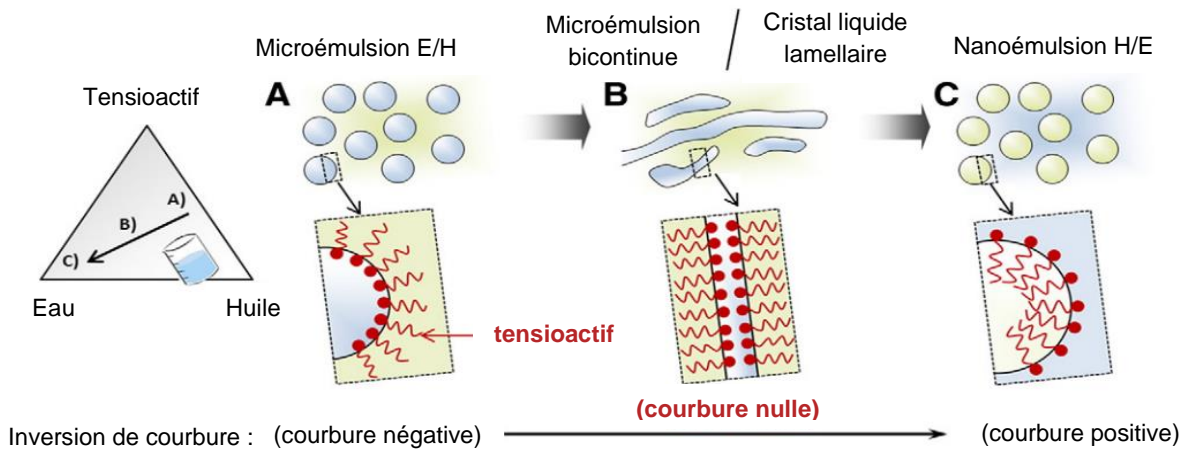


Figure 5: Formation de nanoémulsion par la méthode PIC.(69)

Une formulation contient plusieurs variables, en l'occurrence la température, la concentration en sel ou encore la quantité d'eau apportée au système. La variation de ces paramètres va entraîner une évolution du système et en particulier du sens de l'émulsion. Cette évolution peut être représentée dans une carte de formulation (comme illustré en **Figure 6**). Cette carte présente le rapport eau/huile en abscisse ainsi que la HLD (pour Hydrophilic Lipophilic Deviation en anglais), en ordonnée, concept tenant compte des variables de formulation, détaillée ultérieurement. La flèche verte représente l'inversion de phase en température (PIT) qualifiée de transitionnelle

et la flèche rouge représente l'inversion de phase en composition (PIC) qualifiée de catastrophique.(70)

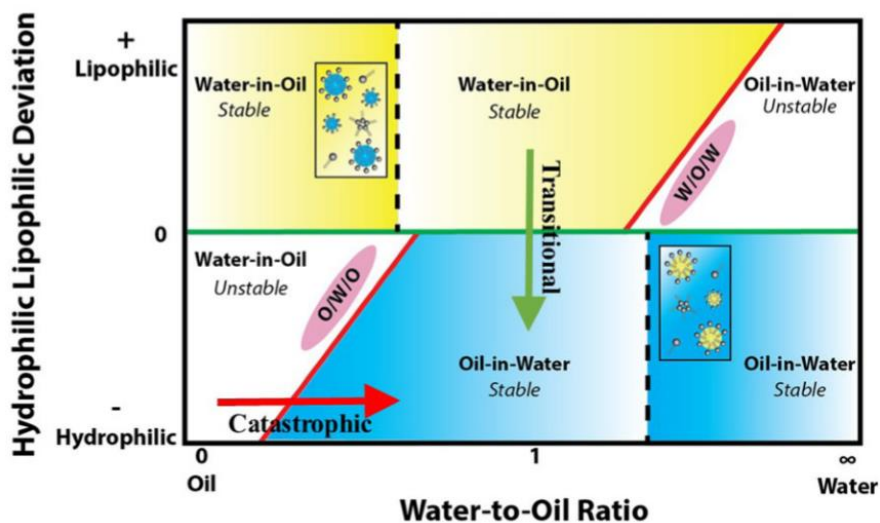


Figure 6: Diagramme de formulation.(70)

Pour ces deux procédés, le système passera par une structure intermédiaire de type microémulsion. La taille des gouttelettes obtenues dépend du ratio massique entre tensioactifs et huile car c'est la structure (bicontinue ou lamellaire) formée par les tensioactifs au point d'inversion qui détermine la distribution en taille.(64) Le principal avantage de cette méthode d'inversion de phase est qu'elle ne nécessite pas l'usage de solvant organique.(48) De plus, ces procédés ne requièrent aucun équipement particulier, limitant ainsi les coûts de production et de maintenance.(70) Nous reviendrons plus en détails sur ces deux procédés ultérieurement.

Les tensioactifs étant au cœur du mécanisme d'inversion de phase, de nombreux paramètres permettent de les caractériser, dont notamment la balance hydrophile lipophile (notée HLB) ou la déviation hydrophile lipophile (notée HLD) définies ci-après.

a) La balance hydrophile/lipophile (HLB)

La balance hydrophile/lipophile a été développée par Griffin en 1948.(71) Il l'a décrite comme une balance entre le groupe hydrophile et la partie lipophile du tensioactif, basée sur leur force et leur taille respective. Il utilisa comme référence l'acide oléique auquel il attribua la valeur de 1 et le sodium oléate d'une valeur de 20. Cependant ces références sont contestées.(71) La HLB peut être considérée comme un index reflétant l'affinité d'un tensioactif donné pour la phase aqueuse ou huileuse : les

tensioactifs hydrophiles auront une HLB > 10 alors que les tensioactifs lipophiles auront une HLB comprise entre 1 et 10. Ainsi, il existe une HLB idéale pour chaque émulsion, en fonction de sa composition et notamment de la nature de l'huile.(70) Il existe plusieurs formules de HLB, selon la structure chimique du tensioactif, parmi lesquelles :(71)

- Pour les éthers d'alkyle de polyoxyéthylène et les esters de polyoxyéthylène, la formule est la suivante :

$$HLB = \frac{E}{5}$$

- Pour les esters d'acide gras d'alcool polyhydrique, la formule est la suivante :

$$HLB = 20 \left(1 - \frac{S}{A}\right)$$

- Pour les tensioactifs contenant des chaînes de polyoxyéthylène et des alcools polyhydriques, la formule est la suivante :

$$HLB = \frac{E + P}{5}$$

Avec :

- E = pourcentage massique des groupements oxyde d'éthylène
- S = valeur de saponification de l'ester
- A = valeur de l'acide
- P = pourcentage massique des groupements alcools polyhydriques

Si la HLB a été développée dans le but de déterminer le tensioactif optimal à utiliser pour la formulation d'une émulsion, elle a quelques limites. Les équations ne prennent en compte que les groupements chimiques entrant dans la composition de la molécule tensioactive. Elle ne donne aucune notion de la quantité nécessaire, information pourtant essentielle pour formuler une émulsion stable. De plus, elle ne tient pas compte de l'environnement dans lequel le tensioactif évolue.(70) C'est pourquoi il y avait un intérêt à développer un autre indicateur qui prendrait en compte ces paramètres, en l'occurrence la HLD.

b) La déviation hydrophile/lipophile (HLD) :

La déviation hydrophile lipophile est un paramètre reflétant l'affinité d'un tensioactif pour les phases aqueuses ou huileuses.(72) C'est une valeur sans dimension.(70) Elle est utile dans la caractérisation d'un tensioactif au sein d'un environnement défini.(72)

Dans le cas d'un tensioactif non ionique, la formule est la suivante :(72),(73)

$$HLD = \alpha - EON + bS - KACN - \varphi A + c_T \Delta T,$$

avec :

- α = paramètre caractéristique du groupement lipophile du tensioactif
- EON = nombre de groupement oxyde d'éthylène par molécule de tensioactif non ionique
- b = constante caractéristique de l'électrolyte
- S = la salinité de la phase aqueuse en pourcentage massique de NaCl
- K = constante caractéristique du type de tensioactif
- ACN = nombre d'atomes de carbone dans la molécule d'alcane
- φA = est fonction du type d'alcool et de sa concentration
- c_T = est une constante propre au type de tensioactif
- ΔT = la différence de température avec la référence (25°C)

Contrairement à la HLB, la HLD ne prend pas en compte seulement les propriétés du tensioactif mais aussi différentes variables comme la salinité de la phase aqueuse, la nature de l'huile, la présence d'alcool et la température.(74) Par exemple, une augmentation de la température entraîne une augmentation de la HLD ce qui se traduit par une augmentation de la solubilité dans la phase huileuse. A l'inverse, une diminution de la température favorise une solubilité dans la phase aqueuse.(48)

Considérant que la phase d'affinité dominante est la phase continue alors, lorsque la HLD est < 0 , le tensioactif non ionique aura une affinité prédominante pour l'eau, ce qui aboutira à une émulsion H/E. A l'inverse, une HLD > 0 donnera naissance à une émulsion E/H, preuve d'une affinité préférentielle pour la phase huileuse. Pour une HLD = 0, le tensioactif a une affinité équivalente pour chacune des 2 phases.(48) C'est à cette valeur de HLD que l'inversion de phase a lieu.(49)

2) Généralités sur les microémulsions

Comme évoqué précédemment, lors d'une inversion de phase, l'interface eau-huile passe par une courbure nulle pour laquelle le système eau/huile/tensioactif forme des microémulsions. Avant de s'intéresser aux procédés PIT et PIC plus en détails, il est donc nécessaire de bien comprendre ce que sont les microémulsions (MEs). Les MEs sont des systèmes monophasiques composés d'eau, d'huile et de tensioactifs. Ils sont translucides. Dans ces systèmes, les tensioactifs permettent la coexistence d'une phase huileuse et d'une phase aqueuse sous forme de microdomaines, pas nécessairement sphériques.(73)

Les MEs peuvent parfois être confondues avec les NEs surtout lorsque ces dernières présentent une structure similaire de gouttelettes de phase dispersée de quelques dizaines de nanomètres dans une phase continue (nous parlerons alors de micelles gonflées), sachant que les MEs peuvent également se présenter sous d'autres formes (structure bicontinue, phase éponge etc.).(70) Le principal critère de différenciation est leur stabilité. En effet, les MEs sont thermodynamiquement stables, quand la stabilité des NEs n'est que sur le plan cinétique.(55) Cela s'explique par un niveau d'énergie libre plus élevé lorsque le système est sous forme de dispersion (NE) que lorsque les phases sont séparées, d'où l'instabilité thermodynamique de la NE. L'énergie libre de la ME est quant à elle inférieure à celle de la configuration en phase séparée, nous pouvons alors la qualifier de thermodynamiquement stable.(47) Pour poursuivre la distinction entre NE et ME, Mc Clements *et al.*(47) définit une ME H/E comme « une dispersion colloïdale thermodynamiquement stable consistant en de petites particules sphéroïdes, composées d'huile, de tensioactifs et potentiellement de co-tensioactifs, dispersées dans un milieu aqueux ». La stabilité thermodynamique signifie que la tension interfaciale du système est proche de zéro.(51) Cependant elles requièrent une plus grande quantité de tensioactifs ce qui peut être un inconvénient pour l'usage médical.(52)

Comme évoqué, les MEs peuvent adopter plusieurs conformations : sphéroïdes (micelles, micelles gonflées), cylindrique (micelles en bâtonnet), lamellaire, ou encore spongieuse (bicontinue).(47),(49) Si pour obtenir des NEs par inversion de phase, il est nécessaire de dissoudre préalablement les tensioactifs dans l'huile, pour les MEs, le simple mélange de tensioactifs, d'huile et d'eau, sans impact de l'ordre d'ajout, est suffisant.(70) Elles se forment donc spontanément, par obtention d'un équilibre

thermodynamique entre les excipients, sous l'impact des paramètres thermodynamiques que sont la température, la composition et la pression(55) et demeurent stables tant que les conditions initiales ayant permis leur formation sont inchangées. En pratique toutefois, il peut s'avérer nécessaire de chauffer ou agiter le mélange pour obtenir la ME.(47) Selon les conditions de formulation et la composition, la ME obtenue peut se présenter sous forme de particules lipidiques dispersées dans l'eau, avec une stabilité infinie, et dont les propriétés physicochimiques, dont fait partie la clarté optique, seront similaires aux NEs basse énergie. (55),(70)

Les NEs peuvent être préparées avec des concentrations en tensioactifs plus faibles que celles requises pour les MEs.(75) Les NEs et les MEs vont avoir des comportements différents dans certaines situations comme une dilution ou une variation de température. Seules les NEs seront stables face à ces changements, les MEs quant à elles seront déstabilisées. Dans le cas d'un usage médical, la formulation subira des changements thermodynamiques tels qu'une dilution dans la circulation sanguine, un changement de température ainsi que des variations de pH et d'osmolarité. Dans ces conditions, il convient alors d'utiliser les NEs.(55)

Classification de Winsor

Pour aller un peu plus loin, la classification de Winsor est une classification adaptée pour les MEs.(51) Elle se base sur les interactions moléculaires entre les molécules tensioactives et les molécules d'eau et d'huiles environnantes.(72). Une représentation schématique de ces systèmes est disponible en **Figure 7**. Elle différencie 4 situations :(51),(73),(76)

- Winsor 1 (W I) : une ME H/E contenant la majorité des tensioactifs, en équilibre avec une phase huileuse pauvre en tensioactifs, au-dessus. Se produit lorsque le tensioactif est essentiellement soluble en phase aqueuse. Ce système correspond à une HLD négative.

- Winsor 2 (W II) : une ME E/H contenant la majorité des tensioactifs, en équilibre avec une phase aqueuse pauvre en tensioactifs en-dessous. Se produit lorsque le tensioactif est essentiellement soluble en phase huileuse. Ce système correspond à une HLD positive.

- Winsor 3 (W III) : un système triphasique avec une phase correspondant à une ME riche en tensioactif, en équilibre avec 2 autres phases, l'une aqueuse, l'autre huileuse, appauvrie en tensioactif. Ce système correspond à une $HLD = 0$.
- Winsor 4 (W IV) : une ME seule, en l'occurrence une solution micellaire générée par une quantité suffisante de tensioactif.

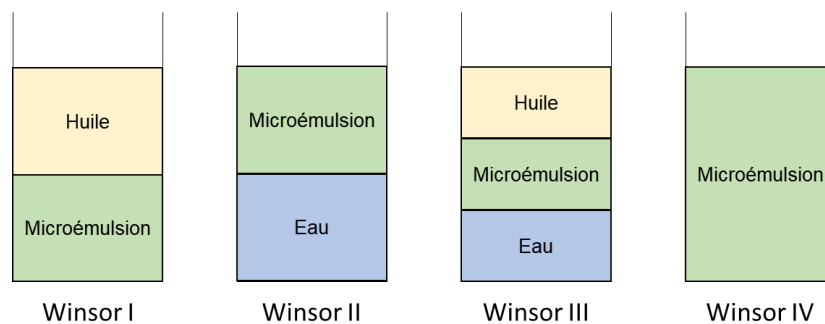


Figure 7: Classification de Winsor. Adapté de Dhoot et al.(77)

3) Inversion de phase en température (PIT)

L'inversion de phase en température (PIT pour phase inversion temperature en anglais) aussi nommée inversion de phase transitionnelle (voir **Figure 6**) est une des méthodes d'émulsification à basse énergie. Son mécanisme repose sur un changement d'affinité du tensioactif entre les différentes phases du système, en fonction de la température.(48)

Son invention est attribuée à Shinoda, qui montra, en 1968, qu'une augmentation de la température entraînait une modification de la tête hydrophile (déshydratation de celle-ci) se traduisant par une baisse de l'hydrophilie et conjointement un gain en lipophilie des tensioactifs non ioniques.(51),(78) En effet, la balance hydrophile/lipophile, qui détermine l'affinité prédominante d'un tensioactif, varie avec la température. C'est le cas du Kolliphor® qui gagne en lipophilie au chauffage.(62)

Dans le protocole PIT, l'inversion du sens de l'émulsion est créée par variation de la température. Cette variation de température, ainsi que de la teneur en sel du système va impacter les interactions entre les groupements oxyde d'éthylène de la tête hydrophile des tensioactifs et les molécules d'eau. La configuration des groupements oxyde d'éthylène va s'en trouver modifiée.(51)

En effet, aux faibles températures les têtes polaires sont très hydratées. Le tensioactif a donc une affinité prédominante hydrophile et va se placer préférentiellement dans la phase aqueuse. En revanche, à forte température, les têtes polaires vont se déshydrater, obligeant les tensioactifs à gagner en lipophilie et à s'orienter vers la phase organique.(70) Ainsi, au fil des cycles en température, le sens de l'émulsion s'inverse, en restant toutefois de l'ordre du macroscopique.

Cependant, au sein de ces cycles en températures, il existe une zone d'inversion de phase, nommée ZIP, au sein de laquelle le tensioactif va se répartir entre la phase aqueuse et la phase organique. Les tensioactifs auront une même affinité pour les phases huileuses et aqueuses. Cela va se traduire par une courbure spontanée nulle et donc une tension interfaciale proche de zéro. Ainsi, au sein de cette ZIP, et donc à l'approche de la température d'inversion de phase, le système va adopter une conformation particulière de type ME.(51),(64),(78)

Concernant le protocole, schématisé en **Figure 8**, il s'agira de réaliser plusieurs cycles en température, traversant la zone d'inversion de phase (ou ZIP).(48) Le système contenant initialement de l'eau, une émulsion H/E est formée à température ambiante en raison de l'hydrophilie du Kolliphor® à cette température. Le chauffage entrainera un gain en lipophilie de ce dernier ce qui, selon la règle de Bancroft précédemment citée, aboutit à la formation d'une émulsion E/H. Ce phénomène étant réversible, lorsque la température décroît et passe sous la température d'inversion de phase, alors le système passe d'une émulsion E/H à H/E.(66) Puis, lors de la phase de refroidissement du dernier cycle et une fois la ZIP atteinte, le système sera dilué avec la deuxième moitié de la phase aqueuse, sous agitation.(48)

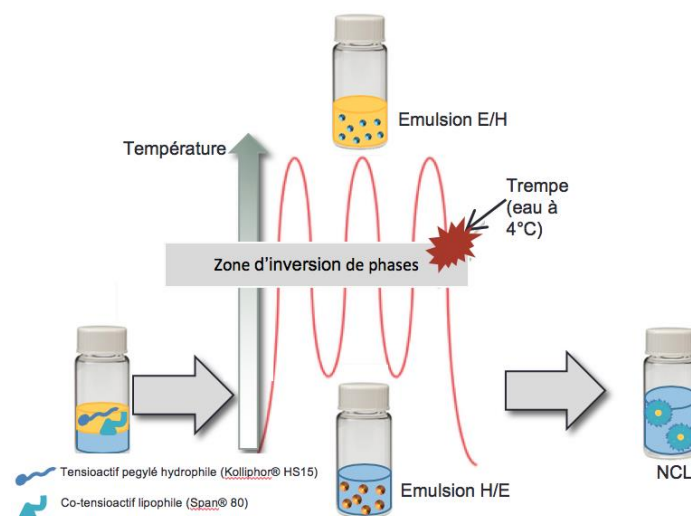


Figure 8: Procédé d'inversion de phase en température. (Figure issue d'un rapport interne) (61)

Plus en détails, Heurtault *et al.*(62) ont développé un protocole en 2 étapes : la première consiste en un mélange des composants suivi d'une augmentation de la température jusqu'à 85°C et d'un refroidissement jusqu'à 60°C. Ce cycle en température est reproduit 3 fois. La température de dilution (aussi notée Tcd pour cold dilution temperature en anglais) est fixée entre 1 et 3°C après le début de la ZIP (72°C dans cet exemple). La 2^{ème} étape est une trempe d'eau froide (proche de 0°C) une fois la Tcd atteinte. C'est cette trempe, irréversible, qui permet la formation des nanocapsules lipidiques.(62) Ce protocole a fait l'objet d'un brevet en 2001.(79)

La ZIP subit l'influence de divers paramètres : elle augmente avec le nombre de groupement oxyde d'éthylène du tensioactif ou diminue si la teneur en sel de la phase aqueuse augmente. Il a été montré par Heurtault *et al.*(62), qu'une variation de la salinité de 1% à 5% permettait de diminuer la zone d'inversion de phase et donc la température à laquelle la trempe d'eau est réalisée, de 81°C à 65°C. Cela rend cette méthode compatible avec l'encapsulation de molécules fragiles, notamment thermosensibles.(60)

4) Inversion de phase en composition (PIC)

La PIC est l'inversion de phase en composition(51), aussi appelée inversion de phase catastrophique, terme introduit par Salager. Il s'agit d'un procédé d'émulsification basé sur le changement du ratio huile/eau du système.(80) Ce procédé peut être qualifié de catastrophique car il est explicable par la théorie des catastrophes de Dickinson.(51)

Dans ce procédé, l'ajout de la phase aqueuse entraîne une augmentation progressive de la phase interne, se traduisant au premier abord par une augmentation du nombre de gouttelettes, qui vont finalement coalescer et devenir la phase externe.(81)

Plus en détails, le système passe par différents états au fur et à mesure de l'ajout d'eau. Lorsque la phase organique est faiblement enrichie en eau, alors une émulsion E/H se forme.(70)

L'inversion de phase en composition passe par la formation d'une structure intermédiaire en phase éponge dont les courbures des monocouches de tensioactifs sont plus faibles que la ME surgonflée intermédiaire du procédé PIT. Par conséquent, dans le procédé PIC, une part plus importante des tensioactifs ne rentre pas dans la composition de la NE et forme des micelles.(82) Il en résulte une NE ou des NCLs plus

volumineuses et également plus polydisperses qu'avec le procédé PIT, malgré des ratios de co-tensioactif/tensioactif/huile équivalents. C'est toutefois un procédé facilement adaptable à l'échelle industrielle.(68)

Le protocole PIC semble avoir un fort potentiel d'application industrielle. En effet, à grande échelle il est plus facile de réaliser une trempe d'eau que de varier la température. De plus, la méthode PIC peut être appliquée à divers types de tensioactifs, là où la PIT nécessite des tensioactifs non ioniques.(82)

Dans le protocole mis au point par Lefebvre *et al.*(65), la phase organique est préalablement chauffée à au moins 30°C pour permettre la solubilisation du Kolliphor®. Puis, une fois la température souhaitée atteinte, l'agitation est augmentée et l'ajout d'une eau à température ambiante est réalisé en une seule fois.(65) C'est cet ajout d'eau qui va provoquer un changement d'hydratation des groupements oxyde d'éthylène des tensioactifs, entraînant un changement d'affinité de ces derniers.

Au sein de l'équipe, des NEs de 20 à 120 nm dont le PDI était < 0,2 ont été obtenues à différentes températures (30, 50, 90°C) avec une formulation comprenant du Labrafac® WL1349 en tant qu'huile, du Kolliphor® HS15 comme tensioactif et du Span® 80 dans le rôle du co-tensioactif. Ces composants ont le statut GRAS (generally recognized as safe) permettant leur usage à des fins médicales. Les 3 températures testées correspondent à la température à laquelle est portée la phase organique au moment où la phase aqueuse est ajoutée, cette dernière étant, quant à elle, laissée à température ambiante. Il a été constaté par Lefebvre *et al.*(65) que la taille des gouttelettes pouvait être contrôlée en faisant varier les concentrations d'huile, de tensioactifs et de co-tensioactifs et plus particulièrement par le Labrafac® dont l'augmentation est fortement corrélée avec une augmentation de la taille des gouttelettes ou NCLs.(65)

5) Approche Sub-PIT et Sup-PIC

Dans ses travaux, K. Roger a souhaité comprendre le mécanisme régissant l'inversion de phase, partant de l'hypothèse qu'il n'y aurait aucun intérêt à agiter le système si le processus est uniquement basé sur l'inversion des tensioactifs. Il a alors mis au point un changement de terminologie en montrant que l'inversion en elle-même n'est pas nécessaire.

Un système peut adopter une infinité d'états mais une fois dans son état d'équilibre, c'est-à-dire son état le plus favorable, il y restera. Dans le cas des systèmes huile/eau/tensioactifs cet état d'équilibre est la séparation des phases avec la présence des tensioactifs dans la phase aqueuse. Les autres états peuvent présenter un intérêt du fait de l'expression de différentes propriétés. Ainsi, les méthodes haute énergie utilisent beaucoup d'énergie pour emmener le système dans un état hors équilibre et former les nanogouttelettes. Dans le cas des méthodes basse énergie (PIT et PIC), c'est la force de cisaillement induite par l'agitation qui permet la formation d'autres états que ceux adoptés par le système sans agitation. Ainsi, le système est éloigné de son état d'équilibre. Parmi l'infinité d'états qu'un système peut adopter, il existe un état dit état d'accès, présentant des caractéristiques particulières avec notamment une courbure précise, qui permet la formation des NEs/NCLs et détermine les propriétés finales de la nanoémulsion.(68)

Dans ses travaux, K. Roger a identifié des états d'accès pour chacun des procédés PIT et PIC. Ces états ont des structures précises, avec notamment une courbure des couches de tensioactifs tournée vers l'huile. En pratique, ces états d'accès se distinguent par une turbidité minimale, aboutissant à appeler l'apparition de cet état d'accès « clearing boundary » que l'on peut traduire en français par zone d'éclaircissement, terme qui sera utilisé par la suite.(68)

Dans le cas du protocole PIT, cet état d'accès est obtenu à une température inférieure à celle de l'inversion de phase, d'où le nom de méthode sub-PIT. Cet état est une microémulsion surgonflée. Dans le cas du protocole PIC, une quantité d'eau supérieure à celle de l'inversion de phase va permettre la formation d'une phase éponge bicontinue et empêcher le système d'évoluer vers son état d'équilibre K. Roger lui attribue le nom de méthode sup-PIC.(68)

a) Méthode sub-PIT :

Pour les tensioactifs polyéthoxylés, la température est la variable ayant le plus d'impact sur l'hydratation et, ainsi, sur la courbure spontanée des couches de tensioactifs.(83) La réalisation d'un diagramme de phase a permis de déterminer les phases d'équilibre du système en fonction de la température (courbe bleue de la **Figure 9**). A faible température l'état d'équilibre du système est une phase micellaire et une phase huileuse (W I). A température intermédiaire le système comporte une

phase aqueuse, une microémulsion et une phase huileuse (W III). Enfin, à haute température, le système se présente sous la forme d'une phase micellaire inverse et d'une phase aqueuse (W II).(84)

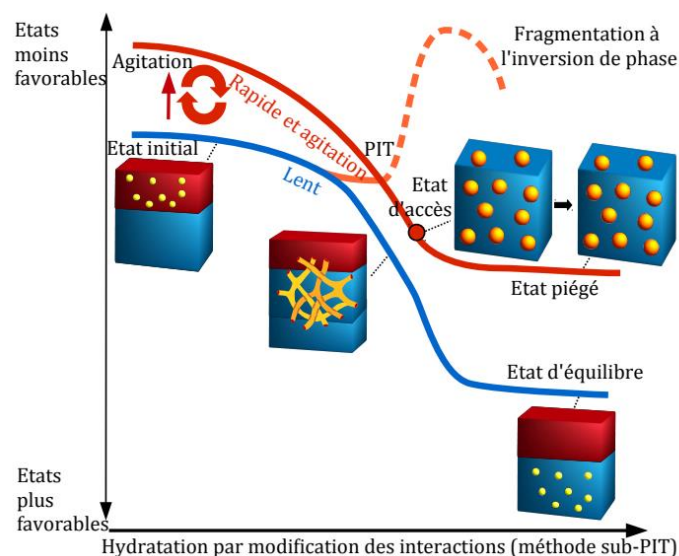


Figure 9: Etats d'un système huile/eau/tensioactifs en procédé sub-PIT.(68)

L'agitation du système à faible température produit une émulsion grossière, fortement turbide. Cette forte turbidité révèle que la solution micellaire (d'un ordre de grandeur de 10 nm) coexiste avec de larges gouttelettes d'huile (de l'ordre de 200 nm). Cependant, son agitation à haute température fragmente les gouttelettes d'huile rendant le mélange plus transparent. La faible turbidité est le signe d'une population homogène de gouttelettes nanométriques.(84)

K. Roger émet l'hypothèse que l'émulsion se forme grâce au chauffage de l'échantillon au-dessus de la zone d'éclaircissement. Cette émulsion est instable et l'arrêt de l'agitation entraîne la séparation des phases. Le minimum de turbidité provient d'une distribution en taille particulière des gouttelettes d'huile correspondant à la disparition des grosses gouttelettes via un processus de solubilisation dans des micelles gonflées. La formation de ces micelles gonflées est rendue possible par agitation.(84) En d'autres termes, la zone d'éclaircissement est une microémulsion sous forme de micelles gonflées. Lorsque la température est inférieure à celle de la zone d'éclaircissement, il y a présence de larges gouttelettes d'huile et de micelles gonflées, responsables d'un aspect laiteux. C'est l'augmentation en température qui permet à l'huile de se solubiliser dans des micelles, clarifiant l'échantillon. En effet, la diffraction de la lumière est principalement due aux gouttelettes. Au niveau de la zone

d'éclaircissement, soit quelques degrés sous la température d'inversion de phase, et sous l'effet de l'agitation, le système est homogène et ce, quelle que soit la concentration en tensioactif du système.(83)

En d'autres termes, l'émulsion est obtenue par l'intermédiaire d'un état fragmenté instable mais maintenu par agitation. L'augmentation en température couplée au maintien d'une agitation amène le système dans un état dit état d'accès qui s'avère être une microémulsion de type micelles gonflées. Cette émulsion devient stable lorsqu'une trempe est réalisée à au moins 17°C sous la température d'inversion de phase. S'il n'y a pas d'agitation, alors une émulsion grossière sera obtenue. Si cette trempe est réalisée à des températures inférieures à la frontière d'éclaircissement, le système restera composé de micelles gonflées en présence de larges gouttelettes d'huile.(84) La trempe à l'eau froide, toujours sous agitation va venir créer un choc thermique qui va figer ce système en une nanoémulsion dont la taille des gouttelettes est dépendante de la taille des micelles gonflées de l'état d'accès. En effet, le diamètre hydrodynamique à l'équilibre des micelles, noté D , mesuré par DLS, est déterminé grâce à la courbure de la couche de tensioactif, noté C , selon l'équation suivante : $C=2/D$. Il est montré que $2/D$ évolue linéairement avec la température et atteindra 0 à la température d'inversion de phase.(84)

En conclusion, pour obtenir des NEs/NCLs par un procédé sub-PIT, 2 conditions sont nécessaires : le maintien d'une agitation tout au long du procédé ainsi qu'une chauffe du mélange au-dessus de la zone d'éclaircissement suivi d'un refroidissement loin de cette frontière à l'aide d'une trempe sous agitation.(84)

b) Méthode Sup-PIC

Selon K. Roger, l'inversion de phase en composition nécessite, tout comme le procédé PIT, l'obtention d'une structure intermédiaire, dit état d'accès. Dans le cas de la PIC, cet état d'accès prendra la forme d'une phase éponge, dont les courbures sont plus faibles que la ME surgonflée intermédiaire du procédé PIT. La morphologie des phases intermédiaires adoptées par le système a été déterminée par SAXS et RMN. (82) Les différentes structures adoptées par le système selon le chemin suivi sont représentées en **Figure 10**.

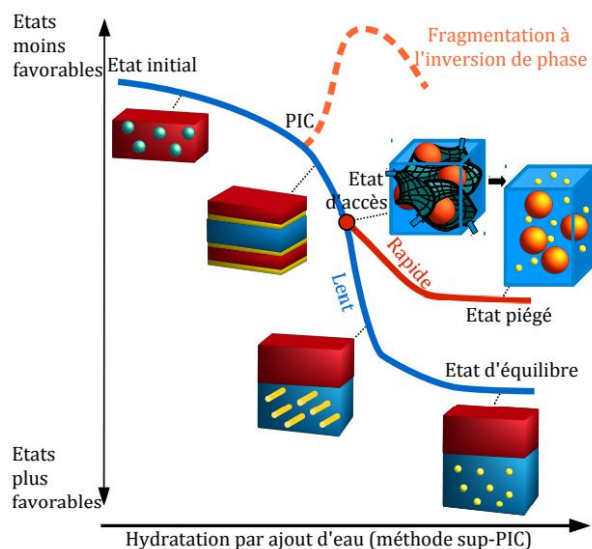


Figure 10: Etats d'un système huile/eau/tensioactifs en procédé sup-PIC.(68)

Dans son état déshydraté, autrement dit l'état initial, le système huile + tensioactifs se présente sous la forme de micelles inverses dont la courbure est orientée vers l'eau. Pour obtenir des NEs ou NCLs, il faut venir perturber ce système et, dans le cas du procédé PIC, cela se fait par un ajout de phase aqueuse brutal et sous agitation. En effet, l'ajout d'eau va entraîner dans un premier temps un gonflement des micelles inverses puis la formation de structures microémulsionnées. Une diminution de la courbure permettra la formation d'une structure bicontinue lamellaire.(64) Puis au cours de la diffusion d'eau, la courbure s'inversera vers l'huile et une phase éponge est obtenue. Cette structure, représentant la zone d'éclaircissement a été démontrée par des analyses SAXS. C'est cette phase éponge qui est considérée comme un état d'accès vers des NEs/NCLs, car, au fur et à mesure de l'ajout d'eau, une nucléation des gouttelettes d'huile sous forme de NEs/NCLs se produira, dont la taille correspond à la courbure de la phase éponge.(82) Ainsi, la taille des gouttelettes obtenues serait définie par la conformation de microémulsion en phase éponge et serait alors liée au ratio tensioactifs/huile et non à la quantité d'eau.(64) Cette phase éponge serait d'ailleurs obtenue à des fractions d'eau supérieures à celle du point d'inversion de phase en composition. K. Roger parle donc de méthode sup-PIC. Ce procédé sup-PIC illustré en **Figure 11** requiert 2 conditions : une quantité d'eau initiale inférieure à celle de la zone d'éclaircissement ; ainsi qu'un ajout d'eau rapide et en quantité suffisante pour dépasser celle de la zone d'éclaircissement. C'est une méthode qui peut être utilisée avec un plus large éventail de tensioactifs que la méthode PIT.(82)

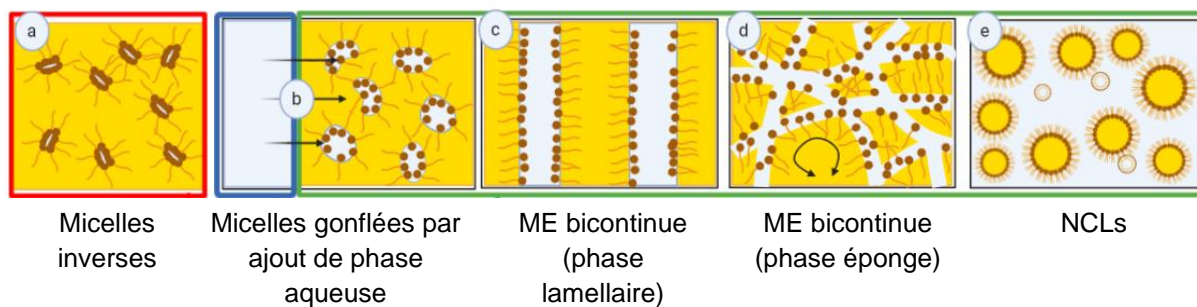


Figure 11: Procédé d'inversion de phase en composition selon K. Roger. (Figure issue d'un rapport interne)

VI. Méthodes de caractérisation

Les méthodes de caractérisation ont divers intérêts. Elles vont permettre de déterminer le point d'inversion de phase et la zone d'inversion de phase. Elles vont également participer à la caractérisation du système. La compréhension des mécanismes sous-jacents à l'inversion de phase et plus particulièrement des différentes structures formées par le système au cours du procédé peut permettre, à terme, l'amélioration de la formulation. Ce niveau de compréhension est nécessaire à la mise au point d'un procédé de formulation continu en microfluidique.

Il est indispensable de bien caractériser les nanoparticules avant d'envisager leur utilisation en clinique, de par l'impact des propriétés physico-chimiques sur la stabilité et la performance de ces dernières. Parmi les paramètres les plus importants à maîtriser, nous pouvons citer la taille et l'indice de polydispersité des NCLs. En effet, il est primordial de s'assurer de la monodispersité de la suspension. Cela est possible grâce à des techniques de diffraction laser, de diffusion dynamique de la lumière ou encore de microscopie (microscopie électronique à transmission, microscopie électronique à balayage ou microscopie à force atomique). Les techniques de microscopie peuvent également fournir des renseignements sur la morphologie des NCLs. Le potentiel zêta, l'efficacité d'encapsulation, la cristallinité ainsi que la stabilité sont également étudiés. Le potentiel zêta permet de mesurer la charge de surface de la nanoparticule. Il peut être déterminé par la mobilité électrophorétique via des techniques de diffraction laser. L'efficacité d'encapsulation permet d'estimer la quantité de principe actif encapsulé dans un nanovecteur en comparaison de la quantité de

principe actif utilisé. Elle est souvent mesurée à l'aide de techniques de spectroscopie UV ou de chromatographie liquide haute performance (HPLC), souvent associées à des techniques de séparation telle que l'ultrafiltration, la centrifugation ou la dialyse. Pour les NCLs, la calorimétrie différentielle à balayage permet de définir le degré de cristallinité des lipides. L'évolution de la distribution en taille et du relargage du principe actif tout au long de la période de stockage permet de définir la stabilité des NCLs.(85) Sont détaillées ci-dessous, les méthodes citées et / ou utilisées dans ce projet.

1) Diffusion dynamique de la lumière

L'intérêt croissant porté aux nanotechnologies a nécessité le développement de méthodes de caractérisation adaptées. Parmi celles-ci, la diffusion dynamique de la lumière (notée DLS pour Dynamic Light Scattering) est parmi les plus répandues dans les laboratoires de par sa facilité d'utilisation et sa rapidité d'analyse.(86)

La DLS permet de mesurer la taille de nanoparticules. Ce système fonctionne grâce à un faisceau laser et détermine la taille en fonction de l'intensité de la lumière diffusée.

Les nanoparticules, lorsqu'elles sont en suspension dans un liquide, se déplacent selon un mouvement Brownien. Ce mouvement est la conséquence de collisions aléatoires entre les nanoparticules et les molécules du milieu liquide dans lequel elles évoluent. Il a été observé pour la première fois par Robert Brown en 1827. Il a ensuite été décrit par Albert Einstein en 1905.(86) La vitesse de déplacement est liée à la taille des gouttelettes : plus celles-ci sont petites, plus elles se déplaceront rapidement. Au contraire, les plus grosses particules se déplaceront lentement. Ainsi, l'appareil va mesurer les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par les nanoparticules et calculer la taille de celles-ci grâce à l'équation de Stokes-Einstein : (86)

$$\varnothing H = \frac{kT}{3\pi\mu D}$$

Avec, $\varnothing H$: le diamètre hydrodynamique

k : la constante de Boltzmann

T : la température du solvant

μ : la viscosité du solvant

D : coefficient de diffusion

Ces fluctuations sont mesurées sur de courts intervalles de temps, de l'ordre de la nanoseconde.

L'appareil de DLS est composé d'un laser, servant à illuminer un échantillon contenu dans une cuve transparente, à une longueur d'onde définie. La température de la cuve peut être contrôlée. Les rayons diffusés par les nanoparticules seront collectés selon un angle de diffusion θ . L'intensité des rayons diffusés sera mesurée par un détecteur. L'intensité du laser est contrôlée par un atténuateur afin d'éviter une saturation du détecteur. Celui-ci est compris entre 1 et 11, (1 correspondant à l'atténuation maximale). Le signal obtenu est transformé par un corrélateur et transmis à un ordinateur.

Afin d'éviter les phénomènes de diffusion multiple, à savoir la diffusion d'un même rayon par plusieurs nanoparticules l'échantillon est fortement dilué.

La DLS mesure le diamètre hydrodynamique moyen, c'est-à-dire le diamètre d'une sphère qui posséderait le même coefficient de diffusion que la particule qui est analysée.

La DLS nous indique 2 paramètres principaux grâce à la méthode des cumulants : le Z-average, valeur moyenne de la taille, utilisable seulement lorsque l'échantillon est monomodal (ne contient qu'un seul pic) ; et le PDI (indice de polydispersité).

2) Cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM)

La microscopie à transmission électronique est une microscopie à lumière inversée, dans laquelle l'échantillon est éclairé par un faisceau d'électrons. Cette technique peut permettre non seulement l'analyse de la taille des nanoparticules mais également de la forme et de leur structure interne et a donc été fréquemment utilisée pour l'étude de liposomes. Il est également possible de visualiser une éventuelle précipitation des molécules encapsulées.(87)

L'appareil est composé d'une colonne sous vide contenant le faisceau d'électrons et de lentilles électromagnétiques permettant de concentrer ce flux sur l'échantillon. Les électrons transmis par l'échantillon seront ensuite projetés sur un écran. Ceux-ci vont alors interagir avec des métaux lourds (plomb, uranium, platine) laissant apparaître un

contraste.(87) Le faisceau d'électrons a une intensité comprise entre 200 kV et 300 kV.(88)

La particularité du Cryo-TEM réside dans la préparation de l'échantillon à analyser. Celui-ci se trouve dans un état congelé, ce qui nécessite un support spécialisé. Une préparation adaptée de l'échantillon est également nécessaire et l'environnement dans lequel celui-ci se trouve doit faire l'objet d'une surveillance particulière tout au long du procédé. Il doit être maintenu à une température d'environ -180°C afin d'éviter le passage de l'état vitreux à l'état cristallin.(87)

Les échantillons sont amenés vers un état visqueux grâce à une congélation ultra-rapide dans de l'éthane liquide. Le processus de congélation doit absolument être rapide afin d'éviter la formation de glace par cristallisation de l'eau. L'observation se fait ensuite à -180°C . L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite l'utilisation d'aucun colorant (sels de métaux lourds) et permet donc d'éviter la formation d'artefacts dus à ces derniers. Elle permet également la préservation des caractéristiques structurales des échantillons et les protège des bombardements d'électrons.(88)

Le principal inconvénient de la méthode du cryo-TEM est un faible contraste dû à un mauvais rapport signal sur bruit. Le cryo-TEM permet de reconstruire une structure en 3 dimensions des macromolécules observées en utilisant plusieurs images de projection (de l'ordre de la centaine ou du millier). Cette méthode fonctionne davantage avec des molécules volumineuses.

3) Diffusion des rayons X aux petits angles

La diffusion des rayons X aux petits angles (noté SAXS pour small-angle X-ray scattering) permet l'étude de la forme, et de la conformation de complexes macromoléculaires. Cette méthode peut utiliser une source de synchrotron à haute intensité. L'échantillon est placé dans un capillaire en quartz et éclairé par un faisceau de rayons X monochromatiques. L'intensité des rayons diffusés par l'échantillon aux petits angles est enregistrée par un détecteur puis soustrait à la diffusion du solvant et du contenant afin d'obtenir l'intensité des particules de l'échantillon.(89)

L'intensité de diffusion est proportionnelle à la concentration et permet d'améliorer le ratio signal/bruit du solvant.(89)

La diffusion des rayons X varie en fonction de la densité en électron de la matière rencontrée. La présence de matière induira un changement de direction du rayon incident. Cette méthode permet l'observation de structures d'un ordre de grandeur allant de quelques Ångströms à plusieurs micromètres.(90)

4) Fractionnement d'écoulement de champ

Le fractionnement d'écoulement de champ ou fractionnement par couplage flux-force (noté F.F.F.) est une technique à la fois de séparation et de caractérisation des nanoparticules. Son principe consiste en l'injection de l'échantillon dans un canal dans lequel un champ de force est appliqué, permettant l'écoulement de l'échantillon, avec un détecteur en sortie. La vitesse du liquide diffère en fonction de sa localisation dans le canal : plus rapide au centre et ralenti le long des parois. Selon leurs caractéristiques, les différents composants de l'échantillon se placeront plus ou moins proches des parois du canal et seront séparés par cette différence de vitesse. Il existe différents sous-types de F.F.F. selon la nature du champ de force appliqué : la F.F.F. thermique qui consiste en une différence de température entre les 2 parois du canal ; la F.F.F. par sédimentation centrifuge où le canal se situe dans une centrifugeuse entraînant la formation d'une force centrifuge perpendiculaire au sens d'écoulement de l'échantillon ; ou encore la F.F.F. par filtration ou d'écoulement asymétrique (A4F) technique dans laquelle la paroi inférieure du canal est une membrane semi perméable retenant les particules.(91),(92)

5) Conductimétrie

La conductimétrie est une des méthodes qui permet de déterminer la zone d'inversion de phase. Il est possible notamment de suivre l'évolution de la conductivité en fonction de la température ou de la fraction volumique. La valeur de conductivité indique la nature de la phase continue.(48) En effet, l'inversion de phase est caractérisée par un changement de phase continue. Or la phase aqueuse, lorsqu'elle contient du sel, est très conductrice, ce qui n'est pas le cas de la phase huileuse dont la conductivité est minimale.

Comme expliqué précédemment, dans le cadre du procédé PIT les groupements hydrophiles des tensioactifs sont déshydratés par une hausse de la température et

gagnent ainsi en lipophilie, entraînant l'inversion de phase et le passage d'une émulsion H/E à E/H.(60) Ce phénomène entraîne un changement de phase continue de la phase aqueuse vers la phase huileuse, responsable d'une chute de la conductivité, qui s'approche alors de 0 mS.cm⁻¹.(25),(27) La phase continue est huileuse lorsque la conductivité est inférieure à un seuil de 10 μS.cm⁻¹.(21),(27)

Ainsi, nous pouvons prendre pour exemple la **Figure 12**, extraite des travaux de Heurtault *et al.*(27), qui illustre l'évolution de la conductivité en fonction de la température, lors du procédé PIT. Ces mesures ont été effectuées sur un système composé de Labrafac® WL 1349 de Lipoid® S75-3 et de Solutol® HS 15 (maintenant nommé Kolliphor® HS 15). La conductivité atteint d'abord des valeurs élevées (de l'ordre de 35 mS.cm⁻¹, dû à la présence de sel (NaCl) dans cet exemple), jusqu'à un certain seuil où la conductivité décroît brutalement, lorsque la température atteint la zone d'inversion de phase, que l'affinité du tensioactif change(50) et que le système passe donc d'une émulsion H/E à E/H.(81)

A l'inverse, une augmentation brutale de la conductivité signe le changement de sens de l'émulsion, de E/H vers H/E. Au sein de la ZIP (zone grisée sur la figure), nous pouvons noter la présence d'un pic, correspondant à la formation d'une ME bicontinue.(48)

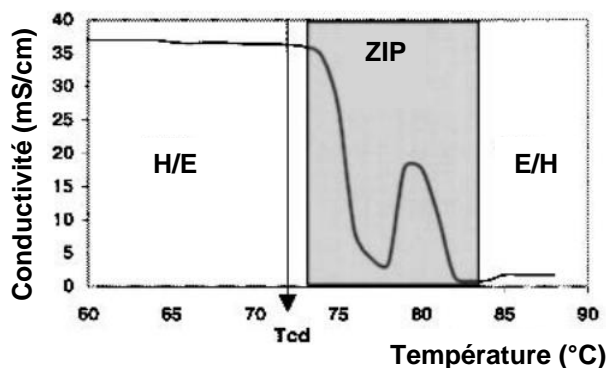


Figure 12: Mesure de conductivité en fonction de la température.(62)

Heurtault *et al.*(62) ont également réalisé des mesures de conductivité à différentes concentrations en NaCl. Les résultats sont présentés en **Figure 13**. Les concentrations en NaCl varient de 1% à 5%. Ce travail montre que, comme attendu, plus la salinité est élevée, plus les valeurs de conductivité sont élevées également. De plus, une augmentation de la salinité entraîne un décalage vers la gauche de la chute en

conductivité, et donc un décalage de la ZIP vers de plus faibles températures. Cela est dû au fait que le NaCl participe à la déshydratation des têtes polaires et donc à une diminution de la température d'inversion de phase.

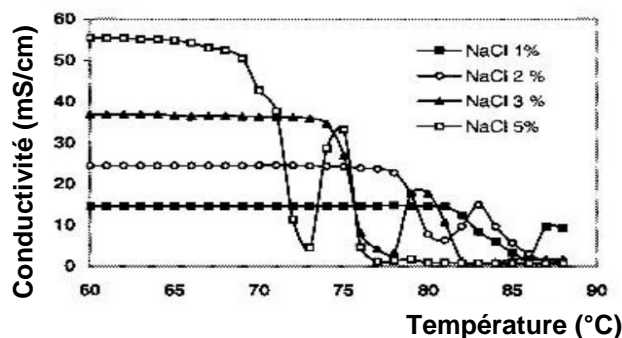


Figure 13: Mesure de conductivité en fonction de la température et à différente concentration en NaCl. (62)

Dans leurs travaux Anton *et al.*(48) étudient l'impact de la quantité de tensioactif au sein du système sur la zone d'inversion de phase. Ils utilisent la même formulation que celle décrite par Heurtault *et al.*(62) ci-dessus. Les résultats de ces analyses sont présentés en **Figure 14**. Le graphique montre un décalage de la ZIP vers de plus basses températures avec l'augmentation de la concentration en tensioactif.

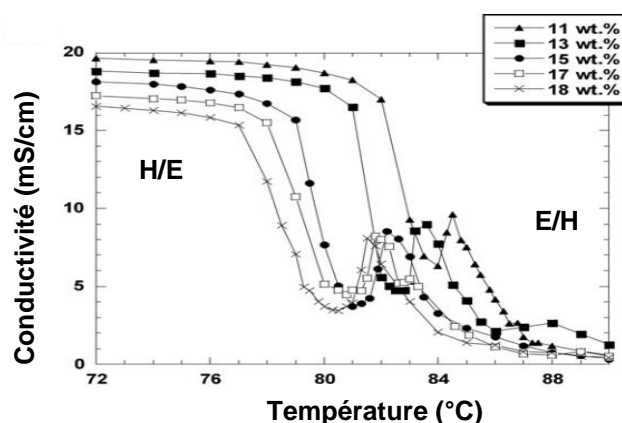


Figure 14: Mesure de conductivité en fonction de la température, à différentes concentrations en tensioactif.(48)

La **Figure 15** montre l'évolution de la conductivité dans le cas d'un protocole PIC. Elle est issue des travaux de Bouchama *et al.*(80) Les mesures ont été effectuées sur un système constitué d'huile de paraffine (phase huileuse) et de triton X-100, un tensioactif non ionique, contenant des groupements PEG, dissous dans la phase aqueuse. Cette dernière contient également du chlorure de potassium en tant

qu'électrolyte, afin de permettre la mesure de la conductivité. Trois mesures ont été effectuées pour chaque fraction de phase aqueuse afin de prouver la reproductibilité de l'expérience. La conductivité n'évolue pas de la même manière que lors du procédé PIT. En effet, ici la conductivité est d'abord très faible de par l'absence d'eau dans le système. Une fois le point d'inversion franchi (20 % massique en eau dans cet exemple), la conductivité augmente brutalement.

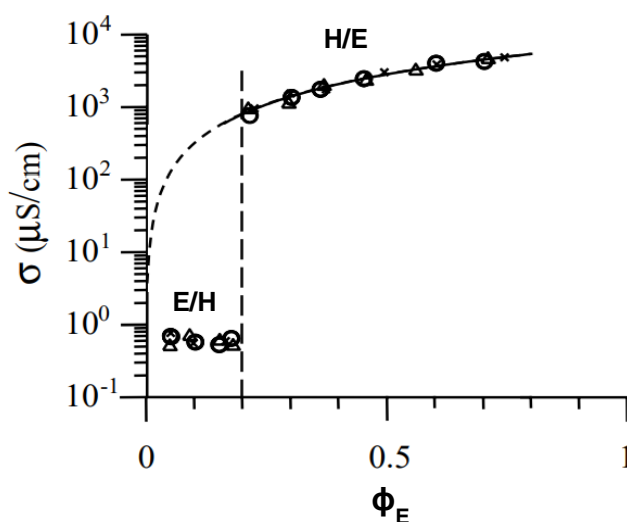


Figure 15: Mesure de conductivité selon la fraction volumique d'eau. La courbe correspond au modèle de Bruggeman.(80)

6) Tensiométrie

L'inversion de phase peut également être suivie par des mesures de tensiométrie. Si la tension interfaciale à l'interface eau/air est proche de 72 mN.m^{-1} à 25°C ,⁽⁹³⁾ les MEs ont une tension interfaciale bien inférieure, généralement de l'ordre de 10^{-3} à $10^{-6} \text{ mN.m}^{-1}$. Ces faibles valeurs sont dues à l'orientation des tensioactifs qui permettent une absence de courbure entre les phases huileuse et aqueuse.^{(19),(44)}

Au cours du procédé d'inversion de phase, et notamment du procédé PIT, à l'approche de $\text{HLD} = 0$, la tension interfaciale diminue permettant la réduction de la taille des gouttelettes (zones grisées sur le graphique de gauche, **Figure 16**). Toutefois, lorsque nous sommes trop proche de $\text{HLD} = 0$ (zone hachurée sur le graphique de droite, **Figure 16**), la tension interfaciale atteint son minimum et se rapproche de 0 mN.m^{-1} (de l'ordre de quelques centaines de $\mu\text{N.m}^{-1}$), affectant la stabilité des gouttelettes et les incitant à coalescer en des gouttelettes plus larges aboutissant à la formation d'une ME.^{(94),(95)}

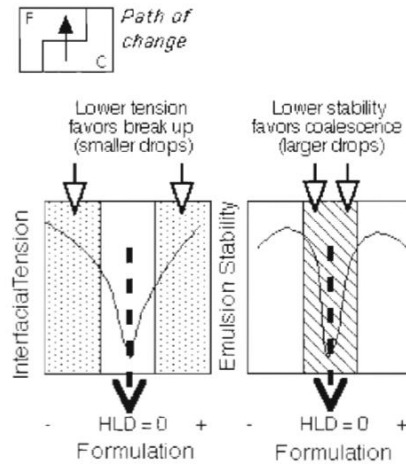


Figure 16: Évolution de la tension interfaciale en fonction de la HLD.(94)

Il en est de même pour le procédé PIC où, à l'approche du point d'inversion, la tension interfaciale diminue également. De ce fait, les gouttelettes s'allongent jusqu'à former une ME de type bicontinue.(96)

7) Rhéologie

La troisième méthode pour analyser les inversions de phases est la rhéologie. La viscosité sera proche de celle de la phase continue lorsque celle-ci est en large excès dans l'échantillon. Au fur et à mesure que la phase interne va croître, la viscosité va augmenter.(97) Néanmoins, la viscosité évoluera différemment selon que l'on applique le protocole PIT ou PIC. Dans le cas du protocole PIC, la variation de viscosité peut être brutale au moment de l'inversion.(97) En revanche, pour le protocole PIT, il existe 2 maximums de viscosité, de chaque côté de la ZIP autrement dit de la ME intermédiaire.

Les travaux d'Allouche *et al.*(76) sur le procédé PIT ont montré que plus les gouttelettes formées sont petites, plus il en résulte une viscosité élevée au sein du système (**Figure 17**). La viscosité est maximale de chaque côté du seuil $HLD = 0$. Cela s'explique par le fait que lorsque $HLD = 0$, le système est sous la forme d'une microémulsion.

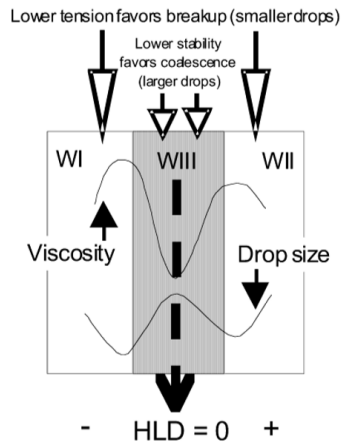


Figure 17: Viscosité et taille de gouttelettes en fonction de la HLD.(76)

Le graphique représenté en **Figure 18** issu de Allouche *et al.*(76) montre l'évolution de la viscosité et de la conductivité en fonction de la température. Il est possible de voir une chute à la fois de la conductivité et de la viscosité lorsque la température approche celle de la ZIP, avec même une viscosité minimale à la température d'inversion de phase.

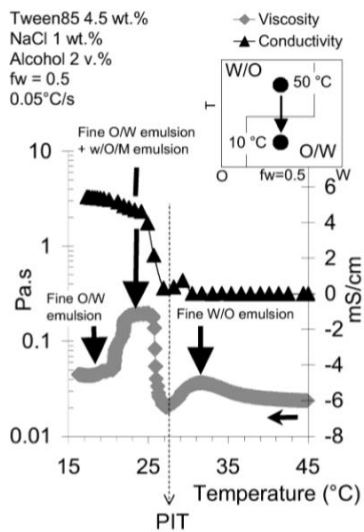


Figure 18: Mesures de viscosité et de conductivité en fonction de la température.(76)

En ce qui concerne le procédé PIC, un ajout d'eau va augmenter la viscosité dû à l'encombrement stérique des micelles gonflées d'eau dans huile. La viscosité augmente d'abord de manière linéaire avec le ratio de phase interne.(94) Puis, au fur et à mesure que la fraction volumique augmente, l'augmentation de viscosité est plus franche. La viscosité devient alors non Newtonienne (elle devient rhéofluidifiante).(95) La viscosité est plus faible pour une structure discontinue que bicontinue, c'est

pourquoi la viscosité est plus élevée au moment de la formation de la ME. Ainsi, le maximum de viscosité indiquera l'imminence de l'inversion de phase.(51) En effet, à ce point critique, les gouttelettes sont tellement proches les unes des autres que l'inversion se produit, et la viscosité décroît alors drastiquement. L'émulsion H/E est formée.(95)

La **Figure 19** présente les résultats obtenus par Mayer *et al.*(98) sur une formulation comprenant du Miglyol® 812 (triglycérides à chaînes moyennes) en tant qu'huile ainsi que du Tween® 80 en tant que tensioactif. Deux profils différents sont obtenus en fonction du ratio huile/tensioactif. En effet, pour un ratio de 1,0, un double pic est obtenu sur les mesures en viscosité. Il est attribué à la formation d'un gel en tant que phase intermédiaire qui n'est pas observé pour des ratios plus faibles où nous serions plutôt en présence d'un liquide visqueux.

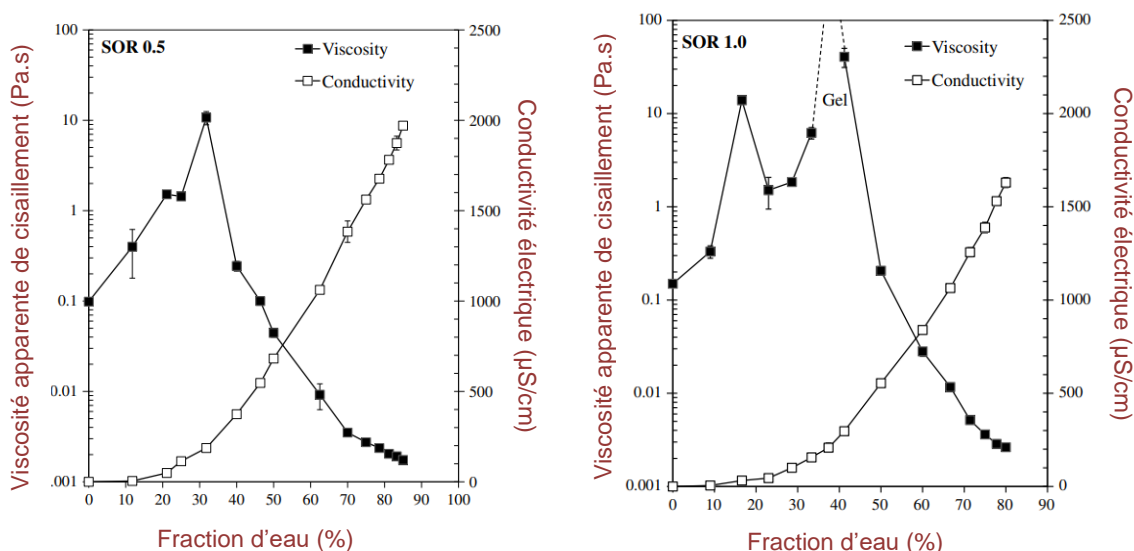


Figure 19: Mesures de viscosité et de conductivité en fonction de la fraction volumique d'eau.(98)

Anisa *et al.*(95) ont également réalisé des mesures de viscosité en procédé PIC, sur des émulsions formulées à partir de 3 huiles différentes. Leurs résultats sont visibles en **Figure 20**. Le profil d'évolution de la viscosité est identique à celui obtenu par Mayer *et al.*(98), à savoir une augmentation non linéaire, suivie d'une chute brutale.

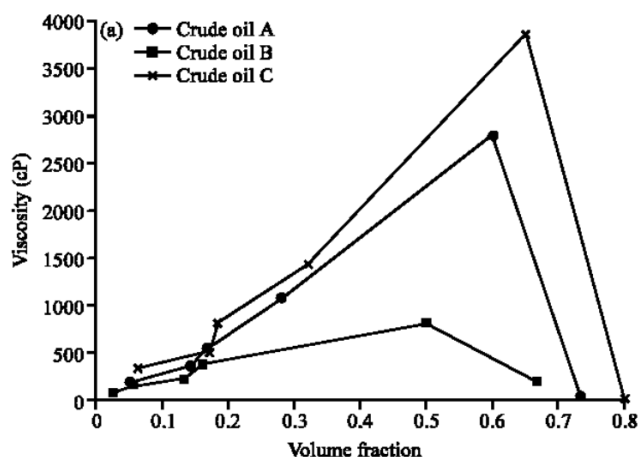


Figure 20: Mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique d'eau dans des émulsions formées à partir de 3 huiles A, B et C.(95)

VII. Le bêta-carotène

Le β -carotène (β C) est un pigment coloré, rouge-orangé, appartenant à la famille des caroténoïdes. Sa formule chimique brute est $C_{40}H_{56}$ et sa masse molaire est de 536,88 g/mol. Sa structure est présentée en **Figure 21**. C'est une molécule hydrophobe présentant des propriétés antioxydantes.(99) Etant présent en abondance dans les plantes, les fruits et légumes, il est la principale source de vitamine A dans l'alimentation humaine.(25),(50) C'est une vitamine impliquée dans la vision, la différenciation cellulaire et la reproduction.(100) La carotte est l'aliment le plus riche en β C, avec une teneur d'environ 48,2 μ g/g.(101) Cependant, sa biodisponibilité est faible et dépendante de la teneur en lipide de l'alimentation.(60) La prise de caroténoïdes réduirait les maladies chroniques et dégénératives de par leur action antioxydante, piégeant les radicaux libres.(101) Le conditionnel est ici employé car des études, détaillées par la suite, tendent à montrer que les effets bénéfiques d'une supplémentation en β C ne seraient pas si évidents. Les caroténoïdes possèdent des caractéristiques pouvant limiter leur usage, comme un point de fusion haut, une instabilité chimique, une faible solubilité dans l'eau et donc une faible biodisponibilité. Le β C est le caroténoïde le plus étudié. Il possède des propriétés antioxydantes, due à la présence de doubles liaisons conjuguées au sein de sa structure chimique. Cependant cela est source de sensibilité thermique (pour des températures supérieures à 80°C) ainsi qu'à la lumière et à l'oxygène.(60)

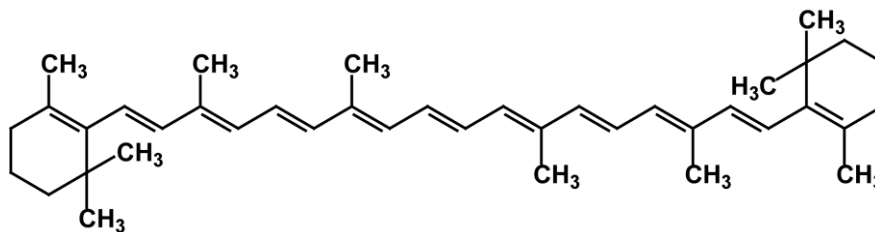


Figure 21: Structure du bêta-carotène

L'usage d'un nanovecteur dans lequel le β C serait encapsulé améliore sa biodisponibilité d'une part et le protège contre une dégradation thermique et une photodégradation d'autre part.(101) Grâce à son caractère hydrophobe, le β C se placera dans le cœur des NCLs.(60) Le β C fait partie de nombreux suppléments vitaminiques. Des études scientifiques ont évalué les effets du β C. Si elles n'ont pas permis de mettre en évidence des effets bénéfiques de la supplémentation en β C, celle-ci serait même la cause d'effets délétères chez certaines populations.

Ainsi, Druesne-Pecollo *et al.*(102) ont publié une méta-analyse des résultats de 9 essais randomisés, menés avant avril 2009 et intégrant 182 323 participants au total. L'objectif est l'étude de l'effet de la supplémentation en β C sur l'incidence du cancer. Le β C est utilisé seul ou en association avec d'autres antioxydants. Les notions de faibles et fortes doses sont différenciées par un seuil de 15 mg/jour. Ils ne notent pas de différences significatives en termes d'incidence de tout type de cancers entre un groupe supplémenté en β C et un groupe sous placebo. Cependant, au sein des études ATBC (Alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study) (103) et CARET (beta-carotene and retinol efficacy trial) (104), le β C augmenterait significativement le risque relatif pour tout type de cancer (RR : 1,08 ; IC_{95%} : 1,01-1,15) (avec RR le risque relatif à savoir le rapport entre la probabilité d'un évènement dans la population exposée et la probabilité de ce même évènement dans la population non exposée ; et IC_{95%} l'intervalle de confiance à 95%). Il est à noter que ces études sont composées exclusivement de participants étant fumeurs ou l'ayant été, ainsi que des travailleurs de l'amiante. Pour ce qui est plus spécifiquement du cancer du poumon, une supplémentation en association avec un autre antioxydant ou avec une dose supérieure à 20 mg/jour augmenterait la prévalence de ce cancer dans les populations masculines, de fumeurs et de travailleurs de l'amiante (RR : 1,13 ; IC_{95%} : 1,04-1,24). De plus, il y aurait un effet dose dépendant sur le cancer de l'estomac. En effet, si la dose est inférieure à 20 mg/jour, alors l'incidence diminue (RR : 0,84 ; IC_{95%} : 0,71-1,00) ; une dose supérieure à 20mg/jour augmente significativement le risque (RR :

1,34 ; IC_{95%} : 1,06-1,70). En conclusion, le risque est dépendant de la dose journalière et des caractéristiques de la population concernée. De plus, l'augmentation du risque est surtout présente dans les populations masculines, chez les fumeurs et les travailleurs de l'amiante. Les auteurs ont tenu à nuancer ces résultats en précisant qu'ils ne permettent pas de dire quel facteur de risque prédomine entre la supplémentation et l'exposition au tabac ou à l'amiante.

Dans leur revue, Vivekananthan *et al.*(105) s'intéressent à la mortalité cardiovasculaire en étudiant les résultats de 6 études regroupant 131 551 patients. Ils trouvent une mortalité cardiovasculaire augmentée (Odds ratio OR : 1,1 ; IC_{95%} : 1,03-1,17) (l'Odds ratio étant le rapport de cote entre la population exposée et non exposée) dans le cas d'une supplémentation en β C. En revanche, il n'y aurait pas d'impact sur le taux d'accident vasculaire cérébral. Il est également conclu un risque augmenté de cancer du poumon mais celui-ci serait dû aux études CARET et ATBC, dont les cohortes sont composées de patients à risque, comme précisé précédemment. Le plus fort taux de prévalence dans ces populations serait dû à une déstabilisation de la molécule de β C par la cigarette, induisant un signal de transduction anormal et, à terme, une sur-régulation des facteurs de croissance tumoraux. L'inquiétude vient du fait que les doses considérées comme à risque sont les doses retrouvées dans des suppléments vitaminiques commercialisés en vente libre.

D'après Wang *et al.*(106) et leur étude menée sur des furets supplémentés en β C et/ou exposés au tabac pendant 6 mois, des taux élevés de β C sont retrouvés dans le plasma et les tissus pulmonaires. Le risque plus élevé chez les fumeurs s'explique par la présence de radicaux libres dans leurs poumons, qui vont venir former des métabolites oxydatifs du β C en raison de sa sensibilité à l'oxydation. Ces métabolites sont structurellement proches des rétinoïdes. Ce mécanisme entraîne la sous-régulation de l'expression du gène RAR β (récepteur de l'acide rétinoïque β) et la décroissance de la concentration en acide rétinoïque. Cela entraîne une augmentation de la prolifération des cellules pulmonaires et favorise la formation de tumeur.(106) Le deuxième mécanisme, concomitant, est la surrégulation de l'activateur de protéine 1 (AP-1), impliqué également dans la prolifération cellulaire. Ces 2 mécanismes vont dans le sens d'une exacerbation de la tumorigénèse.

Ces résultats peuvent remettre en question l'intérêt du β C dans le cadre d'un usage pharmaceutique. Toutefois, dans ce projet, le β C sera encapsulé dans des NCLs en tant que molécule modèle. Cela permettra le développement d'un procédé de

formulation de NCLs, pouvant, par la suite, servir à l'encapsulation d'autres molécules lipophiles et fragiles.

La partie expérimentale de cette thèse porte sur la formulation de NCLs par des procédés basse énergie et la caractérisation des voies de formulation. Ce travail se trouve à l'interface de 2 projets ; Phy2miFOR et EcoNEL. L'objectif final de ces 2 projets est la comparaison de l'absorption intestinale d'une molécule modèle, le β C sous 2 formes galéniques : une forme non encapsulée où le β C est nanocristallisé par un procédé de CO_2 supercritique et une forme encapsulée où le β C sera placé dans des NCLs.

Ce travail a pour but de démontrer que l'encapsulation du β C dans les NCLs assure sa protection d'une part et améliore sa biodisponibilité par voie orale d'autre part. Dans la suite de cette thèse nous nous intéresserons principalement à la formulation des NCLs.

Deux grands axes peuvent être définis dans ce projet : l'étude de stabilité de NCLs chargées en β C dans des milieux biomimétiques ; et la caractérisation des voies de formulation et l'identification des structures intermédiaires adoptées par notre système.

Ainsi, dans cette partie expérimentale seront présentées, dans un premier temps, des études préliminaires à l'encapsulation du β C dans les NCLs avec des mesures de solubilité du β C par dosage spectroscopique ainsi que des mesures de fluorescence de cette même molécule.

Dans un second temps nous nous intéresserons à la formulation des NCLs en procédé PIT et PIC et à la manière dont nous mesurons leur taille par diffusion dynamique de la lumière.

Le second objectif de ce projet est la caractérisation des voies de formulation, autrement dit nous cherchons à comprendre les structures intermédiaires formées au cours des procédés PIT et PIC. La connaissance des caractéristiques physico-chimiques de ces structures est essentielle à la mise au point d'un procédé de production continu dans le futur (microfluidique). Pour cela, nous utiliserons des méthodes permettant de caractériser les inversions de phase, avec des mesures de tensiométrie, de rhéologie et de conductimétrie.

Pour terminer, nous évoquerons la préparation d'un milieu biomimétique, le milieu FeSSIF ainsi que la méthode qui nous permettrait de différencier par diffusion dynamique de la lumière les NCLs au sein de ce milieu contenant une quantité non négligeable d'objets (micelles, vésicules...) de taille similaire aux NCLs.

Les méthodes et les résultats de l'ensemble de ces expériences seront présentés avant d'être discutés et comparés aux données de la littérature dans une partie discussion.

VIII. Matériels et méthodes

1) Matériels

Le Kolliphor[®] HS 15 (mélange d'hydroxystéarate de PEG660 (70%) et de PEG 660 libre (30%)) est fourni par BASF (Ludwigshafen, Allemagne), le Labrafac[®] WL 1349 a été commandé auprès de Gattefossé (Saint-Priest, France). Le Span[®] 80 a été acheté chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Dans la suite de ce rapport, ces composés seront respectivement appelés Kolliphor[®], Labrafac[®] et Span[®] 80. Le NaCl ainsi que le β C sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'eau milliQ est produite par un système de filtration (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Concernant les solvants, l'éthanol est fourni par Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni) et le dichlorométhane par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Entrant dans la composition d'un milieu biomimétique, la lécithine provient de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne), le glycéryl monooléate de Abitec Corporation (Janesville, Etats-Unis), le NaOH de Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Uni). Enfin, l'acide maléique, le sodium taurocholate, la pancréatine et le CaCl₂ ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2) Mesure de solubilité du β -carotène dans le Labrafac[®] par dosage spectroscopique

Dans le but de formuler des NCLs chargées en β C, des essais de solubilité de ce dernier dans le Labrafac[®] doivent être préalablement réalisés. Une solution mère a été réalisée à une concentration de 0,1 mg de β C par gramme de Labrafac[®], notée 0,1 mg β C/gL. Elle a été agitée pendant 7h à température ambiante et à une vitesse intermédiaire d'environ 600 rpm. Une analyse DLS permet de vérifier l'absence de nano-cristaux de β C résiduels et donc de s'assurer de la complète solubilisation du β C dans le Labrafac[®]. La solution mère est ensuite diluée dans du Labrafac[®] afin d'obtenir 4 solutions à des concentrations respectives de 2, 4, 6 et 7 μ g β C/gL. Ces concentrations ont été choisies pour avoir une absorbance comprise entre 0,2 et 1. Ces 4 solutions serviront à établir une gamme d'étalonnage.

6 solutions en excès ont également été formulées : 3 solutions à 10 mg β C/g_L et 3 solutions à 60 mg β C/g_L. Ces solutions sont d'abord passées au vortex puis laissées sous agitation à 1000 rpm pendant 24h à température ambiante. Puis elles sont centrifugées pendant 10 minutes à 7000 rpm afin de faire sédimenter les particules de β C non solubilisées. Enfin, les surnageants subiront une dilution au 1/10 000^{ème} dans le Labrafac[®] pour être dans la même gamme d'absorbance que les solutions étalons, avant d'être analysées par spectroscopie UV-visible. Leur concentration sera déterminée à partir de la gamme d'étalonnage. Les échantillons contenant du β C sont protégés de la lumière en étant recouvert d'aluminium ou en utilisant du verre ambré. Des flushs d'argon permettent de prévenir les phénomènes d'oxydation.

Les mesures d'absorbance sont réalisées à partir d'un spectrophotomètre UV-visible UV-2600 (Shimadzu, Japon). Un balayage spectral est tout d'abord réalisé afin de déterminer le maximum d'absorbance des solutions, sur un intervalle de longueur d'onde allant de 300 à 700 nm. Pour réaliser la gamme, la longueur d'onde est fixée au maximum d'absorbance déterminée grâce au balayage, en l'occurrence 460 nm. Les mesures sont réalisées en triplicat.

3) Mesure de fluorescence du β -carotène

Des mesures de fluorescence du β C sont réalisées grâce à un fluorimètre Fluoromax-4[®] (HORIBA Jobin Yvon Inc, New Jersey, USA). Cet appareil est équipé d'une lampe au Xénon (**Figure 22**) et permet la réalisation de spectres d'émission et d'excitation. Les essais préliminaires sont réalisés sur une solution de β C dans de l'éthanol, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus à ceux de la littérature. Au préalable, le maximum d'absorbance de cette solution sera déterminé par spectroscopie UV-Visible, à l'aide d'un balayage entre 300 et 700 nm. Le maximum d'absorbance obtenu est de 452 nm. C'est donc cette valeur qui sera retenue comme longueur d'onde d'excitation dans le cadre des spectres d'émission, sur un intervalle de 500 à 600 nm. Pour ce qui est des spectres d'excitation, ils seront réalisés entre 400 et 500 nm avec, comme longueur d'onde d'émission, celle permettant l'obtention d'une intensité maximale lors des spectres d'émission, en l'occurrence 520 nm.

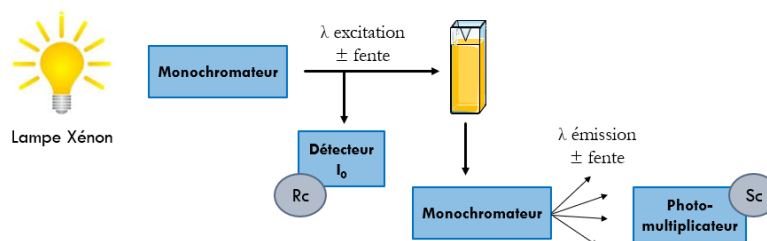


Figure 22: Fonctionnement du fluorimètre

4) Formulation des nanocapsules lipidiques

Dans ce projet, il a été choisi de formuler des NCLs de 50 nm et 100 nm selon les 2 procédés PIT et PIC. La formulation repose sur 3 principaux composants, le Kolliphor[®], le Labrafac[®] et le Span[®] 80, dont les ratios peuvent être définis selon les équations suivantes :

- Le SOR (surfactant-oil ratio) = $\frac{m_{Kolliphor} + m_{Span}}{m_{Labrafac}}$
- Le SpKR (span-kolliphor ratio) = $\frac{m_{Span}}{m_{Kolliphor}}$
- Le SOWR (surfactant-oil-water ratio) = $\frac{m_{Kolliphor} + m_{Span} + m_{Labrafac}}{m_{eau}}$

Les NCLs formulées dans ce projet ont un SOWR constant de 0,1, ce paramètre n'ayant pas d'impact sur la taille des NCLs à partir du moment où la quantité d'eau est suffisante pour l'obtention d'une émulsion H/E. En revanche, la taille des NCLs va varier en fonction des rapports SOR et SpKR et du protocole d'inversion de phase choisi. Les valeurs de ces ratios pour chacune des formulations sont présentées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3: Valeurs des ratios SOR et SpKR

	PIT 50	PIT 100	PIC 50	PIC 100
SOR	1,17	0,67	1,5	0,82
SpKR	0,23	0,33	0,2	0,29

a) Formulation selon le protocole PIT

La première étape consiste à peser les différents composants, en l'occurrence le Kolliphor[®], le Labrafac[®], le Span[®] 80, le NaCl ainsi qu'une partie de l'eau milliQ, à

hauteur d'1/5^{ème} de la quantité finale. Les masses exactes nécessaires à la formulation de NCLs de 50 et 100 nm sont résumées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Composition des NCLs en protocole PIT.

NCL	KOLLIPHOR®	LABRAFAC®	SPAN® 80	NaCl	EAU milliQ
PIT 50	440 mg	460 mg	100 mg	99 mg	2 g
PIT 100	300 mg	600 mg	100 mg	99 mg	2 g

L'échantillon subit un premier chauffage jusqu'à 85-90°C, sous une agitation intermédiaire d'environ 600 rpm. Puis, il est refroidi jusqu'à 35-40°C, toujours sous agitation. Au cours de cette phase de refroidissement, l'échantillon, d'aspect laiteux de prime abord, devient translucide. Ce changement signe le passage d'une macroémulsion à une ME. Cet aspect translucide caractéristique d'une ME apparaît dans un intervalle de température que l'on appelle zone d'inversion de phase (ZIP). Au niveau du point précis de température d'inversion de phase, la microémulsion obtenue est sous forme de système bicontinu. Ce cycle de chauffage/refroidissement est répété 3 fois. Au cours du troisième refroidissement, une fois la ZIP atteinte, le reste de la phase aqueuse (8 mL d'eau milliQ à 4°C) est ajoutée en une seule fois. L'agitation est ensuite maintenue pendant 5 minutes. Les NCLs sont caractérisées par diffusion dynamique de la lumière.

b) Formulation selon le protocole PIC

La première étape consiste également à peser les composants, selon les masses présentées dans le **Tableau 5**. Le Kolliphor®, le Labrafac® et le Span® 80, formant la phase huileuse sont ensuite homogénéisés à l'aide d'une agitation intermédiaire (environ 600 rpm) et chauffés. Lorsque le mélange atteint la température de 50°C, l'agitation est augmentée à 1200 rpm et 10 mL d'eau milliQ sont ajoutés en une seule fois. L'agitation est ensuite maintenue pendant 1 minute à un niveau fort, puis redescendue à un niveau intermédiaire pendant 1 minute supplémentaire. Les NCLs obtenues sont ensuite caractérisées par diffusion dynamique de la lumière.

Tableau 5: Composition des NCLs en protocole PIC

NCL	KOLLIPHOR®	LABRAFAC®	SPAN® 80
PIC 50	500 mg	400 mg	100 mg
PIC 100	350 mg	550 mg	100 mg

5) Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le Zetasizer® Nano-S de Malvern Instruments permet la mesure de taille des NCLs par diffusion dynamique de la lumière. Un rayon laser à 633 nm passe au travers de l'échantillon et la lumière diffusée selon un angle de 173° est collectée à l'aide d'un photomultiplicateur. L'évolution de l'intensité de la diffusion en fonction du temps est modélisée par la méthode des Cumulants, qui permet de déterminer un coefficient de diffusion et donc la taille des NCLs présentes dans l'échantillon.

Afin d'éviter les phénomènes de diffusion multiple apparaissant dans le cas d'échantillons trop concentrés, une dilution dans de l'eau milliQ est nécessaire, au 1/500^{ème} pour les NCLs de 50 nm et au 1/1500^{ème} pour les NCLs de 100 nm. La dilution est considérée comme suffisante lorsque l'atténuateur utilisé par l'appareil pour réduire l'intensité du faisceau incident est entre 8 et 9.

Le Zetasizer® Nano-S nous permet de connaître le diamètre hydrodynamique moyen, nommé Z-average (en nm), le diamètre moyen en intensité (D_{int} en nm) ainsi que le PDI (indice de polydispersité, sans unité). Chaque mesure est réalisée en triplicat par l'appareil, à une température de 25°C.

6) Tensiométrie

L'intérêt des mesures de tensiométrie est de suivre l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la température notamment dans le cadre du procédé PIT. Dans un premier temps, des mesures d'une solution de Kolliphor® à différentes concentrations, dans l'air puis dans le Labrafac® seront effectuées, sans variation de la température. Le but étant ici de définir la CMC (concentration micellaire critique) et de la comparer avec des valeurs retrouvées dans la littérature. Cela nous permettra de nous assurer de la fiabilité de la méthode utilisée. Puis des mesures de tension interfaciale seront

réalisées sur un échantillon dont la concentration en Kolliphor® correspond au procédé PIT, à différentes températures.

a) Détermination de la CMC du Kolliphor®

Ces mesures ont été menées sur une solution de Kolliphor® dans de l'eau milliQ. Un tensiomètre à goutte a été utilisé (Tracker Teclis, Longessaigne, France). Cette solution a été homogénéisée en étant chauffée à 30°C et sous agitation magnétique. Différents types de mesures ont été réalisés : des mesures instantanées sur une gamme de concentration allant de 1 µM à 10 mM et des mesures en cinétique allant de 10 µM à 457 mM sur un temps de 5 minutes afin d'atteindre l'équilibre. Il s'agit de mesures à l'interface eau/air.

b) Mesure à l'interface eau/Labrafac®

Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre à goutte, de 2 manières différentes : en goutte montante, à savoir une goutte de Labrafac® dans une solution aqueuse de Kolliphor®, sur une gamme de concentration allant de 1 µM à 10 mM, et avec un temps d'attente d'environ 5 minutes pour atteindre l'équilibre ; et en goutte pendante, à savoir une goutte de solution aqueuse de Kolliphor® dans du Labrafac®, sur une gamme de concentration allant de 10 µM à 457 mM, en cinétique.

c) Evolution de la tension interfaciale en fonction de la température.

Nous avons souhaité suivre l'évolution de la tension interfaciale sur un intervalle de température correspondant à celui du procédé PIT. Pour cela, un échantillon a été préparé selon les quantités d'excipients nécessaires à la formulation de NCLs 50 nm en procédé PIT soit : Kolliphor® : 2 200 mg, eau milliQ : 10 g, NaCl : 495 mg. Ce mélange est ensuite homogénéisé à 30°C, sous agitation. Le Labrafac® est contenu dans une cuve en quartz placée dans un portoir thermalisé par un bain marie. Une goutte de solution aqueuse est formée à l'aide d'une seringue dans la cuve de Labrafac®. Les mesures de tension sont faites en cinétique, à savoir une mesure toutes les minutes, pendant 30 minutes.

7) Rhéologie

Une parfaite compréhension des états intermédiaires est nécessaire à l'élaboration d'un procédé de production en continu. La connaissance des propriétés rhéologiques permettra une meilleure maîtrise du procédé et le contrôle des difficultés actuellement rencontrées (phénomènes d'obstruction des canaux, déphasage, création d'amas gélifiés, variation de taille des NCLs). Les analyses rhéologiques ont été menées sur des échantillons basés sur la formulation des NCLs 50 nm en procédé PIC. Plusieurs échantillons sont formulés avec différentes fractions de phase aqueuse. Pour cela, 2 solutions mères ont été préparées ; une phase huileuse composée de Kolliphor® (50%), de Labrafac® (40%) et de Span® 80 (10%) ; ainsi qu'une phase aqueuse composée d'eau milliQ et de NaCl (1 mM). La phase huileuse est portée, sous agitation, à 30°C, température à laquelle la phase aqueuse est ajoutée en différentes proportions, de 0 à 0,9. L'agitation est maintenue pendant 5 minutes. L'agitation ayant entraînée la formation de bulles d'air surtout sur les échantillons les plus visqueux, ceux-ci ont subi une étape de sonication à 80 kHz, avec une température maintenue à 30°C et pour une durée de 10 à 40 min en fonction de la quantité de bulles. Deux lots de cette solution ont été réalisés.

Diverses mesures ont été exécutées à l'aide d'un rhéomètre Kinexus Pro équipé d'un rotor de géométrie cône plan, d'un diamètre de 40 mm et formant un angle de 2° avec la surface immobile.

a) Mesure de viscosité en rampe de vitesse de cisaillement

Les mesures se font à 30°C et sur une durée de 30 minutes. La vitesse de cisaillement varie de 1 s^{-1} à $1\,000 \text{ s}^{-1}$, à l'exception des échantillons les plus visqueux en milieu de gamme, à savoir pour les fractions d'eau entre 0,25 et 0,375 où la vitesse de cisaillement varie entre $0,1 \text{ s}^{-1}$ et 100 s^{-1} . 3 allers-retours sont réalisés sur cet intervalle. L'analyse a été menée 2 fois pour chaque lot.

b) Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement constante

Les mesures se font également à 30°C. Deux vitesses de cisaillement ont été choisies : 50 s^{-1} et 500 s^{-1} , ou 5 s^{-1} et 50 s^{-1} pour les échantillons les plus visqueux (de 25 % massique en eau à 37,5 % massique en eau). Le rhéomètre prendra 10 mesures,

chacune espacée de 10 secondes, pour les 2 vitesses de cisaillement. L'analyse a été menée 2 fois pour chaque lot.

c) Mesure en oscillation

Dans un premier temps, il est nécessaire de réaliser un balayage en amplitude. Il s'agit de faire varier la contrainte de cisaillement entre 1% et 1 500%, sous une fréquence de 1 Hz. La progression se fait selon un mode logarithmique et 10 mesures sont réalisées par décade. La température est toujours de 30°C.

Puis, un balayage en fréquence est réalisé. Contrairement au balayage en amplitude, ici la fréquence varie entre 0,1 Hz et 100 Hz alors que la contrainte de cisaillement est constante et est fixée en fonction de la limite de linéarité obtenue sur la courbe en balayage en amplitude. La progression est logarithmique, avec 10 mesures par décade.

8) Conductimétrie

Les échantillons formulés pour les études rhéologiques ont également servi à des mesures de conductivité. Ces échantillons sont composés de Kolliphor[®], Labrafac[®] et Span[®] 80, selon les masses nécessaires à la formulation de NCLs PIC 50 nm. La solution mère est homogénéisée par agitation à 30°C, puis la phase aqueuse, composée d'eau milliQ et de NaCl 1 mM, est ajoutée en différentes proportions comprises entre 0 et 0,9. L'agitation est maintenue pendant 5 minutes. Les mesures de conductimétrie ont été réalisées sur 2 lots différents, aussitôt après la formulation ou 48h après. Les mesures sont faites à 30°C.

9) Préparation du milieu simulé FeSSIF

La préparation du milieu FeSSIF requiert, dans un premier temps, la préparation de plusieurs solutions, l'une à base de lécithine à 100 mg/mL, l'autre à base de glycéryl monooléate à 50 mg/mL, toutes deux dans du dichlorométhane. Séparément, un tampon blanc à base d'eau osmosée contenant du NaOH (3,2652 mg/mL), de l'acide maléique (6,386 mg/mL) ainsi que du NaCl (7,3342 mg/mL) est préparé. Le pH de ce tampon est ajusté à 5,8. Le sodium taurocholate est ensuite ajouté à ce tampon blanc,

à hauteur de 5,377 mg/mL. Pour un volume de 100 mL de tampon blanc, il est ajouté 1,536 mL de la solution de lécithine ainsi que 3,656 mL de la solution de glycéryl monooléate. Ces deux solutions étant à base de dichlorométhane, un évaporateur rotatif est utilisé comme suit : 15 minutes à 40°C et 650 mbar puis 15 minutes à 100 mbar après chacun de ces ajouts afin d'éliminer toute trace de solvant. La solution alors obtenue est conservée à 4°C.

Dans un second temps, une solution de pancréatine à 10 000 U/mL dans de l'eau est préparée. Cette solution aqueuse subit ensuite un cycle de centrifugation de 15 minutes à 5°C et 4 000 rpm. 1 mL du surnageant obtenu à l'issue de cette étape est ajouté au tampon préparé au cours de la première étape. Enfin, pour un volume final de 100 mL de milieu, du chlorure de calcium (0,5549 mg/mL) est ajouté. Le pH du milieu doit être ajusté à 5,8 si nécessaire.

10) Séparation des NCLs du milieu FeSSIF

Dans le but de s'assurer de la stabilité biopharmaceutique des NCLs, celles-ci seront mises dans des milieux gastriques et intestinaux simulés. Leur stabilité sera contrôlée par des mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière sur des prélèvements réguliers. Toutefois, pour que la mesure soit fiable, il faut que les NCLs soient séparées des nano-objets présents dans le milieu. Des méthodes de séparation ont déjà été définies pour le FaSSGF et le FaSSIF-V2, en l'occurrence une filtration et une centrifugation respectivement qui ne se sont pas avérées suffisantes pour le milieu FeSSIF-V2. Nous avons donc testé un protocole d'ultracentrifugation. Ainsi, 4 types d'échantillons ont été préparés : (i) une suspension A contenant 200 µL de NCLs + 1 800 µL de milieu FeSSIF ; (ii) une suspension B contenant 200 µL de NCLs + 1 800 µL d'eau osmosée ; (iii) 2 mL de milieu FeSSIF seul ; (iv) 2 mL d'eau osmosée seule.

Ces échantillons (200 µL) seront ensuite soumis à une ultracentrifugation de 2h à 4°C et à 95 000 rpm (349 000 x g). Le surnageant des échantillons contenant des NCLs aura une partie supérieure légèrement trouble, due à un crémage de ces dernières. Les surnageants seront prélevés (100 µL) puis dilués au 1/5^{ème} dans de l'eau osmosée, avant d'être analysés en DLS.

IX. Résultat

1) Mesure de solubilité du β -carotène dans le Labrafac[®] par dosage spectroscopique

Préalablement à la formulation de NCLs, il est nécessaire de savoir quelle quantité de β C peut être dissoute dans le Labrafac[®]. C'est dans ce but que des mesures de solubilité ont été entreprises. Dans un premier temps, des spectres ont été réalisés sur l'ensemble des solutions afin de déterminer le maximum d'absorption, mais également de s'assurer que celles-ci ne contenaient aucune poussière pouvant interférer avec le résultat. Ces spectres sont visibles en **Figure 23**.

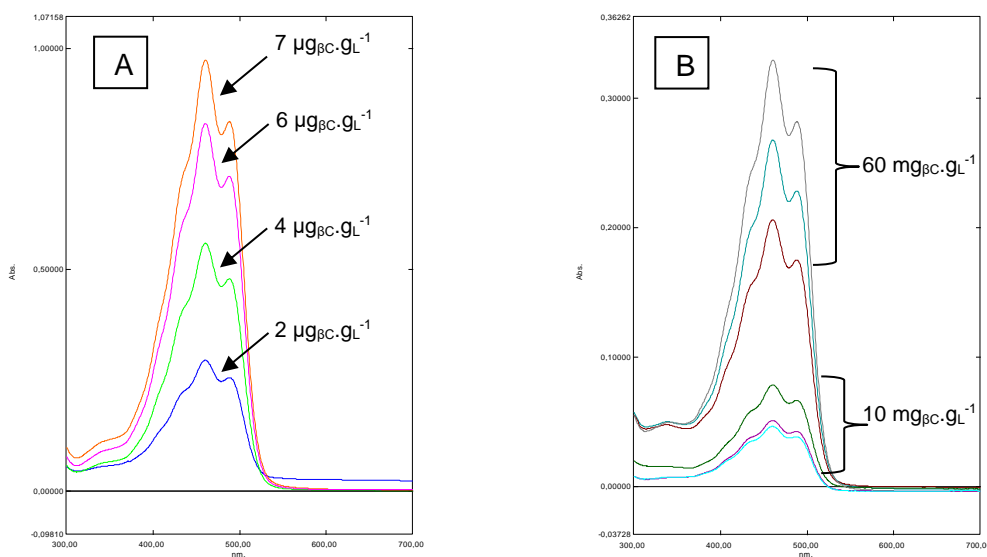


Figure 23: Spectre des solutions de β -carotène + Labrafac[®]. A: Spectre des points de gamme [β C] = 2 à 7 $\mu\text{g}_{\beta\text{C}}/\text{g}_L$. B: Spectre des solutions de β -carotène à 10 et 60 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_L$ diluées au 1/10 000ème.

Nous pouvons constater sur ces spectres que nos échantillons ont bien le pic caractéristique du β C avec un épaulement, suivi d'un premier pic, puis d'un deuxième légèrement inférieur. Cette forme est la preuve de l'absence d'impuretés dans la solution.

Une courbe d'étalonnage (**Figure 24**) fut réalisée et les concentrations en β C des 6 solutions en excès (3 solutions à 10 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_L$ et 3 solutions à 60 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_L$) ont été estimées à partir de cette courbe. Les mesures sont faites à une longueur d'onde de 460 nm, correspondant à l'absorbance maximale du β C dans le Labrafac[®]. Les absorbances obtenues pour les points de la courbe d'étalonnage se trouvent entre 0,296 et 0,974. Le coefficient de corrélation (R^2) est de 0,999, prouvant la linéarité de

la courbe d'étalonnage. Lors d'un deuxième essai, le R^2 obtenu était de 0,997. Toutefois, il est à noter que le 3^{ème} essai permettant d'affirmer la linéarité n'a pu être réalisé en raison des conditions sanitaires.

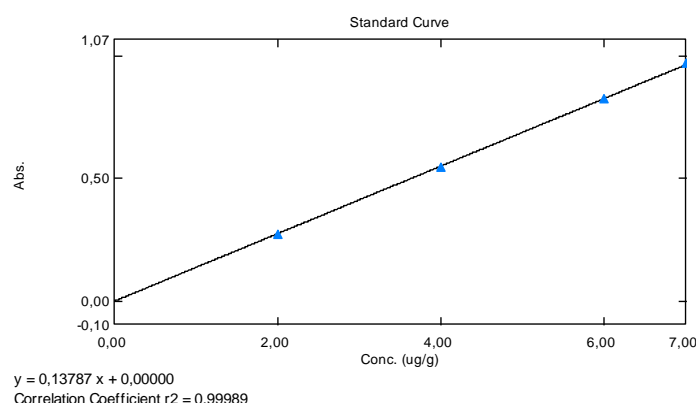


Figure 24: Courbe d'étalonnage d'une solution de β -carotène + Labrafac[®], 460 nm (moyenne des 3 mesures de l'appareil, écart-type confondus avec les points)

L'estimation de la concentration des solutions à 10 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ est de $4,295 \pm 1,248$ $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ (moyenne \pm écart-type, $n=3$). Les solutions à 60 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ ont une concentration estimée à $19,486 \pm 4,490$ $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ (moyenne \pm écart-type, $n=3$). Au vu de ces résultats, détaillés dans le **Tableau 6**, il semblerait que la concentration en βC dissous soit dépendante de la quantité initiale de βC mise en solution et donc de la cinétique de solubilisation. Nous pouvons constater une mauvaise répétabilité des résultats, signe d'une probable faille dans le protocole.

Tableau 6: Absorbance des solutions de β -carotène à 10 et 60 $\text{mg}_{\beta\text{C}}/\text{g}_\text{L}$ (moyenne des 3 mesures de l'appareil \pm écart-type)

Essai	$[\beta\text{C}]_{\text{théorique}}$ ($\text{mg}_{\beta\text{C}}\cdot\text{g}_\text{L}^{-1}$)	Absorbance à 460 nm	$[\beta\text{C}]_{\text{mesurée}}$ ($\text{mg}_{\beta\text{C}}\cdot\text{g}_\text{L}^{-1}$)
1	10	$0,047 \pm 4,52 \cdot 10^{-5}$	3,4338
2		$0,079 \pm 8,03 \cdot 10^{-5}$	5,72591
3		$0,051 \pm 6,21 \cdot 10^{-5}$	3,72567
1	60	$0,206 \pm 2,04 \cdot 10^{-5}$	14,96952
2		$0,330 \pm 4,45 \cdot 10^{-5}$	23,94994
3		$0,269 \pm 5,76 \cdot 10^{-5}$	19,53741

Ces essais ont toutefois permis d'obtenir un ordre de grandeur de la quantité de βC qui peut être solubilisé dans le Labrafac[®].

2) Mesure de fluorescence

Pour réaliser les mesures de fluorescence, une solution à 20 mg/L a été utilisée. Cette solution mère a été obtenue en pré-solubilisant le β C dans du dichlorométhane avant de le solubiliser dans de l'éthanol absolu. Ainsi, dans la solution mère, le dichlorométhane est présent à hauteur de 1%. Cette solution a été diluée afin d'obtenir une solution finale dont le maximum d'absorbance (λ_{\max}) est inférieur au seuil de 0,13. Ce seuil découle de la loi de Beer-Lambert et permet à l'intensité de fluorescence d'être proportionnelle à la concentration de la solution analysée. Les mesures de spectroscopie UV-Visible d'une solution diluée à 0,5 mg/L dans de l'éthanol montrent une absorbance maximale à une longueur d'onde de 452 nm. Un deuxième pic est présent à 478 nm. L'absorbance est de 0,07595, soit inférieure au seuil de 0,13.

Lors de l'analyse en fluorescence, plusieurs largeurs de fente ont été testées, comme visible en **Figure 22**. Les courbes les plus lisses sont obtenues avec une fente de 10 nm en excitation et de 5 nm en émission pour les 2 types de spectres. Plus en détails, sur le spectre en émission, le signal maximal apparaît quand $\lambda = 520$ nm. Le spectre en excitation comporte 2 pics, tout comme le spectre en absorbance, à 451 et 481 nm. Les intensités des signaux sont de 328 950 CPS (coups par seconde) à 520 nm pour le spectre en émission et de 328 270 CPS et 188 770 CPS respectivement à 451 nm et 481 nm pour le spectre en excitation. Les spectres obtenus sont représentés en **Figure 25**. Ces mêmes essais seront faits sur une solution de β C dans du Labrafac[®] ainsi qu'avec des NCLs chargées en β C. L'objectif ici est de quantifier les micelles résiduelles qui se forment en plus des NCLs lors des procédés PIT et PIC et de corroborer les résultats avec ceux obtenus précédemment au laboratoire sur une sonde Dil.

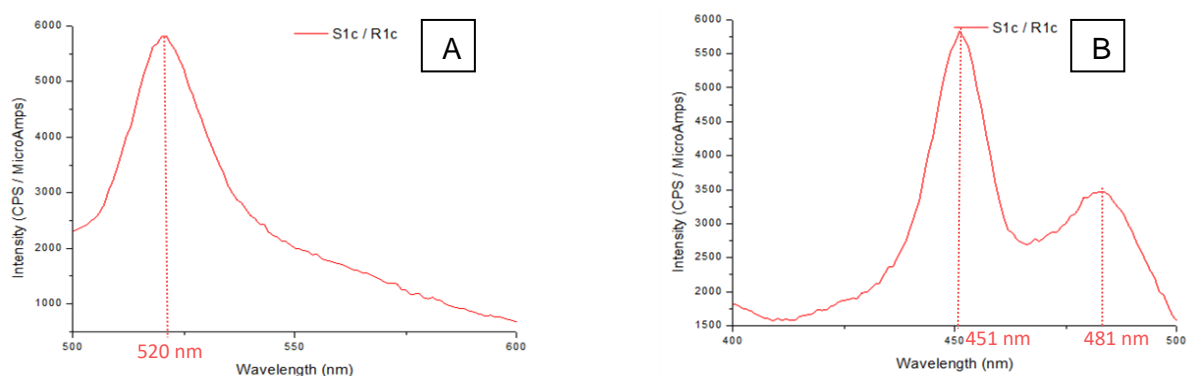


Figure 25: Solution de β -carotène + EtOH 0,5 mg/L. A: Spectre d'émission; B: Spectre d'excitation.

3) Formulation de nanocapsules lipidiques

Comme le décrivent Heurtault *et al.*(62), les NCLs ont une structure dite cœur-couronne. Dans notre cas, le cœur sera lipophile et composé de Labrafac[®]. La coque, quant à elle, sera formée de deux tensioactifs, le Kolliphor[®] et le Span[®] 80. Le β C en tant que molécule lipophile, se placera probablement au niveau du cœur lipophile. Une représentation de la structure des NCLs est disponible en **Figure 26**.

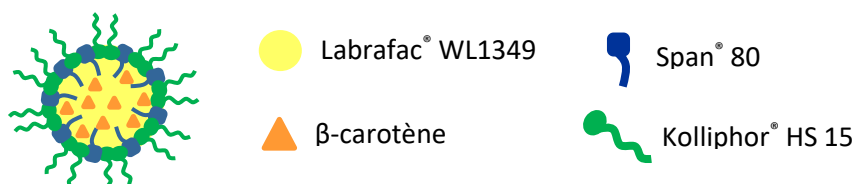


Figure 26: Structure des NCLs chargées en β -carotène

Dans un premier temps, nous avons réalisé des NCLs n'encapsulant aucun principe actif, aussi appelées NCLs blanches. Dans le cas du procédé PIT, l'ajout d'eau a été effectué entre 55°C et 65 °C. Quatre formulations sont obtenues selon que le protocole choisi soit le procédé PIT ou PIC et selon que la taille des NCLs soit de 50 ou 100 nm. Les **Tableaux 7 et 8**, regroupent les résultats des analyses DLS pour ces 4 formulations. Pour ce qui est des NCLs de 50 nm, la méthode PIC nous permet d'obtenir des NCLs entre 44 nm et 46 nm en Z-average alors que la méthode PIT permet la formation de NCLs entre 50 nm et 52 nm. Nous pouvons remarquer une différence de taille de l'ordre de 6 nm entre les NCLs obtenues en PIC et en PIT. Le PDI est situé entre 0,088 et 0,104 pour le procédé PIC et entre 0,036 et 0,048 pour le procédé PIT. Si les deux procédés permettent l'obtention de population monodisperse, le procédé PIT semble montrer une meilleure monodispersité. Pour les NCLs de 100 nm, aucune différence n'est notée entre le procédé PIC et le procédé PIT avec des tailles respectives entre 97 nm - 98 nm et 97 nm. Pour ce qui est du PDI, il est compris entre 0,117 et 0,122 pour le procédé PIC mais est inférieur avec le procédé PIT, avec un intervalle entre 0,053 et 0,072. Ainsi, la même conclusion s'applique pour les NCLs 50 nm et 100 nm, à savoir une meilleure monodispersité en procédé PIT.

Tableau 7: Caractéristiques granulométriques des NCLs blanches 50 nm en procédé PIC et PIT (moyenne \pm écart-type sur 3 mesures de l'appareil)

Nom	Z-average (nm)	PDI	D _{INT} (nm)	
			Taille	Largeur du pic
NCL PIC 50 .1	44 \pm 0,3	0,104 \pm 0,011	49 \pm 0,5	16 \pm 0,7
NCL PIC 50 .2	45 \pm 0,4	0,088 \pm 0,016	50 \pm 1,0	15 \pm 1,5
NCL PIC 50 .3	46 \pm 0,1	0,099 \pm 0,020	51 \pm 0,3	17 \pm 1,1
NCL PIT 50 .1	51 \pm 0,3	0,042 \pm 0,010	54 \pm 0,2	13 \pm 0,5
NCL PIT 50 .2	50 \pm 0,3	0,036 \pm 0,004	53 \pm 0,2	13 \pm 0,4
NCL PIT 50 .3	52 \pm 0,4	0,048 \pm 0,025	55 \pm 0,4	14 \pm 1,5

Tableau 8: Caractéristiques granulométriques des NCLs blanches 100 nm en procédé PIC et PIT (moyenne \pm écart-type sur 3 mesures de l'appareil)

Nom	Z-average (nm)	PDI	D _{INT} (nm)	
			Taille	Largeur du pic
NCL PIC 100 .1	98 \pm 0,3	0,117 \pm 0,016	108 \pm 0,7	36 \pm 0,5
NCL PIC 100 .2	98 \pm 0,4	0,117 \pm 0,012	106 \pm 4,4	34 \pm 5,3
NCL PIC 100 .3	97 \pm 0,4	0,122 \pm 0,020	112 \pm 2,6	42 \pm 5,2
NCL PIT 100 .1	97 \pm 0,9	0,055 \pm 0,010	103 \pm 0,8	27 \pm 1,0
NCL PIT 100 .2	97 \pm 0,6	0,053 \pm 0,017	104 \pm 1,3	29 \pm 3,3
NCL PIT 100 .3	97 \pm 0,3	0,072 \pm 0,006	105 \pm 0,8	29 \pm 1,0

Les mesures présentées dans ces tableaux serviront de référence afin de s'assurer que l'encapsulation du β C n'a pas d'impact sur les propriétés granulométriques des NCLs.

4) Tensiométrie

a) Détermination de la CMC du Kolliphor® :

Ces mesures ont été effectuées sur du Kolliphor® solubilisé dans de l'eau milliQ. L'objectif est de retrouver la valeur de la CMC de la littérature, pour s'assurer que nos conditions de mesures sont fiables. Le premier graphique (**Figure 27 A**) représente la tension superficielle d'une phase aqueuse de Kolliphor® en fonction de la concentration en Kolliphor® sur un intervalle de 1 μ M à 10 mM. Cette première courbe montre bien une diminution de la tension avec l'augmentation de la concentration en Kolliphor®. Le point d'inflexion de cette courbe indiquant la CMC semble se trouver vers 0,1 mM, cohérent avec la littérature situant la CMC du Kolliphor® entre 60 μ M et 100 μ M.(107)

Un deuxième essai a ensuite été réalisé sur une gamme en concentration différente afin d'y inclure les concentrations utilisées lors des formulations en PIT et en PIC. Ce deuxième essai est réalisé en cinétique afin d'obtenir une valeur de tension à l'équilibre. Sur cette courbe (**Figure 27 B**), le point d'inflexion semble plutôt se trouver sur une concentration de 0,5 mM, puis la tension se stabilise et tend vers un plateau. Il convient de préciser que la solution ne semblait pas entièrement homogène aux plus fortes concentrations. Des valeurs de tension plus faibles sont obtenues en début de courbe, aux concentrations les plus basses, en comparaison du premier essai. Cet écart est attribué au fait que ces mesures sont faites en cinétique pour plus de fiabilité.

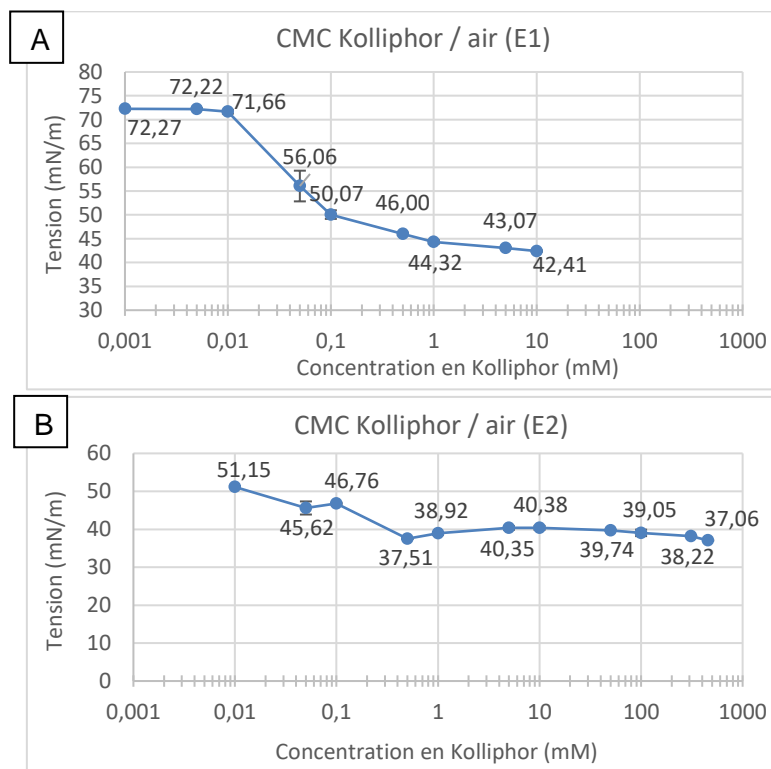


Figure 27: Graphiques représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor® et l'air. A : moyenne et écart-type sur 5 mesures (sans temps d'attente) ; B : moyenne et écart-type sur 20 mesures (en cinétique)

Dans un second temps, ces mesures ont été mises en œuvre sur un système Kolliphor®/Labrafac®. Ces mesures sont réalisées sur un intervalle de concentration de 1 μ M à 10 mM et de 10 μ M à 457 mM respectivement pour le premier et le deuxième essai. Les résultats sont présentés dans les graphiques en **Figure 28 A et B**. Tout comme précédemment, la tension décroît avec l'augmentation de la concentration. L'essai 2, réalisé en cinétique, nous permet de nous rapprocher de la valeur de 11,5 mN/m, issue de la littérature(108) pour une concentration à 0,1 mM.

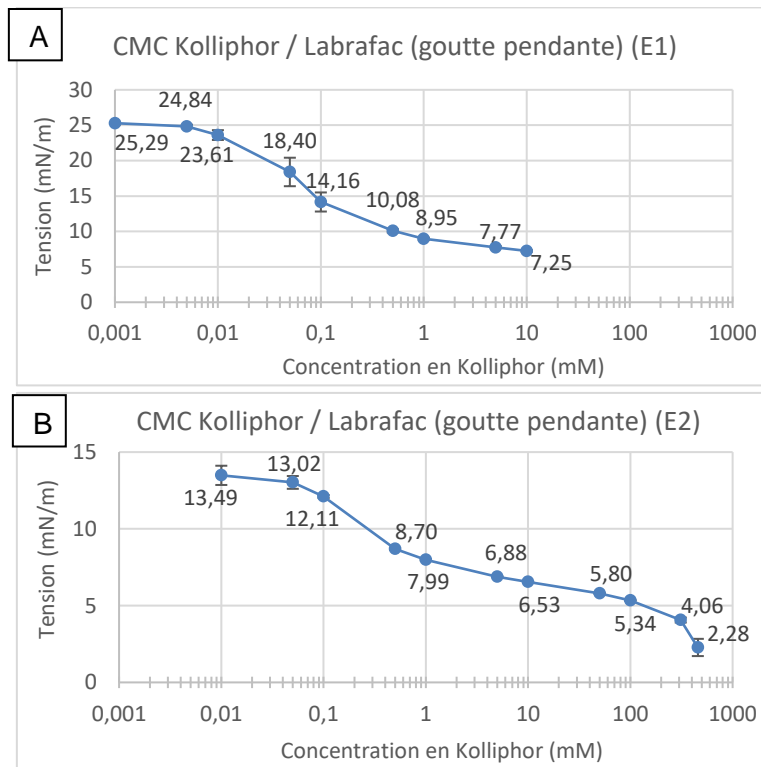


Figure 28: Graphiques représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor® et du Labrafac® en goutte pendante. A: moyenne et écart-type sur 5 mesures (sans temps d'attente) ; B: moyenne et écart-type sur 20 mesures (en cinétique)

Comme attendu, les mesures réalisées en goutte montante lors de l'essai 1 (**Figure 29**) montrent des résultats proches de ceux obtenus en goutte pendante, permettant de valider la méthode.

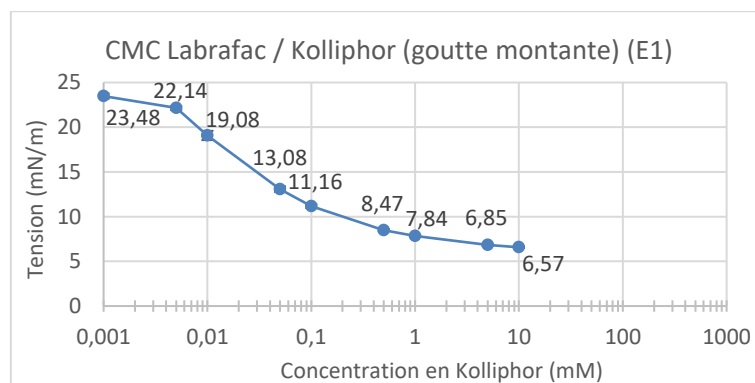


Figure 29: Graphique représentant des mesures de tension entre une solution de Kolliphor® et du Labrafac® en goutte montante. Moyenne et écart-type sur 5 mesures (temps attente d'environ 5 minutes)

b) Evolution de la tension interfaciale en fonction de la température :

L'objectif ici est de tracer l'évolution de la tension en fonction de la température. Pour cette analyse, une solution (Kolliphor®, NaCl, eau milliQ) a été préparée selon les quantités d'excipients nécessaires à la formulation de NCLs 50 nm en PIT. Des gouttes de cette solution sont formées dans un contenant rempli de Labrafac® et chauffées à différentes températures entre 25°C et 70°C. Les mesures sont faites en cinétique sur une durée de 30 minutes. Les résultats de ces mesures sont présentés en **Figure 30**. La courbe montre très nettement une diminution de la tension interfaciale au fur et à mesure que la température augmente, jusqu'à atteindre des valeurs très basses. Le graphique ci-dessous montre la moyenne des 5 dernières mesures excepté pour la mesure à 70°C où une seule mesure a pu être effectuée. Cela s'explique par la très faible valeur de tension obtenue, probablement à la limite du seuil de détection de l'appareil.

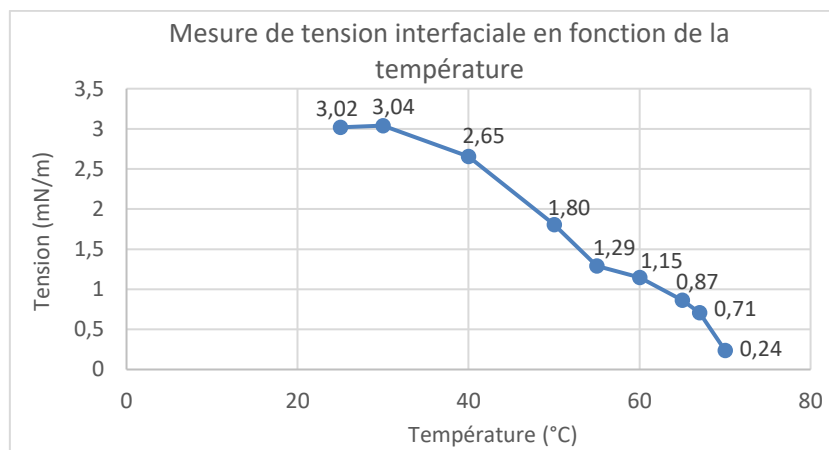


Figure 30: Mesure de tension interfaciale d'une solution PIT 50 dans du Labrafac®. Moyenne et écart-type sur 5 mesures (sauf mesure à 70°C). Mesure en cinétique, 30 minutes

5) Rhéologie

a) Mesure de viscosité en rampe de vitesse de cisaillement

Deux types de graphiques peuvent être obtenus avec ces mesures, le premier représentant la contrainte de cisaillement (en Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement (en s^{-1}) et le second représentant la viscosité (en $Pa \cdot s$) en fonction de la vitesse de cisaillement (en s^{-1}) (**Figure-A 1**, en annexe).

Le graphique représentant la contrainte de cisaillement montre une droite sur les échantillons correspondant aux fractions d'eau 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 0,7 et 0,9. Si cet aspect linéaire semble nous indiquer un comportement newtonien, l'évolution de la viscosité nous oriente plutôt vers un comportement rhéofluidifiant avec toutefois un plateau newtonien au niveau des bornes de l'intervalle de la vitesse de cisaillement (faibles et fortes vitesses). Plus en détails, les échantillons comportant une fraction d'eau de 0 et 0,1 sont newtoniens aux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle en vitesse de cisaillement. Les échantillons ayant une fraction d'eau entre 0,2 et 0,4 sont eux principalement rhéofluidifiant avec parfois une extrémité newtonienne. Enfin, les échantillons de 0,5 à 0,9 sont newtoniens sur l'ensemble de la gamme de vitesse testée avec toutefois une évolution aléatoire de la courbe aux vitesses les plus basses pour les échantillons 0,7 et 0,9 due à une valeur de couple du moteur actionnant la rotation du mobile trop faible.

b) Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement constante

Ces mesures nous permettent de tracer l'évolution de la viscosité des échantillons en fonction de la fraction d'eau, pour une vitesse de cisaillement prédéfinie, en l'occurrence 50 s^{-1} . Il apparaît sur les 4 essais réalisés que le maximum de viscosité se trouve à une fraction d'eau de 0,35. Les viscosités maximales sont de 3,351 Pa.S ; 3,059 Pa.S ; 3,618 Pa.S et 3,912 Pa.S respectivement pour les essais 1, 2, 3 et 4 (**Figure 31**).

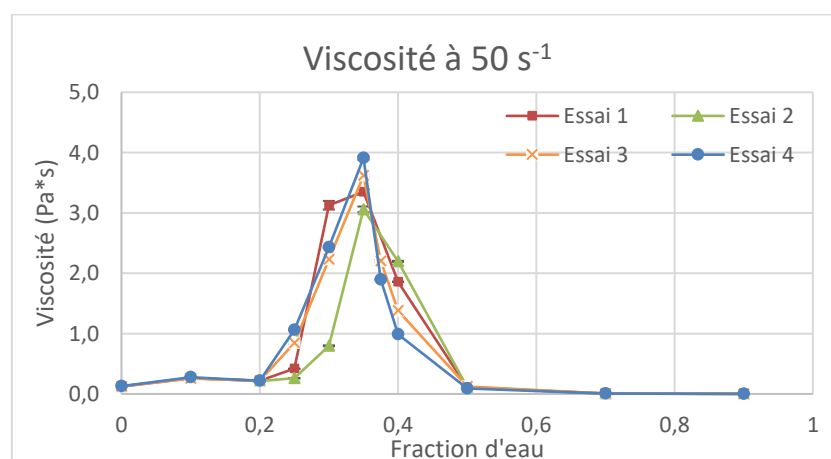


Figure 31: Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement constante (50 s^{-1}). Moyenne et écart-type de 10 mesures.

c) Mesure en oscillation

Les mesures en oscillation ont pour objectif de mieux définir ce qu'il se produit au moment de l'inversion de phase. En effet, lors de l'inversion de phase, la viscosité devient très importante, traduisant une grande structuration de l'échantillon. Les mesures en oscillation permettent ainsi d'accéder à d'autres paramètres que la viscosité sans dénaturer la structure de l'échantillon. Plusieurs paramètres seront regardés : le module élastique G' , le module visqueux G'' et l'angle de phase. Un angle de 90° , signe d'un déphasage entre la déformation et la contrainte, est caractéristique d'un liquide 100% newtonien (le module G' est alors nul). A l'inverse, un angle de 0° , preuve que la contrainte et la déformation sont en phase montre la présence d'un solide parfait élastique (le module G'' est alors nul). Lorsque l'angle est compris entre 0 et 90° , alors le fluide est qualifié de visco-élastique possédant alors des valeurs non nulles de G' et G'' .

Les échantillons les plus visqueux du premier lot ont été testés. Dans un premier temps, un balayage en amplitude est réalisé afin de déterminer l'amplitude de déformation pour laquelle l'évolution des modules G' et G'' est linéaire. C'est parmi cette zone de linéarité qu'est fixée la déformation de cisaillement requise pour les mesures de balayage en fréquence. Ainsi cette déformation a été fixée à 10% pour l'échantillon à 0,1 de fraction d'eau ; 1,5% pour celui à 0,25 ; 50% pour une fraction en eau de 0,3 ; 15% pour l'échantillon à 0,35 et enfin 10% pour celui à 0,4. Les échantillons à 0,1 et 0,25 de fraction d'eau ne présentant aucune linéarité, la déformation choisie est la déformation minimale permettant d'obtenir une mesure fiable (basée sur une valeur de couple $> 5 \cdot 10^{-6}$ N.m). L'angle de phase tend vers 90° mais se trouve généralement aux alentours de $72-80^\circ$. Les mesures en fréquence montrent un module visqueux G'' supérieur au module élastique G' . Ces deux courbes sont croissantes et l'angle de phase est décroissant (**Figure 32**).

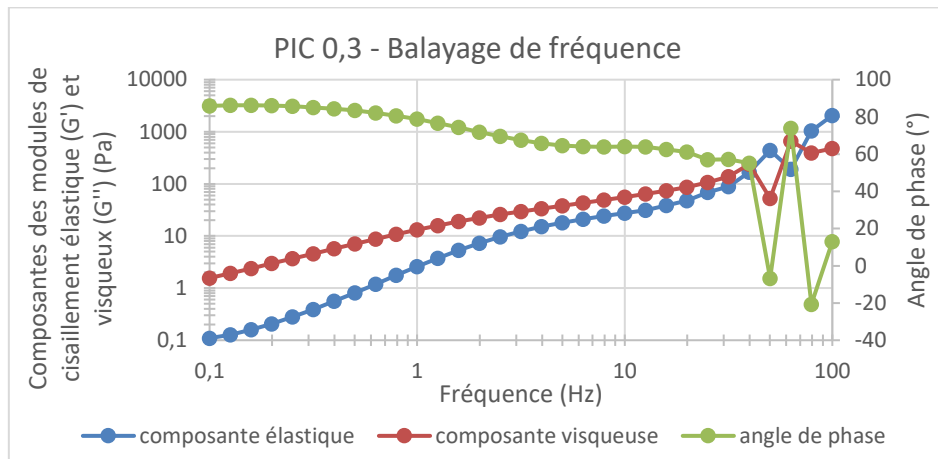


Figure 32: Mesures en oscillation

6) Conductimétrie

3 séries de mesures de conductimétrie ont été menées sur les échantillons à différentes fractions d'eau du lot 1 et du lot 2. Une première série de mesures a été effectuée sur le lot 1, 48h après la formulation, puis 2 séries de mesures sur le lot 2, juste après la formulation des échantillons et 48h après la formulation. Ces 3 courbes (**Figure 33**) montrent un profil similaire, à savoir une augmentation de la conductivité qui atteint son maximum pour une fraction d'eau de 0,6 et de 0,7 respectivement pour les lots 1 et 2. Puis la conductivité décroît. L'augmentation devient plus franche pour les fractions en eau supérieures à 0,3 pour le lot 1 et 0,2 pour le lot 2.

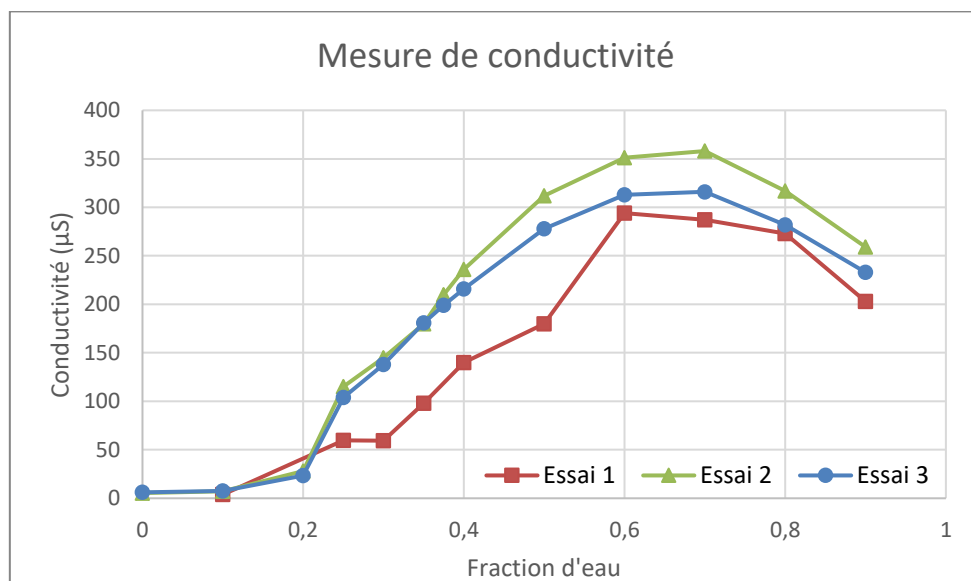


Figure 33: Mesures de conductivité à différentes fractions d'eau

7) Séparation des NCLs du milieu FeSSIF

Les NCLs ayant été utilisées pour ces essais sont issues du procédé PIT et ont une taille de $52 \pm 0,1$ nm (Z-average), un PDI de $0,036 \pm 0,009$ et un D_{int} de $55 \pm 0,3$ nm. 2 essais ont été réalisés. Les suspensions A (200 μ L NCLs + 1 800 μ L FeSSIF), B (200 μ L NCLs + 1 800 μ L eau osmosée) ainsi que le milieu FeSSIF seul ont été analysés en DLS avant et après ultracentrifugation. L'eau osmosée ayant servi à la réalisation des suspensions et à la dilution préalable à l'analyse DLS a également été analysée par cette même méthode afin de confirmer l'absence d'impuretés.

Les moyennes obtenues pour les 2 mesures réalisées sur le milieu FeSSIF sont présentées dans le **Tableau 9**. Plus en détails, 6 populations sont identifiées. Une première population se trouve dans l'intervalle 146 nm – 222 nm. Elle représente 0% à 52,3% de l'intensité de lumière diffusée et correspond probablement à des vésicules formées par les phospholipides présents dans le milieu FeSSIF. Parmi les populations majoritaires nous pouvons également noter une population entre 437 nm et 560 nm pour 0% à 68% d'intensité, ainsi qu'une troisième entre 1 191 nm et 1 628 nm présente jusqu'à 49% en intensité. Deux autres populations, de tailles comprises entre 30 nm et 45 nm (0% - 11,7%) ainsi qu'entre 52 nm et 67 nm (0% - 32,5%) peuvent correspondre à des micelles gonflées. La dernière population est comprise entre 4 932 nm et 5 068 nm (0% - 4,1%). Ces résultats sont en accord avec une forte hétérogénéité du milieu FeSSIF.

Tableau 9: Caractéristiques granulométriques du milieu FeSSIF avant ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).

FeSSIF seul avant UC	Pic 1			Pic 2			Pic 3		
	D_{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D_{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D_{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	$173 \pm 42,9$	$91,3 \pm 29,9$	48,7	$1347 \pm 244,1$	$783,8 \pm 222,1$	45,1	$38 \pm 10,7$	$10,2 \pm 3,8$	6,0
	$514 \pm 67,1$	$208,3 \pm 28,4$	66,3	$5008 \pm 54,5$	$605,5 \pm 32,4$	2,9	$60 \pm 7,7$	$17,5 \pm 3,0$	30,8

Après le procédé d'ultracentrifugation, 3 populations sont distinguées dans le milieu FeSSIF (dont les moyennes sont présentées dans le **Tableau 10**). L'une de ces populations est fortement majoritaire. Elle est située entre 190 nm et 266 nm et est présente dans toutes les mesures effectuées avec une intensité comprise entre 74,6% et 100%. Cette population pourrait correspondre à des vésicules phospholipidiques. La présence de micelles est également supposée avec une population entre 36 nm –

50 nm (0% - 4%). Une autre population est présente mais minoritaire : 4 481 nm – 5 560 nm (0% - 7,1%).

Tableau 10: Caractéristiques granulométriques du milieu FeSSIF après ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).

FeSSIF seul après UC	Pic 1			Pic 2			Pic 3		
	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	214 \pm 8,8	104,2 \pm 17,8	99,0	4716 \pm 332,3	760,6 \pm 179,5	1,0			
	197 \pm 6,8	85,1 \pm 7,2	99,2	4602	827,4	0,8			
Essai 2	232 \pm 20,8	107,0 \pm 4,3	88,0	5254 \pm 275,0	361,9 \pm 318,2	2,6	43 \pm 9,9	8,6 \pm 1,3	1,9
	226 \pm 20,0	141,2 \pm 47,0	95,8	4929 \pm 334,4	640,9 \pm 212,0	4,2			
	257 \pm 13,0	129,7 \pm 14,2	93,4	4836 \pm 170,5	707,6 \pm 97,7	6,6			

Comme attendu, la suspension B est monodisperse avant ultracentrifugation. Seule la population de NCLs est présente avec un D_{int} entre 55 nm et 56 nm (**Tableau 11**). Si après le procédé d'ultracentrifugation, les échantillons sont toujours monodisperses, les NCLs sont légèrement plus volumineuses, avec un diamètre interne oscillant entre 59 nm et 66 nm (**Tableau 12**). Toutefois, les NCLs ne sont pas déstabilisées par le procédé d'ultracentrifugation.

Tableau 11: Caractéristiques granulométriques de la suspension B avant ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).

Suspension B avant UC	Pic 1		
	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	55 \pm 0,5	13,4 \pm 0,6	100
Essai 2	56 \pm 0,7	14,1 \pm 1,0	100

Tableau 12: Caractéristiques granulométriques de la suspension B après ultracentrifugation (moyenne \pm écart-type des 3 mesures de l'appareil).

Suspension B après UC	Pic 1		
	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	63 \pm 0,2	20,1 \pm 0,7	100
	59 \pm 0,3	18,9 \pm 0,6	100
	60 \pm 0,4	22,4 \pm 5,5	100
Essai 2	61 \pm 0,7	18,7 \pm 1,6	100
	62 \pm 0,5	20,6 \pm 1,2	100
	65 \pm 0,7	21,6 \pm 0,9	100
	62 \pm 0,8	19,3 \pm 0,5	100

En ce qui concerne la suspension A (NCLs et milieu FeSSIF), cette dernière est polydispense. Avant ultracentrifugation, la population principale est probablement celle des micelles (20 nm – 29 nm ; 0% - 67,6%). Les moyennes des tailles des autres populations sont présentées dans le **Tableau 13**, leurs ordres de grandeurs sont variables. Il est à noter que l'une des mesures a permis de détecter une population majoritaire (99,5%) à 66 nm. Cette mesure pourrait correspondre aux NCLs.

Tableau 13: Caractéristiques granulométriques de la suspension A avant ultracentrifugation (moyenne ± écart-type des 3 mesures de l'appareil).

Suspension A avant UC	Pic 1			Pic 2			Pic 3		
	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	28 ± 0,9	7,7 ± 0,9	66,0	2350 ± 135,2	1090,7 ± 127,5	33,9	336	60,8	0,1
Essai 2	66 ± 1,2	24,5 ± 1,5	99,5	4964	624,7	0,5			
	21 ± 1,3	4,8 ± 0,1	53,3	5060 ± 104,8	568,0 ± 71,6	2,7	811 ± 24,1	279,1 ± 18,5	43,9

Après l'ultracentrifugation (**Tableau 14**), la population supposée être des micelles est toujours la population principale (22 nm – 30 nm ; 90,3% - 100%). Parmi les autres populations, entre 437 nm et 519 nm (0% - 8,6%) ; deux pics seuls et présents sur une seule mesure, l'un à 1 049 nm et l'autre à 2 997 nm représentant respectivement 2,5% et 7,7%. Enfin, une dernière population entre 4 234 nm et 5 316 nm (0% - 9,4%).

Tableau 14: Caractéristiques granulométriques de la suspension A après ultracentrifugation (moyenne ± écart-type des 3 mesures de l'appareil).

Suspension A après UC	Pic 1			Pic 2			Pic 3		
	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%	D _{int} (nm)	Largeur pic (nm)	%
Essai 1	26 ± 0,6	9,2 ± 0,6	97,7	4478 ± 213,3	880,9 ± 95,6	2,3			
	27 ± 0,5	8,1 ± 0,5	100						
	26 ± 0,5	8,8 ± 1,0	99,5	4742	752,5	0,5			
Essai 2	24 ± 2,2	8,2 ± 2,4	94,3	4593 ± 135,7	833,5 ± 63,3	5,7			
	27 ± 3,5	8,8 ± 3,3	91,1	4772 ± 633,6	733,6 ± 382,5	3,5	668 ± 332,2	187,7 ± 152,6	5,4
	27 ± 2,7	8,4 ± 2,6	94,7	4882 ± 613,8	646,1 ± 369,5	2,7	2997	1284,0	2,6

Ces résultats indiquent que le procédé d'ultracentrifugation choisi pour ces essais n'a pas permis de séparer les NCLs des autres objets formés par les composants du milieu FeSSIF. Ces résultats sont dus à l'hétérogénéité de la composition de ce milieu qui permet la formation d'un certain nombre de nano-objets pouvant masquer les NCLs. Il conviendra de s'assurer que les pics de l'ordre du micromètre ne sont pas des poussières. Cette étude n'a pu être poursuivie en raison des conditions sanitaires.

X. Discussion

Nos travaux sont inspirés de recherches préalablement réalisées au laboratoire dans le cadre de la thèse de Maud Gonnet (60) notamment. Cette dernière utilisait une solution de β C dans du Labrafac[®] à 0,7 mg/mL pour réaliser ces NCLs chargées en β C. Cependant, dans ce projet, le β C étant une molécule modèle et non pas un principe actif, nous souhaitons déterminer la solubilité maximale du β C dans le Labrafac[®]. Les spectres en balayage ont permis de fixer une longueur d'onde d'absorbance maximale à 460 nm. Craft *et al.*(109) indiquent une longueur d'onde maximale entre 448 et 466 nm dans différents solvants organiques pour le β C. Ces données sont cohérentes avec nos résultats. De plus, cette longueur d'onde est également celle utilisée par Maud Gonnet pour ses analyses spectroscopiques impliquant du β C.(60)

Concernant la forme du pic obtenu, celle-ci est caractéristique du β C avec un léger épaulement suivi de 2 pics relativement proches, le premier étant le plus haut et correspondant au maximum d'absorbance. Ces pics caractéristiques sont retrouvés dans la littérature.(110),(111) Cela permet d'affirmer l'absence d'impuretés dans les solutions analysées.

En ce qui concerne les résultats obtenus lors de ces analyses, nous pouvons constater un défaut de répétabilité, indiquant une faille dans le protocole. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet, notamment l'éventuelle présence de poudre encore en suspension dans les échantillons analysés. Pour contrer cela, il est possible d'augmenter la durée et/ou la puissance de l'étape de centrifugation ou bien d'ajouter une étape de filtration. Il peut également être envisagé de vérifier l'absence de particules en DLS. De plus, la cinétique de solubilisation semble très lente. Ainsi, un faible écart de vitesse d'agitation ou de température peut impacter la quantité de β C solubilisée. Si le temps de solubilisation est trop long, il faudra par la suite envisager de l'accélérer avec l'utilisation de solvant intermédiaire ou encore un procédé d'ultrasonication. Il conviendra alors de s'assurer que celui-ci ne favorise pas la dégradation du β C comme cela a pu être observé dans certains travaux où il a été démontré que le temps de sonication ainsi que l'intensité des ultrasons pouvaient aboutir à une dégradation du β C. En revanche, il semble que la température ait un effet protecteur en diminuant les effets de cavitation à plus haute température.(112)

Une dernière hypothèse serait une dégradation du β C malgré toutes les précautions de manipulation.

Pour les analyses en fluorescence, le β C a été préalablement solubilisé dans du dichlorométhane avant d'être dilué dans de l'éthanol pour obtenir une solution mère à 20 mg/L. Le dichlorométhane a été choisi pour faciliter la dissolution du β C dans l'éthanol étant donné que sa solubilité est de 6 g/L dans le dichlorométhane quand elle n'est que de 0,03 g/L dans l'éthanol. Dans leur travaux, Van Riel *et al.*(111) obtiennent, pour une solution de β C dans de l'éthanol à 5,9 mg/L une absorption maximale à 451 ± 1 nm ainsi qu'une fluorescence maximale à 527 ± 2 nm. Nous obtenons des résultats parfaitement cohérents, à savoir une absorption maximale à 452 nm ainsi qu'une fluorescence maximale à 520 nm.

L'objectif de ces analyses de fluorescence est d'estimer la quantité de micelles produite par chacun des 2 procédés et de les comparer, en utilisant directement les propriétés de fluorescence de la molécule modèle encapsulée, le β C. Il n'est pas possible d'utiliser la DLS dans ce cas en raison de la différence de taille entre les NLCs et les micelles. En effet, plus une particule est petite, moins elle diffuse de lumière et doit donc être présente en quantité très nettement supérieure pour être détectable par DLS. La fluorescence est une technique de haute sensibilité. Le fluorophore est capable d'être encapsulé à la fois dans les micelles et dans les NCLs. L'idée est donc de centrifuger la suspension afin de faire crêmer les NCLs tandis que les micelles resteront dans le sous-nageant en raison de la différence de densité entre l'eau et l'huile rentrant dans la composition des NCLs. Ainsi, en comparant la fluorescence émise par l'échantillon avant et après centrifugation, il sera possible de déduire la quantité de fluorescence émise par les micelles présentes dans l'échantillon. Cette expérience a déjà été menée préalablement au laboratoire sur des NCLs composées de Captex[®] 8000, de Lipoid[®] 75-3 et de Kolliphor[®] HS15 et formulées en procédés PIT. Le fluorophore utilisé était le DiI. Après ultracentrifugation, il s'est avéré qu'il restait 44% de la fluorescence initiale dans le sous-nageant.(113)

La formulation de NCLs en procédé PIC a précédemment été étudiée au sein de l'équipe.(65) Différentes températures ont été testées : 30°C, 50°C et 90°C. Initialement les NCLs étaient obtenues à 90°C, température supérieure au point de clarté de la phase huileuse. Cependant, dans un intérêt écologique et dans le cadre de l'utilisation de molécules thermosensibles, il s'avère utile de pouvoir formuler des NCLs à des températures plus faibles. Des NCLs ont pu être obtenues avec succès à

ces 3 températures. Plusieurs conclusions ont été tirées de ces travaux, notamment sur l'impact des différents ratios d'excipients sur les caractéristiques granulométriques des NCLs obtenues. En effet, une augmentation du SOR permet de diminuer la taille. Plus précisément, la taille est divisée par 2 lorsque le SOR augmente de 0,8 à 1,5. A SOR constant, une augmentation du SpKR diminue la taille. Ces travaux sur le procédé PIC ont aussi montré un impact des ratios SOR et SpKR sur le PDI. Lorsque le SpKR est compris entre 0 et 0,2, alors une augmentation du SOR entraîne une diminution du PDI. Cette tendance est d'autant plus forte lorsque le SOR est supérieur à 1,5. En revanche, pour un SpKR de 0,4, une augmentation du SOR entraîne une augmentation du PDI (**Figure 34**).

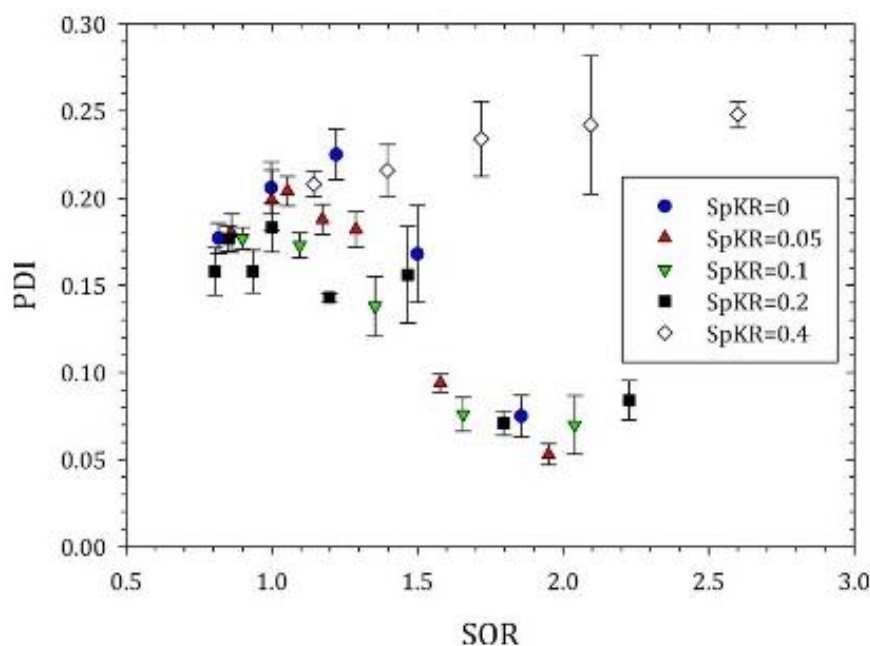


Figure 34: Evolution du PDI en fonction du SOR et du SpKR (moyenne et écart-types sur 3 mesures).(65)

Il faut donc une concentration suffisante en tensioactif pour former des petites gouttelettes tout en faisant attention à ne pas générer trop de micelles. Les NCLs obtenues ont montré une bonne stabilité, à savoir 14 jours à 37°C et jusqu'à 30 jours à 4°C.(65)

K. Roger a montré que dans la méthode sub-PIT le système passait par un état d'accès de type microémulsion surgonflée. Dans cette structure, l'intégralité des molécules tensioactives présentes dans le mélange est utilisée aux interfaces eau/huile. Cela permettrait donc, après la trempe, l'obtention de NEs/NCLs monodisperses. En revanche, dans le procédé sup-PIC, cet état d'accès prend la forme d'une phase

éponge bicontinue. Le rayon de courbure d'une phase éponge est plus faible que celui de micelles gonflées, par conséquent toutes les molécules tensioactives ne sont pas utilisées. Cela se traduit par l'obtention de NEs/NCLs d'une taille plus large et avec une polydispersité plus importante. Les gouttelettes coexistent avec des micelles de tensioactif en excès.(68) Le fait que la phase éponge n'utilise pas l'intégralité des tensioactifs présents dans le mélange justifie également l'utilisation d'une quantité plus grande de tensioactifs dans le protocole PIC que dans le protocole PIT, afin de pouvoir obtenir des NCLs de même taille pour ces deux protocoles.

Des travaux menés au laboratoire via des techniques de FRAP et de RMN-DOSY ont montré la présence de micelles dans le cadre du procédé PIC (résultats non communiqués car publication en cours de rédaction). Il semblerait que ces micelles soient également obtenues dans le procédé PIT bien qu'en quantité moindre. Ces résultats ne sont pas encore publiés.(113) Le fait que des micelles soient observées avec la méthode PIT contrairement aux résultats obtenus par K. Roger peut avoir deux origines : le Kolliphor® utilisé n'est pas un tensioactif pur (mélange de mono- et di-ester et PEG libre) et/ou le procédé PIT utilisé ne correspond pas uniquement à une chute brutale de température sous agitation (comme réalisé par K. Roger) mais à une diminution de température + dilution (ajout d'eau froide).

Concernant les essais de tensiométrie, nous avons d'abord étudié la CMC du Kolliphor®. Les premières mesures ont consisté à mesurer la tension de surface entre une solution aqueuse de Kolliphor® et l'air. Nous avons pu voir sur le premier essai qu'aux très faibles concentrations en Kolliphor® (de l'ordre de 0,001 mM), la tension obtenue est de l'ordre de 72,3 mN/m. Cette valeur est très proche de la tension de surface entre l'eau et l'air qui est de l'ordre de 72,8 mN/m à 20°C.

Ces mesures de tension semblent indiquer un point d'inflexion autour de 0,1 mM. Cette valeur est cohérente avec la littérature où la CMC d'une solution de Kolliphor® dans de l'eau distillée a été estimée entre 0,06 et 0,1 mM.(107) De plus, les essais de goutte de phase aqueuse de Kolliphor® dans le Labrafac® montrent des résultats proches de 11,5 mN/m pour une concentration de 0,1 mM de Kolliphor®. Cette valeur a été obtenue par Balzeau *et al.*(108), pour des gouttes de 5 µL.

Dans le cadre du protocole PIT, l'ajout d'eau froide pour mener à la formation des NCLs est effectué entre 55°C et 65°C, lorsque le système atteint la zone d'inversion de phase. Les tensions interfaciales minimales, qui sont généralement de l'ordre de

10^{-2} à 10^{-3} mN/m et qui prouvent que le point d'inversion de phase est atteint, se trouvent au-delà de 70°C et ne sont donc pas visibles sur le graphique en **Figure 30**. Cependant, les mesures de tensiométrie montrent des valeurs de tension très basses, inférieures à 1 mN/m au-delà de 60°C. Ces faibles valeurs sont cohérentes avec la formation de l'état d'accès de type microémulsion. Ainsi, dans notre protocole, l'ajout d'eau froide a lieu avant le point d'inversion de phase, ce qui coïncide avec le procédé sub-PIT détaillé par K. Roger.

Sur le plan des études rhéologiques, l'objectif était de mieux comprendre le comportement des composants au cours du procédé d'inversion de phase. Les essais qui ont pu être réalisés en rhéologie ont ensuite été confirmés au laboratoire par Sébastien Wang (ingénieur d'études au laboratoire) qui a pu formuler un lot supplémentaire des échantillons à différentes fractions d'eau et 2 séries de mesures supplémentaires. Les essais en rampe de cisaillement confirment un comportement Newtonien ou rhéofluidifiant selon la teneur en eau. Plus en détails, le profil est Newtonien pour les échantillons correspondant aux fractions d'eau 0,1 et 0,5 à 0,9. Un comportement rhéofluidifiant est montré pour les échantillons ayant une fraction d'eau de 0 et 0,2 à 0,4.

Les mesures à vitesse de cisaillement constante montrent une viscosité croissante avec l'augmentation de la fraction d'eau jusqu'à atteindre un pic à 0,35 correspondant à la viscosité maximale. Passée cette fraction en phase aqueuse, la viscosité diminue. Ce profil de courbe est cohérent avec la littérature de même que la fraction d'eau à laquelle le pic de viscosité apparaît. En effet, dans leurs travaux, Mayer *et al.*(98) observent ce pic de viscosité pour des fractions entre 0,25 et 0,4 en fonction du SOR du système (exemple en **Figure 19**). Sébastien Wang a également réalisé des mesures de viscosité à vitesse de cisaillement constante. Toutefois, il a été choisi des vitesses de cisaillement légèrement au-dessus du minimum mesurable pour chaque échantillon afin de pouvoir approcher la valeur de viscosité dynamique η_0 , c'est-à-dire la viscosité quand la vitesse de cisaillement tend vers zéro. Ce graphique (**Figure 35**, courbe rouge) révèle un double pic : l'un à 0,35 comme retrouvé lors des mesures à 50 s^{-1} et l'autre à 0,2 qui n'était pas visible lors des premiers essais à une vitesse plus élevée. L'hypothèse qui peut être formulée ici est que le premier pic correspondrait à la formation d'une ME de type phase lamellaire et le second serait la transition vers une ME de type phase éponge comme cela a pu être expliqué par K. Roger et illustré en **Figure 11**.

De plus, sur les mesures de conductivité un léger épaulement est détecté (**Figure 35**, courbe bleue). Celui-ci concorde avec le creux de viscosité qui apparaît lors de la transition entre les deux types de ME.

Il sera nécessaire par la suite de confirmer ces structures par des mesures en SAXS, notamment dans le cadre d'un nouveau projet au laboratoire (projet Rhéo-PIC).

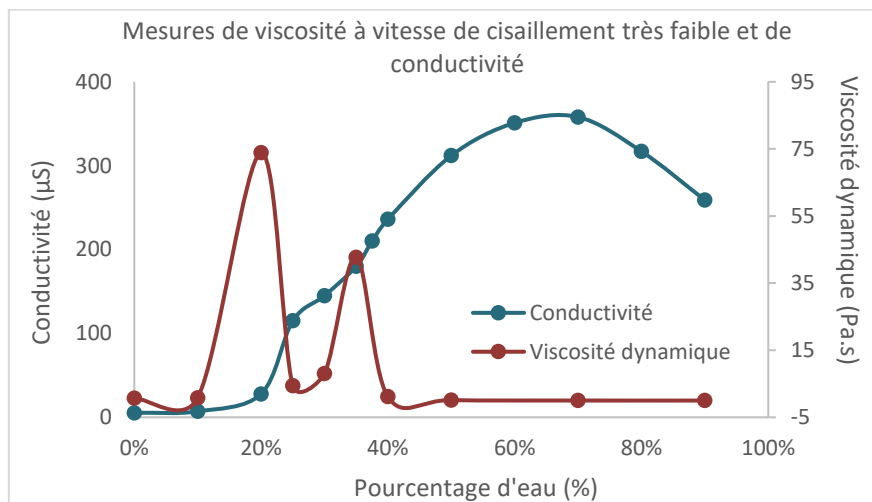


Figure 35: Mesure de viscosité à vitesse de cisaillement proche de 0 et mesures de conductivité.

De plus, il est émis l'hypothèse que pour les fractions de milieu de gamme un gel se forme, particulièrement pour des SOR élevés. Cependant, les mesures en oscillation sur notre système n'ont pas permis de conclure à la formation d'une structure de type gel aux abords de la zone d'inversion de phase, auquel cas, les modules G' et G'' devraient être supérieurs à 100 Pa. Il s'agit plutôt d'un comportement de fluide uniquement visqueux. Les mesures en oscillation menées par Sébastien Wang ont confirmé une prédominance de la composante visqueuse.

Les mesures de conductivité sont également cohérentes avec le profil attendu dans le cas d'un procédé PIC. Bouchama *et al.*(80) ont noté une augmentation à partir d'une fraction en phase aqueuse de 0,2. Cette valeur est également retrouvée par Mayer *et al.*(98) qui indiquent que la conductivité commence à augmenter entre 0,1 et 0,2 selon le SOR, ce qui est également le cas sur nos 3 essais. Ces références sont illustrées respectivement en **Figure 15** et **Figure 19**.

Enfin, concernant les milieux biomimétiques, des méthodes de séparation des NCLs et des nano-objets présents dans ces milieux sont nécessaires à la poursuite du projet. Si pour le FaSSGF une filtration sur 0,2 µm est suffisante, pour le FaSSIF-V2, il faudra

une étape de centrifugation à 13 600 g sur une durée de 5 minutes. Toutefois, en ce qui concerne le milieu FeSSIF-V2, aucune de ces 2 méthodes n'a permis la séparation des NCLs du milieu. C'est pourquoi un protocole d'ultracentrifugation a été testé.

Rappelons que l'étude bibliographique et notamment les travaux d'Elvang *et al.*(28) ont permis de déterminer que la composition du milieu FeSSIF-V2 permettait la formation de nano-objets essentiellement de 2 types : des micelles d'un ordre de grandeur de 30 nm à 70 nm ainsi que des vésicules phospholipidiques entre 90 nm et 210 nm. De plus, les analyses sur les fluides intestinaux humains avaient donné des résultats presque identiques avec des populations de micelles d'une taille estimée inférieure à 20 nm et autour de 50 nm, ainsi que des vésicules phospholipidiques d'environ 200 nm.

Les résultats de notre étude sont en adéquation avec la littérature. En effet, des micelles sont retrouvées aussi bien avant ultracentrifugation avec 2 populations : 30 nm – 45 nm et 52 nm – 67 nm, qu'après l'ultracentrifugation avec une population entre 36 nm et 50 nm. Les vésicules phospholipidiques sont également présentes dans des ordres de grandeurs de 146 nm à 222 nm et de 190 nm à 266 nm réciproquement avant et après l'ultracentrifugation. Enfin, la suspension A comportant des NCLs dans le milieu FeSSIF contient des micelles dont la taille ne semble pas impactée par l'ultracentrifugation : 20 nm – 29 nm avant et 22 nm – 30 nm après cette étape.

Ce procédé d'ultracentrifugation n'étant pas suffisant à la séparation des NCLs, il faudra par la suite réaliser d'autres essais en augmentant le temps d'ultracentrifugation, ou si nécessaire en la couplant à d'autres méthodes telles que la filtration. Si cela n'est toujours pas suffisant, une chromatographie d'exclusion stérique sera envisagée. Si toutefois aucune de ces méthodes ne s'avérait suffisantes à la séparation des NCLs du milieu, il faudra alors opter pour une autre méthode de détection, comme l'A4F ou la spectroscopie UV qui permettrait de détecter le β C.

Des études de stabilité du même type ont déjà été menées au laboratoire sur une formulation différente, à savoir des NCLs composées de Captex® 8000, de Lipoid® S75-3 et de Solutol® HS 15. Ces NCLs ont été obtenues par un procédé PIT. Ces NCLs étaient chargées en Paclitaxel. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 6h et ont subi des prélèvements réguliers. Aucune variation significative de la taille n'a été remarquée sur les milieux testés : SGF, SIF, FaSSIF, FaSSIF-V2 et FeSSIF.

Cependant, des micelles de 9 nm ont été détectées dans le milieu FeSSIF-V2 seul. Ainsi, les NCLs n'ont pu être détectées lors de l'étude de stabilité. (114)

Le taux de relargage du Paclitaxel est de 6,5% dans le milieu FaSSIF-V2, mais environ 30 % dans le FeSSIF-V2. D'une manière générale, les NCLs semblent stables dans les milieux biomimétiques, probablement grâce à la présence de PEG à leur surface. La stabilité semble meilleure à l'état à jeun, par conséquent, une administration préprandiale est préférable. Cette différence peut être explicable par la présence de pancréatine qui facilite la digestion des lipides.

XI. Conclusion

Les nanotechnologies prennent une place de plus en plus importante dans le monde médical. Leur capacité de vectorisation offre une opportunité d'exploiter les principes actifs qui jusqu'à présent ne pouvaient être utilisés en raison d'un manque de solubilité ou d'une trop grande fragilité. Cela est particulièrement vrai dans le cas de la voie orale, voie d'administration préférée du patient mais qui comporte de nombreuses contraintes de formulation.

Ce travail a permis la formulation de NCLs de 50 nm et 100 nm selon deux procédés d'inversion de phase : en température et en composition.

Dans le projet Phy2miFOR du laboratoire MINT, du β C est destiné à être encapsulé au sein de ces NCLs et sa solubilité dans le Labrafac[®] a été approximée en spectroscopie UV. Ces résultats permettront de déterminer la concentration maximale à laquelle les NCLs pourront être chargées en β C.

Le procédé d'ultracentrifugation testé n'a pas permis de séparer les NCLs du milieu FeSSIF-V2. Les conditions sanitaires n'ont pas permis de mener à terme cette étude. Toutefois, d'autres méthodes de séparation ou de détection pourront être testées par la suite.

Du côté de la caractérisation physico-chimique, des études de conductimétrie, rhéologie et tension interfaciale ont été menées. Elles ont pour objectif de mieux définir les structures intermédiaires qui se forment au cours du procédé de formulation. De plus elles sont nécessaires à l'optimisation du procédé de formulation en microfluidique. Ainsi, les études de rhéologie notamment feront l'objet d'un projet de recherche (RhéoPIC) au laboratoire afin de mieux maîtriser la formulation des NCLs en procédé PIC par un procédé microfluidique.

Bibliographie

1. US-FDA, Administration D. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology Contains Nonbinding Recommendations [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 15]. Available from: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>
2. Marques MRC, Choo Q, Ashtikar M, Rocha TC, Bremer-Hoffmann S, Wacker MG. Nanomedicines - Tiny particles and big challenges. Vols. 151–152, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2019. p. 23–43.
3. EC. Commission recommendation on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) (2011/696/EU) [Internet]. Europe; 2011 [cited 2020 Dec 15]. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/
4. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities [Internet]. Vol. 14, *Nanomedicine*. Future Medicine Ltd.; 2019 [cited 2020 Dec 14]. p. 93–126. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30451076/>
5. Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Aug 20];9(1):e1416. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wnan.1416>
6. Tyagi P, Subramony JA. Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery: Key learnings and future outlooks as we think small [Internet]. Vol. 272, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2018 [cited 2020 Aug 17]. p. 159–68. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/buadistant.univ-angers.fr/29355619/>
7. Choi YH, Han H-K. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *J Pharm Investig* [Internet]. 2018 [cited 2020 May 20];48:43–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0370-4>
8. Hafner A, Lovrić J, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanotherapeutics in the eU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine Dovepress* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 7];9:1005–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S55359>
9. Couvreur P. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères. *La chimie et la santé*. 2010.
10. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem* [Internet]. 2018 Aug 20 [cited 2021 Feb 9];6(AUG):360. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2018.00360/full>
11. Houin G. Notions générales de pharmacocinétique : approches physiologique et mathématique [Internet]. [cited 2021 Feb 10]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901988>
12. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Vol. 23, *Advanced Drug Delivery Reviews*.

Elsevier Science B.V.; 1997. p. 3–25.

13. Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery: Formulation to medical application [Internet]. Vol. 13, Nanomedicine. Future Medicine Ltd.; 2018 [cited 2020 Dec 14]. p. 2507–25. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nnm-2018-0088>
14. Germain M, Caputo F, Metcalfe S, Tosi G, Spring K, Åslund AKO, et al. Delivering the power of nanomedicine to patients today. *J Control Release*. 2020 Oct 10;326:164–71.
15. Pacheco TJA, Silva VCM da, Souza DG de. Nano COVID-19 Vaccines: the firsts RNA lipid nanoparticle vaccines being approved from history - Review. *Res Soc Dev* [Internet]. 2020 Dec 19 [cited 2021 Feb 10];9(12):e20191211123. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11123>
16. Campos EVR, Pereira AES, De Oliveira JL, Carvalho LB, Guilger-Casagrande M, De Lima R, et al. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need [Internet]. Vol. 18, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd; 2020 [cited 2021 Feb 10]. p. 125. Available from: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-020-00685-4>
17. Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market [Internet]. Vol. 9, *International journal of nanomedicine*. Dove Press; 2014 [cited 2020 Nov 15]. p. 4357–73. Available from: </pmc/articles/PMC4172146/?report=abstract>
18. Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *J Control Release* [Internet]. 2016 Oct 28 [cited 2020 Sep 2];240:504–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27292178/>
19. Ghosh S, Ghosh S, Sil PC. Role of nanostructures in improvising oral medicine [Internet]. Vol. 6, *Toxicology Reports*. Elsevier Inc.; 2019 [cited 2020 Aug 17]. p. 358–68. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov/buadistant.univ-angers.fr/31080743/>
20. Fotaki N, Vertzoni M. Biorelevant Dissolution Methods and Their Applications in In Vitro-In Vivo Correlations for Oral Formulations. Vol. 4, *The Open Drug Delivery Journal*. 2010.
21. Wawrezynieck A, Péan J-M, Wüthrich P, Benoit J-P. Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale. *médecine/sciences* [Internet]. 2008 Jun 15 [cited 2021 Jan 28];24(6–7):659–64. Available from: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20082467659>
22. Lagarce F. Devenir des nanoparticules utilisées comme médicament dans l'organisme. *Tech l'ingénieur*. 2014;
23. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers [Internet]. Vol. 64, *Advanced Drug Delivery Reviews*. NIH Public Access; 2012 [cited 2021 Jan 20]. p. 557–70. Available from: </pmc/articles/PMC3322271/?report=abstract>
24. Reinholz J, Landfester K, Mailänder V. The challenges of oral drug delivery via nanocarriers [Internet]. Vol. 25, *Drug Delivery*. Taylor and Francis Ltd; 2018 [cited 2021 Jan 20]. p. 1694–705. Available from: </pmc/articles/PMC6225504/?report=abstract>
25. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of

- fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2005 Aug [cited 2020 Apr 23];60(3):413–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893920>
26. Han Y, Gao Z, Chen L, Kang L, Huang W, Jin M, et al. Multifunctional oral delivery systems for enhanced bioavailability of therapeutic peptides/proteins. Vol. 9, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences; 2019. p. 902–22.
 27. Muro S. *Drug Delivery Across Physiological Barriers*. Taylor and. Pan Stanford; 2016.
 28. Elvang PA, Hinna AH, Brouwers J, Hens B, Augustijns P, Brandl M. Bile Salt Micelles and Phospholipid Vesicles Present in Simulated and Human Intestinal Fluids: Structural Analysis by Flow Field–Flow Fractionation/Multiangle Laser Light Scattering. *J Pharm Sci*. 2016 Sep 1;105(9):2832–9.
 29. Choi YH, Han H-K. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. 2018 [cited 2020 Aug 20];48:43–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0370-4>
 30. Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World’s Top Oral Drugs. *AAPS Journal*. 2009;11(4):740–6.
 31. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoît JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* [Internet]. 2006 Jun 25 [cited 2021 Feb 2];23(6):1243–50. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-006-0022-2>
 32. Groo AC, Saulnier P, Gimel JC, Gravier J, Ailhaas C, Benoit JP, et al. Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013 Nov 7 [cited 2021 Feb 2];8:4291–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811111/>
 33. Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, Nontoxic Polyoxyethylene Esters of 12-Hydroxystearic Acid, Reverses Multidrug Resistance. *Cancer Res*. 1991;51(3).
 34. Moss DM, Siccardi M. Optimizing nanomedicine pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetics modelling. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2020 May 20];171(17):3963–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12604>
 35. Griffin BT, Guo J, Presas E, Donovan MD, Alonso MJ, O’driscoll CM. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and biodistribution following oral administration of nanocarriers containing peptide and protein drugs ☆. 2016 [cited 2020 May 20]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.006>
 36. Sim T, Lim C, Hoang NH, Joo H, Lee JW, Kim D won, et al. Nanomedicines for oral administration based on diverse nanoplatform [Internet]. Vol. 46, *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer Netherlands; 2016 [cited 2020 Sep 29]. p. 351–62. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-016-0255-y>
 37. Groo AC, De Pascale M, Voisin-Chiret AS, Corvaisier S, Since M, Malzert-Fréon A. Comparison of 2 strategies to enhance pyridoclox solubility: Nanoemulsion delivery system versus salt synthesis. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Jan 15;97:218–26.

38. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. Vol. 93, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2015. p. 173–82.
39. Clulow AJ, Parrow A, Hawley A, Khan J, Pham AC, Larsson P, et al. Characterization of Solubilizing Nanoaggregates Present in Different Versions of Simulated Intestinal Fluid. *J Phys Chem B*. 2017 Dec 7;121(48):10869–81.
40. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharm Res* [Internet]. 2008 Jul [cited 2020 Apr 24];25(7):1663–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404251>
41. Bergström CAS, Holm R, Jørgensen SA, Andersson SBE, Artursson P, Beato S, et al. Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Jun 16;57(1):173–99.
42. Riethorst D, Baatsen P, Remijn C, Mitra A, Tack J, Brouwers J, et al. An In-Depth View into Human Intestinal Fluid Colloids: Intersubject Variability in Relation to Composition. *Mol Pharm* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jun 14];13:3484–93. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
43. Stippler E, Kopp S, Dressman JB. Comparison of US Pharmacopeia Simulated Intestinal Fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopoeia with respect to their use in In Vitro dissolution testing. *Dissolution Technol*. 2004;6–10.
44. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms [Internet]. Vol. 15, *Pharmaceutical Research*. Springer New York LLC; 1998 [cited 2021 Feb 4]. p. 11–22. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011984216775>
45. Galia E, Horton J, Dressman JB. Albendazole generics - A comparative in vitro study. *Pharm Res* [Internet]. 1999 [cited 2021 Feb 16];16(12):1871–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1018907527253>
46. Nielsen FS, Gibault E, Ljusberg-Wahren H, Arleth L, Pedersen JS, Müllertz A. Characterization of prototype self-nanoemulsifying formulations of lipophilic compounds. *J Pharm Sci*. 2007;96(4):876–92.
47. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities [Internet]. Vol. 8, *Soft Matter*. The Royal Society of Chemistry; 2012 [cited 2020 Dec 5]. p. 1719–29. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/sm/c2sm06903b>
48. Anton N, Gayet P, Benoit JP, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int J Pharm*. 2007 Nov 1;344(1–2):44–52.
49. Rondón González M. Inversion de phase d'émulsion induite par agitation. [Thèse génie des procédés]. Université de Lorraine; 2007.
50. Forgiarini A, Esquena J, González C, Solans C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*. 2001 Apr 3;17(7):2076–83.
51. Perazzo A, Preziosi V, Guido S. Phase inversion emulsification: Current understanding and applications. Vol. 222, *Advances in Colloid and Interface*

- Science. Elsevier; 2015. p. 581–99.
52. Yu Koroleva M, Yurtov E V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications.
 53. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 May 6];252:28–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917301128>
 54. Koroleva M, Nagovitsina T, Yurtov E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2018 Apr 18 [cited 2019 May 6];20(15):10369–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29611566>
 55. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res* [Internet]. 2011 May 6 [cited 2019 May 6];28(5):978–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057856>
 56. Ali A, Nanoémulsions AA. Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline [Internet]. Université Paris Saclay (COmUE); 2016 Dec [cited 2021 Feb 13]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01486119>
 57. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. Vol. 128, *Journal of Controlled Release*. Elsevier; 2008. p. 185–99.
 58. McClements DJ. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. [cited 2021 Apr 8]; Available from: www.rsc.org/softmatter
 59. Calvignac B, Gimel J-C, Roger E, Rolley N, Lefebvre G, Bastiat G, et al. Procédé continu de nano-émulsification par inversion de phase en concentration. FR3099069, 2019.
 60. Gonnet M. Evaluation in vitro et in vivo de la stabilité et de la biodisponibilité de molécules liposolubles encapsulées et incluses dans une matrice modèle [Internet]. Université d'Angers; 2010 [cited 2020 Jan 7]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00538930>
 61. Calvignac, Brice; Gimel, Jean-Christophe; Roger, Emilie; Rolley, Nicolas; Bastiat, Guillaume; Fouchet, Florian; Lefebvre G. Rapport de recherche sur la formulation de nanocapsules lipidiques par procédé d'inversion de phase. 2018.
 62. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res*. 2002;19(6):875–80.
 63. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. *Int J Pharm* [Internet]. 2002 Aug 21 [cited 2020 Jan 6];242(1–2):167–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176240>
 64. Fernandez P, André V, Rieger J, Kühnle A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2004 Dec 20;251(1–3):53–8.
 65. Lefebvre G, Riou J, Bastiat G, Roger E, Frombach K, Gimel JC, et al. Spontaneous nano-emulsification: Process optimization and modeling for the prediction of the nanoemulsion's size and polydispersity. *Int J Pharm*. 2017 Dec 20;534(1–2):220–8.

66. Klucker MF, Dalençon F, Probeck P, Haensler J. AF03, an alternative squalene emulsion-based vaccine adjuvant prepared by a phase inversion temperature method. *J Pharm Sci.* 2012;101(12):4490–500.
67. Roger K. Nanoemulsification in the vicinity of phase inversion: Disruption of bicontinuous structures in oil/surfactant/water systems. Vol. 25, *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* Elsevier Ltd; 2016. p. 120–8.
68. Roger K. Nanoémulsions auto-assemblées par des méthodes physico-chimiques. Vol. 181p. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2013.
69. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. Vol. 17, *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* Elsevier; 2012. p. 246–54.
70. Komaiko JS, McClements DJ. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf [Internet].* 2016 Mar 1 [cited 2020 Apr 6];15(2):331–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12189>
71. Pasquali RC, Taurozzi MP, Bregni C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *Int J Pharm.* 2008 May 22;356(1–2):44–51.
72. Salager J-L, María Andérez J, Briceño I. Emulsification yield related to formulation and composition variables as well as stirring energy*. Vol. 25, *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* 2002.
73. Salager J-L, Antón R, Andérez M, Aubry J-M. Formulation des microémulsions par la méthode du HLD. 2001.
74. Zambrano N, Tyrode E, Mira I, Márquez L, Rodríguez MP, Salager JL. Emulsion catastrophic inversion from abnormal to normal morphology. 1. Effect of the water-to-oil ratio rate of change on the dynamic inversion frontier. *Ind Eng Chem Res.* 2003 Jan 8;42(1):50–6.
75. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm.* 2004 Aug 6;280(1–2):241–51.
76. Allouche J, Tyrode E, Sadtler V, Choplin L, Salager J-L. Simultaneous Conductivity and Viscosity Measurements as a Technique To Track Emulsion Inversion by the Phase-Inversion-Temperature Method. *Langmuir [Internet].* 2004 [cited 2020 Jan 21];20:2134–40. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
77. Dhoot A, Naha A, Priya J, Young NX-J of, 2018 U. Phase Diagrams for Three Component Mixtures in Pharmaceuticals and its Applications. *jyoungpharm.org [Internet].* 2018 [cited 2021 Feb 22];10(2):132–7. Available from: www.jyoungpharm.org%7Cwww.phcog.net
78. Shinoda K, Saito H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *J Colloid Interface Sci.* 1968 Jan 1;26(1):70–4.
79. Heurtault, Béatrice; Saulnier, Patrick; Benoit, Jean-Pierre; Proust, Jacques-Emile; Pech, Brigitte; Richard J. Nanocapsules lipidiques, procede de preparation et utilisation comme medicament. Off la propriété Intellect du Canada. 2001 Mar 2;Brevet.
80. Bouchama F, van Aken G, Autin A, Koper G. On the mechanism of catastrophic

- phase inversion in emulsions. *Physicochem Eng Asp.* 2003;231:11–7.
81. Mira I, Zambrano N, Tyrode E, Márquez L, Peña AA, Pizzino A, et al. Emulsion catastrophic inversion from abnormal to normal morphology. 2. Effect of the stirring intensity on the dynamic inversion frontier. *Ind Eng Chem Res.* 2003 Jan 8;42(1):57–61.
 82. Roger K, Cabane B, Olsson U. Emulsification through surfactant hydration: The PIC process revisited. *Langmuir.* 2011 Jan 18;27(2):604–11.
 83. Roger K, Olsson U, Zackrisson-Oskolkova M, Lindner P, Cabane B. Superswollen microemulsions stabilized by shear and trapped by a temperature quench. *Langmuir.* 2011 Sep 6;27(17):10447–54.
 84. Roger K, Cabane B, Olsson U. Formation of 10-100 nm size-controlled emulsions through a sub-PIT cycle. *Langmuir.* 2010 Mar 16;26(6):3860–7.
 85. Dhiman N, Awasthi R, Sharma B, Kharkwal H, Kulkarni GT. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Front Chem* [Internet]. 2021 Apr 23 [cited 2021 May 9];9:580118. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.580118/full>
 86. Mainard M, Jacob D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques* [Internet]. 2016 Sep 24 [cited 2021 Apr 10];(83):40–4. Available from: <http://www.photoniques.com/10.1051/photon/20168340>
 87. Kuntsche J, Horst JC, Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. Vol. 417, *International Journal of Pharmaceutics.* Elsevier B.V.; 2011. p. 120–37.
 88. Boutin JA, Li Z, Vuillard L, Vénien-Bryan C. La cryo-microscopie, une alternative à la cristallographie aux rayons X ? *médecine/sciences* [Internet]. 2016 Aug 12 [cited 2021 Apr 17];32(8–9):758–67. Available from: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20163208025>
 89. Kikhney AG, Svergun DI. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. Vol. 589, *FEBS Letters.* Elsevier B.V.; 2015. p. 2570–7.
 90. Mannix O. Colloid-polysaccharide complexation studied by SAXS [Internet]. Université Grenoble Alpes; 2019 [cited 2021 Apr 19]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03051021>
 91. Martin M. La F.F.F. - Technique de Fractionnement par Couplage Flux – Force [Internet]. 2000 [cited 2021 May 15]. Available from: <https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/2000/49fff.htm>
 92. Hallan SS, Sguizzato M, Esposito E, Cortesi R. Challenges in the Physical Characterization of Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Apr 14 [cited 2021 May 16];13(4):549. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/549>
 93. Bera A, Mandal A, Kumar T. Physicochemical characterization of anionic and cationic microemulsions: Water solubilization, particle size distribution, surface tension, and structural parameters. *J Chem Eng Data.* 2014 Aug 14;59(8):2490–8.
 94. Pérez M, Zambrano N, Ramirez M, Tyrode E, Salager J-L. Surfactant-Oil-Water Systems Near the Affinity Inversion. XII. Emulsion Drop Size Versus Formulation

- and Composition. *J Dispers Sci Technol*. 2002 Jan;23(1–3):55–63.
95. Anisa ANI, Nour AH, Nour AH. Catastrophic and transitional phase inversion of water-in-oil emulsion for heavy and light crude oil. *J Appl Sci*. 2010;10(23):3076–83.
 96. Rondón-González M, Sadtler V, Choplin L, Salager J-L. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 5. Effect of the Water-to-Oil Ratio and Surfactant Concentration on the Inversion Produced by Continuous Stirring. *Ind Eng Chem Res [Internet]*. 2006 [cited 2020 Mar 25];45:3074–80. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
 97. Pierat N. Preparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation. Thèse de pharmacie. Université Henri Poincare, Nancy.; 2010.
 98. Mayer S, Weiss J, McClements DJ. Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. *J Colloid Interface Sci*. 2013 Jul 15;402:122–30.
 99. Gul K, Tak A, Singh AK, Singh P, Yousuf B, Wani AA. Chemistry, encapsulation, and health benefits of beta-carotene - A review. Yildiz F, editor. *Cogent Food Agric [Internet]*. 2015 Mar 10 [cited 2020 Mar 17];1(1). Available from: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1018696>
 100. Chauveau-Duriot B, Doreau M, Nozière P, Graulet B. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: Validation of a novel UPLC method. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. p. 777–90.
 101. da Silva MM, Nora L, Cantillano RFF, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR, et al. The Production, Characterization, and the Stability of Carotenoids Loaded in Lipid-Core Nanocapsules. *Food Bioprocess Technol*. 2016 Jul 1;9(7):1148–58.
 102. Druesne-Pecollo N, Latino-Martel P, Norat T, Barrandon E, Bertrais S, Galan P, et al. Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer*. 2010;127:172–84.
 103. Virtamo J. Incidence of Cancer and Mortality Following α -Tocopherol and β -Carotene Supplementation: A Postintervention Follow-up. *J Am Med Assoc [Internet]*. 2003 Jul 23 [cited 2021 May 12];290(4):476–85. Available from: <https://europepmc.org/article/med/12876090>
 104. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J Natl Cancer Inst [Internet]*. 1996 Nov 6 [cited 2021 May 12];88(21):1550–9. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/88/21/1550/928505>
 105. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials.[Erratum appears in *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):662]. *Lancet [Internet]*. 2003 [cited 2020 Mar 17];361(9374):2017–23. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=12814711>
 106. Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst [Internet]*. 1999 Jan 6 [cited 2020 Apr 11];91(1):60–6. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890171>

107. Shubber S, Vllasaliu D, Rauch C, Jordan F, Illum L, Stolnik S. Mechanism of mucosal permeability enhancement of CriticalSorb® (Solutol® HS15) investigated in vitro in cell cultures. *Pharm Res* [Internet]. 2015 Sep 5 [cited 2021 Mar 29];32(2):516–27. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-014-1481-5>
108. Balzeau J, Pinier M, Berges R, Saulnier P, Benoit JP, Eyer J. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials*. 2013 Apr 1;34(13):3381–9.
109. Craft NE, Soares JH. Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β -Carotene in Organic Solvents [Internet]. Vol. 40, *Food Chem*. 1992 [cited 2020 Feb 27]. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
110. Kandori H, Sasabe H, Mimuro M. Direct Determination of a Lifetime of the S2State of β -Carotene by Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 1994 Sep 1;116(6):2671–2.
111. Van Riel M, Hammans JK, Van De Ven M, Verwer W, Levine YK. Fluorescence excitation profiles of beta-carotene in solution and in lipid/water mixtures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 May 31;113(1):102–7.
112. Carail M, Fabiano-Tixier AS, Meullemiestre A, Chemat F, Caris-Veyrat C. Effects of high power ultrasound on all-E- β -carotene, newly formed compounds analysis by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ultrason Sonochem*. 2015 Sep 1;26:200–9.
113. Do TAT. Diffusion des nanoparticules dans les hydrogels. 2019.
114. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm*. 2009 Sep 11;379(2):260–5.
115. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date [Internet]. Vol. 33, *Pharmaceutical Research*. Springer New York LLC; 2016 [cited 2020 Sep 7]. p. 2373–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27299311/>
116. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med* [Internet]. 2019 Sep 5 [cited 2020 Nov 13];4(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btm2.10143>
117. Accueil - VIDAL eVIDAL [Internet]. [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://evidal-vidal-fr.buadistant.univ-angers.fr/>
118. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [Internet]. [cited 2021 Jan 6]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=browseByLetter.page&productLetter=D>
119. Medicines | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2021 Jan 6]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
120. Accueil - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cited 2021 Jan 6]. Available from: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/index.php>

Table des Annexes

Tableau-A 1: Liste des nanomédicaments actuellement sur le marché. (2),(4),(7),(8),(17),(115),(116),(117),(118),(119),(120).....	98
Figure-A 1: Résultats des études de rhéologie. A : évolution de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement. B : évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement.....	103

Annexe 1 : Liste des nanomédicaments sur le marché

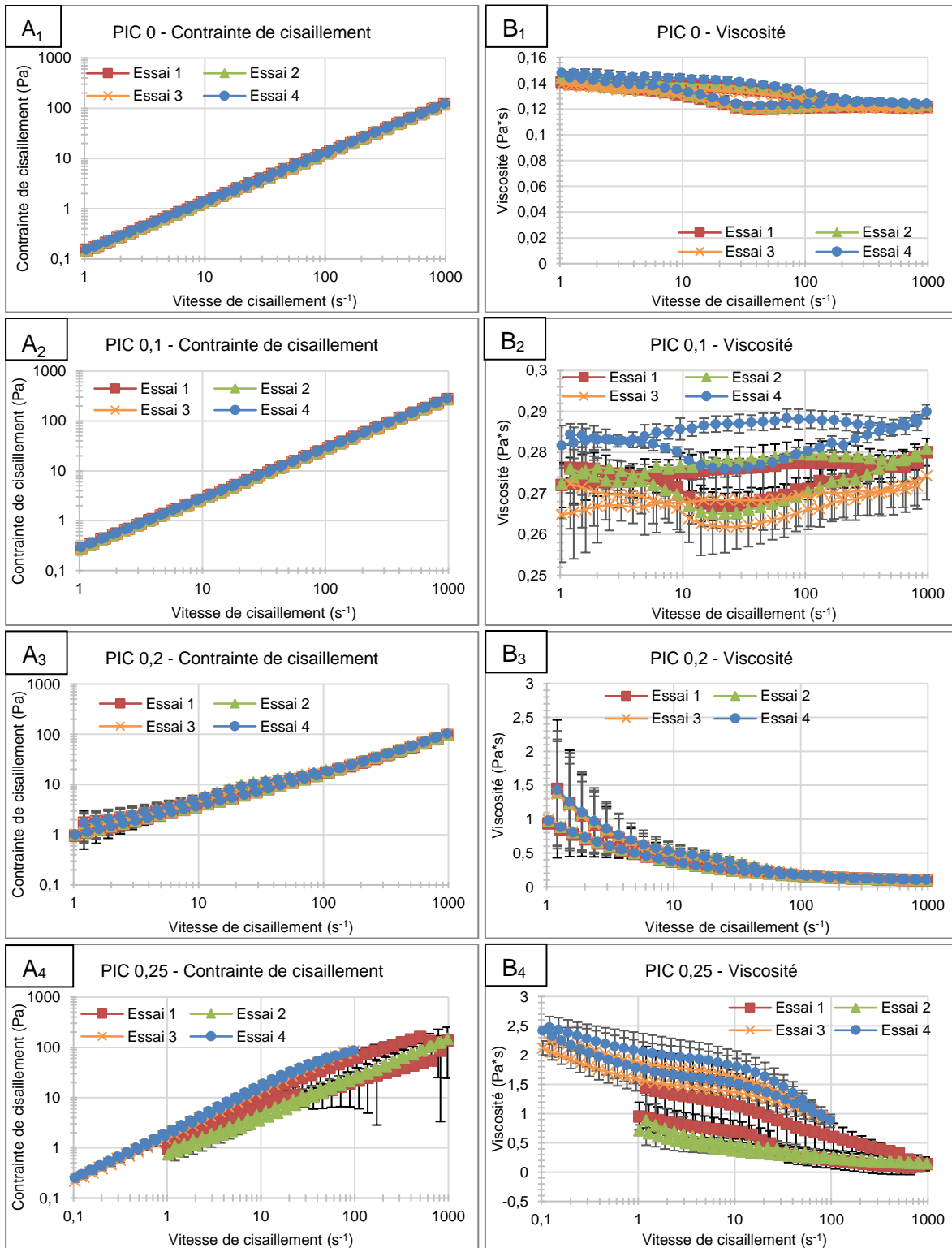
Tableau-A 1: Liste des nanomédicaments actuellement sur le marché.
(2),(4),(7),(8),(17),(115),(116),(117),(118),(119),(120)

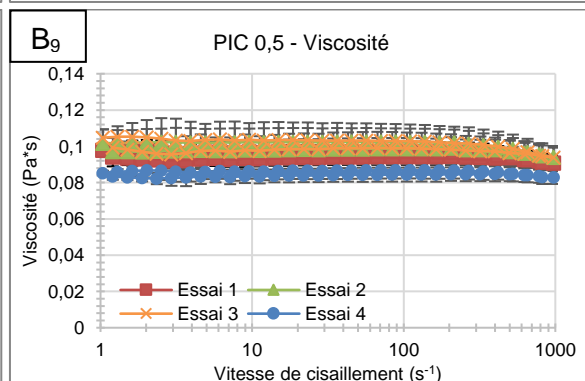
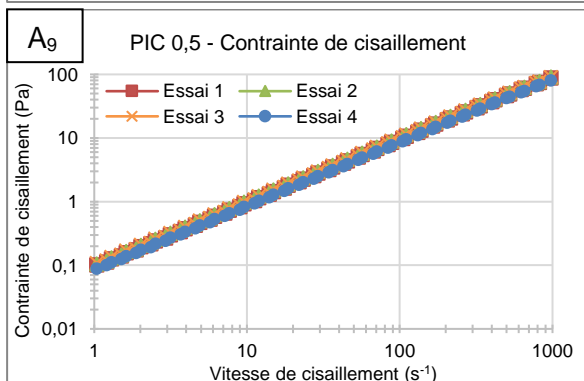
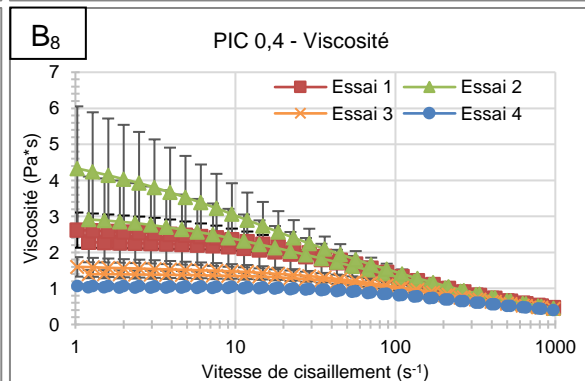
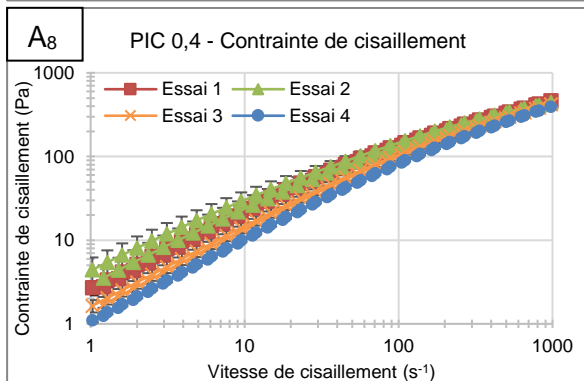
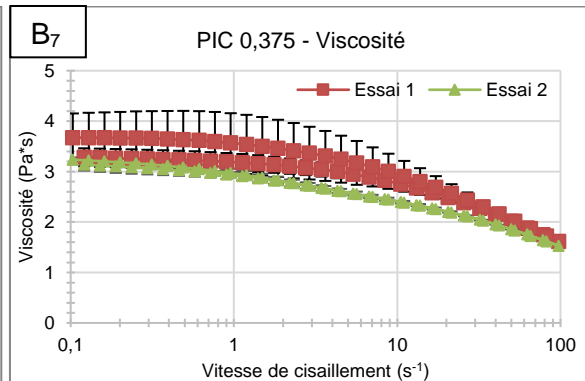
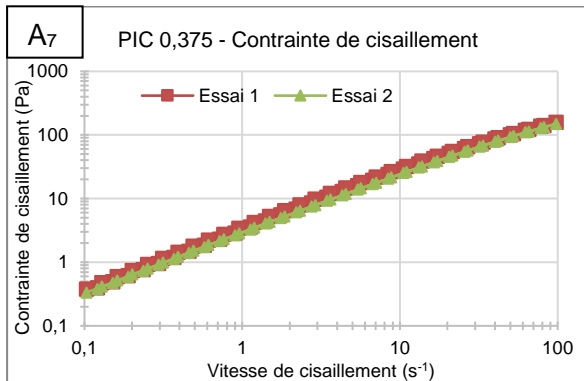
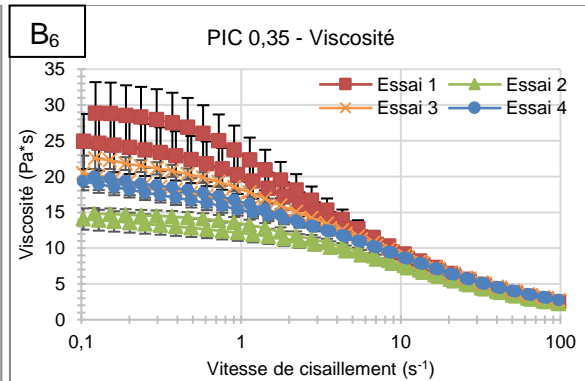
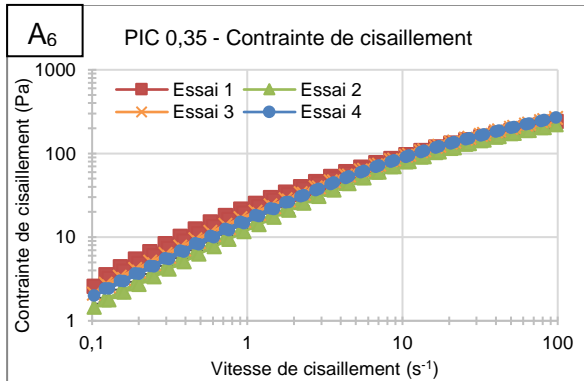
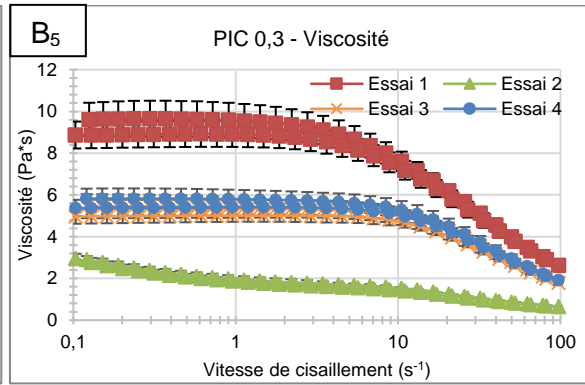
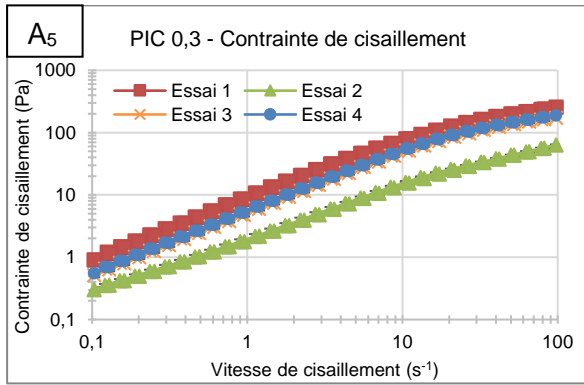
Nom	Molécule active	Indication ; voie d'administration	Autorisation
Liposomes			
AmBisome® (Gilead Sciences)	Amphotericine B, liposomes (60-70 nm)	Ciblage du MPS, diminution toxicité. Infection fongique systémique (IV)	FDA, 1997 EMA, 1998
Doxil® (Baxter Healthcare), Caelyx® (Janssen)	Chlorhydrate de doxorubicine liposomes pegylés (100nm)	Ciblage passif par effet EPR, diminue toxicité ; Sarcome de Kaposi associé au VIH, myélome multiple, cancer ovarien, cancer du sein (IV)	FDA, 1995 EMA, 1996
Marqibo® (Talon therapeutics)	Sulfate de Vincristine liposomes (100nm)	Ciblage passif par effet EPR, diminue toxicité ; Leucémie lymphoïde aigue (IV)	FDA, 2012
Mepact™ (Takeda)	Mifamurtide liposomes multilamellaires	Ciblage du MPS ; ostéosarcome (IV)	EMA, 2009
Onivyde™ (Merrimack)	Irinotecan liposomes pegylés	Augmente libération site tumoral, diminue toxicité ; Cancer pancréatique métastatique (IV)	FDA, 2015 EMA, 2016
Visudyne® (Bausch and Lomb) (Novartis)	Verteporfine liposome	Solubilisation du PA ; dégénération maculaire liée à l'âge, myopie pathologique, syndrome d'histoplasmose oculaire (IV)	FDA, 2000 EMA, 2000
Vyxeos® (Jazz Pharmaceuticals) (Celator pharmaceuticals)	Cytarabine + Daunorubicine liposome (100 nm)	Leucémie myéloïde aigue (IV)	FDA, 2017 EMA, 2018
Formulation lipidique non liposomale			
Abelcet® (Leadiant biosci INC)	Amphotéricine B Complexe phospholipidique >250 nm	Ciblage du MPS, diminue toxicité ; infection fongique systémique, (IV)	FDA, 1995 EMA, 1997
Diprivan® (Aspen) Propofol-Lipuro® (B Braun Melsungen AG) Propofol® (Fresenius kabi)	Propofol émulsion	Anesthésique, (IV)	FDA, 1996 EMA, 1996
Onpattro® (Alnylam Pharmaceuticals)	Patisiran sodique Nanoparticules lipidiques	Amylose médiée par la transthyrétrine, (IV)	FDA, 2018 EMA, 2018
Nanocrystaux			
Bydureon® (AstraZeneca)	Exenatide	Libération prolongée Diabète type 2, (SC)	FDA, 2012, EMA, 2011
Emend® (Merck)	Aprépitant	Absorption rapide meilleure biodisponibilité ; antiémétique (oral)	FDA, 2003 EMA, 2003
Focalin XR® (Novartis)	Chlorhydrate Dexméthylphénidate	Augmente biodisponibilité, libération prolongée ; psychostimulant, (oral)	FDA, 2005

Invega Sustenna®, Xeplion® (Janssen)	Palmitate de palipéridone	Libération prolongée ; schizophrénie (IM)	EMA, 2011 FDA, 2009
Megace ES® (Endo pharmaceuticals)	Acétate de Mégestrol	Augmentation de la biodisponibilité ; Anorexie, cachexie (oral)	FDA, 2005
Rapamune® (Pfizer)	Sirolimus	Augmentation de la biodisponibilité ; Prévention rejet de greffe rénale, lymphangioliomyomatose (oral)	FDA, 2000 EMA, 2001
Risperdalconsta® (Janssen)	Risperidone	Libération prolongée Schizophrénie (IM)	FDA, 2003 EMA, 2003
Ritalin LA®, Ritaline (Novartis)	Méthylphenidate chlorhydrate	Augmente biodisponibilité, Trouble de l'attention avec hyperactivité (oral)	FDA, 2002 EMA, 2003
Ryanodex® (Eagle pharmaceuticals)	Dantrolène sodique	Améliore l'absorption, Hypothermie maligne (IV)	FDA, 2014
Tricor® (Abbvie) Lipanthyl® (Mylan)	Fénofibrate	Augmentation de la biodisponibilité ; hyperlipidémie (oral)	FDA, 2004 EMA, 2005
Triglide® (Skye pharma)	Microparticules de Fénofibrate	Augmentation de la biodisponibilité ; hyperlipidémie (oral)	FDA, 2004
Vivitrol® (Alkermes)	Naltrexone	Libération prolongée ; Addiction aux opioïdes (IM)	FDA, 2006
Zanaflex® (Covis Pharma)	Chlorhydrate de tizanidine	Améliore biodisponibilité ; relaxant musculaire (oral)	FDA, 2002
Zypadhera® (Eli Lilly)	Olanzapine	Libération prolongée ; Schizophrénie (IV)	EMA, 2008
Nanoformulations à base de polymères			
Cimzia® (UCB)	Certolizumab pegol, fragment d'anticorps pegylé	Améliore temps de circulation et stabilité ; polyarthrite rhumatoïde, rhumatisme psoriasique, spondylarthrite ankylosante (SC)	FDA, 2008 EMA, 2009
Copaxone® (Teva Pharmaceuticals)	Acétate de glatiramer, polypeptide	Sclérose en plaque (SC)	FDA, 1996 EMA, 2004
Eligard® (Tolmar)	Acétate de Leuproréline	Libération prolongée ; cancer avancé de la prostate (SC)	FDA, 2002 EMA, 2005
Mircera® (Hoffman la roche) (Roche)	Méthoxy polyéthylène glycol-époétine-bêta	Améliore la stabilité ; Anémie avec insuffisance rénale (IV/SC)	FDA, 2007 EMA, 2007
Neulasta® (Amgen)	PEGfilgastrim	Améliore la stabilité Neutropénie induite par chimiothérapie (SC)	FDA, 2002 EMA, 2002
Oncaspar® (Sigma-Tau) (Servier)	Pégaspargase	Diminue fréquence administration, améliore stabilité ; Leucémie lymphoblastique aigue (IM, IV)	FDA, 1994 EMA, 2016
Pegasys® (Hoffman-la-roche) (Roche)	Peginterféron alpha 2a	Diminue fréquence administration, améliore stabilité ; Hépatite B et C (SC)	FDA, 2002 EMA, 2002
Renagel® Renvela® (Genzyme) (Sanofi)	Sévélamer chlorhydrate	Augmente temps de circulation, Hyperphosphorémie avec insuffisance rénale chronique (oral)	FDA, 2000 EMA, 2000
Somavert® (Pharmacia) (Pfizer)	pegvisomant	Améliorer stabilité ; acromégalie (SC)	FDA, 2003 EMA, 2002

Zilretta® (Flexion Therapeutics)	Triamcinolone acétonide	Libération prolongée ; Ostéoarthrite du genou (intra-articulaire)	FDA, 2017
Conjugué protéique			
Abraxane® (Abraxis) (Celgene)	Paclitaxel, conjugué à l'albumine nanoparticules (130 nm)	Ciblage passif par effet EPR, améliorer la solubilité, cancer du sein métastatique, cancer pulmonaire non à petites cellules, cancer pancréatique métastatique (IV)	FDA, 2005 EMA, 2008
Kadcyla® (Genentech) (Roche)	Trastuzumab emtasine	Cancer du sein (IV)	FDA, 2013 EMA, 2013
Krystexxa® (Horizon)	Pegloticase	Améliore stabilité, Goutte chronique (IV)	FDA, 2010
Ontak® (Eisai Inc)	Denileukin diftitox	Ciblage ; Lymphome cutané à cellules T (IV)	FDA, 1999
PegIntron® (Schering) (Merck)	Peginterféron alpha 2b	Améliore stabilité, Hépatite C (SC)	FDA, 2001 EMA, 2000
Plegridy® (Biogen)	peginterféron bêta 1a	Améliore stabilité ; Sclérose en plaque (SC)	FDA, 2014 EMA, 2014
Zevalin® (Spectrum pharms) (Ceft biopharma)	⁹⁰ Y-Ibritumomab tiuxetan	Lymphome folliculaire, (IV)	FDA, 2002 EMA, 2004
Nanoformulations à base de tensioactifs			
Diprivan® (Aspen) Propofol-Lipuro® (B Braun)	Propofol, émulsion	Solubilisation du PA, Anesthésiant (IV)	FDA, 1996 EMA, 1996
Neoral® (Novartis AG)	Cyclosporine	Traitement antirejet de greffe (oral)	FDA, 1995 EMA, 1995
Norvir® (Abbvie)	Ritonavir	VIH, rejet greffe de rein (oral)	FDA, 1996 EMA, 1996
Nanoformulations à base de métaux			
Feraheme™ (AMAG)	Ferumoxytol, Nanoparticule d'oxyde de fer superparamagnétique	Ciblage du MPS, libération prolongée, traitement des anémies ferriprive avec maladie rénale chronique (IV)	FDA, 2009
Ferinject® (Vifor)	Carboxymaltose ferrique	Déficience en fer, (IV)	EMA, 2010
Ferrlecit® (Sanofi)	Gluconate ferrique de sodium	Augmentation dose Anémie par déficience en fer avec insuffisance rénale chronique (IV)	FDA, 1999 EMA, 1999
Hensify (NBTXR3) (Nanobiotix)	Nanoparticules d'oxyde d'hafnium	Amplificateur de radiothérapie, Carcinome à cellules squameuses localement avancé (intra-tumorale)	CE Mark (2019)
Venofer® (Vifor) (American regent)	Complexe d'hydroxide de fer + saccharose	Augmentation dose, Déficience rénale chronique avec carence en fer (IV)	FDA, 2000 EMA, 1998
Virosomes			
Gendicine® (SiBiono)	Adenovirus recombinant exprimant p53	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou (IV)	Chine, 2003
Rexin-G®	Gène de la cycline G1, particules de 100 nm	Thérapie génique, tumeur solide (IV)	Philippines, 2007

Annexes 2 : résultats des études de rhéologie





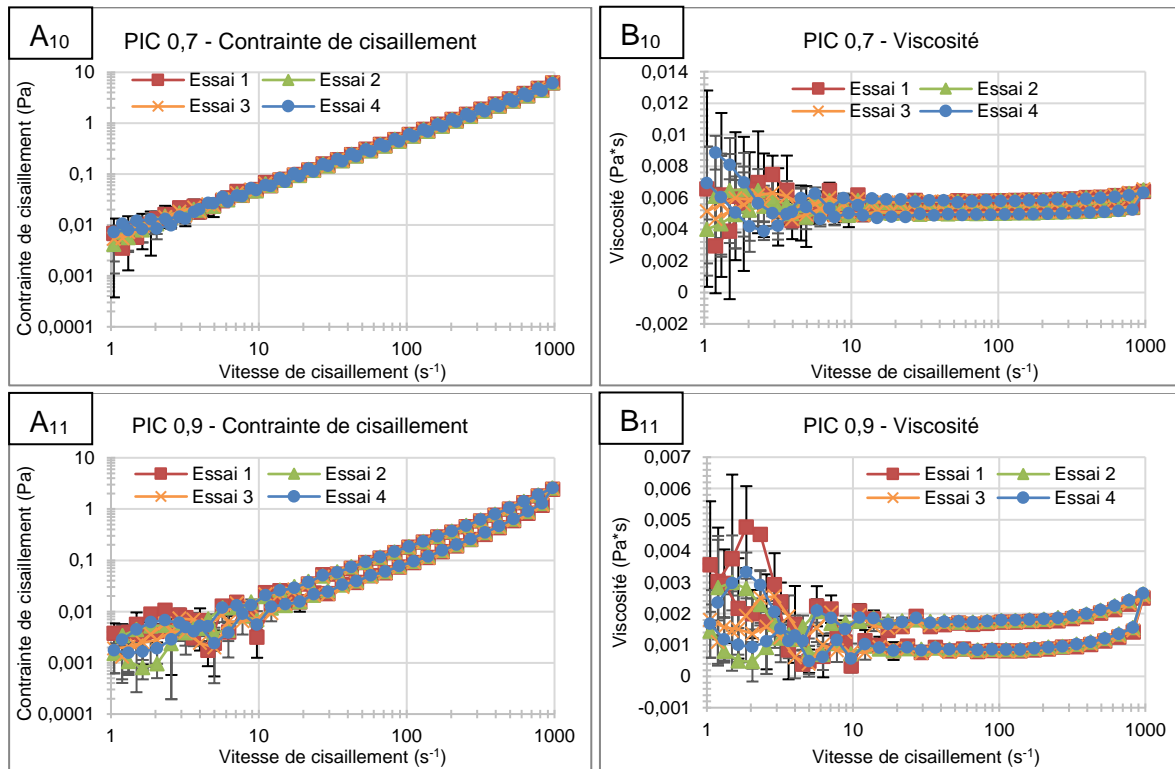


Figure-A 1: Résultats des études de rhéologie. A : évolution de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement. B : évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

NANOMEDICAMENTS ET VOIE ORALE, FORMULATION BASSE ENERGIE DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES

Résumé

De nos jours, les nanomédicaments sont en plein essor de par les nombreux avantages qu'ils offrent dans le domaine de la formulation galénique. L'objectif de ce travail est la formulation de nanocapsules lipidiques (NCLs), via une méthode d'émulsification basse énergie, et pouvant encapsuler une molécule modèle, le bêta-carotène. Deux procédés d'inversion de phase ont été choisis : l'un se base sur des cycles en température (inversion de phase en température ou PIT), l'autre réside en une variation de la composition et notamment de la quantité d'eau (inversion de phase en composition ou PIC). Les NCLs obtenus par ces 2 procédés sont analysées (par DLS) et les mécanismes sous-jacents sont étudiés par différentes techniques, notamment la conductimétrie, la tensiométrie et la rhéologie. Les nanovecteurs sont d'un intérêt particulier dans le cas d'une administration par voie orale. Cependant le milieu gastro-intestinal présente de nombreuses barrières à l'absorption de principes actifs. Des études de stabilité dans les milieux biomimétiques sont également évoqués.

TITLE

NANOMEDICINES AND ORAL ROUTE, LOW ENERGY FORMULATION OF LIPID NANOCAPSULES

Summary

Nowadays, nanomedicines are fast-growing due to the advantages they offer in the field of galenic formulation. The objective of this work is the formulation of lipid nanocapsules (LNCs) through a low-energy emulsification method, and which can encapsulate a model molecule, beta-carotene. 2 process of phase inversion have been chosen: one of these processes is based on temperature cycle (phase inversion temperature or PIT), the other rests on a composition variation, with, particularly, the quantity of water brought to the system (phase inversion composition or PIC). The LNCs obtained by these 2 processes are analyzed (by dynamic light scattering) and the underlying mechanisms are studied by different techniques, especially conductimetry, tensiometry, and rheology. Nanovectors are of particular interests in the case of an oral administration. However, the gastro-intestinal tract presents many barriers to the absorption of active ingredients. Stability studies in biomimetic media are also mentioned.

Mots-clés

Nanomédicament, voie orale, nanocapsules lipidiques, inversion de phase
