



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2012

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**Le CO<sub>2</sub> supercritique :  
un fluide prometteur dans la formulation  
pharmaceutique**

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 janvier 2012

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Caroline MATHIEU**  
née le 05 juillet 1986 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

Président : Mme Francine KEDZIEREWICZ, Maître de conférences  
Directeur : Mme Danielle BARTH, Professeur  
Juges : Mme Véronique FALK, Maître de conférences  
M. Rémi SIMON, Docteur en Pharmacie, Ingénieur Procédés



UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2012

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**Le CO<sub>2</sub> supercritique :  
un fluide prometteur dans la formulation  
pharmaceutique**

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 janvier 2012

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Caroline MATHIEU**  
née le 05 juillet 1986 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

Président : Mme Francine KEDZIEREWICZ, Maître de conférences  
Directeur : Mme Danielle BARTH, Professeur  
Juges : Mme Véronique FALK, Maître de conférences  
M. Rémi SIMON, Docteur en Pharmacie, Ingénieur Procédés

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2011-2012**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

**Responsable de la filière Officine :**

**Responsables de la filière Industrie :**

Francine KEDZIEREWICZ

Francine PAULUS

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement**

**Pharmaceutique Hospitalier :**

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Jean-Michel SIMON

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**

Section CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ 𐄂	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN 𐄂	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☒	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☒	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
<b>PROFESSEUR ASSOCIE</b>		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
<b>PROFESSEUR AGREGE</b>		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

☒ En attente de nomination

\* Discipline du Conseil National des Universités :

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

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

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

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

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES  
DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE  
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# REMERCIEMENTS

**A Madame Francine KEDZIEREWICZ, Maître de Conférences,**

Pour m’avoir fait l’honneur de présider ce jury, pour votre confiance dans ce travail et pour les enseignements de galénique reçus en première année de Pharmacie.

**A Madame Danielle BARTH, Professeur,**

Pour m’avoir fait l’honneur de diriger ce travail, pour m’avoir inspiré le sujet de cette thèse au cours de mon Projet de Fin d’Etudes mené au sein de votre laboratoire, pour m’avoir fait partager votre savoir et vos connaissances, pour votre gentillesse et votre disponibilité.

**A Madame Véronique FALK, Maître de Conférences,**

Pour m’avoir fait l’honneur de juger ce travail, pour votre accompagnement personnalisé durant ces deux années au sein de l’ENSIC.

**A Monsieur Rémi SIMON, Pharmacien-Ingénieur,**

Sans qui je n’aurais peut-être pas choisi cette voie et ce double-diplôme, pour m’avoir fait l’honneur de juger ce travail, pour l’intérêt que vous y avez porté et pour vos multiples conseils.

Veillez trouver ici l’expression de mes plus sincères et profonds remerciements.

**A mes parents,**

Sans qui je n’en serais pas là où j’en suis aujourd’hui et qui m’ont inculqué des valeurs essentielles. Vous m’avez soutenue sans relâche dans mes études et été confiants dans mon travail et mes choix. Merci pour toutes ces années pendant lesquelles vous avez toujours trouvé comment me remonter le moral dans les moments difficiles et pour avoir été présents au quotidien.

**A mes frères, Cyril et Jérôme**

Pour leur soutien, leurs conseils de grands frères et leur humour, qui ont fait de moi une petite sœur fière de sa fratrie.

**A mes belles-sœurs, Julie et Ludivine,**

Qui ont toujours témoigné leur bonne humeur et leur gentillesse à mon égard.

**A mes grands-mères,**

Pour toutes vos petites attentions et pour m'avoir soutenue dans ce travail.

**A ma famille, aux amis de la famille, et à ma belle-famille,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'être présents ou d'avoir une pensée pour moi en ce jour important et pour avoir régulièrement pris de mes nouvelles.

**A mes amis de la fac,**

Qui, de près ou de loin, et de quelque manière qu'il soit, ont été impliqués dans l'écriture de cette thèse, notamment Binôme et Didine pour leur relecture sérieuse et soignée de ce document. Merci à tous pour les moments inoubliables sur les bancs de la fac ou ailleurs...

**A mes amis d'enfance, du lycée ou d'ailleurs,**

Pour qui je suis l'« éternelle étudiante ». Me voilà enfin diplômée ! Merci pour votre présence, parfois à distance, et pour tous les inoubliables épisodes de jeunesse.

**A mon cher et tendre, Cédric,**

Qui a toujours cru en moi et qui me le fait savoir, avec qui les moments les plus difficiles deviennent plus faciles, et sans qui ces trois dernières années n'auraient pas eu la même saveur. Merci pour tous les sacrifices que tu as faits pour nous.

# TABLE DES MATIERES

<b><u>INTRODUCTION GENERALE .....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>CHAPITRE 1 : GENERALITES .....</u></b>	<b><u>19</u></b>
1. LES FLUIDES SUPERCRITIQUES .....	20
1.1. INTRODUCTION .....	20
1.2. DESCRIPTION DE LA ZONE SUPERCRITIQUE .....	20
1.3. PROPRIETES DU FSC .....	21
1.4. CAS PARTICULIER DU CO <sub>2</sub> SC.....	23
2. L'INTERET DE LA FORMULATION GALENIQUE DANS LE CONTROLE DE LA PHARMACOCINETIQUE ET DE LA PHARMACODYNAMIE .....	24
2.1. INTRODUCTION .....	24
2.2. LE CONTROLE DE LA BIODISPONIBILITE ET DE LA LIBERATION DU PA.....	26
2.2.1. Définition de la biodisponibilité(8).....	26
2.2.2. Problème posé .....	26
2.2.3. La phase biopharmaceutique.....	27
2.2.4. Moyens d'amélioration de la biodisponibilité d'un PA .....	28
2.2.5. Résumé des solutions d'amélioration de la biodisponibilité.....	33
2.3. LE CONTROLE DU DEVENIR DU MEDICAMENT DANS L'ORGANISME.....	34
2.3.1. Phase pharmacocinétique : le modèle ADME .....	34
2.3.2. Moyens d'amélioration du devenir du médicament dans l'organisme .....	35
3. RESUME DU CHAPITRE.....	37
<b><u>CHAPITRE 2 : TECHNIQUES DE FORMULATION DU PRINCIPE ACTIF</u></b>	
<b><u>VISANT A MODIFIER SA BIODISPONIBILITE ET SON ABSORPTION .....</u></b>	<b><u>39</u></b>
1. INTRODUCTION .....	40
2. TECHNIQUES DE REDUCTION DE LA TAILLE DES PARTICULES .....	41
2.1. TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DE REDUCTION DE LA TAILLE DES PARTICULES .....	41
2.2. TECHNIQUES EN FLUIDES SUPERCRITIQUES DE REDUCTION DE LA TAILLE DES PARTICULES.....	42
2.2.1. FSC utilisé comme solvant.....	43
2.2.2. FSC utilisé comme antisolvant.....	49
2.2.3. PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) .....	56
2.2.4. SAA (Supercritical Fluid-Assisted Atomization) .....	57
2.2.5. Influence des paramètres de travail sur la génération de particules.....	58
3. TECHNIQUES DE PREPARATION DE FORMES GALENIQUES INNOVANTES.....	62
3.1. INTRODUCTION .....	62
3.2. L'ENCAPSULATION, L'ENROBAGE ET LA FORMATION DE PARTICULES COMPOSITES.....	62
3.2.1. Généralités .....	62
3.2.2. Techniques conventionnelles d'encapsulation (32) .....	63
3.2.3. Techniques d'encapsulation en FSC.....	72
3.3. LA FORMATION DE LIPOSOMES .....	77

3.3.1.	Introduction .....	77
3.3.2.	Préparation des liposomes par les techniques conventionnelles .....	79
3.3.3.	Préparation des liposomes en FSC et avantages.....	81
3.4.	L'INCLUSION DANS DES COMPLEXES : LES CYCLODEXTRINES .....	84
3.4.1.	Généralités .....	84
3.4.2.	Techniques conventionnelles d'inclusion dans des cyclodextrines .....	86
3.4.3.	Techniques en FSC.....	87
4.	RESUME DU CHAPITRE.....	90

## **CHAPITRE 3 : ETAT DE L'ART EN MATIERE DE FORMULATION**

### **SUPERCRIQUE .....** 92

1.	LA THERAPIE PAR VOIE PULMONAIRE .....	94
1.1.	GENERALITES.....	94
1.2.	POUR UN EFFET LOCAL.....	97
1.2.1.	Généralités et présentation du problème.....	97
1.2.2.	Le traitement de l'asthme et/ou de la BPCO .....	98
1.2.3.	Le traitement d'affections microbiennes .....	103
1.3.	POUR UN EFFET SYSTEMIQUE .....	103
1.3.1.	Généralités et présentation du problème.....	103
1.3.2.	Le traitement du diabète par l'insuline.....	105
1.3.3.	Le traitement par l'hormone de croissance .....	107
1.3.4.	Le traitement de cancers.....	107
2.	LA THERAPIE PAR VOIE ORALE .....	109
2.1.	LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR ET DE L'INFLAMMATION .....	110
2.2.	LE TRAITEMENT DES INFECTIONS .....	115
2.3.	LE TRAITEMENT DES MALADIES NEUROLOGIQUES ET PSYCHIATRIQUES.....	119
2.4.	LE TRAITEMENT DES TROUBLES ENDOCRINIENS.....	120
2.5.	LE TRAITEMENT DE CANCERS .....	123
2.6.	LES IMMUNOSUPPRESSEURS .....	123
2.7.	LES ANTI-ANEMIQUES.....	123
3.	LA THERAPIE PAR VOIE PARENTERALE.....	124
3.1.	LE TRAITEMENT DU DEFICIT EN HORMONE DE CROISSANCE .....	124
3.2.	LE TRAITEMENT DES TROUBLES PSYCHIATRIQUES .....	125
3.3.	LE VACCIN ANTI-TETANIQUE.....	125

## **CHAPITRE 4 : LIMITES DE LA TECHNOLOGIE EN FLUIDE SUPERCRITIQUE,**

### **INDUSTRIALISATION ET CONCLUSION .....** 127

1.	LIMITES DE LA TECHNOLOGIE.....	128
2.	INDUSTRIALISATION .....	129
3.	LA TECHNOLOGIE EN FLUIDES SUPERCRITIQUES : FUTURISTE OU SCIENCE-FICTION ? .....	131

### **BIBLIOGRAPHIE .....** 133

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Cagniard de la Tour .....	20
Figure 2 : Diagramme de phase d'un composé pur .....	21
Figure 3 : Diagramme de phase du CO <sub>2</sub> .....	23
Figure 4 : Le devenir du médicament dans l'organisme, de l'ingestion à la réponse pharmacologique et principales pistes d'amélioration de l'effet d'un PA .....	25
Figure 5 : Schématisation d'un système matriciel .....	30
Figure 6 : Pompe osmotique sans membrane de séparation.....	30
Figure 7 : Gélule contenant des microgranules .....	30
Figure 8 : Classification BCS .....	32
Figure 9 : Schéma de principe du procédé RESS.....	44
Figure 10 : Exemple de particules de lovastatine obtenues par le procédé RESS .....	44
Figure 11 : Détente lors du procédé RESS sur le diagramme enthalpie-pressure (diagramme de Mollier).....	46
Figure 12 : Schéma de principe du procédé GAS .....	51
Figure 13 : Schéma de principe du procédé SAS .....	52
Figure 14 : Schéma du procédé PCA .....	54
Figure 15 : Schéma de principe du procédé ASES .....	55
Figure 16 : Schéma du procédé SEDS .....	55
Figure 17 : Schéma de principe du procédé PGSS.....	56
Figure 18 : Schéma du procédé SAA .....	57
Figure 19 : Algorithme de décision du procédé à utiliser et des paramètres à déterminer .....	58
Figure 20 : Schématisation d'une buse annulaire .....	61
Figure 21 : Morphologie des microparticules .....	63
Figure 22 : Principe de la coacervation simple .....	64
Figure 23 : Schéma de principe de la congélation de gouttes .....	66
Figure 24 : Représentation schématique d'un appareil à lit d'air fluidisé en configuration top spray .....	67
Figure 25 : Configurations possibles d'un appareil de nébulisation-séchage.....	69
Figure 26 : Schéma développé d'une molécule de phospholipide.....	77
Figure 27 : Structure d'un phospholipide .....	78
Figure 28 : Structure du liposome .....	78
Figure 29 : Structure de l' $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ -CD .....	84
Figure 30: Schéma de l'installation utilisée par Separex.....	89
Figure 31 : Terbutaline précipitée par le procédé d'atomisation en FSC.....	99
Figure 32 : Echantillon commercial de terbutaline micronisée.....	99

Figure 33 : Comparaison entre la distribution de taille de particules de terbutaline produite par SAA et de l'échantillon commercial.....	99
Figure 34 : Particules d'insuline produites par le groupe Separex .....	106
Figure 35 : Distribution de taille des particules d'insuline obtenue (procédé de Separex) ....	106
Figure 36 : Ibuprofène avant traitement et après traitement par RESS .....	111
Figure 37 : Profil de dissolution de l'ibuprofène original, ayant subi le procédé en FSC, imprégné avec du lactose ou avec une CD.....	112
Figure 38 : Matrice de PVP imprégnée de kétoprofène .....	113
Figure 39 : Particules d'amoxicilline avant traitement SAS.....	115
Figure 40 : Particules d'amoxicilline après traitement SAS avec du DMSO.....	115
Figure 41 : Profil de dissolution du sulfaméthoxazole.....	117
Figure 42 : Profil de concentration plasmatique après administration orale d'itraconazole- $\beta$ -CD .....	118
Figure 43 : Résultats in vivo (sur le chien) de biodisponibilité obtenus avec l'éflucimibe formulée par Formulplex <sup>®</sup> ( $\gamma$ -CD) : comparaison avec la formulation initiale et d'autres technologies .....	121
Figure 44 : Profil de dissolution de l'éflucimibe formulé par 3 méthodes différentes.....	122

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des propriétés d'un gaz, d'un fluide supercritique et d'un liquide ..	22
Tableau 2 : Résumé du devenir du médicament dans l'organisme en fonction de sa forme galénique .....	37
Tableau 3: Propriétés du PA modifiables en vue d'une augmentation ou une diminution de l'activité pharmacologique.....	40
Tableau 4 : Inconvénients des méthodes conventionnelles de réduction de taille des particules ...	42
Tableau 5 : PA utilisés dans le procédé RESS .....	48
Tableau 6 : Avantages et inconvénients du procédé GAS par rapport au procédé RESS.....	51
Tableau 7 : Techniques conventionnelles d'encapsulation.....	64
Tableau 8 : Récapitulatif des caractéristiques des procédés de gélification et de congélation de gouttes .....	66
Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques du procédé en lit d'air fluidisé .....	68
Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques du procédé de nébulisation – séchage .....	70
Tableau 11 : Industrialisation du procédé de nébulisation-séchage .....	70
Tableau 12 : Comparaison des procédés solvant et anti-solvant pour la formation de liposomes..	83
Tableau 13 : Résumé des procédés SC.....	90
Tableau 14 : Performances des méthodes en FSC par rapport aux méthodes conventionnelles de protection du PA.....	91
Tableau 15 : Ordres de grandeurs de la taille des particules recommandée en fonction de la voie d'administration .....	94
Tableau 16 : Résultats de solubilité in vitro de Formulplex ® .....	109
Tableau 17 : Comparaison de la biodisponibilité de l'éflucimibe par différents types de formulations .....	122
Tableau 18 : Sociétés investissant dans la formulation galénique par le CO <sub>2</sub> supercritique .	132

# LISTE DES ABREVIATIONS

h, mn, s :	Heure, Minute, Seconde
mL, L :	Millilitre, Litre
ng, mg, g, kg :	Nanogramme, Milligramme, Gramme, Kilogramme
µm, mm, cm, m :	Micromètre, Millimètre, Centimètre, Mètre
°C :	Degré Celsius
5-FU :	5-FluoroUracile
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ASES :	Aerosol Solvent Extraction System
BCS :	Biopharmaceutics Classification System
BPCO :	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone
COV :	Composé Organique Volatil
DMF :	DiMéthylFormamide
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
DPCC :	DiPalmitoylPhosphatidylCholine
E/H :	Emulsion Eau dans Huile
ELV :	Equilibre Liquide-Vapeur
EMA :	European Medicines Agency
EPO :	Erythropoïétine
FDA :	Food and Drug Administration
FSC :	Fluide supercritique
GAS :	Gaseous Anti-Solvent
GMP :	Good Manufacturing Practices
HPMC :	HydroxyPropylMéthylCellulose
K :	Kelvin
L-PLA :	L-poly(acide lactique)
PA :	Principe Actif
PCA :	Precipitation with Compressed Antisolvent
PGSS :	Particles from Gas Saturated Solutions
PLGA :	Poly-(acide lactique co-glycolique)
R&D :	Recherche et Développement
RESS :	Rapid Expansion of Supercritical Solutions
SAA :	Supercritical Fluid-Assisted Atomization
SAS :	Supercritical Anti-Solvent
SC :	Supercritique
SEDS :	Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids
SIDA :	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

# INTRODUCTION GENERALE

L'optimisation de la formulation galénique et de la distribution des médicaments améliore l'efficacité thérapeutique du médicament, réduit les effets secondaires indésirables, les intolérances et apporte davantage de confort et de sécurité au patient. Actuellement, beaucoup de molécules issues de la recherche pharmaceutique ne sont pas développées en raison de leur trop faible efficacité, notamment de par leur faible solubilité dans les liquides biologiques (sérum, sang, liquide céphalo-rachidien, ...), et à cause de leur inactivation/modification par le métabolisme ou l'acidité gastrique par exemple. Plusieurs solutions d'innovations s'offrent alors aux laboratoires de recherche : certains préfèrent se consacrer à la mise en place d'une formulation galénique nouvelle d'un principe actif (PA) déjà existant afin de lui apporter tout l'environnement nécessaire pour une meilleure efficacité une fois administré dans l'organisme ; d'autres misent sur le contrôle des propriétés de la substance produite, telles que la stabilité, le polymorphisme, la solubilité ou la biodisponibilité, essentielles à l'efficacité du médicament. Les groupes de recherche tiennent compte aussi de l'invasivité d'un traitement et n'hésitent pas à tourner leurs études vers la mise en place de solutions thérapeutiques moins invasives et contraignantes que la voie injectable. Une des solutions est de substituer la voie injectable par les voies orale et pulmonaire qui favorisent l'observance du patient, en tenant toutefois compte du fait de dégradations probables du PA par l'organisme quand administrée par voie orale.

Ce n'est pas le seul challenge auquel est confrontée l'industrie pharmaceutique en ce début de 21<sup>ème</sup> siècle. En effet, en plus du besoin continu d'inventer de nouveaux médicaments et d'améliorer leur efficacité contre de nombreuses pathologies, il est indispensable de protéger l'environnement en favorisant l'utilisation de procédés propres et respectueux de l'environnement ainsi qu'en réduisant l'utilisation de solvants potentiellement dangereux et polluants. Enfin, les normes de plus en plus strictes en matière de résidus de solvants autorisés dans les médicaments et le coût croissant associé au recyclage des solvants organiques ont poussé la recherche pharmaceutique à développer des procédés alternatifs utilisant les fluides supercritiques (FSC) dans toutes les applications recourant aux solvants traditionnels. Les premières applications des FSC dans le domaine pharmaceutique concernaient donc tout naturellement le remplacement des solvants organiques dans les procédés courants mais d'autres applications ont vu le jour depuis une vingtaine d'années. Le traitement du solide divisé est à la fois le plus récent et le plus prometteur des champs d'investigation consacrés aux milieux supercritiques (SC). Aujourd'hui, les méthodes en FSC en pharmacie visent principalement le domaine de la galénique et permettent le contrôle de la biodisponibilité, de

la morphologie et de la forme polymorphique de molécules actives. De façon synthétique, ces techniques reprennent pour partie des méthodes classiquement pratiquées par les chimistes en substituant les FSC aux solvants liquides traditionnels. Ainsi, les méthodes conventionnelles de formulation ont été adaptées et optimisées afin d'aboutir à un concept innovant mettant en œuvre des procédés propres et économiques utilisant peu ou pas de produits toxiques (1), dans un contexte de développement durable. Les procédés mettant en œuvre un milieu FSC répondent à ces attentes et permettent d'améliorer la qualité des produits voire d'en élaborer de nouveaux, ceci tout en respectant l'environnement.

Les deux fluides les plus utilisés en conditions SC sont des produits très abondants naturellement, disponibles à bas prix et à haute pureté, non toxiques, non inflammables et ne présentant aucun danger pour l'environnement : le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'eau. Le  $\text{CO}_2$  est le plus utilisé, avec historiquement le remplacement des solvants organiques dans les procédés d'extraction en pharmacie. Il est aujourd'hui très largement disponible à haute pureté car produit de façon inévitable dans de nombreuses installations pétrochimiques à des quantités bien au-delà de ses utilisations présentes ; sa mise en œuvre comme FSC ne contribue donc pas à l'augmentation des rejets de gaz à effet de serre, mais au contraire, il permet d'éviter le rejet de composés organiques volatils (COV).

Nous allons voir comment l'utilisation du  $\text{CO}_2$  SC permet d'améliorer la qualité des produits qui ne risquent pas d'être contaminés par des résidus de solvant potentiellement toxiques, d'améliorer l'efficacité des formulations réalisées et de réduire les émissions de COV à l'atmosphère et des rejets dans les eaux de surface. Nous n'évoquerons dans cette thèse que les méthodes utilisant le  $\text{CO}_2$  SC, puisque c'est lui qui intervient dans la plupart des procédés en FSC utilisés dans la formulation des médicaments. Les applications des FSC en pharmacie étant multiples (chromatographie, synthèse organique, ...), nous avons choisi de concentrer ce travail de thèse sur la formulation galénique par le  $\text{CO}_2$  SC, et plus précisément sur les techniques mises en œuvre pour améliorer l'efficacité du médicament.

Dans une première partie, nous définirons les FSC et décrirons de manière précise le  $\text{CO}_2$  SC, l'intérêt de la formulation d'un médicament quant au contrôle de sa biodisponibilité et de son devenir dans l'organisme, et les formes galéniques associées mises en œuvre. Dans une deuxième partie, nous décrirons les techniques conventionnelles de formulation des médicaments en vue d'améliorer l'efficacité d'un traitement, ainsi que les procédés innovants

assistés par le CO<sub>2</sub> SC. La troisième partie est un état des lieux de la science pharmaceutique en matière de formulation en milieu SC. Une dernière partie enfin permet de comprendre les limites de ces procédés et les raisons pour lesquelles ceux-ci ont encore du mal à se développer à l'échelle industrielle.

# CHAPITRE 1 :

# GENERALITES

## 1. LES FLUIDES SUPERCRITIQUES

### 1.1. Introduction

Le domaine SC et le fluide dans ces conditions de température et de pression sont caractérisés pour la première fois en 1822, suite aux travaux menés par le physicien Cagniard de La Tour (Figure 1). Ce dernier observe que, dans un espace clos, la séparation entre les phases liquide et gazeuse disparaît au-delà d'une certaine température et d'une certaine pression. Il définit alors le point critique, qui marque l'apparition d'un état intermédiaire entre le liquide et le gaz, appelé alors « état supercritique ». Cette notion sera ensuite discutée, puisqu'il ne s'agit pas d'un état de la matière



Figure 1 : Cagniard de la Tour

comme peuvent l'être le solide, le liquide ou le gaz. Il s'agit cependant d'une expression couramment utilisée dans le jargon scientifique ; nous essaierons de l'utiliser avec parcimonie et nous la mettrons entre guillemets lorsque nous souhaiterons évoquer ce fluide dans ces hautes pressions et températures. A noter que contrairement aux autres transitions de phases (liquide-gaz, liquide-solide ou solide-gaz), le passage dans le domaine SC ne s'accompagne pas d'une discontinuité des propriétés physico-chimiques du fluide (2).

### 1.2. Description de la zone supercritique

Pour tout composé pur, il existe trois états thermodynamiques : état solide, état liquide et état gazeux. Les changements d'états sont progressifs et localisés et fonction de la pression et de la température. Comme le montre le diagramme de phase (Figure 2), tout corps pur possède des courbes d'équilibre qui décrivent ces changements d'état. Le point triple correspond à un couple de température et de pression donné ( $T_{tp}$  ;  $P_{tp}$ ) pour un corps pur, et c'est dans ces conditions uniques que les trois états (liquide, solide et gaz) coexistent.

Pour ce même corps pur, il existe un couple de température et de pression ( $T_c$  ;  $P_c$ ) où la phase liquide et gazeuse ont la même densité, définissant ainsi un point particulier du diagramme, appelé le point critique. Au-delà de ce point, se situe le domaine SC de ce composé, où seule une phase existe. Il n'existe pas de changement d'état entre les phases gazeuse ou liquide et SC ; la transition se fait de manière continue et homogène (une phase n'apparaît pas

localement dans une autre donc sans apparition de surface et donc de tension de surface), c'est pourquoi ces transitions sont matérialisées en pointillés dans le diagramme de phase.

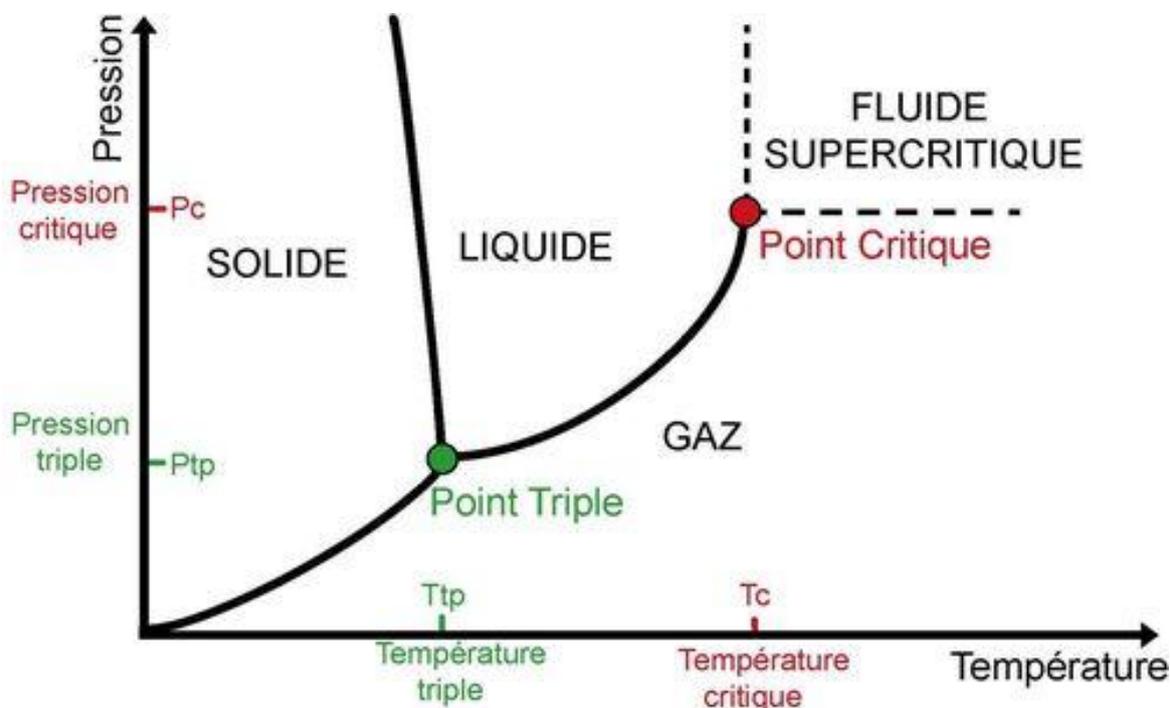


Figure 2 : Diagramme de phase d'un composé pur (3)

### 1.3. Propriétés du FSC

Dans les conditions SC, le fluide a des propriétés intermédiaires à celles d'un gaz et d'un liquide (Tableau 1). Les FSC possèdent une viscosité et une diffusivité proches des gaz, mais leur masse volumique les rapproche du liquide. Cette masse volumique élevée confère aux FSC la propriété d'être de bons solvants. Leur viscosité dynamique, proche de celle des gaz, favorise les transferts de matière. De plus, grâce à leur diffusivité plus élevée que celle des liquides ainsi que grâce à l'absence de tension de surface, ils ont une meilleure pénétration dans les milieux poreux.

Les FSC offrent la particularité d'avoir des propriétés ajustables non seulement par la température, mais aussi par la pression ; ceci leur a valu d'être qualifiés de solvants à « géométrie variable ». A température constante, une augmentation de la pression entraîne une augmentation de la masse volumique et donc une augmentation de leur pouvoir solvant. L'influence de la température sur la solubilité du FSC est plus complexe que celle de la

pression. Aux pressions élevées, quand le fluide est relativement incompressible, la solubilité augmente avec la température suivant ainsi l'augmentation de la tension de vapeur du soluté. Par contre, à des pressions intermédiaires proches de la  $P_c$ , le fluide est hautement compressible et une faible augmentation de la température provoque une forte diminution de la masse volumique et donc une diminution de la solubilité du composé. Il peut être ainsi utilisé comme solvant à un moment donné et plus du tout à l'instant suivant, simplement en diminuant sa pression par exemple : l'étape de séparation solvant/produit est réduite à une détente, ce qui évite des purifications par distillations, extractions liquide-liquide ou autre procédé.

	Masse volumique $\rho$ (kg.m <sup>-3</sup> )	Viscosité $\mu$ (Pa.s)	Diffusivité D (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>Gaz</b> (20°C, 1 bar)	$0,1 < \rho < 2$	$10^{-5} < \mu < 3.10^{-5}$	$1.10^{-5} < D < 4.10^{-5}$
<b>Fluide supercritique</b>			
$T_c ; P_c$	$200 < \rho < 500$	$10^{-5} < \mu < 3.10^{-5}$	$1.10^{-8} < D < 10.10^{-8}$
$T_c ; 4P_c$	$400 < \rho < 900$	$3.10^{-5} < \mu < 9.10^{-5}$	$2.10^{-8}$
<b>Liquide</b> 20°C ; 1 bar	$600 < \rho < 1600$	$2.10^{-4} < \mu < 3.10^{-3}$	$2.10^{-10} < D < 2.10^{-9}$

Tableau 1 : Comparaison des propriétés d'un gaz, d'un fluide supercritique et d'un liquide (ordres de grandeur) (4)

En résumé, le FSC possède plusieurs avantages par rapport au liquide et est intéressant pour :

- son grand coefficient de diffusion et son absence de tension de surface,
- son faible coefficient de viscosité,
- sa bonne capacité volumique,
- sa bonne vitesse de dissolution,
- sa solubilité, variable en modifiant la température ou la pression, ce qui facilite la récupération de la substance dissoute,
- ses propriétés physiques adaptables par « simple » changement de pression et/ou de température.

## 1.4. Cas particulier du CO<sub>2</sub> SC

Le CO<sub>2</sub> est utilisé couramment pour plusieurs raisons :

- il est facile à manipuler dans ses conditions critiques puisque la  $T_c$  et la  $P_c$  sont relativement basses :  $P_c = 73,8$  bar et  $T_c = 31,1^\circ\text{C}$  (Figure 3), non inflammable, inodore, le plus souvent chimiquement inerte, non polluant et non toxique,
- il est peu coûteux (peu cher à la fabrication et sans coût d'élimination comparativement aux solvants organiques),
- il est disponible à une grande pureté,
- il solubilise un grand nombre de solutés dans le domaine SC, la précipitation de ce soluté se fait ensuite par détente (retour du CO<sub>2</sub> à l'état gazeux) d'où l'absence de solvant résiduel à la fin du traitement et la récupération facile du CO<sub>2</sub>,
- il présente un grand pouvoir de diffusion ainsi qu'une densité proche du liquide dans le domaine SC.

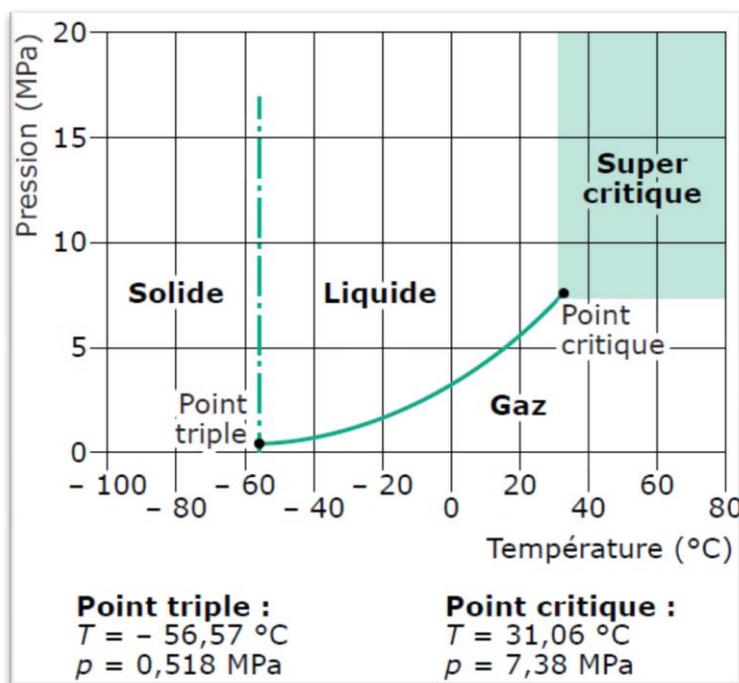


Figure 3 : Diagramme de phase du CO<sub>2</sub> (5)

Dans le cas où on souhaite solubiliser un composé polaire dans le CO<sub>2</sub> SC apolaire, on peut ajouter un cosolvant polaire (ex : éthanol) afin de modifier le pouvoir solvant de la phase SC et ainsi de rendre la solubilisation possible.

## 2. L'INTERET DE LA FORMULATION GALENIQUE DANS LE CONTROLE DE LA PHARMACOCINETIQUE ET DE LA PHARMACODYNAMIE

### 2.1. Introduction

La prise du médicament et le respect des posologies par le patient peuvent dépendre de nombreux facteurs : durée du traitement, heure des prises médicamenteuses, nombre de prises quotidiennes, confort d'utilisation, effets indésirables associés, ... La principale priorité de la Recherche et Développement (R&D) en galénique concerne l'amélioration de la solubilité ou de la vitesse de dissolution des PA dans les milieux aqueux, et, au final, celle de l'observance du patient durant la totalité de son traitement par diminution du nombre de prises et/ou des effets indésirables. Pour ce faire, deux axes de recherche s'offrent au formulateur : soit une action sur le PA lui-même, soit une action sur sa mise en forme par une élaboration de systèmes thérapeutiques sophistiqués autorisant au PA incorporé une efficacité thérapeutique ciblée, programmée, voire optimisée. L'augmentation de l'efficacité d'un médicament se fait donc par plusieurs voies : d'une part, le ciblage thérapeutique permet de personnaliser le traitement et, *in fine*, d'augmenter la biodisponibilité du PA et d'autre part, la modification du PA lui-même a pour but d'optimiser sa vitesse de dissolution, sa solubilité ainsi que sa perméation à travers les membranes biologiques.

Pour comprendre comment de nouveaux concepts de formulation peuvent être imaginés, nous commencerons par décrire brièvement les étapes d'assimilation et d'action du médicament par et sur l'organisme pour ensuite décrire les systèmes qui permettent d'améliorer l'action d'une substance active pour une pathologie donnée. Nous ne décrivons que les phases biopharmaceutique et pharmacocinétique puisque c'est sur celles-ci que la formulation du médicament aura un impact direct. La Figure 4 présente le devenir du médicament dans l'organisme, de son ingestion et donc de sa présence sur le site d'absorption (phase biopharmaceutique) à sa réponse pharmacologique (phase pharmacodynamique) en passant par la phase pharmacocinétique, c'est-à-dire à son passage dans la circulation sanguine et sa distribution dans les tissus.

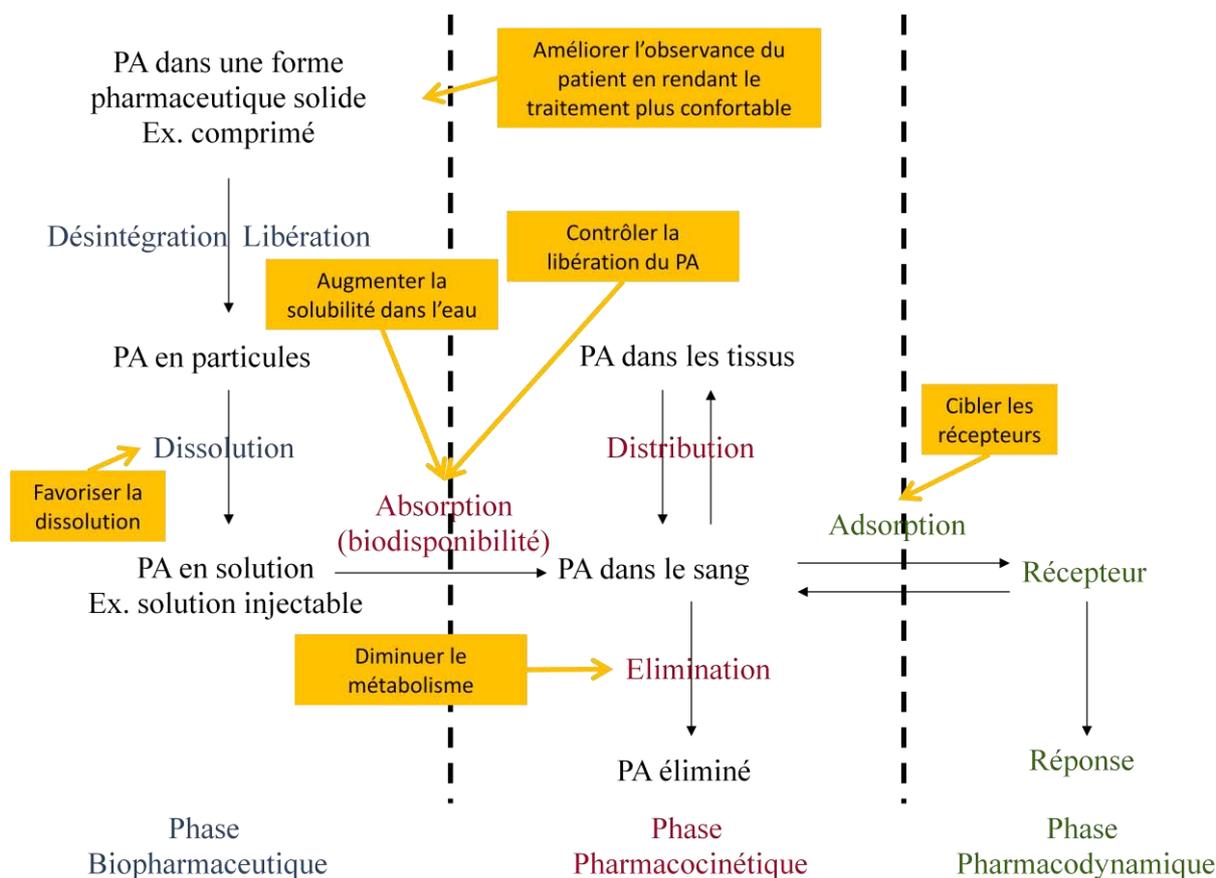


Figure 4 : Le devenir du médicament dans l'organisme, de l'ingestion à la réponse pharmacologique et principales pistes d'amélioration de l'effet d'un PA (inspiré de (6))

Parmi plusieurs solutions d'amélioration de l'effet d'un médicament (Figure 4), trois buts principaux guident la recherche de nouveaux procédés de formation de particules. Une première voie d'amélioration de l'effet d'un médicament est la recherche de formulations dont l'administration est la moins invasive qu'il soit (voie orale, voie pulmonaire, voie nasale), de façon à rendre le traitement plus confortable d'utilisation pour le patient et ainsi améliorer son observance. On peut chercher aussi à favoriser la sélection d'un site d'absorption d'un médicament. De plus, pour atteindre leur cible et être efficaces, ces molécules doivent passer du tractus gastro-intestinal au flux sanguin pour ensuite être transportées sous forme dissoute par le plasma sanguin jusqu'à l'organe cible. Une deuxième voie d'amélioration est donc d'augmenter la biodisponibilité d'un PA en le rendant plus soluble dans l'eau (la plupart des molécules actives issues de la recherche étant insolubles dans les milieux aqueux), en augmentant sa vitesse de dissolution ou en le rendant plus perméable aux membranes biologiques. En effet, si la biodisponibilité du PA est trop faible, une dose plus importante devra être employée, avec tous les risques que cela comporte.

Compte tenu de la variabilité biologique intrinsèque à toute espèce vivante, il est essentiel que la dose active soit la plus faible possible afin de réduire au minimum la dose à administrer et de prévenir ainsi tout accident chez les patients les plus réceptifs. Enfin, une troisième voie est de chercher à contrôler dans le temps la libération de la molécule active. En effet, lorsqu'un médicament à demi-vie courte est administré, un pic d'activité apparaît dès les premières heures, alors qu'il peut être souhaitable d'étaler l'effet thérapeutique sur plusieurs jours ou davantage. Les systèmes d'encapsulation à libération contrôlée (prolongée, retardée, ...) trouvent ici l'une de leurs principales applications. Diverses formulations, comme les complexes d'inclusions, les nano- ou microcapsules ou les liposomes satisfont actuellement les objectifs précédents (7).

## **2.2. Le contrôle de la biodisponibilité et de la libération du PA**

### **2.2.1. Définition de la biodisponibilité(8)**

Selon l'European Medicines Evaluation Agency (EMA), la biodisponibilité se définit comme étant la vitesse et l'étendue avec lesquelles la substance active ou sa fraction active est absorbée à partir de sa formulation pharmaceutique et devient disponible au site d'action (8). Étant donné que le site d'action n'est généralement pas identifié, la biodisponibilité est redéfinie comme étant la vitesse et l'étendue avec lesquelles la substance ou sa fraction active gagne la circulation générale c'est-à-dire parvient jusqu'à la circulation artérielle (aorte). La biodisponibilité est donc une propriété du médicament qui rend compte à la fois du taux de PA qui atteint la circulation générale et de la vitesse à laquelle il y parvient.

### **2.2.2. Problème posé**

Malgré une recherche abondante, bon nombre de nouvelles molécules se trouvent bloquées dans leur développement en raison d'une trop faible biodisponibilité. Les causes sont multiples : mauvaise solubilité en raison du caractère hydrophobe des PA, vitesse de dissolution faible, faible perméabilité, ... Par conséquent, il est essentiel, en R&D pharmaceutique, de pouvoir évaluer toutes les possibilités d'amélioration de la biodisponibilité et de développer des techniques de formulation appropriées.

En résumé, on recherche des biodisponibilités élevées, proches de 100 % pour différentes raisons :

- pour avoir une meilleure sélectivité des effets du médicament et par conséquent ne pas «gaspiller» de la substance active,
- pour ne pas avoir à augmenter inutilement les doses et exposer correctement les sujets ayant les biodisponibilités les plus faibles,
- pour ne pas offrir des opportunités d'interactions conduisant à des effets secondaires par des augmentations inattendues de la biodisponibilité,
- pour avoir des expositions systémiques reproductibles entre les sujets : plus la biodisponibilité est faible, plus la variabilité inter-sujet est importante.

### 2.2.3. La phase biopharmaceutique

Cette phase est la première à avoir lieu une fois le médicament administré. Elle consiste à mettre à disposition le(s) PA dans l'organisme et conditionne donc la quantité de médicament pénétrant dans le milieu intérieur. Pour une formulation destinée à la voie orale, elle se compose de deux phases successives : la libération et la dissolution. Dans le cas d'une administration par voie injectable, les étapes de libération et de dissolution sont inexistantes puisque le PA est directement en solution dans la forme galénique.

#### 2.2.3.1. La phase de libération

Le PA est mis à disposition dans l'organisme de manière différente selon le type de formulation : pour un comprimé, elle se fait la plupart du temps par désintégration de la forme solide, puis par la désagrégation en particules de petite taille, ce qui facilite l'étape de dissolution qui suit. Dans le cas d'une gélule, la libération se résume à l'ouverture de la gélule. Enfin, dans le cas d'une suspension ou solution, cette étape n'existe pas puisque le PA est directement à disposition de l'organisme. Cette étape peut être rapide dans le cas d'une forme pharmaceutique à libération rapide et plus lente dans le cas d'une forme à libération prolongée.

#### 2.2.3.2. La phase de dissolution

Pour traverser les membranes biologiques ou pour être absorbé, le PA doit être dispersé à l'état de molécules, en milieu aqueux, au niveau du site d'absorption. Lors de l'administration

d'un comprimé par exemple, la paroi digestive correspond au site d'absorption, et PA doit être solubilisé à l'intérieur du tube digestif pour être absorbé. La vitesse de dissolution quant à elle dépend des caractéristiques du PA lui-même mais aussi de celles du site d'absorption.

#### 2.2.4. Moyens d'amélioration de la biodisponibilité d'un PA

##### 2.2.4.1. Moyens d'amélioration de la phase de libération du PA

Seule la forme pharmaceutique (comprimé, gélule, solution/suspension injectable, ...) est la source d'une plus ou moins longue étape de libération du PA et du profil de libération. Dans le cas d'une forme orale, l'organisme a besoin de désintégrer puis de désagréger le médicament ; l'assimilation du médicament sera donc plus longue que si ces étapes sont inexistantes. Ainsi, si on souhaite avoir une action rapide du médicament, il faut que le PA soit le plus rapidement possible à disposition dans l'organisme, et donc que l'étape de libération soit la plus courte possible. Ainsi, un comprimé est libéré plus tardivement qu'une solution injectable, pour un même PA et une même dose administrée. Une forme pharmaceutique à libération modifiée est une préparation dont la vitesse de libération de PA est différente (plus lente, plus rapide, différée, ...) de celle d'une forme pharmaceutique à libération conventionnelle destinée à la même voie. On entend par libération conventionnelle une libération dont la vitesse correspond aux normes théoriques de la forme.

###### 2.2.4.1.1. La libération immédiate

Des formes à libération immédiate doivent être capables de libérer le ou les PA dans le tractus gastro-intestinal sans délai ni prolongation de sa dissolution ou de son absorption. En outre, il est spécifié qu'une forme à libération immédiate doit pouvoir libérer au moins 85% (m/m) du PA incorporé dans un délai d'une heure (9).

###### 2.2.4.1.2. La libération accélérée

La vitesse de libération du PA est plus rapide. C'est le cas des comprimés effervescents, des comprimés solubles ou dispersibles, et des comprimés orodispersibles (Lyocs®). La phase de libération du PA est plus rapide puisque le comprimé est désintégré dans un fluide (eau, salive, ...) préalablement à son ingestion.

#### 2.2.4.1.3. La libération différée, retardée

La libération du PA dans l'organisme est retardée grâce à un mode de fabrication appropriée, dans le but de libérer le PA à un niveau déterminé de l'organisme ou d'éviter une interaction PA/voie d'administration. Ce sont des formes gastrorésistantes destinées à résister au suc gastrique et à libérer le(s) PA dans le suc intestinal. Par exemple, ce peuvent être des comprimés enrobés ou des capsules recouvertes d'un enrobage gastrorésistant. Cet enrobage est alors prévu pour résister à l'acidité gastrique mais pas à l'acidité intestinale.

#### 2.2.4.1.4. La libération ralentie (ou prolongée)

Certains PA subissent une dégradation plus ou moins importante dans l'estomac ou l'intestin sous l'action du pH environnant ou des enzymes. Dans la plupart des cas, ces dégradations sont directement proportionnelles à la quantité de PA dissous dans le milieu. En ne libérant que progressivement le PA tout au long de son parcours dans le tube digestif, les formes à libération prolongée n'exposent qu'une faible partie du PA à une dégradation éventuelle. Enfin, les traitements contre les cancers, la dépression, le SIDA, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, l'épilepsie, la douleur ou encore la schizophrénie sont des cibles de choix pour les formes à libération contrôlée. Il s'agit de traitements souvent à vie et donc à prises répétées. Pour assurer au maximum l'observance du patient dans le traitement de ces pathologies lourdes, il est indispensable de minimiser le nombre de prises et de minimiser la dose de PA, puisqu'il s'agit souvent de molécules ayant des effets secondaires notables et très indésirables.

Ces formulations consistent en une dose élevée de PA qui sera libérée de façon graduelle, soutenue et constante sur une longue période de temps. On peut ainsi s'assurer d'un niveau thérapeutique sanguin stable durant une période prolongée, diminuant ainsi le nombre de prises quotidiennes et favorisant l'adhésion du patient au traitement. Par ailleurs, on réduit aussi les effets indésirables en atténuant le pic sanguin comparativement à une même dose qui serait administrée sous une forme galénique non modifiée. Ainsi, par exemple, la nifédipine à action prolongée (Adalate® XLMD, Nifédipine LP) permet d'éviter une hypotension subite et une tachycardie réflexe à la suite de l'administration. On voit aussi une réduction de nausées avec les formulations prolongées de théophylline (Xanthium® LP).

On peut trouver différents systèmes pour assurer la prolongation de l'effet du PA dont :

- Systèmes matriciels (Figure 5) : il s'agit le plus souvent de matériaux poreux insolubles dans lesquels on disperse et emprisonne le PA. La substance active diffuse graduellement au fur et à mesure que l'eau du système gastro-intestinal s'infiltré dans la matrice. Certaines matrices sont aussi partiellement solubles. Dans ces cas, la libération du produit est contrôlée par la vitesse d'érosion de la matrice.

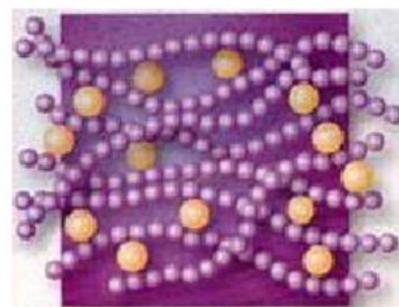


Figure 5 : Schématisation d'un système matriciel (en beige : PA ; en mauve : réseau matriciel)

- Pompes osmotiques : ce sont des petits réservoirs où le PA est contenu dans un noyau non digestible et recouvert d'une membrane semi-perméable (perméable aux fluides mais pas aux électrolytes). Le comprimé a une petite ouverture percée au laser. Le mélange osmotique est une solution hautement concentrée en électrolytes, ce qui crée la différence de pression osmotique entre le système et le milieu extérieur. Dans le tractus gastro-intestinal, l'eau traverse la membrane par osmose, disperse le médicament et l'expulse par l'ouverture à un débit constant (10).

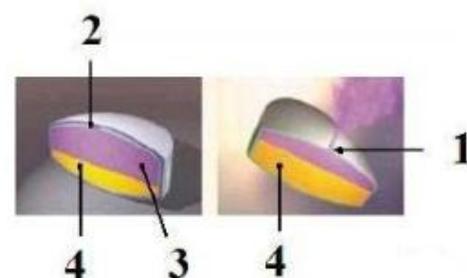


Figure 6 : Pompe osmotique sans membrane de séparation - 1. Orifice ; 2. Membrane semi-perméable ; 3. Couche renfermant le PA ; 4. Couche renfermant un hydrocolloïde contenant le mélange osmotique.

- Gélule contenant des microgranules. : beaucoup de produits se retrouvent sous forme de capsules de gélatine dure qui contiennent des microgranules, soit avec un enrobage gastrorésistant, soit des enrobages de différentes épaisseurs, donc avec des vitesses de dissolution différentes ou encore un mélange de PA à libération immédiate et libération prolongée.



Figure 7 : Gélule contenant des microgranules

#### 2.2.4.1.5. La libération répétée ou fractionnée

Il peut s'agir d'un comprimé dont le noyau est recouvert d'un enrobage gastrorésistant et d'une couche externe apportant une dose de PA immédiatement disponible, d'un comprimé multicouche qui permet de séparer des PA incompatibles ou bien d'utiliser des vitesses de dissolution différentes d'une couche à l'autre, utile en cas de dose d'attaque puis de dose de

maintien. Enfin, il peut s'agir aussi d'une gélule contenant à la fois des granules enrobées et nues, qui se désintègrent en fonction du pH.

#### 2.2.4.2. Moyens d'amélioration de la phase de dissolution du PA

La phase de dissolution implique de nombreux mécanismes, variés, d'où la multitude de facteurs sur lesquels il est possible d'intervenir pour favoriser ou non la dissolution du PA, selon que l'on veuille accélérer, prolonger ou retarder l'action du médicament.

Pour tout PA absorbable, la vitesse de sa dissolution est un facteur essentiel limitant son absorption. L'équation de la vitesse de dissolution d'une substance dans un solvant est donnée par Noyes et Whitney (11) :

$$\frac{dQ}{dt} = K.S.(C_s - C)$$

dans laquelle :

$\frac{dQ}{dt}$  est la vitesse de dissolution ( $\text{mol.s}^{-1}$ ),

K est une constante de vitesse de dissolution liée au PA ( $\text{m.s}^{-1}$ ),

S est la surface de contact entre le PA et le solvant ( $\text{m}^2$ ),

$C_s$  est la concentration du PA dans le solvant au temps t (ou solubilité) ( $\text{mol.m}^{-3}$ ),

C est la concentration du PA dans le solvant au temps i ( $\text{mol.m}^{-3}$ ).

Si on considère que la dissolution se fait par l'intermédiaire d'une couche de diffusion, on utilise l'équation de Nernst et Bruner (12) :

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D.S.(C_s - C)}{e}$$

où les paramètres de l'équation sont les mêmes que précédemment avec en plus :

D est le coefficient de diffusion des molécules de PA dans le solvant (fonction de la température, de l'agitation, ...) ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ),

e est l'épaisseur de la couche de diffusion formée par le solvant autour de la particule non dissoute (m).

### 2.2.4.2.1. L'épaisseur de solvant autour de la particule

Plus l'épaisseur de solvant autour de la particule est fine (*i.e.* plus  $e$  est faible), plus la dissolution est rapide (*i.e.* le rapport  $dQ/dt$  augmente), tant que la solution n'est pas saturée (*i.e.*  $C \neq C_s$ ). La dissolution peut reprendre une fois qu'une fraction de produit dissous a quitté la couche de diffusion vers le liquide environnant, qui ne doit donc lui-même pas être saturé.

### 2.2.4.2.2. La taille des particules

On remarque aussi l'importance de la surface spécifique des particules de PA en contact avec le solvant : plus cette surface de contact avec le solvant est importante (*i.e.* plus  $S$  est grand), plus la vitesse de dissolution est grande.

### 2.2.4.2.3. La concentration à saturation (ou solubilité) du PA

Depuis quelques années, la Food and Drug Administration (FDA) a mis en place un système de classification des PA utilisés pour la voie orale, le Biopharmaceutics Classification System (BCS) (13). Ce système permet de classer les PA selon leur capacité à être dissous dans l'eau (solubilité aqueuse) et leur capacité à traverser les membranes biologiques (perméation). Quatre classes majeures de molécules sont distinguées, numérotées de I à IV (Figure 8). Plus la différence entre la concentration à saturation et celle du milieu environnant est importante ( $C_s - C$ ), plus la vitesse de dissolution est grande. Ainsi, si le PA est plus rapidement absorbé dans les membranes biologiques qu'il n'est dissous, alors la différence de concentration sera importante, et la vitesse de l'absorption sera limitée par la vitesse de dissolution du PA.

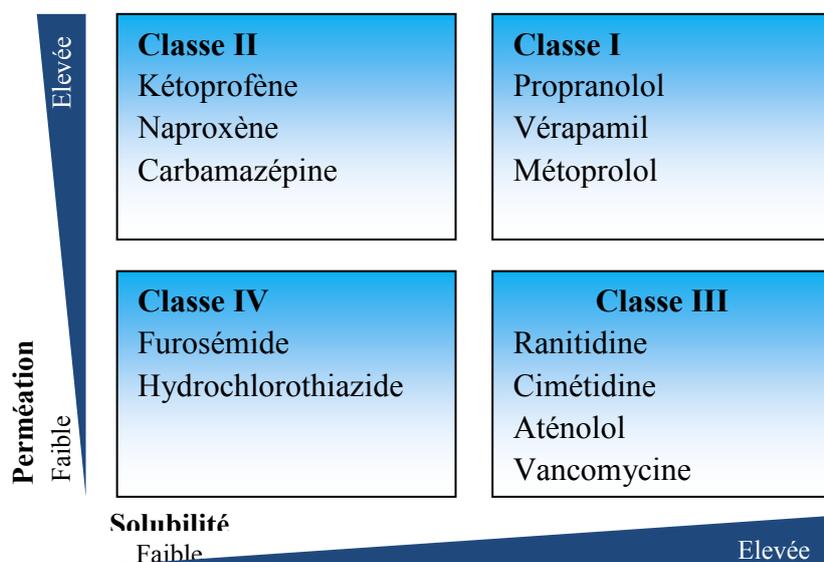


Figure 8 : Classification BCS(14)

### 2.2.5. Résumé des solutions d'amélioration de la biodisponibilité

On comprend aisément, au vu du paragraphe précédent, que meilleure est la solubilité du PA, meilleure est la dissolution dans le fluide environnant. Il est possible de diminuer ou d'augmenter la vitesse de dissolution du PA en modifiant sa solubilité. Pour ce faire, plusieurs voies de travail sont envisageables (15).

La voie chimique permet d'envisager la formation de sels ou d'esters plus ou moins solubles. Les substances ionisées sont plus solubles dans l'eau que celles non ionisées. La formation de sels à partir d'un PA a donc pour but de transformer une substance peu ionisée et donc peu hydrosoluble en un sel ionisé plus hydrosoluble. Ceci est mis en place dans le cas de la pénicilline, l'aspirine, le paracétamol ou le tolbutamide, où on cherche à augmenter la vitesse de dissolution afin d'avoir un effet presque immédiat. La préparation d'esters en revanche permet de retarder la dissolution du PA dans le but de retarder ou de prolonger l'action.

La voie physique, quant à elle, permet d'envisager la modification de l'état cristallin des PA et la taille des cristaux. Les particules solides se présentent sous forme cristalline ou amorphe. Il est souvent difficile d'identifier le système cristallin des poudres utilisées en pharmacie si elles ont été pulvérisées finement. Il est donc important de connaître la structure, cristalline ou amorphe, des matières premières utilisées car il existe des différences de propriétés physiques notables entre ces deux types, qui pourront avoir des répercussions sur l'activité pharmacologique aussi bien que sur la stabilité chimique. Généralement, les structures amorphes sont plus solubles que les structures cristallines : il faut davantage d'énergie pour arracher une molécule au réseau organisé cristallin plutôt que pour l'arracher de l'assemblage inorganisé que constitue le réseau amorphe. Pour avoir une action prolongée, on recherchera donc à obtenir un réseau cristallin. Par exemple, dans le cas de l'insuline, on utilise soit la forme amorphe, soit la forme cristalline, de façon à obtenir des formes galéniques à profils de libération différents (immédiat ou retardé) (16). La cristallisation d'une molécule à effet thérapeutique peut conduire à la formation d'une ou plusieurs variétés polymorphiques (17). Les polymorphes sont des solides ayant même composition chimique mais des structures cristallines différentes. Ces polymorphes, plus ou moins stables, peuvent avoir des propriétés très différentes surtout en matière de solubilité (1). La mise sur le marché de nouvelles molécules thérapeutiques exige désormais que soit précisée dans le brevet la variété polymorphique concernée. Le contrôle du polymorphe formé prend donc une importance

particulière. Pour le pharmacien, deux polymorphes sont deux substances différentes puisque l'activité biologique de chacun d'entre eux est différente. Il est donc important pour lui de pouvoir obtenir le polymorphe recherché de façon contrôlée et reproductible. Enfin, la réduction de la taille des cristaux permet d'envisager une vitesse de dissolution accrue, comme expliqué précédemment (cf. 2.2.4).

## **2.3. Le contrôle du devenir du médicament dans l'organisme**

Une fois la phase biopharmaceutique effectuée, le médicament atteint la circulation sanguine générale de façon à pouvoir atteindre sa cible (le site d'action et ses récepteurs auxquels il est destiné) : c'est la phase pharmacocinétique. Nous décrirons brièvement chaque étape de cette phase puis nous nous concentrerons sur les étapes sur lesquelles la formulation du médicament présente une importance.

### **2.3.1. Phase pharmacocinétique : le modèle ADME**

#### **2.3.1.1. Phase d'absorption (A) ou de résorption**

Il s'agit de la pénétration du médicament dans la circulation sanguine à partir de son lieu d'absorption, après avoir traversé les membranes biologiques. Cette étape n'existe pas lorsque le médicament est directement introduit dans la circulation sanguine par voie injectable.

#### **2.3.1.2. Phase de distribution (D)**

Elle se situe juste après l'absorption, et c'est à ce moment que le médicament parvient dans le plasma où il se trouve sous deux formes :

- soit lié aux protéines plasmatiques (albumine, globuline) : il agit alors comme une réserve de PA mais n'est pas actif pharmacologiquement,
- soit libre et responsable de l'activité pharmacologique.

Le médicament peut alors se distribuer à différents niveaux et avoir son activité thérapeutique.

#### **2.3.1.3. La phase de métabolisme (M)**

C'est pendant cette étape que les médicaments vont être transformés. Ce métabolisme se réalise surtout au niveau du foie mais aussi au niveau des poumons et des reins. Parfois, le

médicament est administré sous forme de prodrogue : il s'agit d'une forme inactive du médicament qui va s'activer lors du métabolisme. Le métabolisme peut aussi parfois conduire à la formation de composés toxiques. A noter que cette étape peut être induite ou au contraire inhibée par la prise de substances, médicamenteuses, alimentaires, ou autres, dénommées inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques. Par exemple, un inducteur enzymatique stimule le métabolisme hépatique donc un médicament normalement métabolisé par le foie sera moins actif s'il est co-administré avec lui. L'effet inverse est attendu dans le cas d'un inhibiteur enzymatique.

#### 2.3.1.4. La phase d'élimination (E)

L'élimination se fait la plupart du temps par les reins avec trois étapes :

- filtration glomérulaire : passage des substances du sang vers l'urine,
- résorption de substances de l'urine vers le sang,
- excrétion finale du plasma vers l'urine.

L'élimination de substances de haut poids moléculaire se fait par la voie biliaire. Enfin, la voie pulmonaire permet d'éliminer dans l'air expiré des composés volatils tels que les anesthésiques volatils, les essences ou l'alcool. Enfin, il ne faut pas oublier certaines voies d'élimination telles que le lait maternel, la salive, les larmes, la peau et les phanères.

### 2.3.2. Moyens d'amélioration du devenir du médicament dans l'organisme

#### 2.3.2.1. La phase d'absorption

De nombreux types de facteurs peuvent modifier la résorption : les facteurs physiopathologiques (âge, activité physique, grossesse, diarrhée ou constipation, maladies chroniques, ...) et les facteurs exogènes (l'alimentation, les médicaments, ...). Nous ne décrirons pas davantage ces facteurs puisqu'ils ne concernent pas la formulation du médicament à proprement parler. La capacité d'absorption de l'organisme est en effet totalement indépendante de la formulation du médicament.

#### 2.3.2.2. La phase de distribution

Cette étape peut être rapide et va dépendre :

- du débit sanguin (phase initiale),
- de la vitesse de diffusion à l'extérieur des capillaires vers les cellules du tissu ou de l'organe,
- enfin, de l'affinité du PA pour le tissu.

C'est sur ce troisième paramètre, l'affinité du PA pour le tissu, que nous allons consacrer une partie de cette thèse, celui-ci pouvant être modulé par la formulation galénique du médicament. En effet, il est possible de cibler un médicament vers le récepteur auquel il est destiné, de manière à ce que seul l'organe ou le tissu atteint soit traité, évitant ainsi des effets secondaires sur d'autres cibles vers lesquelles le médicament se serait dirigé.

#### 2.3.2.3. La phase de métabolisme

Cette étape peut être variable d'un individu à l'autre en fonction de l'expression et de l'activité catalytique de certains cytochromes dans le foie par exemple. De plus, il peut exister des inductions enzymatiques ou des inhibitions enzymatiques, par la prise d'aliments ou de médicaments en association. La formulation galénique du médicament n'intervient donc pas sur cette phase, c'est pourquoi nous ne la décrivons pas davantage.

#### 2.3.2.4. La phase d'élimination

Lors de l'excrétion urinaire, les médicaments présentant un coefficient de partage lipide/eau élevé sont réabsorbés, du moins en partie. Il peut exister aussi une variabilité entre les individus puisque la fixation aux protéines plasmatiques ainsi que la filtration glomérulaire sont différentes. Là-encore, la forme galénique du médicament n'intervenant pas ou peu, nous ne décrivons pas plus les phénomènes biologiques mis en jeu.

### 3. RESUME DU CHAPITRE

Jusqu'au point critique ( $T_c$  ;  $P_c$ ), il n'existe que trois états d'un corps pur : solide, liquide et gaz. Au-delà de ce point critique, on se trouve dans la zone SC où une seule phase existe. La transition de l'état gazeux ou liquide à la phase SC est progressive et continue, contrairement aux transitions liquide-solide, liquide-gaz et solide-gaz. Le  $\text{CO}_2$  SC est de loin le FSC le plus utilisé car le plus avantageux :

- ses paramètres critiques sont facilement accessibles ( $T_c = 31,1^\circ\text{C}$ , proche de la température ambiante ;  $P_c = 73,8$  bar),
- sa faible viscosité, sa diffusivité élevée et son absence de tension de surface facilitent sa pénétration dans les milieux poreux,
- son pouvoir solvant est facilement modulable par la pression et la température,
- la séparation entre le solvant et le produit est facilement réalisée par « simple » détente d'où une absence de solvant résiduel,
- son faible coût, son absence de toxicité, son inertie chimique (sauf vis-à-vis des amines aliphatiques avec lesquelles il donne des carbamates) et sa grande pureté.

En ayant connaissance de la mise à disposition du PA dans l'organisme en fonction de sa galénique (Tableau 2), il est possible d'améliorer l'effet d'un médicament en développant des techniques de formulation appropriées.

Voie	Forme galénique	Phase biopharmaceutique		Phase pharmacocinétique		Phase pharmacodynamique	
Per os	Comprimé	Désintégration de la forme solide	Désintégration en particules de petite taille	Dissolution	Absorption	Adsorption	Réponse
	Gélule	-	Désintégration en particules de petite taille	Dissolution	Absorption	Adsorption	Réponse
	Suspension /solution	-	-	Dissolution	Absorption	Adsorption	Réponse
Injectable	Solution	-	-	-	-	Adsorption	Réponse

Tableau 2 : Résumé du devenir du médicament dans l'organisme en fonction de sa forme galénique

L'accélération de la libération du PA ou l'augmentation de sa biodisponibilité sont obtenues de plusieurs manières. La première voie consiste à diminuer la taille des particules, donc à

microniser le solide pour augmenter sa surface spécifique et par conséquent sa vitesse de dissolution. La deuxième voie consiste à augmenter l'hydrosolubilité de la substance active. Cette modification peut se faire en masquant son hydrophobicité par microencapsulation ou par inclusion dans des complexes, en le combinant avec un excipient judicieusement choisi, pour former un complexe plus soluble que ne l'était la molécule originelle. On recherche aussi à contrôler l'état cristallin de la substance, une substance amorphe étant plus hydrosoluble qu'une substance cristalline. Enfin, l'estérification et la formation de sels permettent d'augmenter ou de diminuer la solubilité du PA.

Une fois le médicament absorbé et circulant librement dans le sang, il se distribue dans l'organisme selon ses propriétés physico-chimiques. Ainsi, une molécule efficace ne se distribue pas exclusivement au niveau des cellules pour lesquelles elle est destinée, c'est pourquoi il existe une certaine déperdition de PA dans des tissus non concernés, entraînant souvent des effets secondaires indésirables voire une toxicité pour ces tissus involontairement atteints, ainsi que la moindre efficacité de la dose administrée.

La vectorisation d'un médicament consiste à concentrer le PA spécifiquement sur sa cible biologique, à rendre plus efficace sa pénétration dans les cellules, et à réduire sa toxicité. Ceci permet d'avoir la possibilité d'administrer une dose plus importante de manière à être plus efficace avec moins d'effets indésirables ou bien de réduire les doses de PA administrées de manière à limiter les coûts du médicament (s'il s'agit d'une substance active coûteuse), tout en conservant la même efficacité au niveau des cellules ciblées.

**CHAPITRE 2 :**

**TECHNIQUES DE**

**FORMULATION DU PRINCIPE**

**ACTIF VISANT A MODIFIER SA**

**BIODISPONIBILITE ET SON**

**ABSORPTION**

## 1. INTRODUCTION

Nous avons compris au cours du chapitre 1 que plusieurs techniques de formulation permettent d'améliorer la biodisponibilité et l'absorption d'un médicament. Voici, résumées dans le Tableau 3, les propriétés du PA qu'il est envisageable de modifier pour moduler son activité.

	Augmenter → obtenir un effet immédiat	Diminuer → obtenir un effet retardé ou prolongé
<b>Biodisponibilité</b>	Sel ionisé	Ester
	Structure amorphe	Structure cristalline
	Petite particules	Grosses particules
	Diminuer l'hydrophobicité	Augmenter l'hydrophobicité
<b>Absorption</b>	Vectorisation	-

Tableau 3: Propriétés du PA modifiables en vue d'une augmentation ou une diminution de l'activité pharmacologique

Les principaux travaux menés par les équipes de recherche portent sur la réduction de la taille des particules de PA, sur la microencapsulation ou l'inclusion dans des complexes en vue de masquer l'hydrophobicité du PA, et enfin la vectorisation. Nous allons donc diviser la suite de ce chapitre en deux thèmes, avec une première partie qui permet, après un rappel des techniques principales conventionnelles utilisées pour réduire la taille des particules, de comprendre celles utilisées en milieu SC. Dans une seconde partie, nous décrirons les techniques conventionnelles d'encapsulation, de formation des liposomes et d'inclusion dans des complexes de type cyclodextrines (CD), pour ensuite présenter les procédés utilisés en FSC. Globalement, ce chapitre permet de comprendre les procédés mis en jeu dans les études présentées dans le chapitre 3 et pourront servir à la comparaison, à la compréhension et à l'interprétation des résultats obtenus dans ces études.

## **2. TECHNIQUES DE REDUCTION DE LA TAILLE DES PARTICULES**

### **2.1. Techniques conventionnelles de réduction de la taille des particules**

Selon la nature de l'état duquel on part, solide ou liquide, il existe deux grandes voies conventionnelles d'obtention de solides divisés et donc de fines particules, chacune présentant des inconvénients (Tableau 4) qui peuvent être gênants voire rédhibitoires dans l'industrie pharmaceutique (18).

A partir de l'état solide, les procédés de broyage (procédé mécanique) et de recristallisation sont les plus utilisés pour la réduction de taille de particules dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, ces méthodes, simples à mettre en œuvre possèdent de nombreux inconvénients.

A partir de l'état liquide, il existe plusieurs procédés pour élaborer des particules :

- l'atomisation permet d'évaporer le liquide dans lequel le soluté est dissous, par un passage très court à température élevée. On obtient alors un résidu solide composé des substances préalablement dissoutes dans le milieu
- la lyophilisation procède à la sublimation du solvant et nécessite donc la congélation préalable de la solution dans laquelle le solide est dissous,
- la précipitation est une réaction chimique mettant en jeu deux réactifs (ou plus), consistant à mettre la solution en présence d'une autre solution, et la réaction mise en jeu conduit à la formation d'une phase solide insoluble dans le liquide.
- la cristallisation est un procédé dans lequel la modification de la température, du pH, de la force ionique ou suite à une évaporation de solvant, des nucléi de particules solides se forment et peuvent croître pour finalement donner un solide humide.

	Broyage et recristallisation (solide)	Atomisation, précipitation, lyophilisation, cristallisation (liquide)
<b>Rendement énergétique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ faible (perte énergétique importante)</li> </ul>	
<b>Particules</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ particules de 10 – 50 µm</li> <li>▪ distribution de taille souvent large (génération de fines non désirées)</li> <li>▪ impossible de contrôler la morphologie</li> <li>▪ taille supérieure au micromètre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ contrôle difficile du polymorphisme cristallin</li> <li>▪ atomisation : taille de particules convenable mais hautes températures locales</li> <li>▪ lyophilisation : large distribution de taille</li> <li>▪ précipitation : pas de contrôle de la taille de particules</li> </ul>
<b>Contamination</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ potentiellement par l’outil de broyage</li> <li>▪ potentiellement par adjuvant de broyage si utilisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ traces de solvant résiduel</li> </ul>
<b>Autre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ non utilisable dans le cas de produits thermosensibles car hautes températures locales</li> <li>▪ étape de tamisage en aval parfois nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ étape de séchage complémentaire nécessaire</li> </ul>

Tableau 4 : Inconvénients des méthodes conventionnelles de réduction de taille des particules

## 2.2. Techniques en fluides supercritiques de réduction de la taille des particules

La technologie des FSC comprend plusieurs types de procédés permettant de réduire la taille des particules (micronisation), le fluide étant utilisé comme (19) :

- solvant de pulvérisation : procédé RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions),
- antisolvant de pulvérisation : procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent) et variantes,
- soluté : procédé PGSS (Particle from Gas-Saturated Solutions)

Nous décrivons aussi dans un quatrième groupe la méthode SAA (Supercritical Fluid-Assisted Atomization) qui dérive de la méthode conventionnelle d'atomisation.

Pour le procédé RESS, la chute de densité liée à une détente brutale est le moteur de la nucléation. Pour les procédés de type SAS, c'est la dissolution réciproque d'un solvant organique et du FSC qui provoque la précipitation.

Généralement, on observe un grand changement de la morphologie du solide après avoir utilisé le FSC : moyenne de taille de particule, distribution de taille de particule, forme de la particule, et par conséquent, aire spécifique et taux de dissolution sont souvent complètement différents de ceux des matériaux d'origine. Nous avons choisi dans ce travail de détailler les méthodes utilisant le CO<sub>2</sub> comme FSC puisque c'est le plus utilisé, mais le principe de chaque technique reste identique, quel que soit le FSC mis en œuvre.

### 2.2.1. FSC utilisé comme solvant

#### 2.2.1.1. RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions)

Le procédé RESS utilise le pouvoir solvant d'un fluide mis dans des conditions au voisinage supérieur des coordonnées critiques. Ce fluide, selon la température et la pression, peut atteindre des masses volumiques importantes qui favorisent le phénomène de solvation en diminuant les distances intermoléculaires (7) et donc les interactions qui existent entre les molécules de solvant et l'espèce chimique introduite lors de la dissolution d'un composé dans un solvant.

Le principe du procédé RESS consiste à dissoudre une ou plusieurs substance(s) dans le FSC, qui joue ici le rôle de solvant, à des conditions opératoires de pression et de température définies, de manière à ce que le mélange soluté/solvant se présente sous la forme d'une seule phase homogène. S'en suit une dépressurisation brusque de la solution de produit à travers un orifice dans une enceinte d'expansion maintenue à basse pression (Figure 9). Cette brusque détente provoque une diminution extrêmement rapide de la densité du CO<sub>2</sub> SC qui devient gaz (et donc un fluide ayant un très faible pouvoir solvant) et conduit finalement à une recristallisation de la substance dissoute (2; 20). Ce procédé peut trouver de multiples applications uniquement quand le produit a une solubilité supérieure à 10<sup>-3</sup> kg/kg dans le CO<sub>2</sub> SC, ce qui limite le procédé aux composés apolaires ou peu polaires.

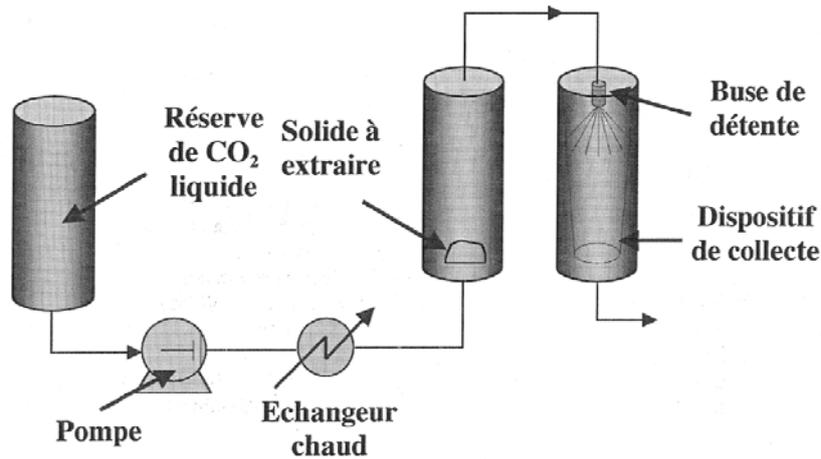
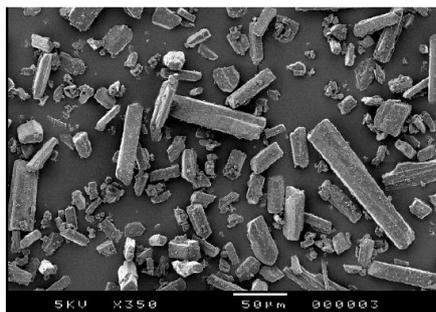
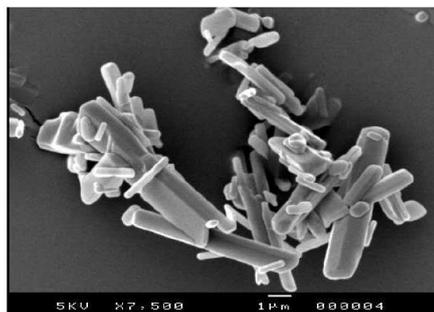


Figure 9 : Schéma de principe du procédé RESS (20)

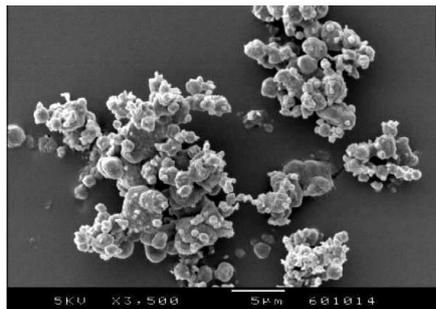
Un solide peut donc être cristallisé à partir d'une solution homogène dans un FSC par détente. Cette détente est effectuée par passage à travers un orifice (trou circulaire, capillaire, buse) conduisant à des particules de formes différentes (Figure 10). En général, on choisit un orifice de très faible diamètre (10 - 100  $\mu\text{m}$ ) afin de provoquer une forte chute de pression (18).



Raw material



a)



b)

Raw material	—	50 $\mu\text{m}$
a)	—	1 $\mu\text{m}$
b)	—	5 $\mu\text{m}$

Figure 10 : Exemple de particules de lovastatine obtenues par le procédé RESS par une buse capillaire (a) et par un orifice de faible diamètre (b) : comparaison avec la poudre initiale (21)

L'expansion du gaz étant quasi-instantanée, le degré de sursaturation est beaucoup plus élevé que celui obtenu par des perturbations thermiques, ce qui permet de récolter des particules extrêmement fines avec une distribution granulométrique très étroite (2). Les paramètres influençant les caractéristiques des particules formées sont la pression, la température, la

pression de post-expansion et la géométrie de la buse de pulvérisation. Les conditions opératoires peuvent influencer non seulement la distribution de taille des particules mais aussi leur forme cristalline : ce procédé permet par exemple l'obtention de la forme III de la carbamazépine requise par la Pharmacopée américaine (2). Il faudra prendre en compte ce phénomène si l'on cherche à maîtriser la forme cristalline du PA.

De très grandes valeurs de sursaturation conduisent à un très grand nombre de nucléi, et plus le rapport de sursaturation est grand, plus les particules sont petites, c'est pourquoi le procédé RESS est souvent présenté comme idéal pour la fabrication de poudres nanométriques. Comme expliqué précédemment, l'onde de choc causée par la détente brutale induit des conditions uniformes et donc une distribution de taille de particules resserrée. La taille des particules peut donc être directement contrôlée par la perte de charge  $\Delta P$  entre l'entrée et la sortie de la buse : plus la perte de charge est grande, plus la sursaturation est élevée, plus les particules sont de petite taille.

Nous avons vu précédemment que la première étape du procédé RESS consiste en une dissolution du solide dans le FSC. Afin de pouvoir optimiser cette étape, il est nécessaire de disposer des données sur les équilibres entre phases avec les composés en présence. Ces données existent parfois dans la littérature mais il faut souvent procéder à des déterminations expérimentales. Il est donc essentiel pour optimiser cette étape de connaître la solubilité du solide étudié dans le fluide considéré en fonction des conditions opératoires. Dans le cas d'un mélange binaire solide/FSC, la solubilité du solide ( $y_2$ ) dans le fluide peut s'exprimer de la façon suivante (l'indice 2 fait référence au soluté) (18) :

$$y_2 = \frac{P_2^{sat}}{P} \exp \left[ \frac{V_2^S}{RT} (P - P_2^{sat}) \right]$$

Avec :

$V_2^S$  : volume molaire du solide pur ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ )

$\gamma_2$  : coefficient de fugacité du soluté dans la phase fluide (déviation à l'idéalité de la fugacité

$f$ ) : calculé à partir d'une équation d'état (sans unité)

$P_2^{sat}$  : pression de sublimation du soluté : calculé à partir d'une équation d'état (Pa)

$P$  : pression de travail (Pa)

$T$  : température de travail (K)

$R$  : constante universelle des gaz parfaits ( $R = 8,314472 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )

L'unité internationale de la température est le Kelvin, noté K, mais pour des raisons de lecture, toutes les températures données dans ce travail seront notées en degrés Celsius, noté °C ( $T_k = T_{°C} + 273,15$ ). De la même façon, l'unité internationale de pression est le Pascal, notée Pa, mais nous utiliserons le bar dans ce travail ( $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$ )

Les variables d'état qui gouvernent la première étape et sur lesquelles on peut agir directement sont la pression et la température, ainsi que le débit de fluide. Le débit de fluide peut en effet conditionner l'atteinte d'un équilibre thermodynamique dans l'autoclave.

La deuxième étape du procédé consiste en une détente brutale de la solution à travers une buse. Si on considère que la variation d'énergie cinétique dans la buse est négligée, on peut considérer la détente comme isenthalpe. La Figure 11 montre une ligne verticale pointillée, matérialisant la chute de pression. On remarque alors qu'on a une chute de température associée à cette chute de pression, à enthalpie constante (en abscisse).

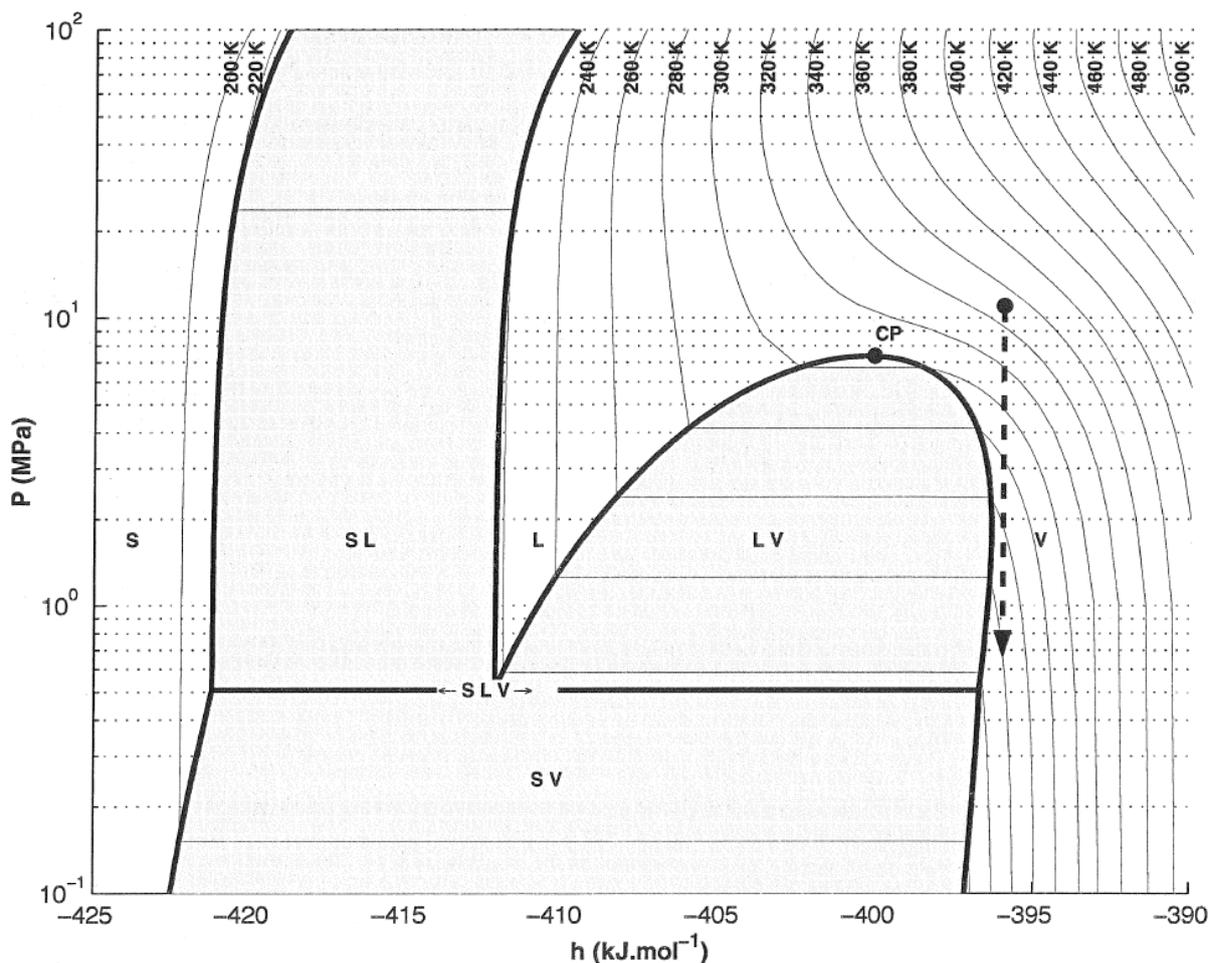


Figure 11 : Détente lors du procédé RESS sur le diagramme enthalpie-pression (diagramme de Mollier) (18)

De plus, il est nécessaire d'éviter l'apparition d'une phase liquide susceptible de resolubiliser la poudre produite. Il faut donc une température suffisamment élevée pendant la pré-expansion, de façon à se trouver en dehors de l'équilibre liquide-vapeur une fois la détente effectuée. Cependant, ceci peut être difficile à mettre en œuvre avec les solutés thermosensibles, comme le sont beaucoup de PA pharmaceutiques. Si la température de départ est trop faible, on peut conduire à la formation de liquide après détente ou même de carboglace avec des risques de colmatage. Pour résoudre ce problème, on peut utiliser des buses chauffantes ou préchauffer le fluide avant son entrée dans la buse. Il est alors nécessaire de connaître la quantité de chaleur transmise au fluide pour pouvoir se situer sur le diagramme de Mollier (Figure 11). La troisième solution est de définir les couples de pression et de température avant et après détente et d'éviter ainsi tous les problèmes précédemment décrits.

La nucléation du soluté intervient lors de la détente brutale, qui s'accompagne d'une onde de choc. Cette perturbation mécanique est responsable des conditions uniformes expliquant la faible dispersion de taille des particules obtenues. Le temps d'expansion ne dépend pas seulement de la vitesse du son (qui dépend de la nature du fluide et des conditions opératoires) mais aussi de la longueur de l'orifice de détente. Avec une buse capillaire, Smith *et al.* (22) ont proposé une approximation du temps d'expansion entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  seconde. C'est pendant cet instant que la solubilité chute de plusieurs ordres de grandeur, provoquant une sursaturation élevée.

Ce procédé rencontre un obstacle majeur à son développement à grande échelle, la solubilité du composé à cristalliser dans le CO<sub>2</sub> SC, puisqu'il n'est pas applicable aux solides peu ou pas solubles dans le CO<sub>2</sub> SC. Pour utiliser cette méthode de formation de particules, il faut pouvoir disposer de molécules à forte solubilité dans le CO<sub>2</sub> SC, ce qui est le cas de peu de molécules pharmaceutiques. Les FSC ont en effet un faible pouvoir solvant pour un grand nombre de molécules, comme les sucres, les protéines, les polymères, et beaucoup de PA. Pour obtenir un rendement suffisant, les quantités de CO<sub>2</sub> SC à utiliser deviennent vite considérables malgré un possible recyclage, et induisent des coûts de fonctionnement conséquents. Une solution pour résoudre ce problème consiste à ajouter de petites quantités d'un cosolvant tel que le méthanol, l'acétone, l'éthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), mais, dans ce cas, on diminue les avantages en termes de respect de l'environnement et le procédé devient plus complexe qu'avec le CO<sub>2</sub> SC seul. Le cosolvant est en fait un troisième composé, qui, ajouté en faible proportion au mélange, va permettre une augmentation de la solubilité.

Sauceau (23) montre par exemple que la solubilité d'un PA pharmaceutique dans le CO<sub>2</sub> peut être multipliée par 10 avec 1% de DMSO ou avec 5% d'éthanol. Il faut alors tenir compte du diagramme de phase binaire CO<sub>2</sub>SC/cosolvant et se placer dans les conditions adéquates qui empêchent l'apparition d'une phase liquide susceptible de dissoudre le solide formé. A noter que dans le cas d'ajout d'un cosolvant, il convient d'en prévoir au préalable son élimination à l'issue de la détente. La chute de pression liée à la détente peut, comme nous l'avons évoqué précédemment, conduire à la formation d'une phase liquide (ce qui n'est pourtant pas souhaité). Cette phase liquide se compose majoritairement de ce cosolvant, et va dissoudre les particules formées. Il est donc nécessaire de disposer des données relatives au mélange réalisé afin de déterminer au mieux les conditions opératoires qui permettent de minimiser la présence de cosolvant résiduel (18).

Le problème de la présence de cosolvant résiduel décrit ci-dessus peut être contourné par la technique RESS-SC (Rapid Expansion of Supercritical Solutions - Solid Cosolvent). Dans cette technique, le cosolvant est un solide qui se dissout dans le CO<sub>2</sub> SC et qui augmente la solubilité de la substance active. Lors de la dépressurisation, le cosolvant retourne à l'état solide et empêche l'agglutination des particules de substance active. Il est ensuite éliminé de la poudre par sublimation lors d'une étape de lyophilisation. Ce procédé RESS-SC a été appliqué avec succès à la micronisation de la griséofulvine et de la phénytoïne (24), mais nous ne décrirons pas davantage ce procédé.

L'usage du procédé RESS dans la réduction de la taille de particules a été beaucoup développé au cours des dernières années. Le Tableau 5 présente quelques substances qui ont été source d'utilisation de ce procédé.

Substance	Usage	Chercheur	Année
Lovastatine	Hypocholestérolémiant	Mohamed et al	1989
		Debenedetti <i>et al.</i>	1993
B-œstradiol	Stéroïde	Krukonis	1984
Acide salicylique	Antalgique	Domingo <i>et al.</i>	1997
Théophylline	Bronchodilatateur	Subra et Debenedetti	1996
Phénacétine	Analgésique	Loth et Hemgesberg	1986
Progestérone	Hormones	Jung et Perrut	2001
Ibuprofène	Anti-inflammatoire	Charoenchaitrakool <i>et al.</i>	2000

Tableau 5 : PA utilisés dans le procédé RESS (liste non exhaustive)

Les atouts du procédé RESS sont importants : il permet de générer d'énormes rapports de sursaturation conduisant à des particules ultrafines et monodisperses. Le fait que le solvant retourne à l'état gazeux en fin de cycle permet de recycler le fluide et d'éviter la présence de solvant résiduel. Enfin, ce type de procédé permet de traiter des molécules sensibles à la chaleur, aux chocs thermiques ou mécaniques. Les articles parus montrent que la taille et la morphologie des particules reste tout de même très incontrôlées. Il faudrait pouvoir modéliser le plus précisément possible les étapes de nucléation et de croissance des cristaux, tout en tenant compte de la géométrie de la buse.

A cause du faible nombre de molécules utilisables dans ce procédé (car peu ou pas solubles dans le CO<sub>2</sub> SC), il a été nécessaire de développer des techniques dites antisolvant.

### 2.2.2. FSC utilisé comme antisolvant

La principale limitation du procédé RESS est la très faible solubilité dans le CO<sub>2</sub>SC d'un grand nombre de substances à usage pharmaceutique. Dans les procédés antisolvant, le soluté est dissous dans un solvant organique liquide et le CO<sub>2</sub> SC est ajouté pour précipiter le soluté. Le solvant organique présente au moins les trois propriétés suivantes :

- être un bon solvant du composé étudié,
- avoir une bonne compatibilité avec l'antisolvant (idéalement, ils doivent être complètement miscibles dans les conditions de température et de pression utilisées),
- persister le moins possible dans le solide cristallisé à la fin du procédé.

Ce principe d'utilisation sera particulièrement adapté pour des molécules telles que de nombreux PA, les sucres, les protéines, ou les polymères connus pour leur très faible solubilité voire leur insolubilité dans le CO<sub>2</sub> SC.

Lors de la mise en contact de la solution avec l'antisolvant SC, un transfert de masse bidirectionnel s'opère : l'antisolvant SC va venir se dissoudre dans la phase organique, ce qui diminue sa densité, son pouvoir solvant et donc la solubilité du soluté. La première composante de la nucléation est donc la diminution de la solubilité par dissolution. La deuxième composante de la nucléation est l'augmentation de la concentration du soluté (et par conséquent la réduction de la taille des gouttelettes (25)) par évaporation du solvant dans la phase SC. Ces deux phénomènes expliquent comment le soluté devient rapidement sursaturé et pourquoi les phénomènes de nucléation puis de cristallisation se produisent (18).

Il existe différentes variantes du procédé antisolvant qui peuvent être classés en deux catégories : le batch et les procédés de pulvérisation continus, et selon la manière dont le solvant et l'antisolvant sont mis en contact : soit la solution de PA est pulvérisée dans le FSC, soit le FSC est injecté dans la solution liquide (2).

Les auteurs utilisent un grand nombre d'acronymes pour désigner ces techniques, parmi lesquelles on peut citer :

- GAS (batch) : Gaseous AntiSolvent : la solution organique est préalablement introduite dans l'autoclave avant que ce dernier ne soit mis sous pression (26),
- SAS (pulvérisation) : Supercritical AntiSolvent : la solution organique est injectée dans un milieu SC grâce à un capillaire. Le procédé SAS est semi-continu pour la phase SC. L'introduction du FSC et l'injection de la solution organique sont réalisés à co-courant,
- ASES (pulvérisation) : Aerosol Solvent Extraction System : il est identique au procédé SAS mais l'introduction du FSC et l'injection de la solution organique sont réalisés à contre-courant,
- SEDS (pulvérisation) : Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluid : une buse coaxiale sert de chambre de prémélange entre la solution organique et le FSC,
- PCA (pulvérisation) : Precipitation by Compressed AntiSolvent.

Après détente de la solution, un débit de CO<sub>2</sub> est maintenu dans la cellule à pression constante de manière à laver les particules formées.

#### 2.2.2.1. Procédé batch

##### 2.2.2.1.1. GAS (Gaseous AntiSolvent)

Gallagher *et al.* (27) ont proposé les premiers le procédé GAS pour contrer les inconvénients rencontrés dans le procédé RESS. En effet, en plus de ne pas être applicable aux molécules polaires, le procédé RESS implique une forte consommation de FSC et de hautes pressions de travail (28).

Le FSC est injecté dans un récipient sous pression contenant la solution ou la suspension de soluté, préalablement introduite dans le réacteur agité. On a alors une pressurisation graduelle due à l'injection de fluide. La diminution de la force de solvant du liquide cause la précipitation du solide en particules ultrafines (29). Une fois les particules formées, le solvant excédentaire est éliminé par un balayage continu de FSC pur. Les particules sont ensuite

collectées après remise à pression atmosphérique de l'enceinte utilisée (Figure 12). Les principaux inconvénients de cette manière de procéder sont liés au mode discontinu : la pression croît continûment tout au long de l'injection du fluide, induisant une sursaturation progressive et non contrôlée et, *in fine*, une distribution de taille des particules élargie (18).

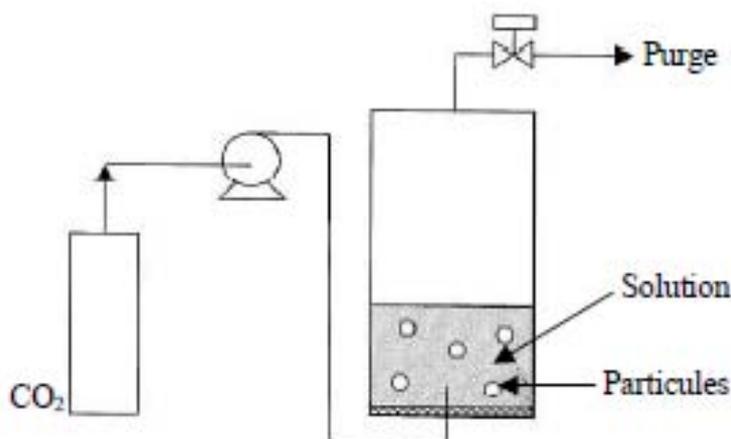


Figure 12 : Schéma de principe du procédé GAS (29)

Si on veut appliquer avec succès les procédés GAS à la production de particules de protéines, il est impératif que la substance active ne soit pas dégradée. Ces procédés exposent les protéines à des solvants organiques, à des FSC, à des hautes pressions et à des forces de cisaillement élevées. Ceci peut conduire à des changements de conformation de la structure secondaire des protéines. Il faudra donc y prêter une attention particulière en ajoutant un modificateur qui permet de protéger la substance labile et d'éviter sa dénaturation (2).

Le Tableau 6 présente les avantages et les inconvénients du procédé GAS par rapport au procédé RESS :

Avantages GAS / RESS	Inconvénients GAS / RESS
Pressions de travail moindres	Utilisation d'un solvant organique (problématique si traces résiduelles)
Gamme de composés utilisables plus large	Rapports de sursaturation variables car addition progressive de FSC d'où possible distribution de taille de particules large
Plus de paramètres de procédés sur lesquels jouer (contrôle taille et morphologie)	Taille de particules plus grande car rapports de sursaturation plus élevés
	Etape de séchage additionnelle souvent requise
	Transposition d'échelle parfois difficile

Tableau 6 : Avantages et inconvénients du procédé GAS par rapport au procédé RESS

## 2.2.2.2. Procédés continus

### 2.2.2.2.1. Généralités

Dans les procédés antisolvant continus SAS, la solution et l'antisolvent se rejoignent au niveau de la buse d'expansion et sont injectés à co-courant. À l'exception de la récupération des particules, le reste du procédé peut être opéré en continu. Le solvant peut être récupéré dans des séparateurs en aval, tandis que l'antisolvent peut être recyclé par compression et chauffage. Une étape de lavage ou d'extraction au CO<sub>2</sub> pur est recommandée en fin de procédé, afin d'éliminer les dernières traces de solvant qui pourraient se trouver au sein des particules cristallisées. Des variantes de ce procédé ont été décrites : ASES (solution organique et FSC injectés à contre-courant), SEDS (utilisation d'une buse coaxiale) ou PCA.

Comme évoqué précédemment, lors de l'optimisation d'un procédé, c'est souvent la zone diphasique liquide/vapeur (ELV) que l'on cherche à éviter afin de ne pas avoir apparition d'une phase liquide dans la chambre d'expansion. Une telle phase pourrait en effet resolubiliser les particules néoformées. En toute rigueur, il faudrait disposer du diagramme ternaire solvant/antisolvent/soluté, car la présence de ce dernier modifie la forme de l'enveloppe (Figure 11).

### 2.2.2.2.2. SAS (Supercritical Anti-Solvent) (29)

Après pressurisation du réacteur et stabilisation du flux d'antisolvent, la solution organique liquide contenant l'espèce dissoute est pulvérisée à travers une buse sous forme de fines gouttelettes (Figure 13). La sursaturation est créée par un double transfert de matière : le solvant du soluté se transfère vers le FSC avec lequel il est au moins partiellement miscible et le FSC se transfère dans le solvant (7).

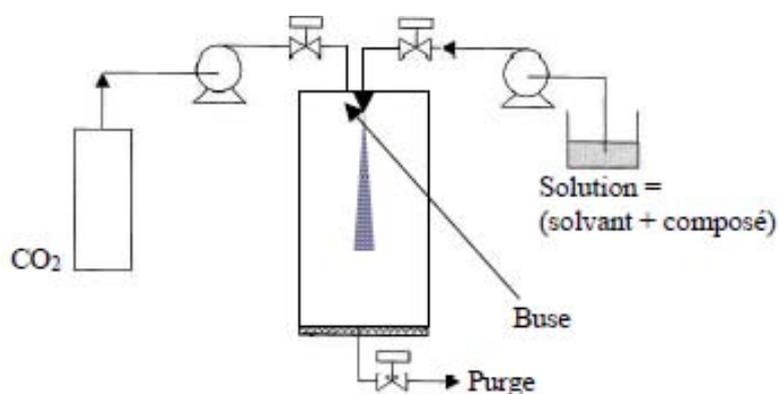


Figure 13 : Schéma de principe du procédé SAS (29)

La sursaturation survient immédiatement quand la solution entre en contact avec le FSC, et conduit à des distributions de tailles de particules étroites.

Les protéines représentent un cas particulier en raison de leur fragilité (sensibilité à la température et au pH) et de leur hydrosolubilité. Le développement du génie génétique a permis l'apparition de nouvelles protéines thérapeutiques, telles que l'insuline recombinante humaine. Cependant, une formulation sèche de ces molécules reste difficile, en raison de la préservation de la bioactivité. Là encore, les procédés de type SAS présentent des avantages, notamment en comparaison de l'atomisation qui met en jeu de hautes températures ou à la lyophilisation, souvent jugée trop onéreuse.

Certains groupes de recherche utilisent une buse à trois conduits coaxiaux, permettant d'injecter simultanément trois fluides : l'antisolvant SC, une solution aqueuse et la solution organique contenant le PA. Ce système présente l'avantage d'éliminer l'eau résiduelle avec le solvant organique, dans la mesure où ils présentent une bonne solubilité mutuelle (18).

Les procédés de type SAS font l'objet d'un intérêt croissant qui ne se dément pas depuis les années 1990. L'intérêt majeur de ce procédé est bien sûr son utilisation potentielle avec n'importe quelle molécule. Il est en effet presque toujours possible de trouver un couple solvant/antisolvant convenable. Comme l'antisolvant est en général fixé (le CO<sub>2</sub> est présent dans plus de 95 % des applications), le choix du solvant est déterminant. Il doit être un bon solvant de la molécule à cristalliser et être miscible, au moins partiellement, avec le CO<sub>2</sub> SC. Il faut aussi noter que moins la molécule étudiée est soluble dans l'antisolvant, plus facile sera la génération de particules avec une minimisation des pertes de matière en aval de l'autoclave.

#### 2.2.2.2.3. PCA (Precipitation with Compressed Antisolvent)

A l'inverse du mode précédent, il est possible de disperser la solution organique contenant le PA dissous dans un autoclave où l'antisolvant a été préalablement pressurisé (Figure 14) (18). Cette pulvérisation entraîne la formation de gouttelettes de solution de taille homogène dans lesquelles l'antisolvant se dissout. La sursaturation est immédiate, contrairement au procédé SAS, et on obtient des particules de taille homogène. Aussi, en raison de la diminution de la taille des gouttelettes de solution pulvérisées dans le FSC par rapport au procédé SAS, on diminue la taille des particules formées.

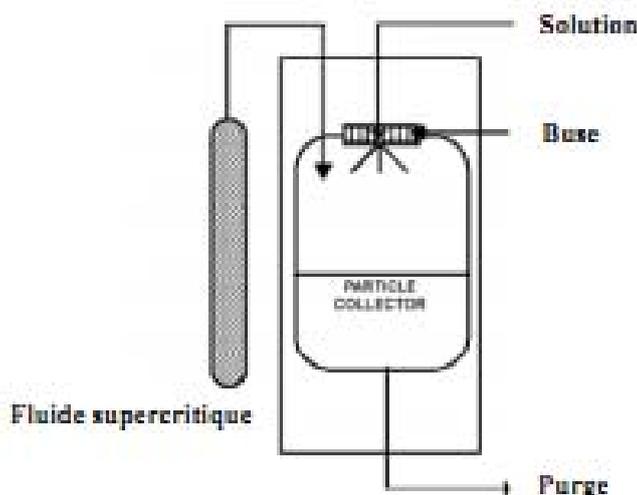


Figure 14 : Schéma du procédé PCA (30)

La société CritiTech est spécialisée dans l'optimisation de la libération de PA dans l'organisme. Son but est de développer des formulations administrables par voie orale, par injection ou par voie inhalée, aussi bien que des dispositifs implantables. Le procédé utilisé par cette société est le procédé PCA, mais elle a développé un dispositif propre à elle, qui consiste à utiliser l'énergie ultrasonore produite par une tuyère convergente/divergente (buse à ultrasons) pour briser les gouttelettes en gouttelettes encore plus fines. Combiné à la pulvérisation du solvant dans le flux de CO<sub>2</sub> SC, on a donc à la fois un transfert de masse rapide du solvant vers le CO<sub>2</sub> SC ainsi qu'une cristallisation qui se fait avant une coalescence possible des gouttelettes. Ce procédé permet de produire de manière continue des particules avec une taille très petite et des distributions de taille étroites.

#### 2.2.2.2.4. ASES (Aerosol Solvent Extraction System)

Ce procédé consiste à dissoudre le PA dans un solvant organique (qui doit lui-même être soluble dans le FSC). L'ensemble est ensuite atomisé sous forme de fines gouttelettes à travers une buse dans une colonne où circule le CO<sub>2</sub> SC à contre-courant (31). La dissolution du FSC à l'intérieur des gouttelettes de liquide provoque une augmentation du volume de celles-ci et une diminution du pouvoir solvant du liquide, causant la sursaturation rapide du soluté et sa précipitation sous forme de fines particules. Après récolte d'une quantité suffisante de particules, l'apport de solution organique dans l'enceinte est arrêté et un débit constant de CO<sub>2</sub> SC est maintenu de manière à extraire le solvant résiduel (18). L'arrivée des deux fluides à contre-courant permet d'améliorer les transferts qui s'effectuent entre la solution organique et le FSC et donc de travailler avec un procédé optimal.

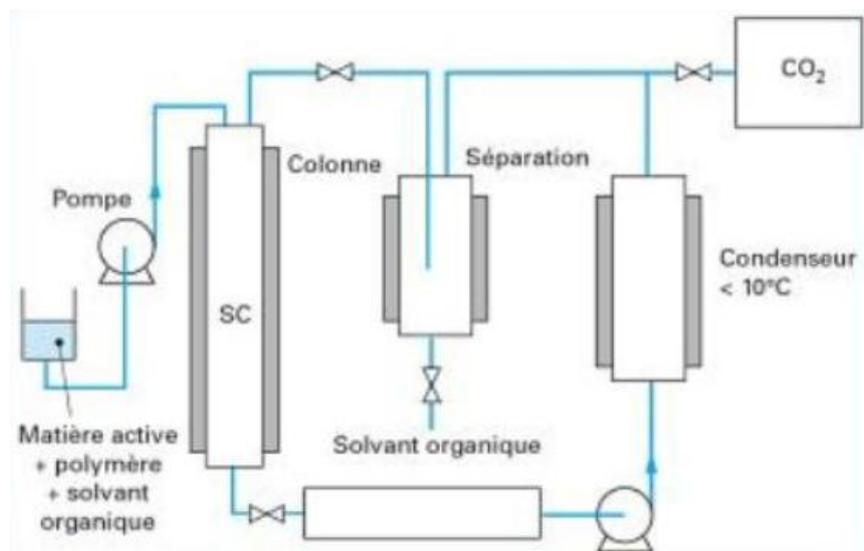


Figure 15 : Schéma de principe du procédé ASES (31)

#### 2.2.2.2.5. SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids)

Ce procédé est une application particulière du procédé ASES et a été développé par Bradford Particle Design dans le but d'obtenir des gouttelettes de plus petites tailles par amélioration du mélange entre la solution et le FSC. Le FSC est utilisé à la fois pour ses propriétés d'antisolvant et comme gaz propulseur au niveau de la buse par effet mécanique. La solution organique et le CO<sub>2</sub> SC sont co-pulvérisés par une buse coaxiale à double entrée vers une cellule à pression et température contrôlées (Figure 16). La vitesse d'entrée du FSC, élevée, permet de disperser la solution en fines gouttelettes. Il s'en suit la formation de particules qui sont récupérées sur un filtre placé au fond de la cellule et le mélange FSC/solvant est séparé de manière à assurer le recyclage de chaque fluide.

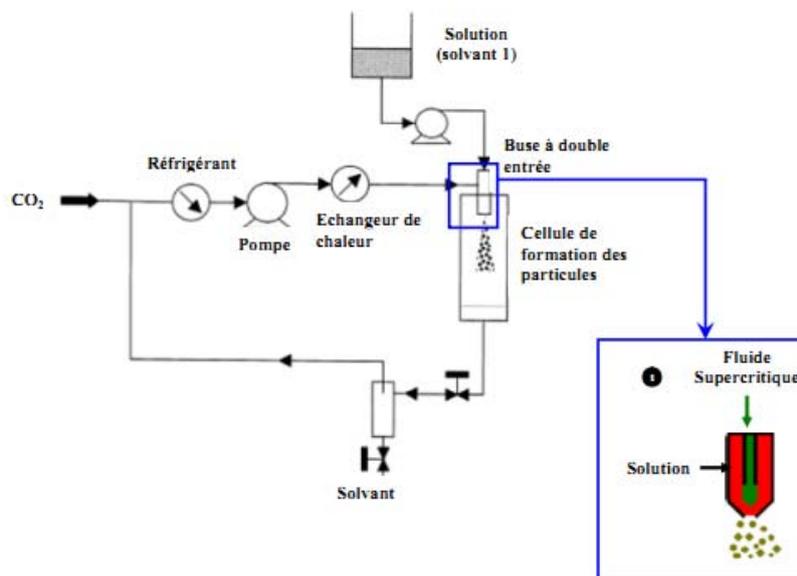


Figure 16 : Schéma du procédé SEDS (30)

Cette méthode est aujourd'hui la plus étudiée car c'est celle qui apparaît comme étant la plus aisément transposable à une échelle industrielle. À l'exception de la récupération des particules, le reste du procédé peut être opéré en continu. Le solvant peut être récupéré dans des séparateurs en aval, tandis que l'antisolvant peut être recyclé par compression et chauffage. Une étape de lavage ou d'extraction au CO<sub>2</sub> pur est recommandée en fin de procédé, afin d'éliminer au sein des particules cristallisées les dernières traces de solvant qui pourraient s'y trouver (18). Les rendements obtenus sont souvent élevés (proches de 95 %) et les poudres obtenues sont stables, pures, et moins cohésives que celles obtenues par les autres procédés de micronisation.

### 2.2.3. PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)

Cette méthode, dans laquelle le FSC joue le rôle d'agent de dispersion, exploite la faculté des gaz sous pression à se solubiliser en quantité importante dans les liquides (entre 5 et 50% m/m) et le FSC est alors utilisé comme soluté. Le principe du procédé PGSS consiste à dissoudre une grande quantité de CO<sub>2</sub> SC dans une solution liquide contenant le composé à cristalliser sous forme dissoute, dans un premier autoclave. La solution obtenue, saturée en gaz, est ensuite pulvérisée à travers une buse dans une chambre d'expansion à basse pression qui provoque la détente du gaz et le refroidissement du produit. Il y'a alors solidification du composé à précipiter suite au refroidissement et à la détente du gaz et les particules peuvent être collectées après dépressurisation du système (Figure 17).

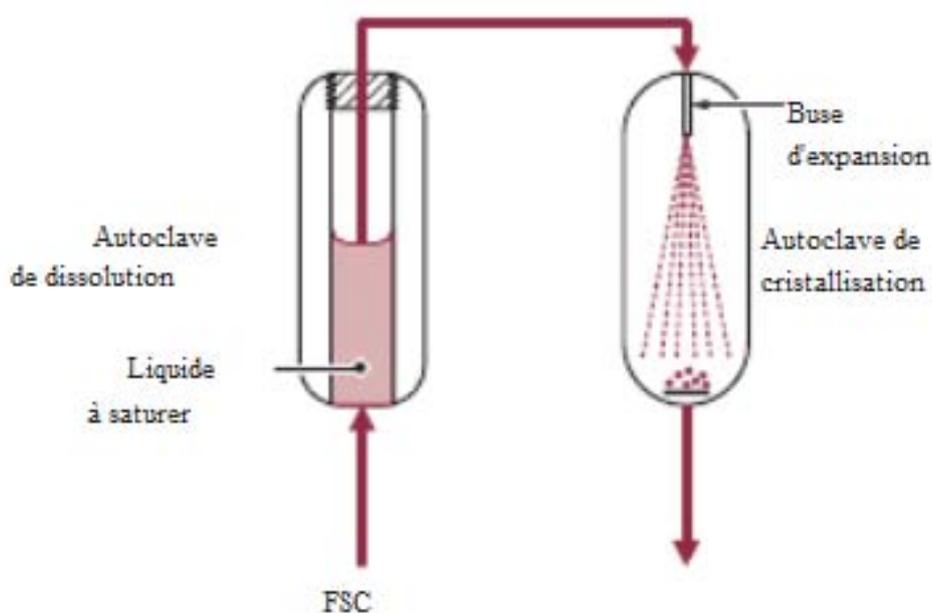


Figure 17 : Schéma de principe du procédé PGSS (20)

Ce procédé a été développé initialement pour des polymères partiellement solubles dans le CO<sub>2</sub> SC mais dans lesquels de grandes quantités de CO<sub>2</sub> peuvent être dissoutes. Il est très utilisé pour les espèces capables d'absorber de larges quantités de gaz, comme certains polymères : polycaprolactone, polyméthacrylate, (D,L)-polylactide, ... (29).

Un autre procédé de génération de particules proche du PGSS a été décrit par Sievers *et al.* (32). Il s'agit de la production d'un aérosol qui est ensuite séché. Du CO<sub>2</sub> SC est mis en contact avec une solution aqueuse d'un PA, dans un té comportant une restriction de diamètre en sortie, laquelle va jouer le rôle d'une buse de dépressurisation. Les microgouttes produites sont séchées dans un courant d'azote chaud. Ces procédés présentent de plus l'avantage d'avoir de très bons rendements et de consommer peu de FSC. Mais là encore, leur principal inconvénient est lié aux conditions de température employées ce qui peut constituer un frein pour le traitement des composés thermolabiles.

#### 2.2.4. SAA (Supercritical Fluid-Assisted Atomization)

Ce procédé, décrit pour la première fois par Reverchon en 2002 (33), a pour particularité de mélanger le FSC et la solution de PA dans une cellule équipée d'une plaque en acier inoxydable perforée améliorant le contact entre la solution liquide et le FSC (Figure 18). L'ensemble est ensuite dépressurisé dans une chambre de précipitation conduisant à la formation des particules de PA. Le but du procédé est en fait d'abaisser la viscosité et donc la tension de surface de la solution liquide pour améliorer l'atomisation de la solution.

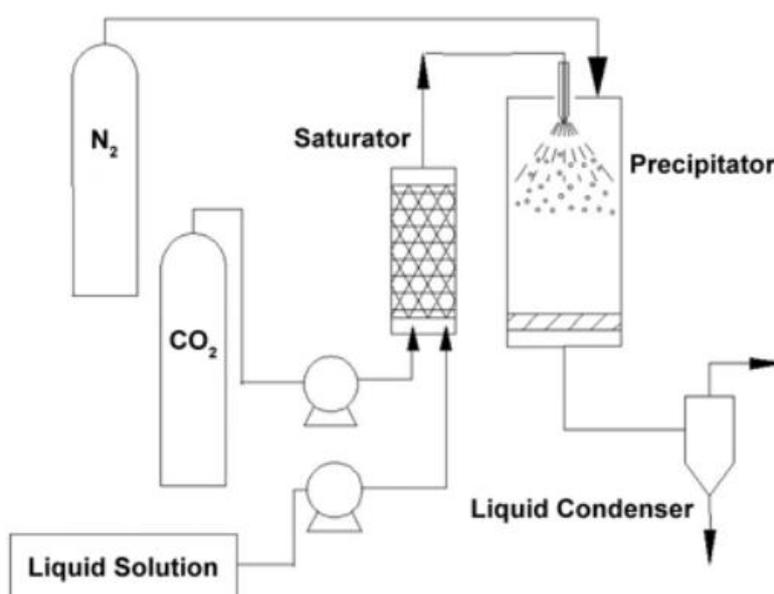


Figure 18 : Schéma du procédé SAA (34)

### 2.2.5. Influence des paramètres de travail sur la génération de particules

Comme pour le procédé RESS, la taille, la forme et la distribution de taille des particules dépendent fortement des conditions opératoires, comme la concentration du soluté dans la solution, les débits mis en œuvre, le rapport des débits entre la solution et l'antisolvant. Les températures et pressions en amont et en aval de la buse doivent aussi être contrôlées.

En vue de l'industrialisation du procédé, le mode semi-continu avec co-injection de la solution et de l'antisolvant est décrit comme étant le plus prometteur (SEDS). Il est alors nécessaire de définir le débit relatif antisolvant/solution afin de pouvoir déterminer le nombre de phases en présence, à l'aide d'un diagramme de phases pression/température ou pression/enthalpie, et de se placer dans les conditions opératoires optimales. On cherche alors à éviter de se trouver dans la zone d'ELV puisqu'on ne souhaite pas voir l'apparition d'une phase liquide dans la zone d'expansion, qui pourrait resolubiliser les particules néo-formées. Les procédés antisolvant permettent de ne pas travailler avec de hautes températures (comme l'atomisation ou le procédé RESS) ou à coût élevé (comme la lyophilisation).

La Figure 19 récapitule l'ensemble des éléments à prendre en compte pour décider quel type de procédé utiliser et sur quels paramètres travailler pour avoir des particules satisfaisantes.

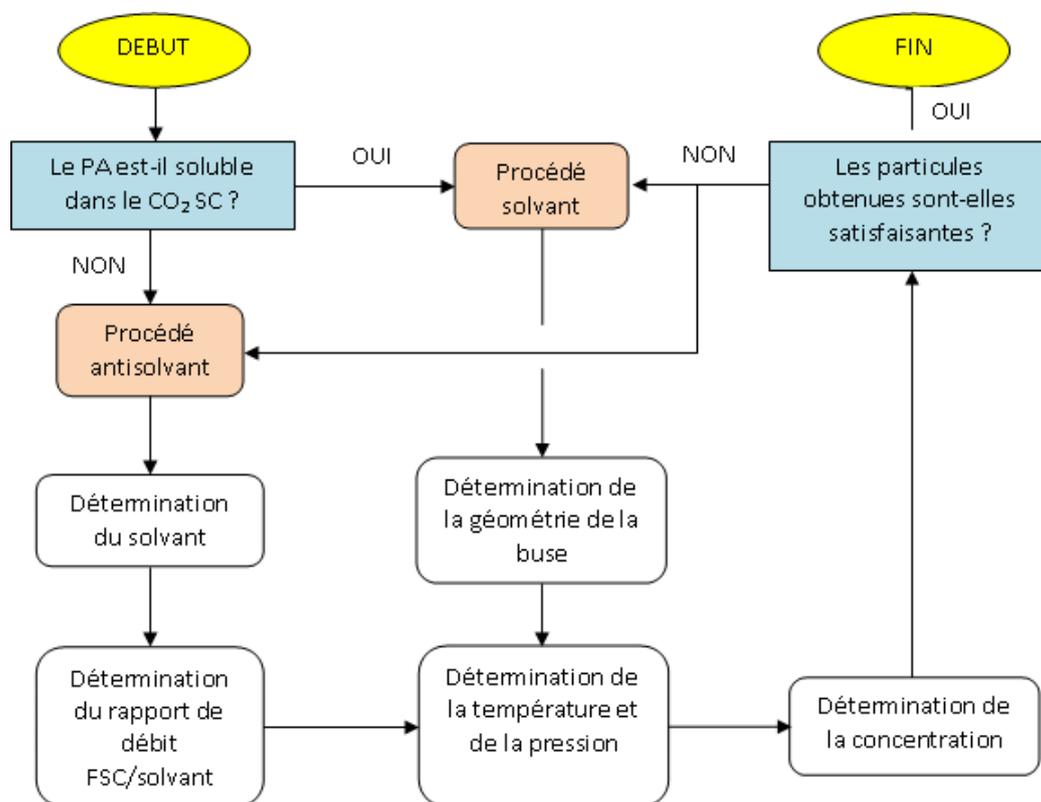


Figure 19 : Algorithme de décision du procédé à utiliser et des paramètres à déterminer

Plusieurs groupes de chercheurs ont tenté de modéliser les procédés antisolvant en tenant compte toute ou partie des paramètres suivants :

- thermodynamiques : connaissance et description du mélange binaire solvant/antisolvent, de façon à pouvoir choisir le couple pression/température,
- hydrodynamique : champ de vitesse et turbulence du jet à la sortie de la buse (donc la géométrie de la buse), tensions de surface, viscosité des fluides,
- transfert de masse bidirectionnel,
- transferts thermiques (ex : chaleur latente de changement de phase).

#### 2.2.5.1. Influence de la pression et/ou de la température

D'après les résultats obtenus par les groupes de recherche, il semble avantageux, pour optimiser la production de particules, et notamment de très fines particules, de travailler dans la zone monophasique située au-delà du point critique du mélange.

En effet, à haute pression, les transferts de masse et les degrés de sursaturation sont plus élevés. En raison de ce fort transfert massique, la durée de vie moyenne d'une goutte est minimale, ce qui conduit à la production de fines particules. La pression de travail influencerait aussi sur la morphologie des particules obtenues : l'étude de Reverchon *et al.* sur le salbutamol (35) conduit à la formation de sphères vides à basse pression (95 bar) puis de particules aciculaires et enfin d'étoiles organisées à des pressions plus élevées (115 bar).

Enfin, en augmentant la température et/ou en diminuant la pression, Kim et Shing (36) forment des particules de taille élevée, ce qui serait dû à la diminution de la solubilité du CO<sub>2</sub> dans le solvant sous ces conditions et donc à une solubilité entre le PA et le solvant plus élevée, conduisant à une sursaturation moins importante et donc à une augmentation de la taille des particules.

#### 2.2.5.2. Influence du choix du solvant

Le solvant doit être choisi scrupuleusement pour ne pas être trop soluble vis-à-vis du PA, ce qui conduirait à un faible degré de sursaturation et donc à la formation de grosses particules de forme irrégulière (36). De plus, selon la tension superficielle du solvant choisi, il pourrait y avoir une différence de la forme des gouttelettes issues de la buse, conduisant à des formes de particules finales différentes.

### 2.2.5.3. Influence de la concentration de la solution PA/solvant

Plus la concentration de la solution PA/solvant est élevée (ou plus le débit de la solution est élevé), plus les particules sont grosses et de forme irrégulière et de distribution de taille élargie (37). Ce phénomène est soumis à diverses hypothèses :

- agglomération des petites particules (36)
- la concentration en solvant augmente ce qui diminue la force de transfert de masse et donc diminue le rapport de sursaturation et par conséquent le taux de nucléation (38)

Selon Martin et Cocero (39), la taille des particules est d'autant plus petite que la concentration dans le solvant est haute, que la turbulence du mélange antisolvant/solvant est élevée et que le rapport des débits CO<sub>2</sub>/solvant est grand. Ces conclusions diffèrent de celles obtenues par d'autres auteurs. Il est en fait difficile d'établir un lien entre la concentration de la solution et les caractéristiques des particules obtenues ; l'influence de ce paramètre sera donc à étudier au cas par cas.

### 2.2.5.4. Influence de la géométrie de la buse

Il a été montré que la taille des particules formées dépend du jet issu de la buse : pour des nombres de Reynolds élevés dans la buse, jusqu'à 10<sup>4</sup>, la taille des particules solides formées diminue. Au-delà de cette turbulence, les particules ont une taille plus grosse, ce qui pourrait être dû à un temps de séjour plus court dans la zone sursaturée. Il serait donc nécessaire de connaître la cinétique de la cristallisation souhaitée, ceci afin de pouvoir déterminer avec précision le temps de séjour nécessaire à la cristallisation et à la formation de fines particules.

Dans le cas des procédés solvant, comme pour les procédés antisolvant, la géométrie de la buse a une influence importante sur la taille des particules formées (18). Dans le cas des procédés antisolvant, un autre point important réside dans l'efficacité de la buse. Son rôle n'est pas, comme dans le cas du procédé RESS, d'assurer une brusque détente, mais plutôt de réaliser entre les deux fluides un mélange suffisamment efficace pour obtenir une sursaturation importante, et d'assurer une dispersion optimale de la solution sous forme de gouttelettes favorisant les transferts de masse. Dans le cas contraire, des conditions pourtant a priori favorables à la nucléation (par exemple un mélange solvant/antisolvant monophasique) peuvent ne pas être atteintes et conduire à un échec.

L'effet de la géométrie de la buse est donc pris en compte : une buse plus petite favorise la vitesse du fluide injecté, donc le mélange des fluides, et par conséquent une production de particules plus fines. De même, une buse concentrique dans laquelle le CO<sub>2</sub> SC est injecté de manière annulaire autour du jet de solvant (Figure 20) favorise de hautes sursaturations et donc des tailles de particules plus petites.

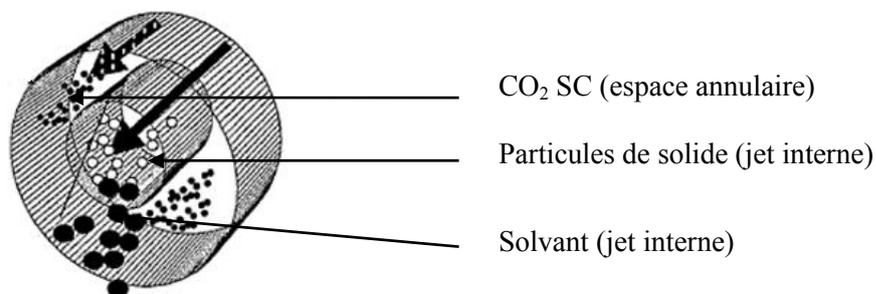


Figure 20 : Schématisation d'une buse annulaire (inspiré de (40))

#### 2.2.5.5. Influence du débit d'introduction du fluide et de la vitesse d'agitation

Outre les paramètres habituels de pression, température, volume, concentration etc..., deux autres facteurs peuvent avoir une influence significative sur les particules obtenues : le débit d'introduction du fluide et la vitesse d'agitation. Le débit d'introduction du FSC est un paramètre crucial puisqu'il provoque une expansion volumique de la solution conduisant à la sursaturation progressive du système et la formation des nucléi. Les particules récoltées après remise à pression atmosphérique de l'enceinte utilisée présentent généralement des distributions de taille assez larges car la saturation survient dans tout le volume du réacteur : la pression augmentant tout au long de l'injection de fluide, on a une sursaturation progressive et non contrôlée, d'où cette distribution de taille des particules élargie. Ceci peut être contrôlé par la vitesse d'agitation du milieu, qui doit être évaluée de manière à rendre la solution solvant/antisolvant la plus homogène possible. Pour un PA liquide, elle serait optimale entre 600 et 1000 tours/mn pendant 1h et pour un PA solide, une vitesse d'agitation entre 200 et 400 tours/mn pendant 1h suffirait (41).

## **3. TECHNIQUES DE PREPARATION DE FORMES GALENIQUES INNOVANTES**

### **3.1. Introduction**

Suite à l'administration d'un médicament (non protégé) et à son absorption dans l'organisme, la distribution ne se fait pas uniquement sur le lieu d'action auquel il est destiné mais aussi vers d'autres récepteurs. Ce phénomène génère des effets secondaires, souvent indésirables. De plus, il existe dans l'organisme de nombreuses enzymes qui peuvent dégrader le médicament avant qu'il n'arrive sur son lieu d'action. L'idée de préserver le PA en l'encapsulant dans un réservoir qui le protégerait des attaques extérieures tout en augmentant potentiellement sa sélectivité pour les cellules à traiter a fait du chemin dans la tête des chercheurs et de nombreuses améliorations ont déjà pu être apportées dans ce domaine. L'encapsulation d'un PA peut aussi avoir pour but de lui conférer une solubilité apparente plus élevée, ce qui lui permet d'être davantage dissous une fois administré. Plusieurs techniques sont développées dans cette optique : l'encapsulation et l'enrobage, la formation de liposomes, et l'inclusion dans des complexes de type CD.

### **3.2. L'encapsulation, l'enrobage et la formation de particules composites**

#### **3.2.1. Généralités**

L'encapsulation peut être définie comme le piégeage d'un composé ou d'un système au sein d'un matériau dispersé en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structuration et sa fonctionnalisation. La nano- et la microencapsulation regroupent l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de nano et de microparticules individualisées, constituées d'un matériau d'enrobage et contenant un PA. Les microparticules (nanoparticules) présentent une taille comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm (entre 1 nm et 1  $\mu\text{m}$ ) et contiennent généralement entre 5 et 90 % en masse de matière active.

Les microparticules (nanoparticules) sont de deux types (Figure 21) :

- la microcapsule (nanocapsule) est une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide plus ou moins visqueux ou solide, entouré d'une écorce solide continue de matériau enrobant,

- la microsphère (nanosphère) est une particule constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersé le PA, à l'état moléculaire, de particules solides ou encore de gouttelettes de solution.

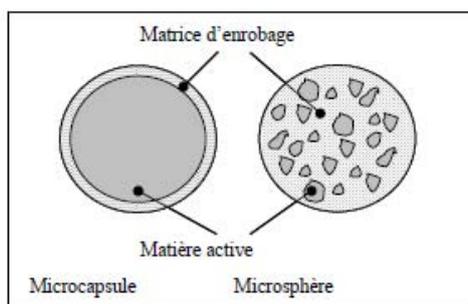


Figure 21 : Morphologie des microparticules(31)

Les choix du procédé et de la formulation déterminent les caractéristiques des microparticules (morphologie, structure, taille, teneur en PA, stabilité, profil de libération, ...). L'encapsulation peut avoir pour mission de rendre un PA peu soluble dans l'eau très soluble, cela en le séparant du milieu environnant par une couche, qui elle est hydrosoluble. On forme ainsi un complexe plus soluble que ne l'était la molécule originelle.

De plus, l'application d'enrobages à dissolution pH-dépendante permet par exemple d'assurer une libération ciblée dans certaines parties du tube digestif et d'éviter une libération prématurée du PA. On veut parfois, par exemple, assurer une libération intacte de PA au niveau du côlon. Seules des formes pharmaceutiques innovantes peuvent répondre à cette problématique puisque celles-ci devront parcourir l'estomac, l'intestin et par conséquent différentes zones de pH et résister à différentes enzymes sans endommager le PA. De nombreuses molécules appartenant à des classes thérapeutiques différentes sont concernées par une délivrance ciblée dans le côlon : des anti-inflammatoires, des anticancéreux, des protéines, des peptides, des vermifuges, des antibiotiques, ...

### 3.2.2. Techniques conventionnelles d'encapsulation (31)

Les procédés de microencapsulation peuvent être classés selon le principe d'obtention : procédés physico-chimiques, mécaniques, chimiques (Tableau 7). Ces techniques sont largement décrites dans la littérature, c'est pourquoi nous ne décrivons que certains points, essentiels à la compréhension et à la comparaison avec les techniques en FSC décrites par la suite.

Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques	Procédés chimiques
Séparation de phases ou coacervation (simple ou complexe)	Nébulisation / Séchage (spray-drying)	Polycondensation interfaciale
Evaporation-Extraction de solvant	Gélification ou congélation de gouttes (prilling)	Polymérisation interfaciale
Gélification thermique d'émulsions (hot melt)	Enrobage en lit fluidisé (spray-coating)	Polymérisation en milieu dispersé par voie radicalaire ou anionique
	Extrusion / Sphéronisation	

Tableau 7 : Techniques conventionnelles d'encapsulation

### 3.2.2.1. Procédés physico-chimiques

#### 3.2.2.1.1. Coacervation

Le procédé de coacervation simple consiste à abaisser la solubilité d'un polymère initialement solubilisé dans un solvant organique ou en milieu aqueux, en faisant varier la température ou en ajoutant un électrolyte, un non-solvant ou un deuxième polymère (agent de coacervation). Il se formera deux phases liquides : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre pauvre en polymère. Il faut toutefois savoir que l'obtention de gouttelettes de coacervat suffisamment stables pour permettre l'encapsulation d'un PA ne pourra être possible que si on se trouve dans la fenêtre de stabilité sur le diagramme ternaire solvant/polymère/agent de coacervation. Le PA dispersé dans la solution initiale de polymère se retrouvera au sein des gouttelettes de coacervat (Figure 22).

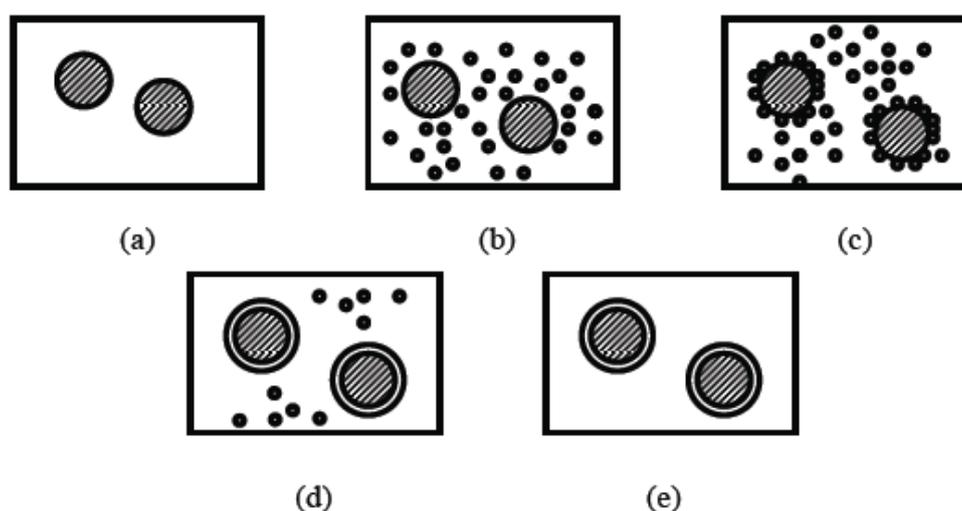


Figure 22 : Principe de la coacervation simple | dispersion du PA dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt de coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e)

(42)(43)

Une fois obtenues, elles sont durcies ou réticulées par un agent de solidification et les microparticules (sphères ou capsules) sont lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées. Ce procédé permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles.

#### 3.2.2.1.2. Evaporation-extraction de solvant

Ce procédé est basé sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion donnant lieu à la précipitation du polymère d'enrobage préalablement dissous dans cette phase, sous forme de microsphères. Les polymères, généralement hydrophobes, sont tout d'abord dissous dans un solvant organique peu miscible avec l'eau (ex : dichlorométhane) puis le PA est dissous ou dispersé dans la solution de polymère. Le mélange est émulsifié dans un grand volume d'eau contenant des tensioactifs (ex : alcool polyvinylique), afin d'obtenir une émulsion H/E. L'évaporation du solvant, après diffusion progressive dans la phase continue, est réalisée sous pression atmosphérique ou pression réduite et sous agitation lente. Enfin, les particules sont lavées, collectées par filtration ou centrifugation puis séchées ou lyophilisées.

#### 3.2.2.1.3. Gélification thermique d'émulsions (« hot melt »)

La gélification thermique ou « hot melt » consiste à dissoudre ou disperser le PA à encapsuler dans le matériau d'enrobage en fusion puis à émulsionner l'ensemble dans une phase dispersante à une température supérieure à la température de fusion du matériau enrobant. On utilise en général, pour le matériau d'enrobage, des lipides de bas point de fusion (ex : cire de Carnauba, alcool cétylique...). Le milieu est ensuite refroidi brutalement afin de solidifier les particules obtenues. Ce procédé permet la microencapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles si l'on choisit une phase dispersante pour laquelle ces molécules ont peu d'affinité (huile de silicone et eau respectivement).

#### 3.2.2.2. Procédés mécaniques

##### 3.2.2.2.1. Gélification et congélation de gouttes (prilling)

La gélification de gouttes est basée sur la formation d'une solution, dispersion ou émulsion de PA dans une solution aqueuse de polymères (ex : chitosane, alginate de sodium, agarose) capables de former des gels sous une action extérieure, physique ou chimique. On forme ensuite des gouttelettes à travers une buse vibrante, qui vont être réceptionnées dans une phase aqueuse gélifiante contenant du chlorure de sodium. Elles se transforment

instantanément en microparticules de gel sphériques. La solubilité du PA dans le milieu de réception doit être la plus faible possible pour minimiser les pertes par solubilisation.

La congélation de gouttes (Figure 23) fait intervenir un matériau enrobant de type corps gras (ex : glycéride ou cire), à point de fusion relativement bas (50 – 120°C). On prépare un fondu de ce matériau enrobant dans lequel le PA est solubilisé ou dispersé soit sous forme particulaire solide ou sous forme de microgouttelettes d'émulsion inverse. La préparation ainsi obtenue est extrudée à travers une buse vibrante et on obtient alors des gouttelettes sphériques de taille uniforme. Un milieu dit « de chute » constitué d'azote ou d'air froid permet de refroidir les gouttelettes et de les solidifier pour donner des microsphères.

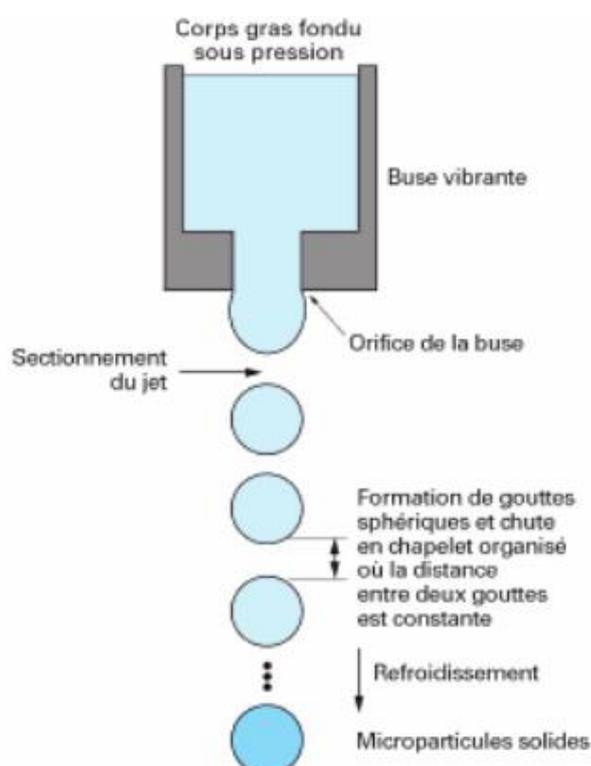


Figure 23 : Schéma de principe de la congélation de gouttes (31)

Le Tableau 8 résume les caractéristiques de ces deux procédés.

<b>Distribution granulométrique</b>	Etroite
<b>Diamètre</b>	200 – 800 µm
<b>Taux d'encapsulation</b>	10 – 30 % m/m
<b>Exemple d'industrialisation</b>	Gélification de gouttes : encapsulation de cellules destinées à une transplantation (pancréas, foie, ...) en cours de tests. Congélation de gouttes : formes à libération modulée de la théophylline (Fournier) et du kétoprofène (Rhône-Poulenc-Rorer)

Tableau 8 : Récapitulatif des caractéristiques des procédés de gélification et de congélation de gouttes

### 3.2.2.2.2. Extrusion – Sphéronisation

Elle peut être utilisée pour l'encapsulation de PA dans des polymères thermoplastiques. On réalise l'extrusion du fondu contenant le polymère et le PA, de façon à former des filaments. Ces filaments sont refroidis et découpés pour obtenir des microparticules cylindriques ou arrondies, ensuite érodées mécaniquement pour leur donner une forme de microsphère. Le PA doit être stable thermiquement à la température d'extrusion et les tailles initiales des poudres de polymère et de PA doivent être voisines. La taille des particules est supérieure à 200 µm.

### 3.2.2.2.3. Procédé d'enrobage en lit fluidisé (31)

Ce procédé ne s'applique qu'à des PA solides. Des PA liquides peuvent cependant être encapsulés après adsorption par des supports particulaires poreux. Ce procédé continu se fait en trois temps (Figure 24) :

- fluidisation de la poudre de particules,
- pulvérisation du matériau enrobant liquide sur les particules grâce à une buse de pulvérisation,
- séchage et filmification de l'enrobage.

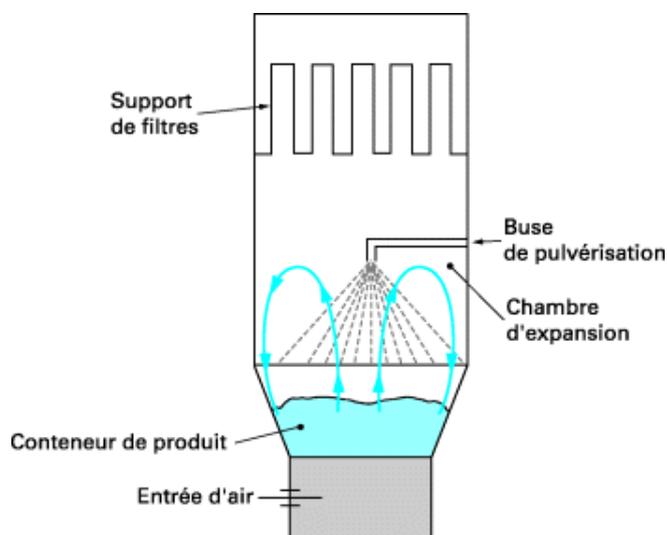


Figure 24 : Représentation schématique d'un appareil à lit d'air fluidisé en configuration top spray

La fluidisation assure plusieurs fonctions dans la suspension fluide de particules :

- elle permet un mélange constant des particules, qui conduit à un mélange homogène,
- elle assure un transfert de chaleur optimal entre l'air et la surface des particules,
- elle produit enfin un mouvement cyclique des particules de la zone de pulvérisation jusqu'à la zone de séchage.

Deux types de configuration de l'appareillage existent : en configuration « top spray », la buse de pulvérisation est placée au sommet de la suspension fluide et la formulation de matériau enrobant est pulvérisée à contre-courant (Figure 24). Dans la configuration « bottom spray », la formulation de matériau enrobant est pulvérisée à co-courant à la base du lit fluidisé.

Ces appareillages peuvent aussi être équipés par un système Würster : il s'agit d'un cylindre placé dans la partie inférieure du lit. Une plaque de distribution de l'air placée à sa base permet d'entraîner les particules de l'intérieur de ce cylindre vers la zone de pulvérisation puis vers la chambre d'expansion où le solvant s'évapore. La vitesse des particules diminue alors, les particules retombent sur la plaque de distribution et recommencent un nouveau cycle. Enfin, récemment, une technique de pulvérisation tangentielle a été développée (enrobage en lit fluidisé rotatif). Il s'agit du même type d'appareillage sauf que le mouvement des particules décrit une spirale hélicoïdale dans laquelle la fluidisation est particulière. De plus, la buse est cette fois située à l'intérieur même de la cavité du lit en mouvement et pulvérise la solution d'enrobage tangentiellement au flux de particules à co-courant. Les films d'enrobage ont alors une épaisseur très uniforme.

Le Tableau 9 récapitule les caractéristiques du procédé en lit d'air fluidisé.

<b>Epaisseur des films d'enrobage</b>	< 20 $\mu\text{m}$
<b>Taux d'encapsulation</b>	60 – 90 % m/m
<b>Taille des particules initiales</b>	
<b>top spray et bottom spray</b>	> 100 $\mu\text{m}$
<b>tangential spray</b>	> 250 $\mu\text{m}$
<b>Distribution granulométrique des particules initiales</b>	Etroite
<b>Paramètres à maîtriser :</b>	
<b>liés au séchage du film</b>	volume d'air de fluidisation température de l'air degré d'humidité de l'air
<b>liés à la pulvérisation</b>	concentration de la formulation liquide pulvérisée débit de la formulation taille des gouttelettes formées

Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques du procédé en lit d'air fluidisé

#### 3.2.2.2.4. Procédé de nébulisation-séchage ou spray-drying (31)

Il s'agit d'un procédé continu qui permet de transformer une formulation liquide initiale en une forme microparticulaire sèche. La formulation liquide initiale peut être constituée :

- soit d'une solution de PA et de matériau enrobant,
- soit d'une dispersion de particules solides de PA dans une solution ou une émulsion de matériau enrobant,
- soit d'une émulsion de PA dans une solution de matériau enrobant.

Le procédé se fait en quatre étapes :

- nébulisation de la formulation liquide initiale pour former un aérosol,
- mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée,
- séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides,
- séparation de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.

L'appareillage est classiquement constitué d'une haute tour au sommet de laquelle la formulation liquide initiale est nébulisée, soit par passage à travers une buse d'atomisation pneumatique ou ultrasonore, soit par un système de type disque tournant ou buse rotative. Les microgouttelettes formées entrent en contact avec un flux d'air établi à co-courant (Figure 25), filtré, et chauffé. Les microparticules se forment dans la chambre de dessiccation par vaporisation rapide et entraînement du solvant. Elles sont collectées à la base de cette chambre après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone. Dans le cas du système à contre-courant, la buse de nébulisation est située à la base de la chambre de dessiccation et les microgouttelettes présentent donc initialement une vitesse et une trajectoire opposées au flux d'air, ce qui améliore les transferts de chaleur et de matière.

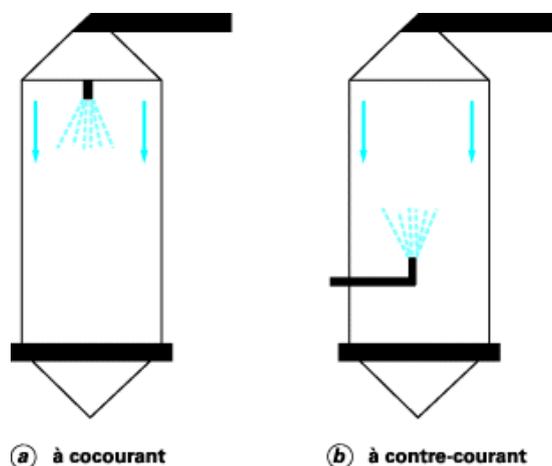


Figure 25 : Configurations possibles d'un appareil de nébulisation-séchage (a : à cocourant ; b : à contre-courant)

Le Tableau 10 et le Tableau 11 permettent de connaître les limites de ce procédé.

<b>Taille des particules obtenues</b>	Séchage à co-courant : 1 – 50 µm Séchage à contre-courant : 50 – 200 µm (agrégation des petites particules)
<b>Distribution granulométrique</b>	Large
<b>Ecart-type</b>	Egal au diamètre moyen
<b>Taux d'encapsulation</b>	40 % m/m maximum
<b>Rendement de production<sup>1</sup></b>	80 – 98 % Pertes dues à l'adhésion des microparticules sur les parois de la chambre de dessiccation et du conduit de transfert entre la chambre et le cyclone
<b>Morphologie</b>	Sphères : une partie de la matière active (de 30 à 60 %) peut être localisée à la surface des particules et n'est donc pas protégée d'où sa libération immédiate une fois en contact avec un solvant de la matière active.
<b>Conclusion</b>	Opération pas adaptée pour le masquage de goût ni pour stabiliser une matière vis-à-vis de l'oxydation par exemple.

Tableau 10 : Récapitulatif des caractéristiques du procédé de nébulisation – séchage

<b>Industrialisation</b>	Facile Besoin de maîtriser de nombreux facteurs : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ concentration en matière active ou en matériau enrobant</li> <li>▪ taux global de matière non volatile dans la formulation (de 3 à 40 %)</li> <li>▪ viscosité de la formulation</li> <li>▪ température d'entrée de l'air (40 – 200°C)</li> <li>▪ débit de la formulation à nébuliser et sécher (de quelques millilitres à quelques litres par minute)</li> </ul>
<b>Exemple de réalisation industrielle</b>	Parlodel® LAR (Novartis), commercialisé sous forme de microsphères injectables à libération prolongée de bromocriptine encapsulée dans des copolymères biodégradables d'acide lactique et glycolique (PLGA)

Tableau 11 : Industrialisation du procédé de nébulisation-séchage

<sup>1</sup> = masse de particules recueillies / masse de matière sèche dans la formulation initiale

### 3.2.2.3. Procédés chimiques

#### 3.2.2.3.1. Polycondensation interfaciale

Ce procédé consiste à faire réagir deux monomères, l'un dans la phase dispersée, l'autre dans la phase dispersante, afin d'obtenir une membrane de polymère à la surface des gouttelettes formées.

Dans le cas d'un PA lipophile, la première étape consiste à préparer une solution contenant le PA et un premier monomère dans un solvant organique puis de former une émulsion grâce à un tensioactif. On ajoute ensuite dans cette phase aqueuse le second monomère hydrosoluble afin d'induire la réaction des deux monomères à l'interface huile/eau où ils auront diffusé.

Pour un PA hydrophile, on forme une émulsion inverse (E/H) dans un solvant de température d'ébullition élevée, à partir d'une solution aqueuse PA/monomère hydrosoluble. Puis le monomère organosoluble est ajouté dans la phase dispersante. La taille des microsphères obtenues est comprise entre 0,5 et 100  $\mu\text{m}$  et dépend principalement de l'agitation du système, de la vitesse d'ajout des deux monomères et de la cinétique de diffusion.

#### 3.2.2.3.2. Polymérisation en milieu dispersé

Ces procédés permettent la formation de microparticules à partir de monomères synthétiques. Ils mettent en jeu une phase de formation des particules appelée nucléation suivie d'une phase de croissance donnant lieu à des particules de type matriciel. Deux mécanismes principaux sont à distinguer : la polymérisation en émulsion et la polymérisation en dispersion.

Dans le premier cas, une émulsion des monomères en phase aqueuse est réalisée avant la polymérisation, le PA étant préalablement solubilisé ou dispersé dans les monomères. La réaction de polymérisation radicalaire ou anionique selon les monomères utilisés s'initie respectivement par l'ajout d'un amorceur ou par simple contact avec la phase aqueuse. Les particules obtenues ont un diamètre de 1 à 15  $\mu\text{m}$ .

Dans le cas de la polymérisation en dispersion, la nucléation se fait en phase homogène, les monomères et le PA étant initialement solubilisés dans la phase continue. La croissance des oligomères suite à la polymérisation amorcée par un initiateur, donne lieu à leur précipitation sous forme d'agrégats stabilisés par les tensioactifs présents dans la phase continue. Cette

technique conduit à des particules de diamètre nettement supérieur à celui des particules obtenues par polymérisation en émulsion : de 100 nm à 5 µm.

#### 3.2.2.4. Conclusion

Les techniques classiques de préparation de systèmes microparticulaires injectables à libération contrôlée, telles que la méthode d'émulsion (H/E)/évaporation de solvant, la coacervation en phase organique, ou la technique de double émulsion (E/H/E)/évaporation de solvant, conduisent à l'utilisation de solvants organiques. Ceux-ci nécessitent des étapes de contrôle et de dosage des taux de solvants résiduels afin d'éviter tout effet secondaire au patient. De plus, les autorités gouvernementales mettent en place des normes sévères pour éviter les normes de contamination de l'environnement par les solvants organiques inhérents aux procédés de production et limiter voire supprimer l'emploi de solvants organiques dans les compositions pharmaceutiques. Enfin, dans les formulations de protéines, des problèmes de dénaturation induits par le contact avec les solvants et des phénomènes indésirables d'adsorption aux interfaces solvants/eau peuvent apparaître.

#### 3.2.3. Techniques d'encapsulation en FSC

Les techniques en milieu SC ont des principes de fonctionnement similaires aux techniques réalisées de manière conventionnelle. Les phénomènes physiques et/ou chimiques sont les mêmes. De la même façon que pour la micronisation, les techniques d'encapsulation sont classées en deux groupes, en fonction du rôle du CO<sub>2</sub> SC : solvant ou antisolvant. Un troisième groupe, à part, rassemble les techniques dans lesquelles le CO<sub>2</sub> SC joue le rôle d'agent de dispersion du PA. Toutes les techniques utilisées pour la micronisation de PA sont employées pour l'encapsulation de PA (RESS, GAS, SAS, PCA, ASES, SEDS, PGSS).

L'intérêt de l'utilisation des FSC réside dans des distributions de taille des particules obtenues moins larges, dans le taux d'encapsulation du PA, souvent meilleur par la formulation SC, ainsi que dans l'absence de solvant résiduel en fin de procédé. Du fait que la taille des particules, leur morphologie, ainsi que le taux d'encapsulation influent sur la libération du PA, ces paramètres doivent être contrôlés de la manière la plus précise qu'il soit pour obtenir des systèmes performants. La mise en œuvre étant basée sur le même principe que celle de la micronisation, seules les différences et les étapes qui diffèrent seront mentionnées dans les descriptions qui suivent, ceci afin de ne pas faire de redite.

### 3.2.3.1. FSC utilisé comme solvant

#### 3.2.3.1.1. RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution)

Cette méthode s'apparente au spray-drying puisqu'il s'agit de l'atomisation d'une solution de FSC contenant le matériau d'enrobage et le PA. Cette solution est nébulisée dans un milieu de pression inférieure au point critique, entraînant l'expansion brutale du fluide se trouvant initialement à l'« état SC » et la précipitation des solutés sous forme de microsphères. En effet, nous avons vu précédemment que grâce aux propriétés du FSC, une forte diminution de la densité du solvant peut être obtenue par un léger changement de pression, donnant lieu à une forte diminution de la solubilité des composés initialement dissous. Le procédé RESS est donc utilisé pour l'encapsulation de PA par co-précipitation d'un polymère et d'un PA ce qui permet de former en une seule étape des microsphères(44)(45). Ce procédé, simple d'utilisation, est potentiellement utilisable avec tout type de substance et peut servir à fabriquer des systèmes à libération contrôlée. L'inconvénient de cette méthode serait qu'il faut disposer de PA et de polymères très solubles dans le FSC, ce qui est rarement le cas puisque la plupart des polymères sont peu solubles dans le FSC. On peut cependant améliorer la solubilité d'un polymère dans le FSC par ajout d'un cosolvant.

#### 3.2.3.1.2. Autres procédés

Un procédé moins brutal consiste à dissoudre dans un autoclave le matériau d'enrobage dans le FSC puis à ajuster les conditions de température et de pression de manière à ce qu'il précipite autour de la matière active en suspension. Ce procédé se rapproche du procédé de coacervation simple et permet l'obtention de microcapsules.

Un autre procédé dit d'« imprégnation » consiste à charger de matière active des particules de polymère préformées. La première phase de ce procédé consiste à augmenter la porosité des particules par gonflement du polymère exposé au fluide SC. Puis, du FSC contenant le PA est introduit entraînant le transfert de ce dernier vers la phase polymère. Enfin, le FSC est évacué de manière progressive provoquant le piégeage du PA à l'intérieur des particules. Cette technique est intéressante de par le fait qu'elle se déroule à température ambiante et permet un contrôle précis de la taille étant donné que les particules sont préparées avant d'être chargées en PA.

### 3.2.3.2. FSC utilisé comme antisolvant

Les procédés utilisant les FSC en tant que non solvant, peuvent s'assimiler aux procédés de coacervation en milieu liquide, avec l'avantage de limiter les traces de solvant résiduel. Ils permettent d'encapsuler des composés tels que les peptides et les protéines, non solubles dans le FSC ou trop fragiles pour subir l'expansion rapide du procédé RESS. Dans chacun des cas, le matériau d'enrobage est dissous dans le solvant en même temps que le PA.

#### 3.2.3.2.1. SAS

Une fois que le FSC est additionné au PA et au matériau d'enrobage en solution, il est maintenu à haute pression puis détendu, ce qui conduit à la sursaturation de la solution et à la précipitation du soluté. Ce procédé n'est pas approprié pour l'encapsulation d'ingrédients solubles dans l'eau car l'eau est faiblement soluble dans les FSC.

#### 3.2.3.2.2. ASES (Aerosol Solvent Extraction System)

Ce procédé consiste à dissoudre et/ou disperser le matériau enrobant et le PA dans un solvant organique puis à atomiser l'ensemble dans une colonne où circule le FSC. Une extraction rapide du solvant que l'atomisation a dispersé sous forme de gouttelettes dans le FSC est alors observée, précipitant le matériau d'enrobage sur le PA et entraînant l'encapsulation.

#### 3.2.3.3. PGSS et CriticalMix®

Le procédé PGSS est particulièrement adapté pour encapsuler des produits sensibles tels que les protéines. Il a permis aussi de travailler sur l'insuline, la calcitonine ou la RNase avec une perte d'activité fonctionnelle et d'intégrité structurale minimales.

La technologie CriticalMix® utilise le CO<sub>2</sub> SC pour encapsuler des médicaments dans une matrice biodégradable (des polymères biocompatibles) dans le but d'obtenir des médicaments à libération prolongée. Elle emploie la technique PGSS : le polymère et le PA sont conduits avec du CO<sub>2</sub> dans une enceinte chauffée et pressurisée. La liquéfaction du polymère par le CO<sub>2</sub> SC permet le mélange du PA dans le polymère. L'ensemble est ensuite dépressurisé à travers une buse et le polymère se solidifie en piégeant le PA, formant des microparticules homogènes de PA et de matrice. Ce procédé se fait en une seule et fonctionne à des températures ambiantes. Il est donc adapté à l'encapsulation de PA labiles, comme les

protéines. Les protéines peuvent être encapsulées avec un taux d'encapsulation de 100 %. Aucune dégradation ni d'agglomération et aucun effet sur les structures secondaires et tertiaires des protéines. Enfin, le PA et le matériau d'enrobage ne doivent pas être solubles dans le FSC.

#### 3.2.3.4. Les procédés brevetés

Les procédés brevetés décrits ci-après ne sont pas les seuls à exister mais c'est ceux que nous évoquerons dans la suite de cette thèse, c'est pourquoi il nous a semblé important de les décrire dans cette partie. D'autres procédés ont été développés par des entreprises, une partie est répertoriée à la fin de ce travail (chapitre 4, Tableau 18).

##### 3.2.3.4.1. Formulcoat® (Pierre Fabre)

Le Centre de Développement Fluides Supercritiques des laboratoires Pierre Fabre propose une technologie nouvelle (Formulcoat®) qui consiste à enrober un PA solide dans un agent enrobant lipidique, conduisant à un enrobage uniforme et homogène, sans agglomération. Le CO<sub>2</sub> SC est dissous dans un agent enrobant fondu puis le mélange est dépressurisé sur un flux continu de PA solide. Cela entraîne la détente du CO<sub>2</sub> et la solidification de l'agent enrobant à la surface du PA. La principale application est le masquage de goût de composés pharmaceutiques mais Formulcoat® peut également être utilisé pour des relargages différés, pour stabiliser des formulations ou pour favoriser la solubilisation du PA. Les principaux avantages sont :

- L'absence de solvant organique durant le procédé d'enrobage
- La possibilité d'enrober des particules <50 µm
- Aucun stress mécanique
- Procédé basse température
- Coûts de production intrinsèquement bas

##### 3.2.3.4.2. Formuldisp® (Pierre Fabre)

L'invention proposée par les laboratoires Pierre Fabre (Formuldisp®) concerne un procédé batch d'imprégnation d'un excipient pharmaceutique polymérique non poreux par une substance active, caractérisé par trois étapes successives. Le but de l'imprégnation n'est pas

seulement d'augmenter la dissolution du PA en milieu aqueux, mais d'obtenir une forme amorphe stabilisée du PA.

La première étape consiste à mélanger le PA hydrosoluble sous forme cristalline avec l'excipient polymérique non poreux, solide et insoluble dans le CO<sub>2</sub> SC et dans l'eau, à température et pression ambiantes. L'excipient et le PA sont uniformément répartis dans le mélange final. Cette étape se fait dans un mélangeur à tambour, un mélangeur convectif, un mélangeur fluidisé ou un mélangeur statique. Le mélange obtenu est ensuite introduit dans un réacteur fermé, de type autoclave par exemple, de manière concomitante ou successive avec le CO<sub>2</sub>.

La deuxième étape consiste en une mise en contact en mode statique, sans agitation, du mélange à une pression entre 80 et 170 bar, à une température entre 31 et 90°C pendant 1 à 6 heures : c'est l'étape de diffusion moléculaire. L'utilisation de CO<sub>2</sub> SC évite l'utilisation d'un solvant organique qui aurait du être ensuite éliminé de l'excipient pharmaceutique polymérique imprégné obtenu. Cette étape peut par exemple se faire dans un réacteur fermé, de type autoclave.

La dernière étape est la récupération d'une poudre sèche, formée par l'excipient polymérique imprégné par le PA par dépressurisation et refroidissement du réacteur. Le PA imprégnant l'excipient polymérique se trouve sous forme amorphe, donc il y a eu une modification physique de celle-ci lors de son imprégnation. Sous l'effet de l'augmentation de la pression et de la température dans la deuxième étape, l'excipient polymérique non poreux a une augmentation de la mobilité de ses chaînes polymériques, ce qui permet la pénétration de la substance active dans l'excipient et donc son imprégnation par la substance active.

Les inventeurs de ce procédé proposent une technique alliant les avantages de l'utilisation d'une étape de diffusion moléculaire en mode statique avec du CO<sub>2</sub> SC, en évitant toutefois quelques inconvénients que les études précédentes ont comme par exemple :

- la nécessité d'utiliser un excipient poreux,
- la nécessité de mettre en place des étapes supplémentaires (lavage supplémentaire, pulvérisation, ...),
- des conditions de température et de pression élevées,
- l'utilisation de l'agitation.

La deuxième étape du procédé se fait sans agitation, ce qui rend le procédé facilement industrialisable : en effet, l'utilisation d'une agitation dans un réacteur sous haute pression n'est possible qu'au stade de laboratoire et non au stade industriel. En effet, le moteur, à pression atmosphérique, doit transmettre un mouvement à un arbre d'agitation sous pression, et il est donc difficile d'assurer l'étanchéité autrement que par un entraînement magnétique. Cela limite les possibilités en termes de couple d'agitation.

### 3.3. La formation de liposomes

#### 3.3.1. Introduction

La première personne à avoir volontairement fabriqué des liposomes est Bangham en 1965. Les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux. Ils se forment spontanément quand des lipides (en général des phospholipides) sont dispersés dans un milieu aqueux. Il existe des liposomes

de deux types : unilamellaires (une couche lipidique) et multilamellaires (plusieurs couches lipidiques). Leur taille varie de 20 nm à plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ . Lorsque des protéines sont insérées dans leur matrice, on parle alors de protéoliposomes (46).

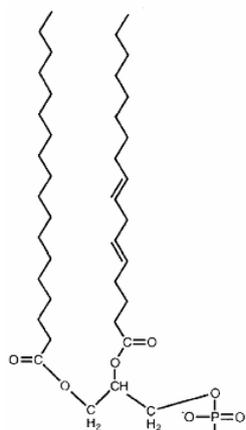


Figure 26 : Schéma développé d'une molécule de phospholipide

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire et une queue apolaire (Figure 26, Figure 27). Ils font partie de la famille des glycérolipides. Les glycérolipides sont construits à partir du glycérol, dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras qui forment la zone apolaire (hydrophobe) de la molécule de phospholipide. La troisième fonction alcool porte un groupe polaire, qui constitue la tête polaire (hydrophile) du lipide. Dans le cas des phospholipides, il s'agit du groupe phosphate, lui-même estérifié par différents groupements, souvent azotés (Figure 26).

Les acides gras possèdent généralement 16 ou 18 atomes de carbone et peuvent comporter une ou plusieurs insaturations. Tous les phospholipides ne peuvent pas être utilisés pour la fabrication de liposomes. Seuls ceux dont l'encombrement stérique des chaînes hydrocarbonées est voisin de celui de la tête polaire conviendront.

En milieu aqueux, l'organisation la plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre composantes hydrophobes et molécules d'eau. Les phospholipides

s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux. Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule : c'est le liposome (Figure 28).

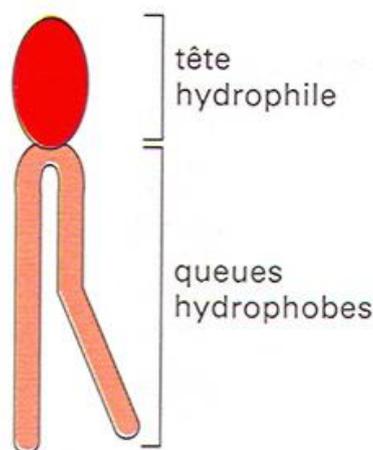


Figure 27 : Structure d'un phospholipide

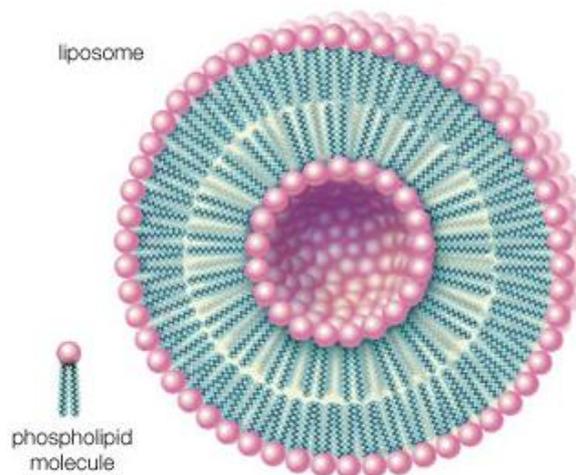


Figure 28 : Structure du liposome

On peut piéger des molécules variées dans un liposome en les stockant dans la phase aqueuse interne si ces molécules sont hydrophiles ou en les solubilisant dans la membrane si elles sont hydrophobes. Ils peuvent être utilisés comme vecteurs de molécules actives et sont particulièrement adaptés aux PA qui ont besoin d'être ciblés ou qui sont particulièrement fragiles, comme les protéines.

Les propriétés de la membrane d'un liposome fabriqué à partir de phospholipides naturels sont très proches des propriétés des membranes naturelles. Ils sont alors sans danger pour les traitements médicaux et ils peuvent véhiculer des médicaments vers les zones à traiter. Le libre passage de macromolécules d'un compartiment à l'autre est empêché, au contraire de celui de quelques solutés hydrophobes ou de petits solutés hydrophiles qui diffusent librement au travers de la bicouche (46).

Ces structures phospholipidiques sont pour le moment encore peu développées au niveau industriel quelle que soit la méthode de préparation (46), puisqu'elles sont peu stables et une grande partie est captée par le système immunitaire. En 2004 (47), deux traitements employant des liposomes ont reçu une AMM : Ambisome® de Nektar (amphotéricine B, traitement intraveineux des infections fongiques) et Myocet® d'Elan (doxorubicine, traitement du cancer du sein).

Les liposomes peuvent véhiculer des médicaments dans l'organisme. Suivant la nature du médicament, sa localisation au niveau du liposome est différente. Si le médicament est soluble dans l'eau, il est encapsulé dans le volume intraliposomal, alors que s'il est hydrophobe, il est dissous dans la phase lipidique. S'il est amphiphile, le composé est localisé au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides.

Le PA est alors délivré dans la cellule. Certains liposomes, capables de fusionner avec la paroi bactérienne, peuvent être administrés directement par inhalation et favorisent de façon marquée la pénétration de l'agent antimicrobien dans les micro-organismes et améliorent l'efficacité du PA en prolongeant sa durée de vie. Le médicament peut être aussi délivré lentement et de manière continue par le liposome vers les cellules cibles sans qu'il ne pénètre dans les cellules. Ainsi, la morphine, composé amphiphile, peut être encapsulée dans des liposomes multilamellaires. Après injection de ces liposomes à l'endroit souhaité, la morphine diffuse lentement au travers des nombreuses bicouches avant d'être libérée de façon passive et continue dans le milieu. L'emploi de liposomes permet de prolonger l'action de la morphine et de réduire sa concentration locale et donc sa toxicité et ses effets secondaires. Les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages. Ils s'accumulent dans le foie et la rate, ce qui limite leur utilisation pour traiter des affections au niveau d'autres organes. Par contre, le traitement des affections spécifiques du foie et de la rate est plus facile *via* les liposomes. Pour augmenter le temps de vie des liposomes dans la circulation, une composition lipidique spéciale doit être utilisée afin d'éviter la phagocytose. L'addition de gangliosides ou de polyéthylène glycol augmente le temps de circulation. Les liposomes peuvent aussi être utilisés comme vecteurs de thérapie génique par encapsulation d'un gène ou d'un plasmide. Malgré les avancées effectuées ces dernières années, l'emploi de liposomes comme vecteurs de matériel génétique reste limité. L'efficacité de transfection est plus faible qu'avec les vecteurs viraux, en particulier des problèmes de ciblage du noyau sont observés et le temps d'expression du gène est souvent trop court.

### 3.3.2. Préparation des liposomes par les techniques conventionnelles

Toutes les techniques de préparation des liposomes ont en commun trois étapes :

- l'évaporation du solvant de la phase lipidique
- la dispersion des lipides dans un milieu aqueux
- la purification des liposomes formés

La préparation doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du (des) lipide(s) choisi(s). En effet, les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase. Une agitation est souvent nécessaire pour améliorer les résultats. Dans un milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant : il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des liposomes multilamellaires se constituent en bicouches lipidiques concentriques et séparées, les unes des autres, par des couches d'eau. Ces liposomes ont des tailles très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport au poids du lipide. Un traitement physique doit leur être appliqué pour les transformer en vésicules de taille homogène, formées d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux. Suivant le traitement appliqué, les vésicules peuvent être de petite taille ou de grande taille.

La principale différence entre les techniques de préparation est la manière dont les constituants membranaires sont dispersés dans le milieu aqueux avant la phase de coalescence qui conduit à la formation de la membrane. On rencontrera trois modes de dispersion des phospholipides : la dispersion physique, la dispersion en deux phases et la solubilisation par un détergent. Quand on utilise des liposomes pour piéger des substances actives, il est indispensable d'éliminer l'excès de substance qui n'a pas été encapsulée. A partir de là, on pourra estimer le pourcentage d'encapsulation et étudier ensuite le relargage du soluté en fonction du temps ou des conditions du milieu.

Les méthodes conventionnelles de préparation des liposomes sont des méthodes simples à mettre en œuvre. Cependant, ces méthodes ont souvent été étudiées et appliquées sur de petits volumes de solution et il existe donc peu d'éléments pour les extrapoler. Nous ne ferons donc que citer ces méthodes de préparation des liposomes, sans les décrire en profondeur, puisque peu utilisées dans le cadre de la formulation de médicaments.

La méthode de Bangham consiste à solubiliser des phospholipides dans un solvant organique puis d'évaporer ce solvant jusqu'à formation d'un film phospholipidique. Ce film est hydraté par ajout d'une solution aqueuse sous agitation pour former les liposomes. Le diamètre des liposomes obtenus est de l'ordre de 0,05 à 10  $\mu\text{m}$ .

La méthode d'élimination du solvant repose sur le même principe que la méthode de Bangham. Cette méthode permet de produire des liposomes avec une taille comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ .

Les méthodes d'injection ont pour principe la dissolution des phospholipides dans une phase organique, suivie par l'injection de cette solution dans une solution aqueuse chauffée pour former des liposomes. Ces méthodes produisent des liposomes avec un diamètre moyen compris entre 0,03 et 0,11  $\mu\text{m}$ .

La méthode d'évaporation du solvant en phase inverse permet d'organiser les phospholipides en micelle inverse dans un milieu solvant organique/eau (faible proportion d'eau). Puis, lors de l'élimination du solvant, les micelles inverses deviennent des micelles normales puis des liposomes.

Enfin, dans la méthode de l'émulsion double, une émulsion E/H est formée par ajout d'une faible quantité d'eau dans un solvant organique contenant les phospholipides solubilisés. Cette émulsion est agitée pour disperser les gouttes d'eau dans la phase organique. Ensuite, cette émulsion est placée dans un grand volume de phase aqueuse et agitée, de façon à former une émulsion double E/H/E. Du diazote, appliqué sous forme de courant dans l'émulsion double permet d'éliminer le solvant organique et de former des liposomes. Les liposomes formés ont un diamètre moyen de 0,05  $\mu\text{m}$ .

La plupart de ces méthodes utilisent des solvants organiques toxiques. La nocivité de ces solvants est réelle et sans comparaison avec celle de l'éthanol utilisé comme solvant dans la plupart des procédés SC de formation des liposomes comme nous le verrons par la suite. Enfin, l'utilisation de ces solvants requiert une étape supplémentaire pour s'assurer que les liposomes formés sont exempts de traces de solvant résiduelles, d'où la mise en œuvre d'étape de post-traitement. Les nombreuses étapes de mise en forme compliquent la transposition industrielle, c'est pourquoi ces méthodes ne sont pas envisageables pour des applications pharmaceutiques à grande échelle.

### 3.3.3. Préparation des liposomes en FSC et avantages

La formation de liposomes à l'aide des FSC fait appel à des opérations de contact et de dépressurisation en profitant de la solubilité des phospholipides dans les mélanges  $\text{CO}_2$

SC/cosolvant, et le grand changement de volume atteint lors de l'expansion du CO<sub>2</sub>. La solubilité limitée des phospholipides et de substances médicamenteuses lipophiles dans le CO<sub>2</sub> SC nécessite souvent l'addition d'un cosolvant tel que l'éthanol, peu toxique et autorisé dans les préparations injectables (2).

Toutes les techniques utilisées pour la micronisation de PA sont employées pour la formation de liposomes (RESS, GAS, SAS, PCA, ASES, SEDS, PGSS). La mise en œuvre étant proches de celles de la micronisation, seules les différences et les étapes qui diffèrent seront mentionnées dans les descriptions qui suivent, ceci afin de ne pas faire de redite.

### 3.3.3.1. FSC utilisé comme solvant

#### 3.3.3.1.1. Méthode de décompression et méthode de l'injection

Plusieurs auteurs décrivent des procédés qui diffèrent légèrement et obtiennent des résultats parfois très différents. Par exemple, Castor *et al.* (48) décrivent deux procédés batch, qui diffèrent par l'introduction de la phase aqueuse : la méthode de décompression et la méthode de l'injection. Deux autoclaves servent à la solubilisation des composés avec le CO<sub>2</sub> SC et à la formation des liposomes dans les conditions ambiantes.

Dans la méthode de la décompression, le mélange phospholipides/cosolvant (éthanol)/PA hydrophobe/solution aqueuse est solubilisé dans le CO<sub>2</sub> SC. S'en suit une détente à travers une buse et la formation de la suspension liposomiale. Les liposomes formés sont unilamellaires avec un diamètre entre 0,01 et 0,3 µm.

Dans la méthode de l'injection, le mélange phospholipides/cosolvant (éthanol)/PA hydrophobe/CO<sub>2</sub> SC est détendu à travers une buse dans le second autoclave contenant la solution aqueuse. Les liposomes formés sont multilamellaires de diamètre compris entre 0,06 et 2 µm.

#### 3.3.3.1.2. Évaporation supercritique en phase inverse

Otake *et al.* (49) ont élaboré l'évaporation SC en phase inverse : les phospholipides et le cosolvant sont introduits dans une cellule à volume variable puis à injecter le CO<sub>2</sub> tout en chauffant. Une fois l'équilibre atteint, une solution aqueuse est ajoutée lentement dans la cellule. On laisse alors le système à l'équilibre pour que l'agent enrobant se dissolve dans le CO<sub>2</sub> SC pour former une solution homogène. On diminue lentement la température puis on

dépressurise jusqu'à pression atmosphérique pour obtenir des particules de PA revêtues d'une couche uniforme de phospholipides. Au cours de la dépressurisation de la cellule, des liposomes unilamellaires de taille entre 0,1 et 1,2  $\mu\text{m}$  se forment.

### 3.3.3.1.3. Autres méthodes

A l'échelle de laboratoire (50), une méthode de développement de petits liposomes a été élaborée. Cette méthode permet d'utiliser quinze fois moins de solvant organique que les méthodes conventionnelles en ayant le même taux d'encapsulation. La longueur et le diamètre interne du capillaire d'injection influencent le volume d'encapsulation, l'efficacité d'encapsulation et la taille moyenne des liposomes. En utilisant ce procédé, on peut encapsuler des PA hydrophobes comme des taxoïdes, du cisplatine, de la vincristine ou de la doxorubicine.

### 3.3.3.2. FSC utilisé comme antisolvant

Là encore, les méthodes de préparation de liposomes avec les méthodes antisolvant sont identiques à celles utilisées pour la micronisation de particules. Pour cette raison, nous invitons le lecteur à se référer aux méthodes présentées dans ce chapitre (2.2.2)

Le Tableau 12 permet de comparer les procédés solvant et anti-solvant pour la formation de liposomes. Certes les procédés solvant permettent d'obtenir des particules de taille inférieure à celles obtenues par les procédés antisolvant, mais les procédés antisolvant sont plus adaptés à la formulation de produits à visée thérapeutiques : conditions opératoires plus douces et possibilité d'opérer en mode continu.

	Procédés solvant	Procédés anti-solvant
Type	Batch	Batch et semi-continus
Pression de travail	165 – 300 bar	95 – 160 bar
Température de travail	41 – 65°C	35 – 62,5°C
Cosolvant	Ethanol	Ethanol et autres (méthanol, chloroforme, dichlorométhane)
Dispositif	Compact	
Liposomes obtenus	10 – 100 nm	De l'ordre du $\mu\text{m}$
Perspective	Développement et amélioration du procédé	Visée thérapeutique

Tableau 12 : Comparaison des procédés solvant et anti-solvant pour la formation de liposomes

### 3.4. L'inclusion dans des complexes : les cyclodextrines

#### 3.4.1. Généralités

Des molécules capables de former des complexes par encapsulation moléculaire comme les CD sont de plus en plus utilisées. Les médicaments sont souvent des molécules hydrophobes, ce qui peut poser des problèmes d'assimilation par voie orale lors de la digestion. La complexation des PA avec des CD permet de mieux contrôler leur passage dans le circuit sanguin ou la progressivité de leur diffusion. De plus, par greffage de certains groupements chimiques, on peut rendre amorphes ces CD, d'où l'augmentation de leur solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques (51).

Les CD sont des oligosaccharides cycliques formés d'unités de  $\alpha$ -D-glucopyranose reliées par des liaisons ( $\alpha$ -1,4) et formant une cavité centrale relativement hydrophobe car délimitée par le squelette hydrocarboné et les molécules d'oxygène des unités de glucose. La présence des groupements hydroxyles vers l'extérieur leur confère un caractère hydrophile. En raison de l'absence de rotation libre autour des liaisons reliant les unités de  $\alpha$ -D-glucopyranose, les CD ne sont pas parfaitement cylindriques mais ont une forme plutôt torique ou conique.

Les CD les plus courantes sont de trois types (Figure 29) :

- les  $\alpha$ -CD (Alfadex) contenant 6 unités de glucopyranose
- les  $\beta$ -CD (Betadex) contenant 7 unités de glucopyranose
- les  $\gamma$ -CD contenant 8 unités de glucopyranose

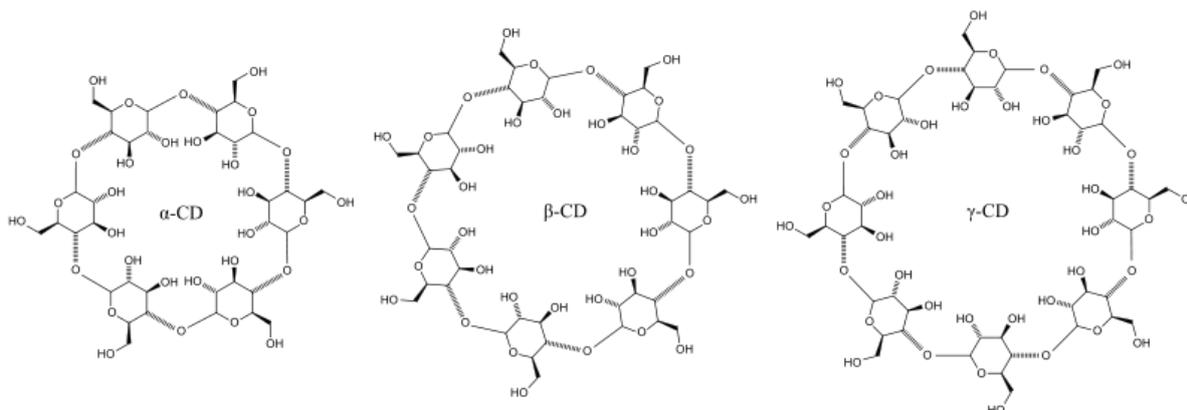


Figure 29 : Structure de l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -CD

Lorsqu'elles sont en solution, leur cavité étant apolaire (hydrophobe), les molécules d'eau se trouvent chassées et des molécules apolaires, peu solubles dans l'eau, peuvent venir se loger

dans cette cavité par des liaisons non covalentes. Elles sont alors utilisées comme solubilisants de substances peu hydrosolubles. En effet, la surface externe de la CD reste polaire, ce qui lui confère une bonne solubilité dans l'eau. Ainsi, il est possible de solubiliser le complexe en milieu aqueux en protégeant la molécule lipophile incorporée. La plupart des médicaments étant des molécules organiques de faible polarité, on comprend alors l'utilisation potentielle de ces composés comme vecteurs de médicaments. Ainsi, une molécule de classe II ou IV selon la classification BCS (Figure 8), pourra « devenir » une molécule de classe I si elle est incluse dans une CD. Ces CD permettent parfois de multiplier la solubilité du PA par 50 (52) et donc sa biodisponibilité (ex : Brexin® (antiinflammatoire)). Le taux d'inclusion est défini comme suit :

$$\%age\ d'inclusion = \frac{quantité\ de\ PA\ totale - quantité\ de\ PA\ libre}{quantité\ de\ PA\ totale} * 100$$

On comprend donc qu'une molécule hydrophobe de taille adaptée pourra venir s'insérer dans la CD et présenter ainsi une solubilité apparente grandement augmentée. Chaque anneau n'accueille en général qu'une molécule lipophile ; ainsi, en fonction de la taille de celle-ci, on peut accommoder la taille de la CD appropriée ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). Les  $\beta$ -CD sont le plus souvent les mieux adaptées à une majorité de PA. Cependant, les CD naturelles, et en particulier la  $\beta$ -CD, présentent une solubilité dans l'eau limitée (53). Aussi, par alkylation ou hydroxyalkylation d'un ou plusieurs groupements hydroxyles des molécules de glucose, on obtient des CD synthétiques dont la solubilité dans l'eau est améliorée (53). L'une des principales raisons de cette augmentation de la solubilité est la transformation de la CD cristalline en une forme amorphe plus aisément soluble (53).

Lorsque le complexe est administré par voie orale et qu'il atteint la lumière intestinale, le fait que le PA ne soit pas lié à la CD de façon covalente permet une libération aisée grâce au caractère lipidique des cellules intestinales, qui ont une affinité pour le PA plus importante que la CD. Par ailleurs, la présence d'un agent de compétition (qui peut être un excipient ou une substance endogène) facilite la dissociation du complexe et donc l'absorption du PA.

Afin d'illustrer l'intérêt de la complexation de molécules thérapeutiques avec des CD, nous allons décrire quelques applications thérapeutiques de cette forme innovante. Bien que les CD et le CO<sub>2</sub> SC aient débouché séparément sur de nombreuses applications pharmaceutiques, peu de publications associent ces deux sujets, hormis dans le domaine de la séparation chirale

où les CD sont couramment utilisées comme phase stationnaire. Ce n'est que vers la fin des années 1990 que les premières publications concernant la formation de complexes d'inclusion en milieu SC entre des composés pharmaceutiques et des CD sont apparues.

L'itraconazole est un antifongique triazolé actif par voie orale, soluble dans les solutions aqueuses de faible pH, mais particulièrement insoluble dans les conditions de pH physiologiques. On peut alors inclure l'itraconazole dans deux molécules de CD pour voir une biodisponibilité augmentée du médicament administré sous forme solide par voie orale (54).

La cyclosporine A est un immunosuppresseur synthétisé par un champignon (*Tolypocladium inflatum*), utilisé dans la lutte contre le rejet d'organes, suite à une transplantation. Cette molécule a une très faible biodisponibilité par voie orale, avec des concentrations sanguines variables selon le type d'alimentation associé à la prise du médicament. Il est nécessaire de pouvoir contrôler sa concentration afin d'assurer au patient une activité immunosuppressive correcte du médicament. L'inclusion du PA dans une CD permet à la fois de stabiliser les concentrations plasmatiques du médicament et/ou d'obtenir la libération prolongée du médicament (54).

En thérapie génique, les CD pourraient être une alternative de choix dans l'inclusion d'actifs nucléotidiques, de par la souplesse de leur structure, leur grande capacité de stockage et leur faible toxicité. En revanche, les résultats obtenus quant à leur efficacité n'ont été obtenus qu'*in vitro* et *in vivo*, leur efficacité reste inférieure à celle des vecteurs viraux. Les complexes obtenus par CO<sub>2</sub> SC présentent des caractéristiques de structure différentes de celles obtenues par les techniques conventionnelles.

### 3.4.2. Techniques conventionnelles d'inclusion dans des cyclodextrines

Il s'agit en premier lieu de sélectionner la CD qui s'adapte le mieux au PA. Il faut alors tenir compte de plusieurs paramètres :

- la taille de la molécule de CD doit être adaptée à celle du PA.
- l'augmentation de la solubilité du PA dans l'eau par la formation de complexe doit être significative. Par exemple, l'hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) (substitution des groupements hydroxyle des molécules de glucose par des groupements hydroxypropyle), est 30 fois plus soluble dans l'eau que la  $\beta$ -CD et est moins sensible aux amylases intestinales.

- la stabilité du complexe formé doit être suffisante. Ainsi, la diméthyl- $\beta$ -CD permet la formation de complexes qui présentent une très bonne stabilité en milieu aqueux de part le caractère très hydrophobe de sa cavité en comparaison avec les autres CD.

Le choix de la CD étant fait, l'incorporation du PA est en général obtenue par addition d'un excès de la molécule lipophile à une solution aqueuse de CD (53). La suspension est alors agitée pendant une durée pouvant aller jusqu'à une semaine à la température désirée. Il est parfois possible de raccourcir le procédé d'incorporation en formant une solution sursaturée par sonication suivie d'une précipitation à la température désirée (53).

Afin d'optimiser l'incorporation du PA dans la CD, il est nécessaire de réaliser :

- l'optimisation de la quantité de CD ajoutée au PA : elles ne doivent pas être en excès dans la solution par rapport à la quantité de PA pour permettre la présence d'une plus grande proportion de molécules lipophiles libres, donc absorbables, dans le liquide gastro-intestinal (55),
- l'obtention d'une dissolution optimale du complexe,
- l'optimisation de la libération du PA,
- l'obtention d'une constante de stabilité importante car les molécules de CD libres (ne formant pas de complexes) sont susceptibles d'arracher des composants lipophiles de la membrane et perturber ainsi l'absorption du PA.

Il s'agira, enfin, lors du choix des excipients, de s'assurer qu'ils ne perturbent pas la complexation du PA et de la CD. Il a en effet été prouvé par exemple que l'éthanol et le propylène glycol réduisent la complexation de la testostérone et de l'ibuprofène en milieu aqueux (53).

### 3.4.3. Techniques en FSC

Si la molécule à encapsuler est relativement soluble dans le CO<sub>2</sub> SC, la complexation peut être réalisée en faisant percoler le mélange SC à travers un lit de CD, celle-ci étant insoluble dans le CO<sub>2</sub>. C'est ce qu'ont réalisé Charoenchaitrakool *et al.*(56) avec l'ibuprofène. En revanche, une molécule insoluble dans le CO<sub>2</sub> SC devra être co-cristallisée avec la CD lors d'un procédé SAS.

### 3.4.3.1. Les procédés brevetés

Les procédés brevetés décrits ci-après ne sont pas les seuls à exister mais c'est ceux que nous évoquerons dans la suite de cette thèse, c'est pourquoi il nous a semblé important de les décrire dans cette partie. D'autres procédés ont été développés par des entreprises, une partie est répertoriée à la fin de ce travail (Tableau 18).

#### 3.4.3.1.1. Formulplex® (Pierre Fabre)

Le Centre de Développement Fluides Supercritiques des laboratoires Pierre Fabre a mis au point un nouveau moyen d'obtenir des complexes d'inclusion par CD en milieu SC (Formulplex®). Cette nouvelle technologie présente de nombreux avantages dont celui de pouvoir travailler en conditions douces et sans solvant et de réaliser d'importantes économies d'énergie (57). C'est un procédé batch, sans agitation, utilisant seulement du CO<sub>2</sub> pressurisé et une petite quantité d'eau. Les avantages sont nombreux par rapport aux techniques conventionnelles :

- Une seule étape,
- Rendement de 100%,
- Sans solvant,
- Coûts et investissements réduits,
- Réaction simple et reproductible,
- Changement d'échelle facile.

Les CD utilisées dans les formulations sont de plusieurs types : les CD naturelles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , l'HP- $\beta$ -CD, la méthyl- $\beta$ -CD RAMEB (méthylée partiellement et randomisée). Formulplex® est alors considérée comme la première étape de la formulation du médicament.

#### 3.4.3.1.2. Separex

Les laboratoires français Separex ont décrit la fabrication de très fines particules de PA insoluble ou très peu soluble dans les solutions aqueuses, inséré dans une CD ainsi que d'un dispositif permettant la mise en œuvre de ce procédé (51). Ils utilisent les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -CD ainsi que des CD greffées. Le procédé consiste à mettre en solution du PA dans un premier solvant liquide et les molécules hôtes dans un deuxième solvant liquide, puis de mettre en contact ces deux solutions grâce à un FSC. Cette mise en contact permet de diminuer le pouvoir solvant

des solvants liquides et de faire précipiter, par effet antisolvant, les CD qui y sont dissoutes (Figure 30). On extrait ensuite les solvants résiduels par le FSC et on récupère enfin les particules générées sous forme de poudre sèche.

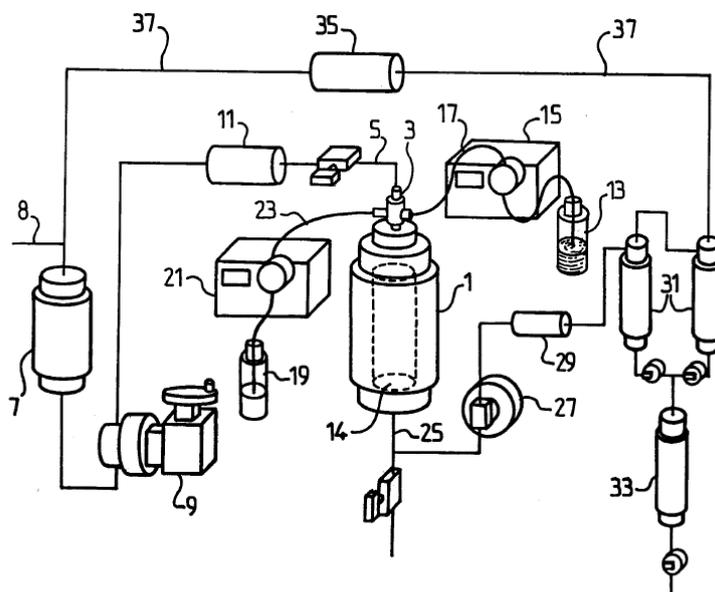


Figure 30: Schéma de l'installation utilisée par Separex (1. Chambre d'atomisation ; 3. Buse de pulvérisation ; 5. Canalisations ; 7. Réservoir de stockage ; 8. Entrée d'appoint de CO<sub>2</sub> ; 9. Pompe ; 11. Echangeur ; 13. Réservoir de PA dans solvant ; 14. Filtre ; 15. Pompe ; 17. Conduite ; 19. Réservoir de molécule hôte dans solvant ; 21. Pompe ; 23. Conduite ; 27. Vanne de régulation ; 29. Filtre ; 31. Séparateur de type cyclonique ; 33. Eléments de soutirage ; 35. Condenseur ; 37. Conduite reliant le séparateur au réservoir de stockage) (51)

Une des variantes du procédé décrit ci-dessus est de dissoudre le ou les PA avec les CD dans un solvant puis d'introduire le mélange dans un récipient sous pression. Celui-ci est ensuite balayé par un FSC. La mise en contact entre le complexe PA/CD et le FSC permet de réaliser simultanément la précipitation et le séchage des particules dans des conditions douces, ce qui est nécessaire pour l'encapsulation de produits fragiles comme les protéines. Cette mise en contact est soit effectuée par introduction du FSC dans un autoclave contenant la solution, soit par pulvérisation de(s) solution(s) à travers une ou plusieurs buses dans un autoclave balayé par le FSC. Au cours de l'opération, le flux de FSC entraîne le solvant dans lequel sont dissous le PA et la CD, ce qui a pour effet d'augmenter leur concentration à sursaturation, provoquant la précipitation des produits sous forme complexée. On sépare ensuite les particules du FSC contenant les solvants organiques par passage au travers d'un filtre disposé au fond de la chambre d'atomisation. Le solvant est séparé du fluide par les éléments de soutirage et le CO<sub>2</sub>, débarrassé en grande partie du solvant, est recyclé. Lorsque la quantité de particules fixées sur le filtre en bas de la chambre d'atomisation est suffisante, on interrompt le pompage des solutions de PA et de molécule hôte. On peut ensuite éliminer les faibles quantités de solvant présent dans les particules en faisant percoler à travers le lit de particules

un courant de CO<sub>2</sub> SC. Enfin, on dépressurise la chambre et on récupère les particules formées.

#### 4. RESUME DU CHAPITRE

Le Tableau 13 est un récapitulatif des différents procédés utilisant le CO<sub>2</sub> SC.

Procédé	Solvant	Antisolvant	Principe
<b>RESS</b>	CO <sub>2</sub> SC	-	Le composé est dissous dans le CO <sub>2</sub> SC La solution de CO <sub>2</sub> SC est détendue à travers une buse
<b>GAS</b>	Conventionnel	CO <sub>2</sub> SC	Le composé est dissous dans un solvant conventionnel Le CO <sub>2</sub> SC est introduit dans la solution
<b>PCA</b>	Conventionnel	CO <sub>2</sub> SC	Le composé est dissous dans un solvant conventionnel La solution est atomisée de manière discontinue dans le CO <sub>2</sub> SC
<b>ASES</b>	Conventionnel	CO <sub>2</sub> SC	Le composé est dissous dans un solvant conventionnel La solution est atomisée de manière continue dans le CO <sub>2</sub> SC
<b>SEDS</b>	Conventionnel	CO <sub>2</sub> SC	Le composé est dissous dans un solvant conventionnel La solution et le CO <sub>2</sub> SC sont atomisés simultanément à travers une buse coaxiale
<b>PGSS</b>	Composé	-	Le CO <sub>2</sub> SC est dissous dans le mélange contenant le composé. La solution est détendue à travers une buse.

Tableau 13 : Résumé des procédés SC (58)

Les études montrent l'importance accordée aux recherches concernant le procédé SAS, qui a pris le dessus sur le procédé RESS en raison du plus grand nombre de molécules potentiellement utilisables. Cependant, il est important et nécessaire de pouvoir maîtriser certains paramètres, à commencer par le choix du solvant de la molécule à cristalliser qui doit être miscible avec le CO<sub>2</sub>. Les deux autres paramètres primordiaux du procédé SAS sont le rapport des débits des fluides et la géométrie du dispositif au sein duquel le mélange des fluides va s'opérer. Même si des travaux de modélisation ont pu faire nettement progresser la compréhension des phénomènes, l'influence des conditions opératoires sur le type de particules obtenues est loin d'être totalement élucidée (18). La maîtrise de ces paramètres est donc indispensable en vue de développer et de concevoir des systèmes à l'échelle industrielle.

Il est parfois indispensable de protéger un PA des agressions que peut lui faire subir l'organisme afin d'éviter sa dégradation avant son absorption. Différentes techniques ont été développées (encapsulation et enrobage, formation de liposomes et inclusion dans des complexes tels que les CD). Les procédés conventionnels de formulation de tels systèmes possèdent de nombreux inconvénients qui peuvent être contrés grâce aux méthodes en FSC. Le Tableau 14 récapitule les caractéristiques des méthodes conventionnelles et de celles en FSC et permet de comprendre l'intérêt de ces dernières dans la préparation de systèmes de protection du PA.

Méthodes conventionnelles	Méthodes en FSC
Températures de travail parfois élevées	Températures de travail voisines de l'ambiante
Ajout de solvants toxiques d'où post-traitements indispensables et dénaturation possible des protéines par stress mécanique	Utilisation de l'éthanol peu toxique
Solvant organique utilisé en grande quantité	Quantité de solvant organique utilisée réduite
Nombreuses étapes et étapes de lavage / centrifugation / séchage nécessaire	Procédé en une seule étape (favorise l'encapsulation)
Nombreux paramètres à contrôler, parfois inconnus	Paramètres de contrôle moins nombreux, définis
Particules de plusieurs centaines de $\mu\text{m}$	Particules de quelques $\mu\text{m}$
Taux d'encapsulation variable et souvent faible	Taux d'encapsulation maîtrisé et plus élevé
Distribution granulométrique parfois large	Distribution granulométrique étroite

Tableau 14 : Performances des méthodes en FSC par rapport aux méthodes conventionnelles de protection du PA

**CHAPITRE 3 :**

**ETAT DE L'ART EN MATIERE**

**DE FORMULATION**

**SUPERCRITIQUE**

L'élaboration de particules par des procédés SC fait l'objet d'un très vif intérêt dans l'industrie pharmaceutique en vue, entre autres, d'augmenter la biodisponibilité de molécules très peu solubles dans les milieux biologiques, de préparer des formulations permettant une administration peu invasive et bien absorbées par l'organisme, et enfin d'élaborer des formulations à libération contrôlée ou ciblée. Pour ces raisons, l'utilisation de systèmes innovants, comme les techniques utilisant le CO<sub>2</sub> SC prennent tout leur sens et ils trouvent un grand nombre d'applications. Ces méthodes permettent notamment l'élaboration de poudres de PA de faibles granulométries et ayant des distributions de taille resserrée (ce qui assure une variabilité inter-sujet réduite et une industrialisation du procédé réussie), le tout à des conditions opératoires modérées, notamment en termes de températures. D'autres types de formulations sont envisagés dans l'industrie pharmaceutique, l'objectif n'étant pas de trouver de nouvelles molécules mais de modifier les systèmes actuels pour en obtenir de nouveaux, plus performants, mais contenant toujours le même PA.

Dans cette partie de thèse, nous proposons quelques résultats issus de la recherche scientifique qui concernent des PA largement utilisés en pharmacie. Les résultats décrits sont ceux obtenus, pour la plupart, en laboratoire, c'est-à-dire sur paillasse. Peu ont été pour le moment industrialisés à moyenne ou à grande échelle. Cette partie ne prétend pas décrire l'ensemble des résultats des recherches dans le monde mais permet de comprendre par des exemples illustrés les raisons de l'engouement pour les FSC et l'avenir certain qu'ils ont dans le domaine de la pharmacie. Les conclusions de chacune des études présentées seront données telles qu'elles sont communiquées dans la littérature. Il faut cependant tenir compte du fait que les laboratoires de recherche travaillent souvent en étroite collaboration avec l'industrie ; certaines études financées par les industries pharmaceutiques montrent des résultats positifs en faveur de la source de financement. Il n'est pas rare que les résultats et leur interprétation soient biaisés pour être en accord avec les vœux du sponsor. Les résultats des essais pré-cliniques ou cliniques étant très peu communiqués, il est difficile en tant que personne extérieure au projet de pouvoir tirer des conclusions quant à l'efficacité des produits fabriqués. Nous essaierons de prendre donc suffisamment de recul pour pouvoir conclure de la manière la plus pertinente possible sur ces études.

Afin de pouvoir déterminer si les caractéristiques des particules obtenues sont satisfaisantes par rapport à la voie d'administration envisagée, nous avons rassemblé dans le Tableau 15 les

ordres de grandeurs de la taille de particule souhaitée pour envisager une administration efficace (59).

Voie	Particules	Taille de particules (µm) recommandée
Pulmonaire	Microparticules	1 – 5
Orale	Nano- et microparticules	0,1 - 100 <sup>2</sup>
Parentérale		
Intramusculaire	Nano- et microparticules	0,6 - 10
Sous-cutanée		0,2 – 100
Intraveineuse		0,1 – 0,3

Tableau 15 : Ordres de grandeurs de la taille des particules recommandée en fonction de la voie d'administration

Ce chapitre s'articule en trois parties, selon la voie d'administration pour laquelle le PA est destiné : la première partie est un bilan des études menées dans le but de formuler des particules destinées à être inhalées. Dans un second temps, nous illustrerons par quelques exemples l'intérêt de la formulation en FSC pour augmenter la solubilité des PA en vue d'améliorer leur biodisponibilité ou pour contrôler la libération dans le temps du PA dans l'organisme quand administrés par voie orale. Dans un troisième temps, nous étudierons des résultats issus de recherches en milieu SC dont le but est d'améliorer la performance de la voie parentérale.

## 1. LA THERAPIE PAR VOIE PULMONAIRE

### 1.1. Généralités

L'interdiction de l'utilisation des chlorofluorocarbones dans les inhalateurs pressurisés, l'inefficacité partielle et la non-reproductibilité de la libération de poudres sèches par les systèmes d'inhalation actuels sont des raisons parmi d'autres pour développer de nouvelles technologies de traitements par la voie pulmonaire.

<sup>2</sup> Les microparticules inférieures à 5 µm traversent la muqueuse intestinale et celles supérieures à 5 µm restent dans la lumière intestinale.

Afin d'assurer une administration pulmonaire réussie, plusieurs voies de travail sont possibles :

- améliorer le système mécanique de délivrance du médicament dans les alvéoles pulmonaires, ce qui est très envisageable mais n'est pas l'objet de cette thèse et ne sera donc pas décrit dans ce travail,
- améliorer les propriétés de nébulisation des particules : c'est l'objectif que l'on souhaite décrire dans ce travail.

Les aérosols présentent plusieurs inconvénients, notamment l'agrégation particulaire (interactions hydrophobes, électrostatiques, capillaires) d'où un phénomène de clairance du poumon, et des propriétés d'écoulement et de nébulisation mauvaises d'où un dépôt de fractions d'aérosols dans la bouche et la partie respiratoire supérieure. Pour éviter ce phénomène, il est parfois envisagé d'enrober des particules dans un agent d'enrobage qui possède des propriétés antiagrégantes, de diminuer la densité des particules afin d'augmenter leur dispersibilité, ou de coprécipiter le PA avec une autre substance dans le but de modifier les interactions interparticulaires. Enfin, les particules larges et poreuses sont préférables pour une administration par inhalation plutôt que les petites particules non poreuses puisque les particules larges poreuses présentent un rapport surface/volume plus petit et sont donc moins soumises aux phénomènes d'agrégation.

Jusqu'à présent, les formulations destinées à la voie pulmonaire ne présentaient qu'une biodisponibilité autour de 50 % et rarement supérieure, à cause de la faible proportion de particules déposées dans les régions alvéolaires pulmonaires : la pénétration des particules dans l'appareil respiratoire est entre autres conditionnée par le diamètre des particules inhalées dans l'aérosol. Il est aussi indispensable que les microparticules soient suffisamment stables une fois déposées sur la muqueuse de la surface des alvéoles.

Comme vu précédemment, les poudres micronisées peuvent être obtenues par différentes techniques conventionnelles, mais dans ces cas, les particules obtenues ont un diamètre souvent trop gros pour être acheminées au plus profond des alvéoles pulmonaires et sont donc peu convenables à l'administration par les aérosols. De plus, les méthodes conventionnelles de micronisation aboutissent toutes à des résultats peu convaincants : distribution de taille large, dénaturation thermique, formes irrégulières et rugosité des particules produites, ce qui empêche une efficacité parfaite du PA. Seule une partie infime du PA administré est

effectivement efficace, impliquant en parallèle des effets secondaires qui peuvent être très gênants pour le patient. Des études de formulation en FSC ont été réalisées dans le but d'obtenir des particules de taille plus petite et avec une distribution de taille plus étroite que celles obtenues par les techniques conventionnelles.

La notion de diamètre aérodynamique (60) doit impérativement être connue pour pouvoir caractériser la taille des particules se déposant par impaction et sédimentation. La déposition des particules au sein du tractus pulmonaire dépend surtout de la masse de la particule, et donc de leur taille et de leur densité. Or, dans les études décrites, les particules sont le plus souvent décrites en termes de taille plutôt que de masse, d'où l'intérêt d'introduire cette notion. Le diamètre aérodynamique se définit comme le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire ayant la même vitesse de sédimentation que la particule décrite.

$$d_{aero} = \frac{d_{geom}(\rho/\rho_A)^{1/2}}{\gamma}$$

avec :

$d_{aero}$  = diamètre aérodynamique (m)

$d_{geom}$  = diamètre géométrique (m)

$\rho$  = densité de la particule

$\rho_A$  = densité de l'eau = 1

$\gamma$  = facteur de forme (= 1 pour les particules sphériques)

La diffusion brownienne dépend de la taille et non de la densité donc la notion de diamètre aérodynamique ne sera pas appliquée pour les particules inférieures à 0,5  $\mu\text{m}$ .

En résumé, du point de vue de la galénique, les facteurs qui ont un rôle important dans la déposition alvéolaire et qui assurent donc une administration pulmonaire efficace sont la taille des particules (entre 1 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre) et leur distribution granulométrique (qui doit être étroite), l'absence de toute trace de solvant résiduel, leur individualisation et leur facilité de dispersion, la taille et le poids moléculaire du PA (61).

## 1.2. Pour un effet local

### 1.2.1. Généralités et présentation du problème

Les thérapies locales par inhalation permettent généralement une libération contrôlée et relativement lente du PA, entraînant une augmentation du temps de séjour du médicament, une diminution de sa vitesse d'entrée dans le flux sanguin, et par conséquent une meilleure tolérance du patient pour le PA. L'observance du patient vis-à-vis du médicament est ainsi augmentée, en raison de la diminution de la fréquence d'administration du médicament.

Pour permettre une libération optimale du PA dans le poumon, il est donc important de s'assurer qu'il est sous forme de microparticules non chargées, non adhésives, non hygroscopiques, facilement dispersibles, de taille appropriée, de forme et de densité convenables. Les FSC et plus particulièrement le CO<sub>2</sub> SC permettent de mettre en œuvre des procédés de micronisation performants en vue de la réduction de la taille des particules. A noter cependant qu'en dessous de 1 µm de diamètre, les particules sont souvent remises en suspension dans l'air inspiré (car trop légères) et repartent vers le milieu extérieur lors de l'expiration. Celles qui parviennent toutefois au poumon profond sont victimes d'agrégation et perdent de leur efficacité. Les particules supérieures à 5 µm quant à elles sont remontées vers la cavité buccale par les mouvements ciliaires puis éliminées par ingestion. On cherchera donc pour cette application particulière à former des particules de taille comprise entre 1 et 5 µm, avec une distribution de taille étroite.

Les avantages de l'administration pulmonaire sur les autres voies d'administration pour le traitement d'affections pulmonaires sont les suivants :

- Grande surface d'échange
- Déposition rapide au niveau du système respiratoire d'où une réponse clinique rapide,
- Administration directe du PA au niveau de son site d'action,
- Diminution des effets indésirables systémiques,
- Déposition de grandes quantités de PA au niveau du site d'action, tout en réduisant la dose administrée au patient (10 à 20% de la dose administrée par voie orale) donc l'effet thérapeutique est supérieur à celui obtenu avec une dose identique administrée par voie orale,
- Pas de dépendance de la résorption gastro-intestinale et du premier passage hépatique.

A l'heure actuelle, ce sont essentiellement des agents anti-asthmatiques (agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques, anticholinergiques, inhibiteurs de la dégranulation mastocytaire), des traitements de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (corticostéroïdes), des agents anti-microbiens et des mucolytiques qui sont administrés par la voie pulmonaire en vue d'exercer un effet local.

### 1.2.2. Le traitement de l'asthme et/ou de la BPCO

#### 1.2.2.1. Les agonistes $\beta$ 2-adrénergiques

##### 1.2.2.1.1. Le salbutamol

En 2001, Reverchon *et al.* (35) micronisent le salbutamol par la méthode SAS dans le but d'obtenir des particules de taille et de distribution de taille contrôlées. Différents solvants sont testés afin de déterminer le meilleur couple solvant/soluté : le DMSO, l'alcool méthylique, et le mélange éthanol/eau. La température de travail est de 40°C et la pression est maintenue entre 95 et 150 bar. Finalement, les particules les plus intéressantes sont obtenues en utilisant le DMSO et sont en forme d'aiguille de 1 à 3  $\mu\text{m}$  et de sphères de 0,2 à 0,35  $\mu\text{m}$  de diamètre (pour des concentrations PA/solvant de 10 mg/mL et 1 mg/mL respectivement) soit donc des diamètres aérodynamiques de 1,0 à 1,2  $\mu\text{m}$ , inférieurs à celui des particules de PA d'origine. Les particules obtenues sont de morphologies différentes selon la pression : à 95 bar, les particules de salbutamol obtenues sont sphériques, creuses et de quelques microns. Entre 110 et 150 bar, les particules sont en forme d'aiguille. En augmentant la concentration de la solution, les aiguilles s'organisent en forme d'étoile, structures plus organisées. Si l'administration par aérosol est envisagée pour de telles poudres, l'épaisseur de l'aiguille formée doit être prise en compte pour calculer le diamètre aérodynamique de la particule.

En 2007, l'équipe de Richardson (62) compare l'efficacité de microparticules de salbutamol/lactose élaborées par la méthode SEDS avec celles précipitées par les méthodes conventionnelles, en utilisant un même système mécanique de délivrance du médicament, le Clickhaler®. Les résultats montrent que l'efficacité des deux types de particules est similaire, avec toutefois une non-reproductibilité des caractéristiques des particules obtenues par la méthode SEDS en fonction du batch : en fait, seul un batch permet d'obtenir des particules ayant la même efficacité que les particules produites par micronisation conventionnelle. L'avantage certain du procédé en FSC est d'éviter la présence de solvant résiduel dans la poudre finale et expose donc le patient à des risques moindres.

### 1.2.2.1.2. La terbutaline

Reverchon et Della Porta (37) proposent en 2003 une étude de la micronisation de la terbutaline en FSC par le procédé SAA. Les particules obtenues en utilisant comme solvant l'eau ou des solvants organiques sont sphériques et non coalescentes. En opérant avec une solution faiblement concentrée (10 mg/mL), les particules obtenues sont de taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , ce qui est trop faible pour envisager une administration efficace par voie inhalée. Pour des solutions entre 30 et 50 mg/mL, les résultats sont concluants puisqu'on génère alors plus de 90 % de particules de taille comprise entre 1 et 3  $\mu\text{m}$  (aucune particule n'est supérieure à 3  $\mu\text{m}$ ). Avec une solution à 80 mg/mL enfin, la distribution de taille est légèrement élargie, avec 99 % des particules comprises entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  (Figure 31). La Figure 32 et la Figure 33 montrent qu'environ 30 % des particules de l'échantillon commercial ont un diamètre supérieur à 5  $\mu\text{m}$  et n'ont donc aucun intérêt dans la libération pulmonaire, tandis que presque la totalité de celles formées en FSC ont une taille comprise entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  et sont donc très adaptées à l'administration par les aérosols.

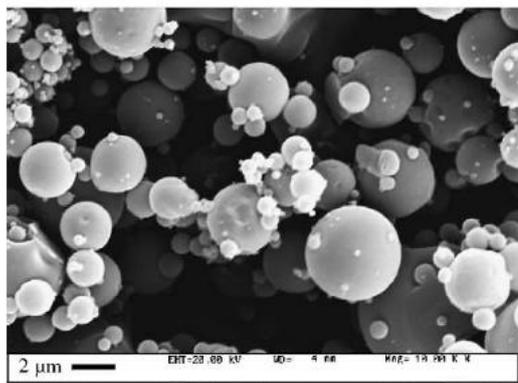


Figure 31 : Terbutaline précipitée par le procédé d'atomisation en FSC (Pression de la chambre de saturation = 95 bar ; Température de la chambre de saturation = 82°C ; Température de la chambre de précipitation = 70°C ; Concentration de la terbutaline dans l'eau = 80mg/mL) (38)

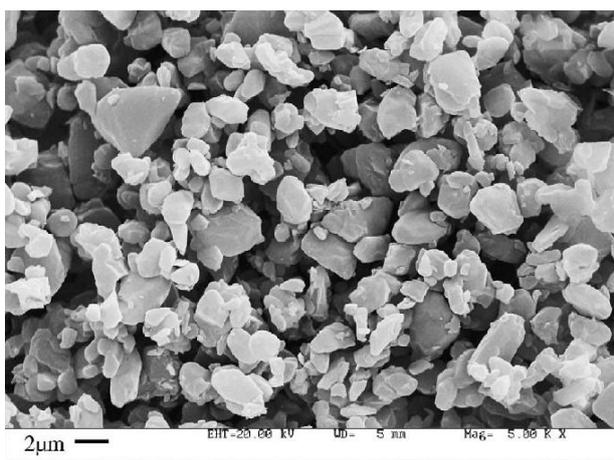


Figure 32 : Echantillon commercial de terbutaline micronisée (37)

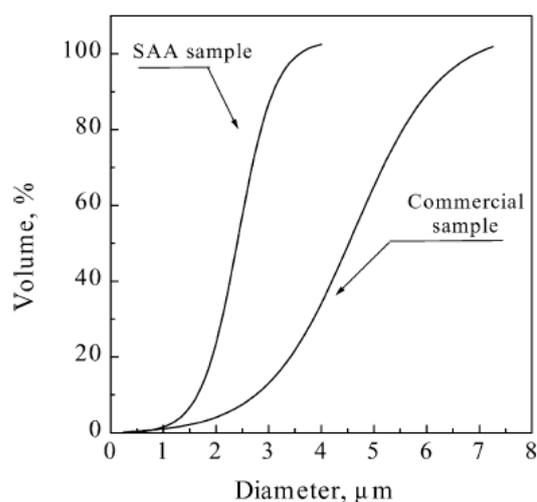


Figure 33 : Comparaison entre la distribution de taille de particules de terbutaline produite par SAA et de l'échantillon commercial (37)

Suite à cette étude, Rehman *et al.* (63) réalisent en 2004 la production de particules de terbutaline par SEDS et observent la formation de particules de différents degrés de

crystallinité, taille et morphologie, selon le solvant utilisé (méthanol, méthanol/eau, eau, éthanol). Les microparticules réalisées avec l'éthanol comme solvant ont un diamètre moyen de 3,3  $\mu\text{m}$  tandis que le matériau d'origine a un diamètre de 3,0  $\mu\text{m}$ . Cependant, ces poudres présentent une énergie de surface réduite en raison de la faible taille des particules et de leur état semi-cristallin, ainsi qu'une diminution des interactions adhésives et cohésives, ce qui leur confère des propriétés de fluidisation et de dispersion améliorées.

#### 1.2.2.2. Les anticholinergiques

##### 1.2.2.2.1. L'ipratropium

Kim et Shing (36) choisissent de former des particules d'ipratropium par la méthode ASES avec trois solvants organiques différents : le diméthylformamide (DMF), l'éthanol, et un mélange d'éthanol et d'acétone. Le choix du DMF semble être le meilleur puisque les particules obtenues sont alors régulières, non agglomérées, entre 2 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre.

#### 1.2.2.3. Les inhibiteurs de la dégranulation mastocytaire

##### 1.2.2.3.1. Le cromoglycate de sodium

Le cromoglycate de sodium est utilisé en solution aqueuse dans des applications thérapeutiques (Lomudal®) et dans les inhalateurs de poudre sèche. Le procédé SAA proposé pour la première fois en 2002 par Reverchon *et al.* (33) permet de produire des micro- et des nanoparticules de dexaméthasone, de carbamazépine, et d'ampicilline de taille et de distribution de taille contrôlées.

De par ces résultats concluants, Reverchon *et al.* (64) choisissent en 2007 de produire des microparticules de cromoglycate de sodium ayant une taille de particule et une distribution de taille contrôlées, en utilisant la technique SAA. Différentes concentrations en soluté dans l'eau et différentes températures de précipitation sont mises en œuvre. Les particules obtenues sont sphériques, non agglomérées, amorphes, avec 50 à 66 % des particules ayant un diamètre compris entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ . On vérifie aussi l'absence de dégradation du PA après micronisation.

#### 1.2.2.4. Les corticostéroïdes

Steckel *et al.* (65) proposent la génération de particules de stéroïdes, et plus particulièrement de béclométhasone, betaméthasone, budésonide, dexaméthasone, flunisolide, fluticasone, prednisolone et triamcinolone.

Ils utilisent la méthode ASES avec une solution PA/dichlorométhane, PA/méthanol ou PA/dichlorométhane/méthanol à 1 %. En choisissant comme paramètres de procédé une température de 40°C, une pression de 85 bar et un diamètre de buse de 0,3 mm, le produit obtenu est pur, dénué de toute impureté, avec une gamme de taille adaptée à l'administration pulmonaire (< 5 µm) et ne subit aucune décomposition chimique pendant toute la durée du procédé. La teneur résiduelle en dichlorométhane est conforme à la législation : < 350 ppm.

#### 1.2.2.4.1. Le fluticasone

L'intérêt de l'administration du fluticasone par voie pulmonaire réside dans son métabolisme : 99% du fluticasone administré par voie orale est métabolisé par le foie tandis qu'il n'existe aucun métabolisme par le poumon.

Le propionate de fluticasone existe sous deux formes polymorphiques (I et II). Les techniques conventionnelles de micronisation permettent d'obtenir la forme I. En revanche les techniques en FSC, notamment la technique SEDS, permettent d'obtenir les formes I et II à différentes proportions selon les paramètres de fonctionnement. En sachant que la forme II du propionate de fluticasone obtenue par FSC a des propriétés plus intéressantes puisque les particules formées ont une densité plus faible, un pouvoir de fluidisation plus grand et des caractéristiques des particules meilleures que la forme I, nous trouvons dans cette application particulière tout l'intérêt de travailler en milieu SC.

#### 1.2.2.4.2. Le budésonide

L'objectif de l'étude de Martin *et al.* (38) est de préparer des microparticules de budésonide et de budésonide/poly(acide lactique) (PLA) en utilisant la méthode PCA. En plus de déterminer l'influence des paramètres de pression, de température, de débit des fluides, et de la concentration en PA sur la morphologie et la taille des particules obtenues, les microparticules sont caractérisées par leur charge de surface et les interactions entre le PA et le polymère. Enfin, des études de libération du PA sont effectuées. Le procédé permet d'obtenir des particules de 1-2 µm de diamètre avec une distribution de taille étroite. Le taux d'encapsulation est finalement proche de 80 % et on conclue à une perte de la cristallinité. Il existe un réel besoin pour ce PA de formuler des systèmes à libération prolongée, autant pour préserver les patients des effets indésirables de ce PA que pour assurer une bonne manipulabilité de la poudre. Les particules de budésonide/PLA montrent une libération

pendant 4 semaines. Le taux d'encapsulation obtenu par les méthodes conventionnelles (évaporation de solvant) est de 65 %. La raison majeure de cette différence serait due au partage du PA entre deux phases immiscibles dans la méthode par évaporation de solvant. Du point de vue de la forme cristalline, la méthode utilisant le FSC utilisée permet de diminuer la cristallinité de la substance, ce qui provoque une augmentation de la solubilité, de la libération et du transport à travers les membranes.

#### 1.2.2.4.3. Le bécloéthasone

Le brevet déposé par Mainelab (41) décrit un procédé de formation de liposomes de dipropionate de bécloéthasone. Le PA est mis en suspension dans le CO<sub>2</sub> SC contenant un ou plusieurs phospholipides dissous, sous agitation. Les phospholipides utilisés sont de divers types : phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, phosphatidyléthanolamine et tous leurs dérivés.

Afin de précipiter l'agent enrobant autour des particules de PA, on agit sur la température et la pression de travail : la température de travail est de 35 – 80°C et la pression est de 100 à 250 bar. On pourra faire varier la concentration en agent enrobant et en PA en fonction de la composition de la microparticule désirée. Les chercheurs spécifient toutefois que pour obtenir des particules à libération contrôlée, le rapport massique PA/agent enrobant doit être compris entre 5/95 et 20/80. Pour élaborer un enrobage destiné à stabiliser la particule, ce rapport doit être plutôt compris entre 95/5 et 70/30.

Plus particulièrement, la formation de liposomes de dipropionate de bécloéthasone se fait avec pour agent enrobant le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) scellé dans un sac de papier filtre poreux de porosité contrôlée fixé sur l'arbre de l'agitateur. Le PA est alors mis en suspension par une solution DPPC/CO<sub>2</sub> SC dans un autoclave et avec une agitation contrôlée. Les particules obtenues ont un diamètre moyen de 5 µm avec un taux d'encapsulation de dipropionate de bécloéthasone de 81% m/m, elles sont non agglomérées et ont donc des propriétés de nébulisation améliorées (due à la nature de l'agent enrobant et à la qualité de l'enrobage obtenu par la technique du FSC). Les microparticules peuvent en outre, de par leur enrobage, permettre une libération prolongée du PA. Elles ont une biodisponibilité supérieure à 60 % par amélioration du taux de déposition dans les alvéoles.

### 1.2.3. Le traitement d'affections microbiennes

#### 1.2.3.1. L'érythromycine

En 2004, Reverchon et Spada (66) étudient la micronisation de l'érythromycine par la méthode SAA. Sur le plan pharmacocinétique, il faut noter que l'érythromycine administrée par voie orale peut être inactivée par le liquide gastrique acide, qu'elle a une bonne diffusion tissulaire, sauf dans le liquide céphalorachidien. Les particules d'érythromycine obtenues par ces expériences sont sphériques et non coalescentes, par l'utilisation de méthanol et d'éthanol. Les particules ont une taille inférieure à 3  $\mu\text{m}$ , avec 88% des particules ont une taille comprise entre 1 et 3  $\mu\text{m}$ , dans les conditions opératoires les plus favorables. De plus, aucune trace de dégradation de la molécule n'est observée, après comparaison avec le matériau de base.

#### 1.2.3.2. Le cefadroxil

Des microparticules de cefadroxil sont préparées par le procédé SAA (67) à partir d'une solution eau/éthanol. Les paramètres optimaux qui permettent d'obtenir des particules de 3  $\mu\text{m}$  et moins et avec une distribution de taille étroite sont une pression de 100 bar, une température de 60°C, un débit de solution de 3 mL/mn et une solution concentrée à 4 mg/mL.

## 1.3. Pour un effet systémique

### 1.3.1. Généralités et présentation du problème

La membrane alvéolocapillaire offre un site d'échange idéal entre le milieu extérieur et le compartiment sanguin, avec une surface importante, une grande finesse, une ventilation riche d'un côté et une vascularisation riche de l'autre, un faible équipement enzymatique, et surtout un accès facile, simple et physiologique. Les avantages de l'utilisation de la voie d'administration pulmonaire en vue d'un effet systémique sont les suivants :

- Voie d'administration non invasive,
- Enorme surface d'absorption (100  $\text{m}^2$ ) et membrane très perméable au niveau alvéolaire (0,2 à 0,7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur),
- Faible activité enzymatique,
- Contournement de la métabolisation hépatique et du pH acide de l'estomac,
- Cinétique d'absorption reproductible, indépendante du régime alimentaire et de la vitesse du transit gastro-intestinal,

- Permet l'absorption de molécules très petites autant que de très grosses protéines bien que le mécanisme d'absorption des grosses molécules reste à l'heure actuelle mal compris (68),
- Bien que contenant des protéases, les poumons sont également riches en inhibiteurs de protéases, ce qui permettrait de protéger la plupart des peptides et des protéines administrés par voie pulmonaire (69).

Le poumon profond ou les alvéoles sont la cible principale des aérosols thérapeutiques par inhalation destinés à la voie systémique, pour la libération de protéines ou de peptides par exemple. Ainsi l'insuline, l'hormone de croissance humaine, l'ocytocine, la calcitonine et l'œstradiol ont montré une bonne biodisponibilité après administration pulmonaire. Cette voie d'administration est également de plus en plus souvent citée comme voie d'administration pour des produits issus de la thérapie génique.

Ces macromolécules présentent cependant un risque lorsqu'elles sont administrées par la voie pulmonaire :

- dénaturation de la protéine lors de la nébulisation,
- perte de médicaments dans l'oropharynx,
- mauvais contrôle de la zone de déposition,
- mauvaise reproductibilité des effets thérapeutiques due aux variations des modèles respiratoires,
- absorption trop rapide des médicaments entraînant une toxicité locale et une phagocytose des particules par les macrophages du poumon.

Les macromolécules, et plus particulièrement les protéines et les peptides, sont habituellement administrées uniquement par injection. Pourtant, les chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'administration pulmonaire d'une poudre sèche de ces grosses molécules. Le but serait d'atteindre directement la circulation générale, tout en gardant le maximum de confort et le minimum de douleur pour le patient, ce qui assure une meilleure observance de sa part.

Le premier traitement à inhaler élaboré en vue d'un effet systémique, une insuline sous forme de poudre pour inhalation, porte le nom d'Exubera® et est le résultat d'un co-développement entre Pfizer et Nektar Therapeutics, ces derniers ayant mis au point le dispositif pour inhalation. Cette insuline d'action rapide doit être inhalée au moyen d'un dispositif spécial

comprenant une des doses sous plaquette thermoperforée et d'un inhalateur. Ce dispositif a cependant rapidement été retiré du marché à cause des risques de développement du cancer du poumon associés (70).

### 1.3.2. Le traitement du diabète par l'insuline

Comme beaucoup de peptides, l'insuline n'est pas absorbée par le tube digestif en raison de l'équipement enzymatique local et de l'absence de voie de transport transcellulaire adaptée. La voie injectable s'est donc très tôt imposée comme la plus appropriée. Outre son caractère désagréable, cette voie présente cependant des inconvénients comme une reproductibilité imparfaite, un risque de lipodystrophie ou d'insulinorésistance, l'obligation de conserver les solutés au frais et le faible rapport concentration / volume. En règle générale, les diabétiques de type I doivent s'injecter de l'insuline environ 4 fois par jour, auxquelles s'ajoutent les piqûres de contrôles de glycémie, soit donc entre 12 et 15 piqûres / jour. On comprend alors l'intérêt suscité par une voie d'administration inhalée potentiellement non agressive, indolore, et sans inconvénient majeur.

En 1991, Debenedetti *et al.* (71) proposent la micronisation d'insuline par deux procédés antisolvants différents : le SAS et le SEDS. Le problème alors est que la protéine est largement exposée à une quantité non négligeable de solvant organique, ce qui résulte souvent en une diminution de la bioactivité.

En 2002, Snavely *et al.* (72) utilisent un procédé antisolvant en milieu SC pour produire de petites particules d'insuline. La poudre obtenue est agglomérée, ce qui est défavorable à l'administration pulmonaire, mais une fois désagglomérées, les particules ont une taille entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ , favorable à la voie inhalée.

En 2003, le groupe Separex développe une autre technique (73), par séchage d'une émulsion E/H, qui permet d'avoir le minimum de contact entre la protéine et le solvant organique : le PA est dissous dans un liquide aqueux puis émulsionné dans le solvant organique à l'aide d'un surfactant. La pulvérisation de cette solution dans un FSC permet alors d'extraire l'eau et le solvant organique, pour former des microparticules sèches de PA. De plus, la présence du surfactant permet de protéger le PA de la dénaturation. Les résultats montrent que l'activité de l'insuline est préservée (elle est au moins aussi bonne que l'insuline de base) et que 95 % des particules formées ont un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$  (Figure 34 et Figure 35).

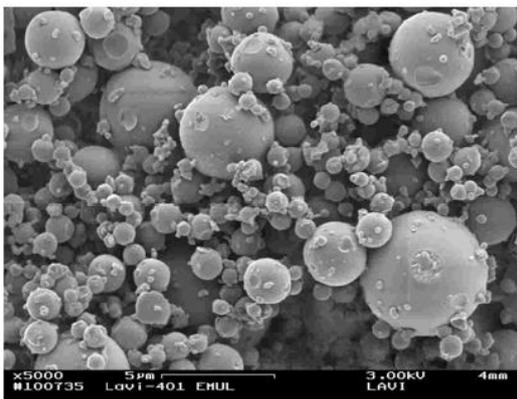


Figure 34 : Particules d'insuline produites par le groupe Separex

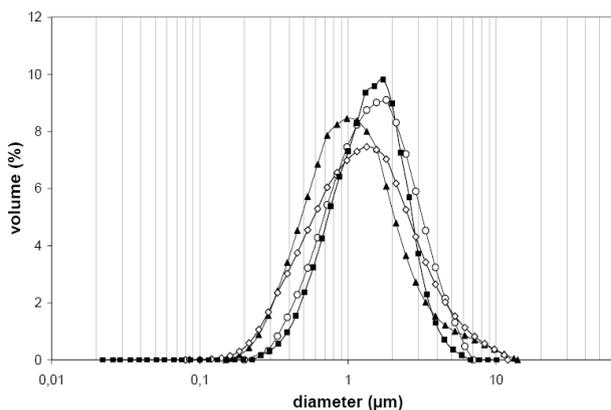


Figure 35 : Distribution de taille des particules d'insuline obtenue avec le procédé de Separex

En 2009 enfin, Pyo (74) propose de microniser l'insuline par le procédé SEDS. Il obtient deux formes différentes de particules à l'issue de la cristallisation selon le solvant utilisé : sphériques avec le DMSO ou en forme de baguette avec l'éthanol. Le DMSO et l'éthanol sont ici utilisés comme solvants polaires aidant le CO<sub>2</sub> SC à extraire l'eau de la solution aqueuse de protéines.

Le brevet déposé par Mainelab en 1999 (41) concerne aussi la micronisation de l'insuline enrobée dans un polymère. La première étape consiste à mettre en contact le PA contenant l'agent enrobant avec un FSC. Ceci est envisagé de plusieurs manières :

- injecter la suspension dans un autoclave contenant le FSC,
- ou introduire le FSC dans un autoclave contenant la suspension,
- ou mettre en contact la suspension avec du CO<sub>2</sub> liquide puis mettre sous les conditions SC dans l'autoclave afin d'extraire le solvant.

Le solvant est alors extrait par le FSC et on évacue ce mélange FSC/solvant de façon à pouvoir récupérer facilement les microparticules formées. Le brevet propose l'utilisation de poly(acide lactique co-glycolique) (PLGA) comme agent enrobant, d'acétate d'éthyle comme solvant organique et d'insuline. Les différents essais se font à des températures comprises entre 20 et 50°C et à des pressions entre 50 et 150 bar. Les résultats des essais montrent que pour un procédé fonctionnant avec un rapport massique de solvant/FSC compris entre 3,5 et 25 %, la quantité de solvant résiduel dans la couche externe est inférieure à 500 ppm et la surface des particules est parfaitement lisse. On obtient finalement des microparticules non agglomérées, de diamètre moyen 3 μm et dont le taux d'encapsulation en insuline est de 87 % m/m. La nébulisation est améliorée d'où son utilisation potentielle par voie inhalée.

La technologie CriticalSorb® (75) est utilisée pour l'amélioration de l'absorption à travers la muqueuse nasale de molécules telles que les protéines et les peptides. Elle permet d'obtenir une bonne tolérance par la muqueuse nasale et a le potentiel de fournir une alternative viable à l'injection d'une grande variété de médicaments. L'insuline montre une biodisponibilité élevée dans les études précliniques lors de l'administration par voie nasale.

### 1.3.3. Le traitement par l'hormone de croissance

Critical Pharmaceuticals (75) développe actuellement une formulation en spray nasal de la somatropine (hormone de croissance recombinante humaine). La somatropine n'est généralement pas absorbée par la muqueuse nasale. Cependant la technologie CriticalSorb® améliore l'absorption de la somatropine en encapsulant le médicament au sein de polymères biodégradables et permet ainsi de livrer les médicaments par spray nasal ; ceci permet de faciliter de manière considérable l'utilisation pour le patient par rapport aux traitements actuels de l'injection quotidienne. La phase I des essais cliniques est en cours et des résultats provisoires montrent que la formulation proposée est capable d'induire l'IGF-1 de la même façon qu'une injection sous-cutanée du produit actuellement commercialisé.

### 1.3.4. Le traitement de cancers

#### 1.3.4.1. Le 5-fluorouracile (5-FU)

Les principales indications du 5-FU sont les tumeurs du tube digestif, du sein, de l'ovaire et leurs métastases, ainsi que les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures où il est associé à d'autres antinéoplasiques. Cette molécule appartient à la classe des médicaments antimétabolites, de la sous-classe des analogues de la pyrimidine. Le problème du 5-FU est qu'il provoque une toxicité systémique comme des toxicités gastro-intestinales, des effets hématologiques et des troubles de la moelle osseuse.

Le but de l'étude de Kalantarian (76) est de produire des particules de 5-FU en utilisant le procédé SAS, avec pour solvants le méthanol avec du dichlorométhane, de l'acétone ou de l'éthanol, à une pression de travail comprise entre 100 et 150 bars, à une température de travail de 40°C, et avec un débit de 1 mL/mn. Les particules obtenues sont de forme régulière, sphériques, de surface lisse et d'un diamètre moyen de 248 nm dans le cas de la micronisation avec le mélange méthanol/dichlorométhane 50/50. Les études *in vitro* montrent que la fraction

délivrée par l'administration pulmonaire peut augmenter de plus de 20 % en utilisant un transporteur composé de particules de lactose plus ou moins fines.

Chen *et al.* (77) préparent en 2008 des microcapsules de 5-FU par le procédé SEDS. Dans un premier temps, les particules de 5-FU sont adsorbées sur de la silice puis les nanoparticules formées sont enrobées par du poly(L-lactide) (PLLA). L'adsorption sur la silice permet d'avoir une efficacité d'enrobage par le PLLA accrue. Les microcapsules formées ont une distribution de taille étroite avec une moyenne de 536 nm. Le taux d'encapsulation est de 80,53 %. Plus de 25 % du 5-FU enrobé dans le PLLA est libéré dans la première demi-heure (contre près de 80 % dans le cas des particules nues), puis le PA est libéré graduellement de manière prolongée, plus lentement que dans le cas des particules non enrobées.

#### 1.3.4.2. La buséréline

La technologie utilisée est la méthode SAS (78). Le chitosane est utilisé comme vecteur du PA et permet d'améliorer l'absorption du PA sur les surfaces épithéliales. Le but est de charger les microparticules de chitosane avec des macromolécules de buséréline, PA utilisé dans le traitement du cancer de la prostate. Ce PA est habituellement dégradé par la digestion enzymatique quand il est administré par voie orale, c'est pourquoi il est administré par injection. Les auteurs proposent d'éviter cette voie invasive produisant une formulation par inhalation. Les microparticules de chitosane devront se dissoudre une fois en contact avec la muqueuse nasale. Le chitosane ayant un pKa faible (de 5,6), il ne pourra pas être utilisé dans les applications médicales puisqu'à pH physiologique (de 7,4), il est insoluble et inefficace pour améliorer l'absorption. On utilisera alors une forme triméthylée : le chlorure de N-triméthylchitosane. L'exemple est d'utiliser l'acétate de buséréline avec un diamètre de 0,2 – 5 µm. Aucun essai clinique n'est pour l'instant d'actualité. On remarque que le type de triméthylchitosane utilisé a une influence sur la formation de la particule et de sa morphologie. Le degré de substitution ainsi que la masse molaire de l'agent encapsulant ont été identifiés comme étant des facteurs significatifs.

## 2. LA THERAPIE PAR VOIE ORALE

Dans la plupart des cas, l'efficacité d'un traitement par voie orale sera augmentée si on parvient à augmenter la solubilité d'un PA dans les fluides biologiques. Deux techniques majeures d'amélioration de la solubilité d'un PA sont la réduction de la taille des particules ainsi que la protection du PA par différents moyens (microparticules, CD, liposomes). Dans certains cas, il peut être aussi nécessaire de prolonger la durée d'action d'un PA. Nous avons choisi de décrire des résultats obtenus pour différents PA couramment utilisés en pharmacie et en fonction du but du traitement. Plusieurs études sont parfois disponibles pour un même PA, nous les décrirons les unes à la suite des autres en fonction de leur date de parution puis nous essaierons d'en tirer les meilleures conclusions.

Les résultats *in vitro* obtenus par l'utilisation de la technologie Formulplex® (79) prouvent de l'intérêt à opérer en conditions SC pour des médicaments faiblement solubles (Tableau 16).

Classe thérapeutique	PA (avant)	Après Formulplex®
Anti-inflammatoire	0,2	824
Antifongique	274	4628
Hypocholestérolémiant	1	156
Cicatrisant	0	318
Antiseptique	80	2500
Veinotonique	5	10
Anti-inflammatoire	25	3887
Anti-inflammatoire	3,23	110,12
Statine	0	40
Anticancéreux	0	184
Anticancéreux	31	70
Antifongique	7700	17453

Tableau 16 : Résultats de solubilité *in vitro* de Formulplex® (CD utilisée :  $\beta$ ,  $\gamma$ , méthyl- $\beta$  RAMEB, HP- $\beta$  ; Test de dissolution : Eau tamponnée, 37°C, solubilité après 15 mn, Unité de résultats :  $\mu\text{g/mL}$ ) (79)

Les résultats obtenus montrent qu'une substance ayant une solubilité nulle sans traitement (cas du cicatrisant, de la statine et d'un anticancéreux) peut devenir soluble une fois la technique Formulplex® utilisée. La solubilisation du PA est au minimum multipliée par deux après traitement mais peut l'être jusqu'à plus de 4000 fois (dans le cas d'un anti-

inflammatoire), ce qui rend alors le PA très intéressant d'un point de vue thérapeutique. Des résultats *in vivo* permettent aussi de prouver de l'efficacité de Formulplex®, notamment sur les molécules de classe II dans la classification BCS (rappel : classe II = faible solubilité, forte perméabilité).

## 2.1. Le traitement de la douleur et de l'inflammation

### 2.1.1. L'aspirine

A travers l'étude de Huang *et al.*(80) de 2005, on peut évaluer les performances des paramètres du procédé RESS grâce à l'analyse des caractéristiques des particules obtenues. Ce procédé permet de produire des particules sphériques ultrafines d'aspirine (0,1 à 0,3  $\mu\text{m}$ ) avec une distribution de taille de particules étroite, à des conditions douces : 70°C et 180 bar.

### 2.1.2. L'ibuprofène

Le travail mené par Charoenchaitrakool *et al.* (56) permet de produire des complexes d'inclusion entre l'ibuprofène et la méthyl- $\beta$ -CD. La biodisponibilité du PA est alors augmentée en raison du caractère amorphe du PA formé ainsi que de la mouillabilité des particules formées.

L'étude de Kayrak *et al.* (81) est menée dans le but de déterminer les paramètres optimaux de production de microparticules d'ibuprofène sur la taille et la morphologie des particules produites : la pression (130 – 170 bar), la température (76 – 104°C), la longueur du capillaire (8 – 12 mm), la distance d'atomisation (20 – 60 mm) et l'angle de collision (45 et 90°). Les particules d'origine ont une taille de 45  $\mu\text{m}$  et sont de forme rectangulaire tandis que les particules produites ont une taille comprise entre 2,85  $\mu\text{m}$  et 7,48  $\mu\text{m}$  et sont de forme irrégulière. Le degré de cristallinité est réduit. 95 % des particules de l'ibuprofène d'origine sont plus petites que 70  $\mu\text{m}$  et aucune n'est inférieure à 15  $\mu\text{m}$ . Après mise en œuvre du procédé RESS, 45 % des particules sont inférieures à 2  $\mu\text{m}$  et 88 % sont inférieures à 5  $\mu\text{m}$  avec des distributions de taille plus étroites.

Le procédé breveté par Separex (cf chapitre 2, 3.4.3.1.2) (51) permet d'obtenir des particules d'ibuprofène inclus dans une méthyl- $\beta$ -CD. En travaillant avec l'acétone comme solvant, à une pression de 150 bar et à une température de 40°C pendant 1h, les particules obtenues ont

un diamètre moyen de 1,1  $\mu\text{m}$  et 90% des particules ont une taille comprise entre 0,7 et 2,9  $\mu\text{m}$ . La composition massique des particules finale est de 8% de PA pour 90% de CD. La teneur résiduelle en solvant organique est conforme aux normes.

En 2003, Cristini *et al.* (82) mènent une étude de micronisation de l'ibuprofène par la méthode RESS. Avec une température de 35°C et à 120 bar, des particules entre 1 et 2  $\mu\text{m}$  sont formées à partir de particules initiales de taille comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  (Figure 36).

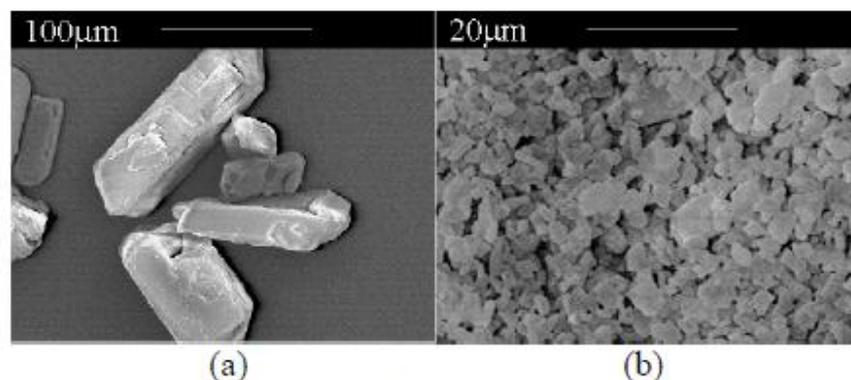


Figure 36 : a) Ibuprofène avant traitement ; b) Ibuprofène après traitement par RESS à 35°C et 110 bar (82)

En comparant les biodisponibilités de l'ibuprofène formé avec le matériau initial, les chercheurs se rendent compte que la libération du PA est plus lente dans le cas des petites particules de quelques  $\mu\text{m}$  qu'avec les particules plus grosses de quelques centaines de  $\mu\text{m}$ . Cette diminution de taille de particules conduit en fait à une libération de PA faible à cause de grandes tensions de surface (cinétique de libération 4 fois plus faible dans le cas des particules formées avec le procédé RESS). Le même procédé a donc été utilisé dans des conditions similaires pour produire des particules composites d'ibuprofène imprégnées de lactose ou incluses dans une  $\beta$ -CD. Une nette amélioration de la vitesse de dissolution est observée dans le cas de l'ibuprofène inclus dans une  $\beta$ -CD ou imprégné par le lactose plutôt que dans le cas de l'ibuprofène obtenu par le procédé RESS (Figure 37). Ceci est attribué à la capacité de ces excipients à réduire les effets de tension de surface. Cependant, la vitesse de dissolution de l'ibuprofène imprégné par le lactose est toujours plus faible que l'ibuprofène de base. Pour expliquer ce phénomène, il a fallu vérifier que des interactions entre le lactose et l'ibuprofène existent. Or il existe peu d'interactions entre le PA et l'excipient utilisé, c'est pourquoi dès que le lactose est solubilisé, l'ibuprofène ne se trouve plus dans un milieu protecteur et son comportement est le même que quand il n'est pas imprégné. En revanche, le comportement de l'ibuprofène inclus dans une  $\beta$ -CD est différent, puisque les vitesses de dissolution du PA sont

nettement améliorées. La raison est que les interactions entre l'ibuprofène et la  $\beta$ -CD utilisée sont plus fortes.

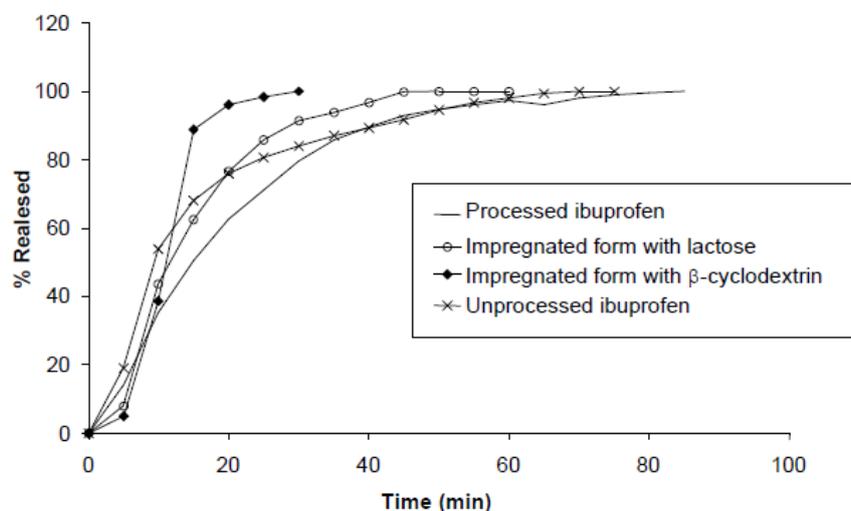


Figure 37 : Profil de dissolution de l'ibuprofène original, ayant subi le procédé en FSC, imprégné avec du lactose ou avec une CD

L'étude de Wang *et al.* de 2008 (83) porte sur la formation de microsphères d'ibuprofène dans un lipide (acide myristique ou tripalmitine) par la méthode PGSS. Les chercheurs comparent, à l'issue des expériences, les tailles des microsphères obtenues avec celle des particules de lipide seul. Ils concluent que les microsphères ibuprofène/acide myristique obtenues ont en moyenne une taille plus petite que les particules d'acide myristique seul et sont légèrement plus grandes dans le cas ibuprofène/tripalmitine que les particules de tripalmitine seule. Les études de dissolution montrent que les microsphères ibuprofène/acide myristique libèrent le médicament de façon améliorée : en 100 mn, 80 % de l'ibuprofène formulé avec l'acide myristique est dissous contre seulement 60 % dans le cas de l'ibuprofène seul.

### 2.1.3. Le paracétamol

Le but de l'étude de Kalani (84) est avant tout d'optimiser les différents paramètres du procédé (pression, température et concentration en polymère) de production de petites particules sphériques de paracétamol encapsulé dans du PLA. Il s'agit d'obtenir une distribution de taille de particules étroite en utilisant la méthode antisolvant. L'étude permet de comprendre aussi les interactions entre les différents paramètres. La pression de travail est fixée à 120 bar, la température à 30°C, la concentration en polymère à 16 ppm. Les particules obtenues ont un diamètre moyen de 30 nm et une distribution de taille étroite.

L'étude de Chong *et al.* de 2009 (85) propose l'encapsulation de paracétamol dans un polymère d'Eudragit® par la technique SAS. Les résultats montrent que les particules nues de

paracétamol sont de forme irrégulière tandis que les particules encapsulées sont sphériques. Le diamètre moyen de ces particules est estimé à 50 nm. Les essais de dissolution *in vitro* montrent une dissolution plus lente pour les particules encapsulées par rapport aux particules nues, ce qui est dû à la couche de polymère qui protège le PA. En comparaison avec l'étude de Baykara et Karatas (86) qui ont formulé des microcapsules de paracétamol par la technique de coacervation, les profils de dissolution sont semblables.

#### 2.1.4. Le kétoprofène

Le kétoprofène est formulé par Formuldisp® avec trois excipients différents (87): le PVP réticulé (Polyplasdone®) (Figure 38), la méthylcellulose (Metolose®) et l'hydroxypropyl-méthylcellulose (Benecel®) à 150 bar et 80°C pendant 2h. Les essais réalisés concernant l'amorphisation de la substance active au cours du temps et la cinétique de dissolution sont concluants : l'amorphisation est totale et stable entre 7 mois et 1 an (selon l'excipient) après la préparation et la cinétique de dissolution est largement augmentée par rapport à un mélange classique, notamment avec l'HPMC comme excipient.

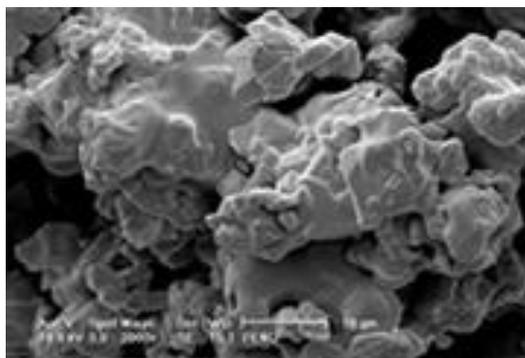


Figure 38 : Matrice de PVP imprégnée de kétoprofène (87)

En 2010, Hezave *et al.* (88) micronisent le kétoprofène par le procédé RESS avec une pression comprise entre 140 et 220 bar, une température d'extraction entre 35 et 65°C, une buse de longueur entre 2 et 15 mm et de diamètre entre 450 et 1700  $\mu\text{m}$  et une distance d'atomisation de 1 à 10 cm. Finalement, les particules obtenues, quasiment sphériques, en forme d'aiguille ou de forme irrégulière, ont une taille moyenne entre 0,35 et 7,03  $\mu\text{m}$  selon les conditions opératoires, contre 115,42  $\mu\text{m}$  pour le PA d'origine. Les plus petites particules, uniformes, sont obtenues à une température de 40°C, une pression de 220 bar, une distance d'atomisation de 1 cm, une longueur et un diamètre de buse de 450  $\mu\text{m}$  et 5 mm respectivement.

### 2.1.5. Le naproxène

Le procédé RESS (50) est utilisé pour la production de microparticules chargées de PA. Du L-poly(acide lactique) (L-PLA), du naproxène et un mélange de naproxène/L-PLA ont été dissous dans du CO<sub>2</sub> SC puis précipités par le procédé RESS. On obtient alors des particules de naproxène encapsulées dans le polymère.

Kim *et al.* (44) ont utilisé le procédé RESS pour coprécipiter le naproxène avec du L-PLA. Les microparticules formées avec une pression de 190 bar sont sphériques et ont un diamètre entre 20 et 90 µm.

### 2.1.6. Le piroxicam

En 1999, Van Hees *et al.* (89) ont démontré la formation d'un complexe d'inclusion entre le piroxicam et la β-CD. En maintenant un mode statique un mélange physique piroxicam/ β-CD en proportion 1:2,5 au contact du CO<sub>2</sub> SC à 150 bar et 150°C pendant 6h, le rendement d'inclusion obtenu est de l'ordre de 94%.

En 2008, Sauceau *et al.* (90) préparent des complexes d'inclusion entre le piroxicam et une β-CD en utilisant un agent ternaire, la L-lysine. Finalement, les meilleurs complexes sont obtenus pour un ratio piroxicam/ β-CD/L-lysine de 1:2:1,5 (agent ternaire en excès), et 27,5 % d'eau, avec une durée de process de 2h, à 150°C et 150 bar. L'addition de L-lysine permet d'augmenter l'inclusion dans la CD. Une explication possible serait la capacité de mouillabilité de la L-lysine, qui permettrait une meilleure distribution de l'eau dans la poudre et donc une meilleure association. La dissolution en milieu aqueux est améliorée quand les particules sont produites par le procédé en FSC plutôt que par mélange physique.

### 2.1.7. La prednisolone

Le procédé d'inclusion dans une CD proposé par les laboratoires Separex (51) permet de formuler des complexes de prednisolone et de méthyl-β-CD en utilisant l'éthanol comme solvant, à 150 bar et 40°C, pendant 1h. Les particules obtenues ont un diamètre moyen de 1,4 µm avec 90 % des particules entre 0,8 et 3,5 µm, composée à 11 % en masse de PA et à 85 % en masse de méthyl-β-CD. La teneur résiduelle en solvant organique est conforme aux normes.

## 2.2. Le traitement des infections

### 2.2.1. Les antibiotiques

#### 2.2.1.1. L'amoxicilline

Peu soluble dans l'eau, il est nécessaire de surdoser l'amoxicilline pour obtenir un effet satisfaisant. La formation de microparticules d'amoxicilline permet donc de diminuer le dosage de l'antibiotique et d'accélérer son délai d'action.

Selon les paramètres utilisés dans le procédé de Kalogiannis *et al.* (91) de 2005, la moyenne et la distribution de taille des particules sont différentes. En revanche, dans chaque cas, les particules sont sphériques, non agglomérées et de taille entre 0,2 et 1,6  $\mu\text{m}$ . Plusieurs études sont menées, l'une en utilisant le DMSO comme solvant et l'autre en ayant recours au mélange éthanol/DMSO. Les analyses montrent que les microparticules d'amoxicilline deviennent amorphes après traitement en milieu SC avec le DMSO. Avant la précipitation par SAS, les particules d'amoxicilline ont une taille entre 5 et 50  $\mu\text{m}$  (Figure 39), une forme de cristal et ont une distribution de taille assez aléatoire, ce qui implique une cinétique de dissolution instable, mais surtout des propriétés physico-chimiques inconnues. Après traitement, les particules d'amoxicilline ont radicalement changé, puisqu'elles se présentent alors sous forme de sphères régulières (Figure 40). A une pression de 150 bar, on obtient des particules de 0,49  $\mu\text{m}$  et une distribution de taille étroite.

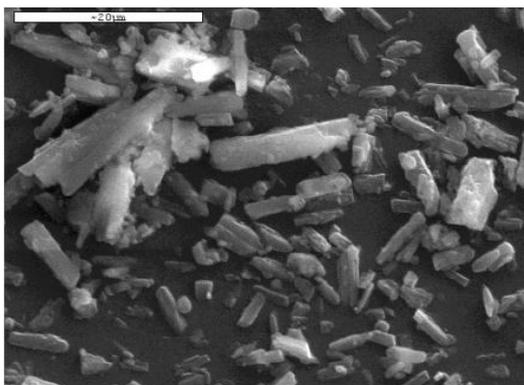


Figure 39 : Particules d'amoxicilline avant traitement SAS

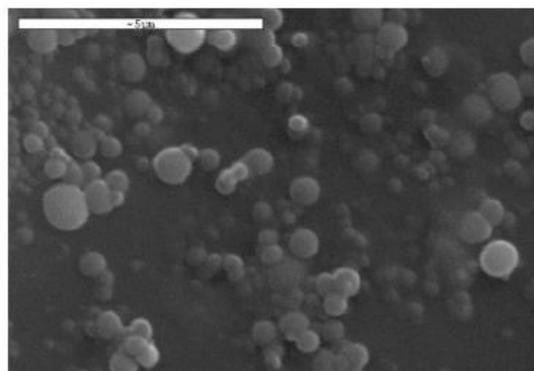


Figure 40 : Particules d'amoxicilline après traitement SAS avec du DMSO et à une pression de 150 bar

D'autres particules d'amoxicilline ont alors été produites en remplaçant le DMSO par du méthanol ou de l'éthanol, deux solvants moins dangereux. Les particules obtenues ont

davantage tendance à coalescer, c'est pourquoi il a été décidé de travailler avec un mélange éthanol/DMSO.

En 2000, Reverchon (92) a tenté de produire des particules d'amoxicilline par précipitation SAS en utilisant comme solvant le DMSO. Cependant la précipitation a entraîné la formation d'agglomérats, entre autres. Il n'est parvenu à obtenir une précipitation satisfaisante qu'en utilisant le N-méthylpyrrolidone, qui est un solvant très toxique et dangereux.

Des microparticules d'éthylcellulose et d'amoxicilline ont été précipitées par SAS (93) à l'aide de dichlorométhane ou de DMSO. Tous les paramètres de travail ont été maintenus constants sauf la pression et la température. Les particules co-précipitées montrent une cinétique de libération plus lente que celle des particules de PA seul. Les particules formées sont sphériques tandis que celles des matériaux d'origine (éthylcellulose et amoxicilline) sont de forme irrégulière ou parallélépipédique. Leur taille est aussi inférieure à celle des particules d'éthylcellulose d'origine : de 0,35 à 2,66  $\mu\text{m}$  (contre 3,8 – 5,0  $\mu\text{m}$ )

#### 2.2.1.2. L'ampicilline

La méthode utilisée est la méthode SAS (94). Trois solvants ont été utilisés (N-méthylpyrrolidone, DMSO et éthanol) mais c'est avec le N-méthylpyrrolidone que la précipitation est la meilleure : les particules produites ont un diamètre moyen de 0,26  $\mu\text{m}$  avec une distribution de taille étroite. La forme sphérique ainsi que la coalescence des particules peut être contrôlée par les paramètres du procédé.

#### 2.2.1.3. Le sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole est une molécule peu soluble dans l'eau et avec une demi-vie de 8 à 12 h dans l'organisme. La micronisation du PA a été réalisée par l'équipe de Chang *et al.* (95) par les méthodes antisolvant en batch et en continu. La méthode en continu a révélé des résultats plus satisfaisants puisqu'elle permet d'obtenir des particules plus petites que le PA d'origine. La concentration en sulfaméthoxazole, le débit de la solution de PA, la pression et la température ont un effet sur la taille de particule. Dans cette étude, le solvant utilisé est l'acétone. Après avoir déterminé la solubilité du sulfaméthoxazole dans les conditions ambiantes, il est possible de l'extrapoler aux conditions de températures souhaitées. Le groupe de recherche décide de travailler à 35°C avec une solution concentrée à 30 % m/m de

sa concentration à saturation. Les particules du matériau initial (de 41,7  $\mu\text{m}$ ) s'agglomèrent en blocs de taille supérieure à 100  $\mu\text{m}$ . Les particules obtenues par le procédé batch et par le procédé en continu sont respectivement de 41,2 et 5,1  $\mu\text{m}$ . L'étude de la structure cristalline avant et après le traitement par la méthode antisolvant montre que la cristallinité est préservée mais avec différentes intensités : une forme cristalline différente est obtenue avec le procédé batch. En conclusion, les particules les plus petites ont été obtenues en utilisant le procédé continu à 100 bar, 35°C, avec un débit de fluide de 0,25 mL/mn avec une concentration à 30 % m/m de la saturation. Les particules obtenues sous ces conditions sont ensuite testées pour connaître leur dissolution dans les fluides intestinaux. La dissolution est trois fois plus rapide dans le cas du PA micronisé par rapport au matériau d'origine, ce qui est dû à la réduction de la taille des particules. Enfin, la co-précipitation du sulfaméthoxazole avec un polymère hydrophile, l'hydroxypropylcellulose permet une dissolution encore meilleure (Figure 41).

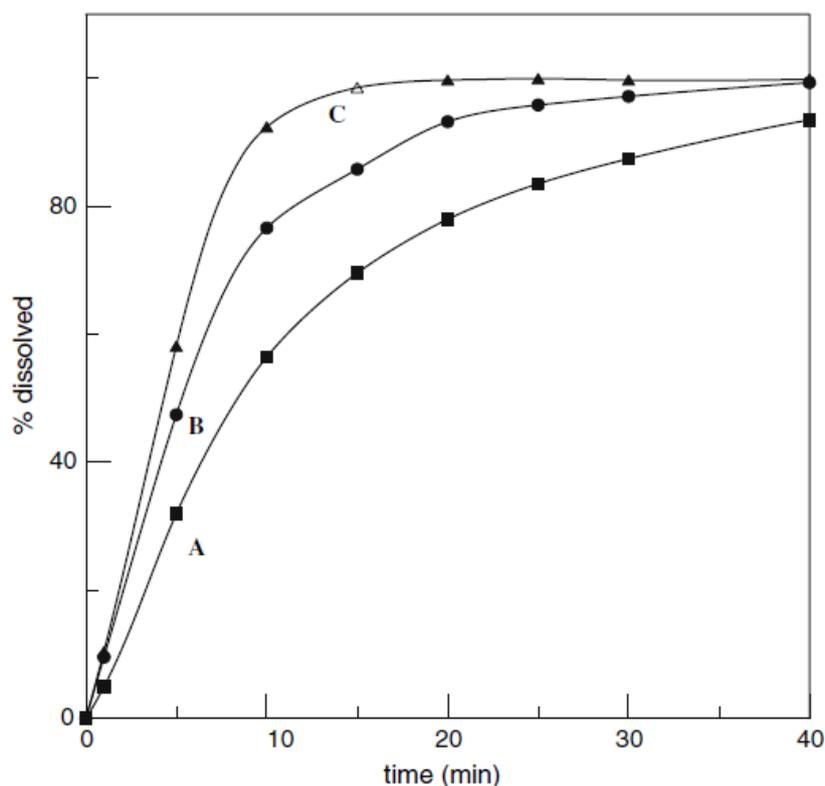


Figure 41 : Profil de dissolution du sulfaméthoxazole (A : original ; B : sulfaméthoxazole micronisé par SAS ; C : sulfaméthoxazole co-précipité avec HPC)

Or, les particules obtenues sont pourtant des agglomérats d'hydroxypropylcellulose et de sulfaméthoxazole. La vitesse de dissolution de ces particules serait en fait augmentée de par la nature hydrophile du polymère d'imprégnation.

## 2.2.2. Les antifongiques

### 2.2.2.1. L'itraconazole, l'éconazole et le fluconazole

La solubilité de l'itraconazole, de l'éconazole et du fluconazole dans le CO<sub>2</sub> SC est la suivante : fluconazole > éconazole > itraconazole. Les chercheurs (96) observent une complexation partielle de l'itraconazole dans la β-CD tandis qu'elle est complète dans le cas des deux autres PA. Ceci peut être dû à la taille moléculaire plus petite de l'éconazole et du fluconazole et donc à une plus grande probabilité d'être inclus dans la CD. Les deux cycles pyrrole du fluconazole augmentent aussi la probabilité d'inclusion et résulte en une plus grande interaction entre le PA et la CD.

L'étude de Hassan *et al.* (97) de 2007 propose d'inclure l'itraconazole dans une β-CD. En comparant les caractéristiques des particules obtenues par la méthode en FSC utilisée avec celles obtenues par le mélange ou par des méthodes de coprécipitation traditionnelles, de plus grand taux d'inclusion sont obtenus avec les particules obtenues par la méthode en FSC. De plus, l'étude montre que le taux d'inclusion est meilleur en augmentant le temps d'exposition, c'est pourquoi les chercheurs ont choisi de travailler sur une durée de 3h avec un rapport PA/CD de 1:4. Le mélange physique ne permet pas de former des complexes satisfaisants puisque les taux d'inclusion sont nuls, la méthode par coprécipitation quant à elle permet d'obtenir des taux de 3,46 %. En revanche, en procédant avec le CO<sub>2</sub> SC avec une température de 130°C sous 450 bar, le taux d'inclusion est de 33,53%. Les études *in vivo* sur le rat montrent que la biodisponibilité de l'itraconazole complexé avec la β-CD par la méthode en CO<sub>2</sub> SC est augmentée en comparaison avec l'itraconazole produit par mélange physique ou par coprécipitation traditionnelle (Figure 42).

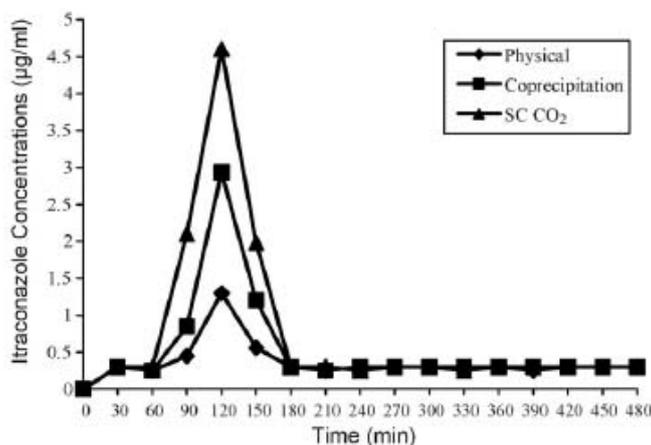


Figure 42 : Profil de concentration plasmatique après administration orale d'itraconazole-β-CD (rapport 1:2 ; méthode en FSC à 50°C, 250 bar et pendant 3h) (97)

Peters *et al.* montrent que la solubilité de l'itraconazole dans les solutions aqueuses augmente encore quand on utilise la HP- $\beta$ -CD.

Une autre étude (98) de 2008 montre que les complexes d'itraconazole et de hydroxypropyl- $\beta$ -CD formés par ASES présentent une meilleure dissolution que l'itraconazole non complexé (90% de l'itraconazole est dissous en 5 à 10 mn). Les études de solubilité montrent une solubilité de 753,6  $\mu\text{g/mL}$  à pH 1,2 lorsque le rapport molaire PA/CD est de 1:3, tandis que l'itraconazole non soumis au procédé en FSC montre une solubilité inférieure à 5  $\mu\text{g/mL}$  en solution acide. Les particules d'itraconazole obtenues par le procédé ASES sont de taille micrométrique, agglomérées et incluses dans la HP- $\beta$ -CD. La dissolution du complexe est plus forte comparée à celle obtenue par l'itraconazole non complexé et par le mélange physique. Les cristaux d'itraconazole pur sont en forme d'aiguille, de 10-30  $\mu\text{m}$  de long et 5-10  $\mu\text{m}$  de large. Les particules de HP- $\beta$ -CD sont quant à elles sphériques avec un diamètre entre 50 et 100  $\mu\text{m}$ . En utilisant le procédé ASES, les complexes formés ont un diamètre entre 30 et 50  $\mu\text{m}$ .

## **2.3. Le traitement des maladies neurologiques et psychiatriques**

### **2.3.1. Le milnacipran**

Le milnacipran est formulé par Formuldisp®, procédé breveté par Pierre Fabre (cf chapitre 2, 3.2.3.4.2), avec deux types d'excipients dérivés de la cellulose : la méthylcellulose et le HPMC, dans le but d'obtenir un effet différé du PA. On obtient une formulation avec un relargage différé, dans le cas d'un traitement avec du  $\text{CO}_2$  SC à 150 bar et 80°C pendant 2h.

### **2.3.2. La carbamazépine**

La biodisponibilité de la carbamazépine ne dépasse habituellement pas 70 à 85 %. La carbamazépine, avec une solubilité dans l'eau de 12  $\mu\text{g/mL}$  (à 25°C), appartient à la classe II de la classification BCS. Elle peut être cristallisée sous forme de 4 polymorphes et la forme IV, la plus stable est recommandée par l'USP.

En 2001 puis en 2003, Moneghini *et al.* (99)(100) réduisent la taille des particules de carbamazépine de 284 à 31  $\mu\text{m}$  par le procédé GAS et obtiennent une dissolution dans l'eau augmentée.

En 2004, Sethia et Squillante (101) formulent une dispersion solide de carbamazépine dans du PVP, formulation qui permet une dissolution améliorée du PA.

L'étude de Bolten et Türk (102) de 2011 concerne la micronisation de la carbamazépine par le procédé RESS. Les particules obtenues sont environ 60 fois moins grosses que les particules du matériau d'origine, avec une moyenne de taille comprise entre 0,43 et 0,9  $\mu\text{m}$ . La forme IV est préférentiellement obtenue pour une température de travail supérieure à 90°C. A pH acide de 2 et à 37°C, les études de dissolution montrent un profil amélioré (deux fois plus rapide) par rapport au matériau d'origine.

### 2.3.3. La phénytoïne

En 2006, Thakur et Gupta (24) produisent des particules de phénytoïne (un anticonvulsivant utilisé dans le traitement de l'épilepsie) grâce au procédé RESS. Ce procédé étant peu applicable aux molécules peu solubles dans le CO<sub>2</sub> SC, ils choisissent d'utiliser le menthol comme cosolvant solide. L'utilisation de ce cosolvant permet alors d'augmenter la solubilité du PA dans le CO<sub>2</sub> SC de 400 fois à 196 bar et 45°C. Les particules d'origine, rectangulaires, ont une longueur de 4  $\mu\text{m}$  et une largeur de 3  $\mu\text{m}$ . De par l'utilisation du procédé RESS à 196 bar et 45°C, ils observent non seulement une diminution de la taille des particules à 200 nm mais aussi une modification de leur forme qui devient sphérique. A des pressions supérieures à 196 bar, la taille des particules diminue à 105 nm. L'utilisation de menthol comme cosolvant permet de diminuer encore la taille des particules à 120 nm à 196 bar et à 75 nm à pressions plus élevées.

## 2.4. Le traitement des troubles endocriniens

### 2.4.1. La simvastatine

Un complexe d'inclusion entre la simvastatine et l'HP- $\beta$ -CD réalisé par la méthode SAS en 2007 par Jun *et al.* (103) montre une meilleure performance en termes de réduction du taux de cholestérol et de triglycéride, en comparaison avec la simvastatine non complexée. Ceci serait dû à une meilleure solubilité et dissolution du complexe. L'étude menée montre la présence de liaisons intermoléculaires hydrogène entre la simvastatine et la CD ce qui entraîne la

formation de la forme amorphe. La solubilité aqueuse et le profil de dissolution du complexe augmentent considérablement en comparaison du PA seul et du mélange simple.

#### 2.4.2. L'éflucimibe

En 2003, l'équipe de Fages travaille pour les laboratoires Pierre Fabre et met au point le procédé Formulplex® (cf chapitre 2, 3.4.3.1.1) qui permet, entre autres, l'augmentation de la biodisponibilité de l'éflucimibe. Les résultats (Figure 43) montrent l'efficacité de la technologie Formulplex® en terme d'augmentation de la solubilité (et par conséquent de la biodisponibilité) de l'éflucimibe : le pic de concentration est atteint environ 2h après administration quelle que soit la méthode de mise en forme, mais la valeur de la concentration est environ 6 fois supérieure dans le cas de Formulplex® par rapport au Nanocrystal® (nanocristaux) par exemple. Cela prouve une meilleure efficacité du PA sous cette forme complexée, une fois administré dans l'organisme.

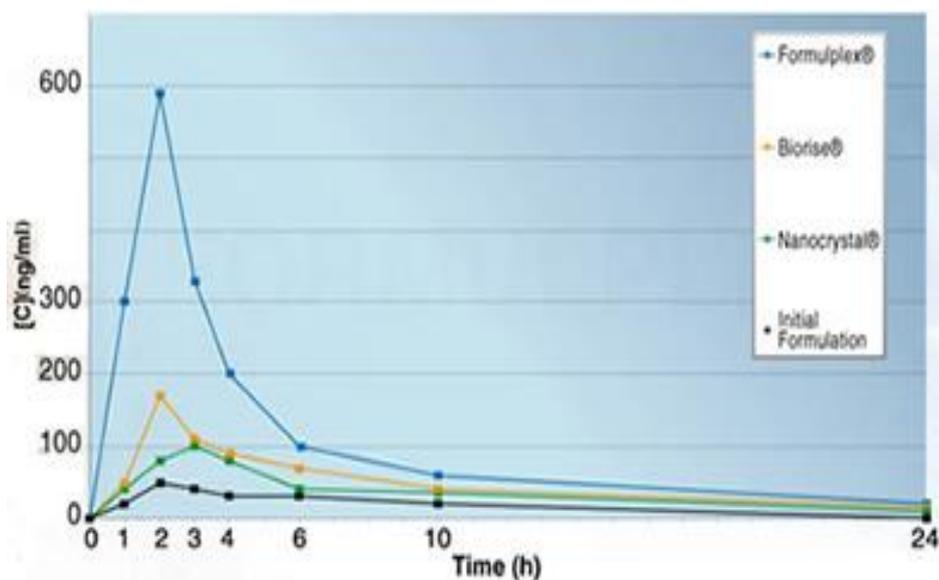


Figure 43 : Résultats in vivo (sur le chien) de biodisponibilité obtenus avec l'éflucimibe formulée par Formulplex® (γ-CD) : comparaison avec la formulation initiale et d'autres technologies (57)

Enfin, d'autres essais comparent la solubilité du PA formulé de trois manières différentes (Figure 44) : seul, inclus dans un complexe de CD par cristallisation conventionnelle et enfin formulé en CO<sub>2</sub> SC. On voit bien que le PA formulé en CO<sub>2</sub> SC se solubilise bien mieux, en comparaison avec ce même PA formulé différemment.

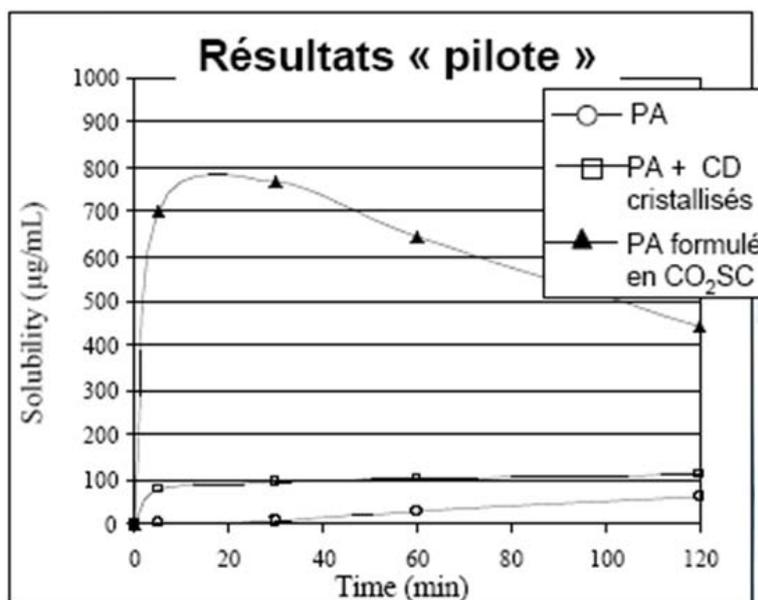


Figure 44 : Profil de dissolution de l'efflucimibe formulé par 3 méthodes différentes (58)

Enfin, différentes technologies ont pu être comparées avec l'obtention des résultats suivants (Tableau 17) :

Technologie	Biodisponibilité (ng/mL)
<b>PA seul</b>	231
<b>Mélange</b>	1714
<b>FSC</b>	2351
<b>Broyage</b>	519
<b>DDT1 (non précisé)</b>	621
<b>DDT2 (non précisé)</b>	795

Tableau 17 : Comparaison de la biodisponibilité de l'efflucimibe par différents types de formulations (57)

Là-encore, la méthode d'inclusion dans une CD à l'aide de FSC prouve de son efficacité en termes d'augmentation de l'efficacité par amélioration de la biodisponibilité du PA (augmentation de la biodisponibilité d'un facteur 10).

## **2.5. Le traitement des cancers**

### **2.5.1. La vinflunine**

Par la formulation de la vinflunine base avec une carboxyméthylcellulose (croscarmellose de sodium) avec du CO<sub>2</sub> SC à 150 bar et à 50°C pendant 2h (technologie Formuldisp® (cf chapitre 2, 3.2.3.4.2)), les laboratoires Pierre Fabre ont obtenu une forme avec une amélioration de la biodisponibilité orale de la vinflunine base et une amélioration de la cinétique de dissolution du PA.

## **2.6. Les immunosuppresseurs**

### **2.6.1. La cyclosporine**

Tandya *et al.* (104) étudient la micronisation de la cyclosporine, de la classe II (BCS) dans le but de rendre le PA plus soluble dans les milieux aqueux et donc d'augmenter sa dissolution dans les fluides organiques. Ils utilisent pour cela deux méthodes : RESS et PGSS. Après micronisation, ils obtiennent des particules de taille inférieure à 1 µm contre une taille initiale entre 40 et 100 µm, ainsi qu'une diminution du degré de cristallinité. Dans le procédé PGSS, la cyclosporine est micronisée à des pressions entre 160 et 200 bar et des températures entre 25 et 45°C.

## **2.7. Les anti-anémiques**

### **2.7.1. L'érythropoïétine (EPO)**

L'EPO est une hormone glycosylée dont l'action est la croissance hématopoïétique. Elle est utilisée pour maintenir ou élever un taux de globules rouges du patient, dans le cas d'anémie, lors de l'hémodilayse d'insuffisants rénaux chroniques, en parallèle à une chimiothérapie, chez les malades du VIH ou ayant une intervention chirurgicale. Le traitement nécessite au moins trois injections par semaine.

Cette invention (105) permet de produire des microsphères d'EPO destinées à être administrées par voie injectable, sous-cutanée ou intramusculaire, qui ont pour but de prolonger la libération du PA et qui sont dépourvues de toute trace de solvant organique. Dans cette invention, l'agent enrobant, soluble dans le CO<sub>2</sub> SC, est le Gelucire®, un mélange de

mono-, di- et triglycérides, d'esters d'acides gras et de polyéthylène glycol. Cette invention consiste à mettre en suspension sous agitation dans un autoclave l'EPO, insoluble dans le FSC, dans une solution de Gelucire® dissoute dans le FSC. La modification des conditions de travail (pression de 100 à 250 bar ; température de 35 à 80°C) ajoutées à l'agitation du milieu (450 tours/mn pendant 1 h) conduisent à la diminution de la solubilité de l'agent enrobant dans le FSC, l'affinité de l'agent enrobant pour le PA s'accroît, et l'enrobant s'adsorbe autour du PA. Les microparticules peuvent être récupérées grâce au placement d'un insert cylindrique à l'intérieur de l'autoclave, dont le frittage est inférieur à la taille des microparticules désirées. Les particules obtenues ont un diamètre compris entre 0,1 et 150 µm et une teneur en PA entre 0,5 et 50%. Ces particules sont dénuées de toute trace de solvant résiduel.

### **3. LA THERAPIE PAR VOIE PARENTERALE**

Le chapitre 2 nous a permis de comprendre les nombreux avantages que peuvent avoir des systèmes à libération contrôlée (spatiale ou temporelle) en terme de concentration en PA dans l'organisme, qui permettent ainsi de réduire la fréquence d'administration, améliorant l'observance du patient et le coût du traitement.

#### **3.1. Le traitement du déficit en hormone de croissance**

L'hormone de croissance humaine (ou somatropine) est peu absorbée par voie orale, c'est pourquoi elle est habituellement administrée par injections. Les patients souffrant de déficit en hormone de croissance sont traités pendant plusieurs années par une injection quotidienne unique de la somatropine, ce qui a un impact considérable sur la vie des patients. Une administration bimensuelle (réduction du nombre d'injections) aurait des avantages significatifs par rapport aux traitements actuels, notamment l'amélioration des résultats thérapeutiques par amélioration de l'observance du patient et par réduction de la survenue d'effets secondaires. Cette libération prolongée du PA peut être envisagée par l'encapsulation de l'hormone dans des polymères tels que le PLGA ou le PLA. Cette idée a été développée puis le médicament a été mis sur le marché en 1999 par Genentech, mais il a été retiré du marché en 2004 à cause de sa non-compétitivité par rapport au traitement quotidien : la formulation de ce produit était très coûteuse et la production d'un batch ne pouvait se faire qu'en deux semaines.

La technologie CriticalMix® des laboratoires Critical pharmaceuticals (utilisée pour des injectables à libération prolongée) dérive du procédé PGSS et a été exploitée par Jordan *et al.* (106) en 2010 pour l'encapsulation d'hormone de croissance humaine dans du PLGA/PLA. Le taux d'encapsulation de l'hormone dans le PLGA est compris entre 97,1 et 100 % (en comparaison, le taux d'encapsulation obtenu par le procédé en émulsion est de 50%), sans dégradation du PA ou baisse de l'activité protéique *in vitro*, ni agrégation des particules obtenues. Pour une des formulations obtenues (ratio PLGA/PLA de 90/10), 90% des particules obtenues sont inférieures à 100 µm avec un diamètre moyen de 61 µm, ce qui convient à une injection sous-cutanée si les particules sont dispersées dans un vecteur adapté. Les essais sur des primates montrent une libération prolongée sur une période de 7 à 14 jours après une injection sous-cutanée unique (sans inflammation sous-cutanée ni réponse inflammatoire chronique), ce qui permet d'envisager des taux plasmatiques maintenus pendant plusieurs jours à plusieurs semaines. Cette formulation est actuellement en phase I d'essai clinique.

### **3.2. Le traitement des troubles psychiatriques**

La rispéridone est le médicament le plus prescrit de sa catégorie pour le traitement de la schizophrénie et autres troubles psychiatriques et est le seul médicament approuvé par la FDA pour le traitement de la schizophrénie chez les adolescents puisqu'elle produit moins d'effets secondaires que les médicaments antipsychotiques classiques.

La technologie CriticalMix® permet de formuler la rispéridone sous forme d'une injection à action prolongée. Le médicament permettrait de ne réaliser qu'une administration toutes les deux semaines et s'apprête à entrer en phase de développement préclinique.

### **3.3. Le vaccin anti-tétanique**

L'utilisation de polymères biodégradables pour encapsuler et libérer des produits injectables à libération contrôlée comme les protéines recombinantes, les peptides et l'ADN est très développée. L'un des axes de recherche est le développement de vaccins à dose unique et à libération contrôlée. Jusqu'à présent, la plupart des vaccins s'administrent en plusieurs fois et en l'espace de plusieurs mois, dans le but de développer une réponse immunitaire efficace.

Mais l'observance des patients est parfois faible, c'est pourquoi l'idée de développer des vaccins à dose unique est intéressante. Les avantages sont multiples : meilleure observance du patient, coût du traitement plus faible et diminution du nombre d'administrations. Les vaccins actuellement mis sur le marché utilisent généralement des adjuvants tels que des sels d'aluminium pour générer des réponses immunitaires fortes. Cependant, cet adjuvant a une compatibilité limitée avec les antigènes, et est incapable d'induire une réponse des lymphocytes T importante dans les infections virales et parasitaires. Les vaccins à base de microparticules sont intéressants puisqu'ils permettent d'encapsuler une large gamme d'antigènes, induisent une réponse des lymphocytes T et suffisamment stables pour envisager une administration orale, nasale ou parentérale. La taille des particules influe sur le taux de libération des antigènes et l'immunogénicité. Les particules de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  agissent comme une réserve après l'injection tandis que les particules inférieures à 10  $\mu\text{m}$  peuvent être phagocytées par les macrophages.

Le vaccin tétanos-toxoïde est utilisé dans la prévention du tétanos. Il s'agit d'une suspension stérile de toxoïde (toxine inactivée) et d'un sel d'aluminium (adjuvant renforçant l'immunogénicité) dans une solution de chlorure de sodium, et est administré par voie intramusculaire en trois fois, généralement en même temps que le vaccin contre la diphtérie.

Cette étude (107) permet de formuler ce vaccin à l'aide de la technologie NanoMix®, méthode d'encapsulation en FSC. Cette technologie exploite la faculté du  $\text{CO}_2$  SC à se dissoudre dans des polymères tels que le PLA ou le PLGA, ce qui abaisse la température de transition vitreuse et permet de liquéfier le polymère. Le PA est alors mélangé de manière homogène dans le polymère, avec pour avantage de travailler à des températures ambiantes et sans utiliser de solvants organiques. Le but de l'étude est alors de comparer le temps de la réponse immunitaire obtenue avec cette formulation avec celle obtenue avec les formulations commercialisées contenant de l'aluminium et à injection multiple. Sur les souris, la réponse immunitaire est obtenue en 154 jours dans les deux types de formulations. Le taux d'encapsulation du PA dans le PLA est d'environ 80%, avec un maintien de l'antigénicité et de l'activité biologique.

**CHAPITRE 4 :**

**LIMITES DE LA TECHNOLOGIE**

**EN FLUIDE SUPERCRITIQUE,**

**INDUSTRIALISATION ET**

**CONCLUSION**

## 1. LIMITES DE LA TECHNOLOGIE

Le traitement du solide voit actuellement émerger les premières réalisations en Allemagne, en France et aux Etats-Unis. D'importants groupes industriels rachètent de petites structures de recherche parauniversitaires ou privées, ce qui constitue un indicateur pertinent du potentiel de ce secteur, même si une fois de plus les réalisations ne sont pas en adéquation avec l'important travail de recherche qui lui est consacré. D'autres entreprises font appel à la sous-traitance car ne possèdent pas d'unités de production en FSC (1). Les limitations à l'essor des technologies SC sont de plusieurs ordres : financiers, technologiques ou intellectuels.

En premier lieu, le problème des coûts demeure l'obstacle majeur. Selon le type d'application, les pressions mises en œuvre sont de l'ordre de un à quelques centaines de bars, ce qui se traduit inévitablement par un investissement important. Il a été montré que le prix de ces équipements diminue plus rapidement avec leur capacité que celui des équipements conventionnels. Malheureusement, un des créneaux les plus prometteurs, celui des applications pharmaceutiques, est caractérisé par de faibles quantités de production en comparaison à la chimie lourde par exemple. Le coût d'investissement, souvent présenté comme un frein au développement industriel des FSC, semble pourtant de relative faible importance en pharmacie, en raison de la valeur ajoutée des molécules traitées qui peut atteindre plusieurs dizaines de milliers d'euros par gramme. Le problème du changement d'échelle reste posé et rares sont les articles s'intéressant à ce problème. Cependant, l'échelle industrielle peut aussi être synonyme d'installations de petites tailles, dans la mesure où la production annuelle peut représenter des volumes de l'ordre de la tonne, ce qui est le cas par exemple pour certaines protéines thérapeutiques.

Au-delà des études de laboratoire, le développement et la commercialisation de médicaments ainsi formulés requièrent la mise en place d'équipements adaptés, conformes aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Il faut assurer la sécurité des installations fonctionnant à haute pression (entre 50 et 300 bar) avec des risques d'émission de poudres fines ou d'aérosols de produits actifs. La manipulation de solvants, de fluides combustibles, de poudres organiques nécessitent parfois des installations opérant en atmosphère explosive. La manipulation de poudres submicroniques à haute activité biologique doit être sécurisée puisque leur toxicité n'est pas toujours bien connue. Enfin, il est nécessaire de pouvoir être certain d'assurer la gestion de FSC. Dans le cas des installations SC, on rencontre des

difficultés particulières dans la mise en place de systèmes de nettoyage en place, de nombreux dispositifs n'étant pas disponibles pour une utilisation à haute pression. Malgré ces contraintes, les performances des procédés SC sont telles que de nombreuses formulations sont actuellement en développement avancé. Elles permettent d'espérer une arrivée sur le marché de médicaments novateurs formulés à l'aide d'un FSC dans les toutes prochaines années.

En résumé, les problèmes réglementaires, notamment de BPF, sont à considérer, mais ce sont des domaines aujourd'hui bien maîtrisés par les sociétés du secteur. Le fonctionnement des installations ne constitue pas une limitation économique et s'avère même plutôt compétitif en face des procédés traditionnels dans la mesure où le FSC le plus couramment employé ( $\text{CO}_2$ ) est d'un coût très bas, et peut même, dans la plupart des cas, être recyclé. Les coûts de fonctionnement résident principalement dans la main d'œuvre et les cycles de compression et détente effectués pour isoler les produits formés. Une optimisation de ces étapes s'avère donc être une nécessité pour améliorer la rentabilité du procédé.

## 2. INDUSTRIALISATION

De façon à transposer de manière convenable les technologies en FSC de la paillasse à l'échelle industrielle, et à rendre les procédés en FSC fiables et rentables, il est nécessaire de maîtriser toutes les étapes et tous les paramètres du procédé (débits, pressions, températures, ...). La connaissance de ces caractéristiques doit être effectuée à l'échelle du laboratoire, pendant laquelle on s'efforcera aussi d'optimiser la taille des particules obtenues ainsi que la distribution granulométrique du PA.

On peut alors envisager un premier « scale-up » de façon à se rendre compte des résultats obtenus sur des équipements de capacité supérieure. Des équipements de capacité intermédiaire permettent alors de produire des lots tests qui pourront être étudiés. Le fait de ne pas transposer directement la technologie à l'échelle industrielle est une mesure de sécurité qui permet de limiter des investissements parfois inutiles. Les essais réalisés à l'échelle semi-industrielle permettent d'ajuster certains paramètres de travail, notamment en terme de consommation de  $\text{CO}_2$ , de pressions et de températures mises en œuvre. Il sera aussi possible à ce moment là de dimensionner les équipements de manière plus précise pour les rendre davantage performants. Enfin, suite à cette production test et si les résultats des lots tests sont satisfaisants, la technologie peut être envisagée pour une production industrielle. Comme pour

toute installation industrielle, il faudra alors réfléchir à l'environnement de l'unité de fabrication, à son ergonomie et à toutes les utilités qui doivent s'y trouver (7).

Le processus de production de médicaments micro- et nanoparticulaires commence par un contrat de recherche pour déterminer les conditions dans lesquelles le PA peut être fabriqué sous forme de micro- ou de nanoparticules. On a vu précédemment qu'actuellement, la plupart des industries pharmaceutiques souhaitant utiliser les procédés SC font appel à des sous-traitants. Le client devra alors fournir le médicament en vrac ainsi que des informations suffisantes pour identifier un solvant approprié. Le sous-traitant utilisera alors ce matériel et les informations relatives au PA fourni pour produire des lots d'essai du médicament en tant que matière micro- ou nanoparticulaire. Le médicament formulé est ensuite retourné au client pour évaluer sa biodisponibilité entre autres, et, dans un processus itératif, une formulation optimale est développée. A ce stade, un deuxième contrat est négocié pour produire des quantités suffisantes du médicament dans les conditions BPF (ou GMP) pour effectuer la phase I et/ou la phase II des essais cliniques. Si ces essais sont concluants, la production est réalisée à grande échelle de façon à produire des quantités suffisantes pour les essais cliniques de phase III. Enfin, si l'approbation est obtenue, un contrat pour la fabrication du produit commercial est envisagé.

De façon à pouvoir commercialiser le produit, il est indispensable d'avoir à disposition des équipements de production destinés à fonctionner à grande échelle et capables de fournir des quantités répondant à la demande. La technologie en FSC offre là plusieurs avantages : le procédé se faisant en une étape unique, l'équipement est plus facile à modéliser et à envisager que pour un procédé en plusieurs étapes. L'équipement doit être fabriqué en acier inoxydable et doit être conçu pour rendre la maintenance la plus simple possible. Il implique l'utilisation de peu de solvants. La compréhension des nombreux phénomènes mis en jeu lors du procédé (mécanismes de formation des particules, transferts de masse, ...) permet de concevoir au mieux l'installation et les utilités nécessaires. Thies et Muller (108) sont parvenus à développer un procédé ASES permettant de produire 200 g de particules de PLA tandis que d'autres industriels, notamment Bradford Particle Design, parviennent à produire une tonne de produit par an, dans les conditions GMP.

### **3. LA TECHNOLOGIE EN FLUIDES SUPERCRITIQUES : FUTURISTE OU SCIENCE-FICTION ?**

En premier lieu, ces méthodes ont fourni, dans de nombreux cas, des solutions lorsque les techniques traditionnelles n'étaient pas à même d'apporter des réponses satisfaisantes.

En second lieu, les contraintes de coût évoquées plus haut ont contraint, pour le court terme, à cibler les recherches sur des molécules à haute valeur ajoutée, susceptibles de justifier les surcoûts. Cette orientation « obligée » a permis de mettre en évidence de nouvelles niches d'application dans lesquelles ces technologies deviennent concurrentielles. Enfin, ces techniques sont avant tout des techniques propres impliquant peu ou pas de solvants organiques, alors que la législation en matière de sécurité et de protection de l'environnement évolue sans cesse vers des normes de plus en plus drastiques. En particulier, de façon graduelle mais inéluctable, la liste des solvants licites s'est considérablement réduite récemment. Cette situation contraint les industriels à trouver des solutions alternatives, soit en modifiant le procédé de fabrication, soit en trouvant un solvant de substitution pour celui désormais interdit. Il est clair qu'à terme, cette évolution de la législation ne peut qu'être favorable au développement des techniques SC qui deviennent ainsi une solution de recours. En outre, il faut ajouter que la connotation de « procédé propre » devient dans l'esprit des industriels un argument de marketing.

En conclusion, les FSC offrent une alternative intéressante à l'usage des solvants traditionnels, mais leur développement au stade industriel est à court terme freiné par leur coût. L'évolution de la législation en matière de protection de l'environnement constitue à n'en pas douter un de leurs meilleurs atouts à moyen terme. En effet, si des limitations technologiques subsistent toujours, l'intense recherche actuellement consacrée à leur réduction devrait permettre l'émergence définitive de ces méthodes.

De nombreuses sociétés pharmaceutiques suivent activement ce domaine de recherches, certaines d'entre elles sont citées dans le Tableau 18. Il est probable, en 2011, que nous soyons proches de la première annonce d'une unité de production industrielle d'un médicament utilisant l'un ou l'autre des procédés décrits précédemment (18).

Société / Collaboration (C) ou Rachat (R)	Procédés	Référence du brevet si existant(année)
Allied Corporation	Enrobage	
Aphios Corporation	Liposomes de PA hydrophobes Microsphères Camposomes® Taxosomes®	US 5 776 486 (1998) US 7147806 (2004)
Bristol-Myers Squibb / Bradford Particle Design (C)	Coformulation	WO 2001015664 (2001)
Critical Pharmaceuticals	CriticalMix®	US 20110172141 (2011)
Crititech	Encapsulation	US 7744923 (2007)
Crystec Pharma		
Ethypharm (Mainelab)	Microparticules à libération prolongée pour injection Microcapsules	WO 2001089481 (2001) FR 2 809 309 (2000) FR 9 813 136 (1998)
Ferro Corporation	Nano- et microparticules	US 20060076293 (2006)
FeyeCon	Co-cristal	US 20100184744 (2010)
GSK / Lavipharm (R)		
Inhale Therapeutic System / Bradford Particle Design (R)		
Johnson et Johnson / Inhale Therapeutic System (C)		
Lavipharm	Particules	
Lavipharm / Separex (R)	Encapsulation	WO 2001049407 (2001)
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	Méthodes et appareils de production de liposomes	WO 2002032564 (2001)
Nektar Therapeutics	Particules destinées à être inhalées  Particules	US 6838076 (2002) US 2004017639 (2004) US 20060165606 (2006) US 7 087 197 (2006) US 7 150 766 (2006)
Pierre Fabre	Enrobage de poudres Imprégnation Inclusion  Formulplex® Formuldisp® Formulcoat®	FR 2 874 836 (2004) FR 2 945 449 (2009) FR 2 868 315 (2004) US 20070270379 (2005)
RTP Pharma, Inc.	Particules submicrométriques, PA hydrophobes, particules à surfaces modifiées	US 6 177 103 (2001)
Separex	Encapsulation Particules composites Inclusion	FR 2 803 539 (2000) FR 2 943 543 (2009) US 7 291 296 (2007)
Thar Technologies	Nano- et microparticules	
XSpray	RightSize® Particle technology	

Tableau 18 : Sociétés investissant dans la formulation galénique par le CO<sub>2</sub> supercritique (liste non exhaustive)

# BIBLIOGRAPHIE

1. **BADENS, E., BOUTIN, O. et CHARBIT, G.** Les fluides entre deux états : une alternative potentielle pour la préservation de l'environnement. *Echos SC*. Décembre 2005, 2, pp. 4-7.
2. **DELATTRE, L.** Applications pharmaceutiques du dioxyde de carbone supercritique. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Elsevier Masson SAS, 2007, Vol. 65, 1, pp. 58-67.
3. **BRADU, B.** Bibnum. [En ligne] 2008. [Citation : 23 Septembre 2010.] <http://www.bibnum.education.fr/physique/thermodynamique/1%E2%80%99h%C3%A9lium-liquide#>.
4. **SAMVURA, J.-C.** Utilisation du CO2 supercritique dans le domaine agro-alimentaire. [En ligne] [Citation : 22 Janvier 2011.] <http://www.ptaa.be/Newsletter10/CO2%20Supercritique.pdf>.
5. **LUMIA, G.** Utilisation du CO2 supercritique comme solvant de substitution. *Techniques de l'Ingénieur*. 2002, IN-5, pp. 1-6.
6. **IFSI, Colmar.** Cours de Pharmacocinétique de l'IFSI de Colmar. [En ligne] [Citation : 21 Juillet 2011.] <http://ifsicolmar.perso.neuf.fr/cours.html>.
7. **KOMUNJER, L.** *Formulation des solides divisés - Des procédés aux propriétés d'usage*. s.l. : EDP Sciences, 2009. Vol. 14. ISBN 978-2-7598-0367-5.
8. **EMA.** European Medicines Agency. *Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. [En ligne] 2001. [Citation : 16 Juin 2011.] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003519.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003519.pdf).
9. **Department of Health and Human Services U.S. ; Food and Drug Administration ; Center for Drug Evaluation and Research.** Guidance for Industry - Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. [En ligne] Août 1997. [Citation : 11 Septembre 2011.] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>.
10. **QIU, Y. et ZHANG, G.** Research and development aspects of oral controlled-release dosage forms, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York : D.L. Wise, 2000, pp. 465-504.
11. **AMIJI, M.M. et SANDMANN, B.J.** *Applied physical pharmacy*. s.l. : McGraw-Hill Companies, 2003. ISBN 0-07-135076-4.
12. **BANKER, G.S. et RHODES, C.T.** *Modern pharmaceuticals*. 4ème édition. s.l. : Marcel Dekker, 2006. Vol. 121. ISBN 0-8247-0674-9.
13. **FDA.** The Biopharmaceutics Classification System (BCS) - Guidance for industry. [En ligne] Août 2000. [Citation : 11 Juillet 2011.] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>.
14. **Absorption Systems.** BCS Biowaivers Background Information. [En ligne] [Citation : 11 Juillet 2011.] <http://www.absorption.com/site/services/bcs/background/default.aspx>.

15. **VAUBOURDOLLE, M.** *Médicaments*. 3ème édition. 2007. Vol. 4, Coll. Le Moniteur Internat.
16. **AIACHE, J.-M., et al.** Formes à libération modifiées destinées aux voies orale et parentérale. [auteur du livre] Michel VAUBOURDOLLE. [éd.] Wolters Kluwer. *Médicaments*. 3è édition. 2007, Vol. IV, pp. 183-220.
17. *Solid state morphology of particles prepared by a supercritical fluid process.* **PERRUT, M., JUNG, J. et LEOEUF, F.** Venice : s.n., 2003. 4th International Symposium on High Pressure Technology and Chemical Engineering.
18. **FAGES, J., et al.** Élaboration de solides divisés par fluides supercritiques. *Techniques de l'Ingénieur*. 2005, pp. 1-12.
19. **PERRUT, M.** Applications industrielles des fluides supercritiques et équipements de mise en oeuvre. *Techniques de l'Ingénieur*. J4950, pp. 1-9.
20. **FAGES, J., et al.** La génération de solides divisés par fluides supercritiques. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2003, Vol. 81, pp. 161-175.
21. *Pharmaceutical applications of Supercritical Fluids.* **PERRUT, M.** Bordeaux : s.n., 2002. Invited lecture at the 8th Meeting on supercritical fluids .
22. **SMITH, R., et al.** Performance of capillary restrictors in supercritical fluid chromatography. *Analytical Chemistry*. 1986, Vol. 58, pp. 2057-2064.
23. **SAUCEAU, M.** *Mesure et modélisation de la solubilité des composés solides dans des fluides supercritiques : application à la génération de poudres.* 2001. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris.
24. **THAKUR, R. et GUPTA, R.B.** Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solutions with solid cosolvent (RESS-SC) process. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 2006, Vol. 308, pp. 190-199.
25. **SHEKUNOV, B.Y. et SUN, Y.** Surface tension of ethanol in supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*. 2003, Vol. 27, pp. 73-83.
26. **GINTY, P., et al.** Drug delivery goes supercritical. *Nanotoday*. Elsevier, Août 2005.
27. **GALLAGHER, P. M., et al.** Gas Antisolvent Recrystallization : New Process To Recrystallize Compounds Insoluble in Supercritical Fluids. *Supercritical Fluid Science and Technology*. American Chemical Society, 29 Août 1989, chap. 22, pp. 334-354.
28. **CHARBIT, G., BADENS, E. et BOUTIN, O.** Methods of Particle Production. *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development*. 2004, chap. 4.
29. **ROY, C.** *Génération de particules par un procédé assisté par CO<sub>2</sub> comprimé : cristallisation et formulation.* Paris : s.n., 2008. Thèse.
30. **MARRE, S.** *Ingénierie de surface des matériaux en milieux fluides supercritiques.* Bordeaux : s.n., 2006. Thèse de doctorat.
31. **BENOIT, J.-P. et RICHARD, J.** Microencapsulation. *Les Techniques de l'Ingénieur*. 10 03 2000, J2210.
32. **SIEVERS, R.E., et al.** Supercritical and near-critical carbon dioxide assisted low-temperature bubble drying. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2000, Vol. 39, pp. 4831-4836.

33. **REVERCHON, E.** Supercritical-Assisted Atomization To Produce Micro- and/or Nanoparticles of Controlled Size and Distribution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2002, Vol. 41.
34. **DELLA PORTA, G., DE VITTORI, C. et REVERCHON, E.** Supercritical Assisted Atomization : A Novel Technology for Microparticles Preparation of an Asthma-controlling Drug. *Pharmaceutical Science & Technology*. 2005, Vol. 6, 3.
35. **REVERCHON, E., DELLA PORTA, G. et PALLADO, P.** Supercritical antisolvent precipitation of salbutamol microparticles. *Powder Technology*. Elsevier, 2001, Vol. 114, pp. 17-22.
36. **KIM, Y.H. et SHING, K.S.** Supercritical fluid-micronized ipratropium bromide for pulmonary drug delivery. *Powder Technology*. Elsevier, 2008, Vol. 182, pp. 25-32.
37. **REVERCHON, E. et DELLA PORTA, G.** Terbutaline microparticles suitable for aerosol delivery produced by supercritical assisted atomization. [éd.] Elsevier. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, 258, pp. 1-9.
38. **MARTIN, T.M., et al.** Preparation of Budesonide and Budesonide-PLA Microparticles Using Supercritical Fluid Precipitation Technology. *Pharmaceutical Science & Technology*. 2002, Vol. 3, 3.
39. **MARTIN, A. et COCERO, M.-J.** Micronization processes with supercritical fluids : Fundamentals and mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews - Drug Delivery Applications of Supercritical Fluid Technology* . Vol. 60, 3.
40. **CALDERONE, M. et RODIER, E.** *Procédé d'enrobage de poudres*. WO2006/030112 2006.
41. **MAINELAB.** *Microparticules pour administration pulmonaire*. 9910411 France, 11 Août 1999.
42. **BENOIT, J.P., et al.** Sphéroïdes et formes vectorisées. [En ligne] 2007. [Citation : 21 Janvier 2011.] hal.archives-ouvertes.fr.
43. **LESOIN, L.** *Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques*. Aix-Marseille : s.n., 2011. Thèse de Doctorat.
44. **KIM, JH, PAXTON, TE et TOMASKO, DL.** Microencapsulation of naproxen using rapid expansion of supercritical solutions. *Biotechnology Progress*. 1996, Vol. 12, pp. 50-61.
45. **TOM, J.W., DEBENEDETTI, P. et JEROME, R.** Precipitation of poly(L-lactic acid) and composite poly(L-lactic acid)-pyrene particles by rapid expansion of supercritical solutions. *Journal of Supercritical Fluids*. 1994, Vol. 7, pp. 9-29.
46. **LORIN, A., et al.** Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2004, Vol. 3, 8, pp. 163-176.
47. **CANTO, A.** Des techniques de plus en plus complexes pour les comprimés. *Industrie Pharma Magazine*. Décembre 2004 - Janvier 2005, 12, pp. 54-56.
48. **CASTOR, T.P.** *Methods and apparatus for making liposomes*. US005554382A Etats-Unis, 1993.
49. *Formation and physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method*. **OTALE, K., et al.** Versailles (France) : s.n., 2003. 6th International Symposium on supercritical fluids.

50. **SHINDE, G.V., et al.** Supercritical fluids, a potential approach for novel drug formulation - A review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2009, pp. 5-12.
51. **SEPAREX.** *Procédé de fabrication de très fines particules constituées d'un principe actif inséré dans une molécule hôte*. 0013393 France, 19 Octobre 2000.
52. **ALLO, O., BLANC, P. et DALMASSO, M.-A.** *Pharmacie galénique B.P. (Cahiers du préparateur en pharmacie)*. 2ème édition. s.l. : Groupe Liaisons SA, 2005. pp. 86-88.
53. **LOFTSSON, T. et BREWSTER, M.** Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. American Pharmaceutical Association and American Chemical Society, 1996, Vol. 85, 10, pp. 1017-1025.
54. **KANETO, U.** Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. 2002, Vol. 44, pp. 3-7.
55. **HIRAYAMA, F. et UEKAMA, K.** Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999, Vol. 36, pp. 125-141.
56. **CHAROENCHAITRAKOOL, M., DEHGHANI, F. et FOSTER, N.R.** Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier Science, 2002, Vol. 239, 1-2.
57. **Pierre Fabre Médicaments.** Supercritical Solutions. [www.supercritical-solutions.com](http://www.supercritical-solutions.com). [En ligne] Pierre Fabre laboratories, 2008. [Citation : 11 Juillet 2011.]
58. **ARESTA, M.** *Carbon dioxide recovery and utilization*. s.l. : Kluwer Academic Publisher, 2003. ISBN 1-4020-1409-0.
59. **BANDI, N., et al.** Formulation of Controlled-Release Drug Delivery Systems. [auteur du livre] P. YORK, U.B. KOMPPELLA et B.Y. SHEKUNOV. *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development*. 2004, Vol. 138, chap. 9.
60. **JASPART, S.** *Mise au point et évaluation des microparticules lipidiques solides en vue du développement galénique de préparations pour inhalation à libération prolongée*. Liège : s.n., 2007. Thèse de Pharmacie.
61. **BECQUEMIN, M.-H. et CHAUMUZEAU, J.-P.** L'insuline par voie inhalée : un modèle pour l'absorption systémique pulmonaire ? *Revue des maladies respiratoires*. Elsevier Masson, 2008, pp. 209-222.
62. **RICHARDSON, C.H., et al.** Determination of the Relative Bioavailability of Salbutamol to the Lungs Following Inhalation from Dry Powder Inhaler Formulations Containing Drug Substance Manufactured by Supercritical Fluids and Micronization. *Pharmaceutical Research*. Springer Science + Business Media, Novembre 2007, Vol. 24, 11, pp. 2008-2017.
63. **REHMAN, M., SHEKUNOV, B.Y. et YORK, P.** Optimisation of powders for pulmonary delivery using supercritical fluid technology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 2004, Vol. 22, 1, pp. 1-17.
64. **REVERCHON, E., ADAMI, R. et CAPUTO, G.** Production of Cromolyn Sodium Microparticles for Aerosol Delivery by Supercritical Assisted Atomization. *Pharmaceutical Science and Technology*. 2007, Vol. 8, 4, pp. E1-E9 (Article 114).
65. **STECKEL, H., THIES, J. et MULLER, B.W.** Micronizing of steroids for pulmonary delivery by supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 13 Juin 1997, Vol. 152, 1, pp. 99-110.

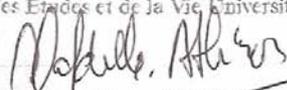
66. **REVERCHON, E. et SPADA, A.** Erythromycin micro-particles produced by supercritical fluid atomization. *Powder Technology*. Elsevier, 2004, Vol. 141, pp. 100-108.
67. **ZHIYI, L., et al.** Experimental investigation on the micronization of aqueous cefadroxil by supercritical fluid technology. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2009, Vol. 48, pp. 247-252.
68. **PATTON, J.S.** Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996, Vol. 19, 1, pp. 3-36.
69. **COURRIER, H.M., BUTZ, N. et VANDAMME, T.F.** Pulmonary drug delivery systems : Recent developments and prospects. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2002, Vol. 19, 4-5, pp. 425-498.
70. *L'année 2008 du médicament : gare à la non-qualité. Prescrire.* 304, Février 2009, La revue Prescrire, Vol. 29, pp. 138-144.
71. **TOM, J.W. et DEBENEDETTI, P.** Particle formation with supercritical fluids — a review. *Journal Aerosol Science*. 1991, 22, pp. 551-584.
72. **SNAVELY, W.K., et al.** Micronization of Insulin from halogenated alcohol solution using supercritical carbon dioxide as an antisolvent. *Journal of pharmaceutical sciences*. American Pharmaceutical Association, 2002, Vol. 91, 9, pp. 2026-2039.
73. *Preparation of inhalable protein particles by SCF-emulsion drying.* **JUNG, J., LEBOEUF, F. et PERRUT, M.** [éd.] Kikic I., Perrut M. Brunner G. Versailles (France) : s.n., 2003. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids. pp. 1837-1842.
74. **PYO, D.** Two Different Shapes of Insulin Microparticles Produced by Solution Enhanced Dispersion Supercritical Fluid (SEDS) Process. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2009, Vol. 30, 5, pp. 1215-1217.
75. **Critical Pharmaceuticals.** Supercritical CO<sub>2</sub> : A fizzy solution for drug formulation. *Innovations in Pharmaceutical Technology*. 2011.
76. **KALANTARIAN, P., et al.** Preparation of 5-fluorouracil nanoparticles by supercritical antisolvents for pulmonary delivery. *International Journal of Nanomedicine*. Dovepress, 2010, pp. 763-770.
77. **CHEN, A.-Z., et al.** Development of core-shell microcapsules by a novel supercritical CO<sub>2</sub> process. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*. Springer, 2009, Vol. 20, 3, pp. 751-758.
78. *Microparticles prepared in supercritical fluids inhalable drug delivery systems.* **PELLIKAAN, H., et al.** Versailles (France) : s.n., 2003. Proceedings of the Sixth International Symposium on Supercritical Fluids.
79. **Innovation Fluides Supercritiques.** Innovation Fluides Supercritiques. [En ligne] [Citation : 3 Décembre 2010.] [www.supercriticalfluid.org](http://www.supercriticalfluid.org).
80. **HUANG, Z., et al.** Formation of ultrafine aspirin particles through rapid expansion of supercritical solutions (RESS). *Powder Technology*. Elsevier, 2005, Vol. 160, pp. 127-134.
81. **KAYRAK, D., AKMAN, U. et HORTACSU, O.** Micronization of ibuprofen by RESS. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2003, Vol. 26, pp. 17-31.
82. *Elaboration of ibuprofen microcomposites in supercritical CO<sub>2</sub>.* **CRISTINI, F., et al.** 2003. 6th International Symposium on Supercritical Fluids.

83. **WANG, X., et al.** Preparation of ibuprofen/lipid composite microparticles by supercritical fluid technique. *Frontiers in Chemical Engineering in China*. Higher Education Press and Springer, 2008, Vol. 2, pp. 361-367.
84. **KALANI, M., YUNUS, R. et ABDULLAH, N.** Optimizing supercritical antisolvent process parameters to minimize the particle size of paracetamol nanoencapsulated in L-poly lactide. *International Journal of Nanomedicine*. Dovepress, 2011, Vol. 6, pp. 1101-1105.
85. **CHONG, G.H., et al.** Coating and Encapsulation of Nanoparticles using Supercritical Antisolvent. *American Journal of Applied Sciences*. Science Publications, 2009, Vol. 6, 7, pp. 1352-1358.
86. **BAYKARA, T et KARATAS, A.** Preparation of acetaminophen microcapsules by coacervation phase separation method. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 1993, Vol. 19, pp. 587-601.
87. **LOCHARD, H. et FREISS, B.** *Procédé d'imprégnation par CO<sub>2</sub> supercritique*. 0953221 France, 15 Mai 2009.
88. **HEZAVE, A.Z.i, AFTAB, S. et ESMAEILZADEH, F.** Micronization of ketoprofen by the rapid expansion of supercritical solution process. *Journal of Aerosol Science*. Elsevier, 2010, 41, pp. 821-833.
89. **VAN HEES, T., et al.** Application of Supercritical Carbon Dioxide for the Preparation of a Piroxicam-beta-Cyclodextrin Inclusion Compound. *Pharmaceutical Research*. 1999, Vol. 16, 12.
90. **SAUCEAU, M., RODIER, E. et FAGES, J.** Preparation of inclusion complex of piroxicam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2008, Vol. 47, pp. 326-332.
91. **KALOGIANNIS, C.G., PAVLIDOU, E. et PANAYIOTOU, C.G.** Production of Amoxicillin Microparticles by Supercritical Antisolvent Precipitation. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2005, Vol. 44, pp. 9339-9346.
92. **REVERCHON, E., DELLA PORTA, G. et FAVILENE, M.G.** Process parameters and morphology in amoxicilline micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation. *Journal of Supercritical Fluids*. 2000, 17, pp. 239-248.
93. **MONTES, A., et al.** Co-precipitation of amoxicillin and ethyl cellulose microparticles by supercritical antisolvent process. *The Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2011, Vol. 60, pp. 75-80.
94. **TENORIO, A., et al.** Controlled submicro particle formation of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2007, Vol. 40, pp. 308-316.
95. **CHANG, Y.-P., TANG, M. et CHEN, Y.-P.** Micronization of sulfamethoxazole using the supercritical anti-solvent process. *Journal of Materials Sciences*. 2008, Vol. 43, pp. 2328-2335.
96. **AL-MARZOUQI, A.H., et al.** Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier, 2009, Vol. 49, pp. 227-233.
97. **HASSAN, H.A., et al.** Enhancement of dissolution amount and in vivo bioavailability of itraconazole by complexation with beta-cyclodextrin using supercritical carbon dioxide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier, 2007, Vol. 45, pp. 243-250.

98. **LEE, S.-Y., et al.** Preparation of itraconazole/HP-beta-CD inclusion complexes using supercritical aerosol solvent extraction system and their dissolution characteristics. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2008, Vol. 44, pp. 400-408.
99. **MONEGHINI, M., et al.** Processing of carbamazepine-PEG 4000 solid dispersions with supercritical carbon dioxide : preparation, characterisation, and in vitro dissolution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, Vol. 222, pp. 129-138.
100. **MONEGHINI, M., et al.** Study of the solid state of carbamazepine after processing with gas anti-solvent technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003, Vol. 56, pp. 281-289.
101. **SETHIA, S et SQUILLANTE, E.** Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, Vol. 272, pp. 1-10.
102. **BOLTEN, D. et TURK, M.** Micronisation of carbamazepine through rapid expansion of supercritical solutions (RESS). *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier, 2011. In Press, Corrected Proof.
103. **JUN, S.W., et al.** Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier, 2007, Vol. 66, pp. 413-421.
104. **TANDYA, A, DEGHANI, F. et FOSTER, N. R.** Micronisation of cyclosporine using dense gas techniques. *Journal of Supercritical Fluids*. 2006, Vol. 37, pp. 272-278.
105. **MAINELAB et ETHYPHARM.** *Microsphères à libération prolongée pour administration injectable*. 0006587 23 Mai 2000.
106. **JORDAN, F., et al.** Sustained release hGH microsphere formulation produced by a novel supercritical fluid technology : in vivo studies. *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 2010, Vol. 141, pp. 153-160.
107. **BAXENDALE, A., et al.** Single shot tetanus vaccine manufactured by a supercritical fluid encapsulation technology. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 2011, Vol. 413, pp. 147-154.
108. **THIES, J. et MULLER, BW.** Size controlled production of biodegradable microparticles with supercritical gases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998, Vol. 45, 1, pp. 67-74.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 6 janvier 2012

<p style="text-align: center;"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par Caroline MATHIEU</p> <p><u>Sujet</u> : Le dioxyde de carbone supercritique : un fluide prometteur dans la formulation pharmaceutique</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme Francine KEDZIEREWICZ, Maître de conférences      Directeur : Mme Danielle BARTH, Professeur</p> <p>Juges : M. Rémi SIMON, Pharmacien-Ingénieur Procédés      Mme Véronique FALK, Maître de conférences</p>	<p style="text-align: center;">Vu,</p> <p style="text-align: center;">Nancy, le 9 décembre 2011</p> <p style="text-align: center;">Le Président du Jury      Le Directeur de Thèse</p> <p style="text-align: center;">   </p> <p style="text-align: center;"><b>Mme KEDZIEREWICZ    Mme BARTH</b></p>
<p style="text-align: center;">Vu et approuvé,</p> <p style="text-align: center;">Nancy, le 12-12-11</p> <p style="text-align: center;">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p style="text-align: center;">   <b>Francine PAULUS</b> </p>	<p style="text-align: center;">Vu,</p> <p style="text-align: center;">Nancy, le 19.12.2011</p> <p style="text-align: center;">Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p style="text-align: center;">         Pour le Président          et par Délégation,          La Vice-Présidente du Conseil          des Etudes et de la Vie Universitaire,    <b>Jean-Pierre FINANCE</b>          C. CARDEVILLE-ATKINSON       </p> <p style="text-align: center;">N° d'enregistrement : 3865</p>

N° d'identification : 3865

**TITRE :**

Le dioxyde de carbone supercritique : un fluide prometteur dans la  
formulation pharmaceutique

Thèse soutenue le 6 janvier 2012  
Par Caroline MATHIEU

**RESUME :**

A ce jour, de nombreuses molécules d'intérêt pharmaceutique sont stoppées dans leur développement en raison d'une trop faible solubilité dans les fluides biologiques et par conséquent une activité moindre au sein de l'organisme. Plusieurs voies de recherche sont alors possibles : imaginer et développer de nouvelles molécules plus solubles, améliorer les propriétés physico-chimiques des molécules déjà existantes, ou offrir aux substances actives un environnement favorable à leur dissolution dans l'organisme. Ces deux dernières solutions vont être exploitées dans ce travail de thèse, plus particulièrement en ayant recours à l'utilisation de dioxyde de carbone supercritique.

Les techniques en fluides supercritiques ont plusieurs objectifs : certaines sont conçues pour réduire la taille des particules afin d'envisager une administration par des aérosols ou en vue d'améliorer leur solubilité et donc leur biodisponibilité. D'autres sont développées dans le but d'obtenir une libération contrôlée du médicament, par encapsulation, par la formation de liposomes ou par inclusion du principe actif dans des complexes de type cyclodextrine.

Nous verrons que ces techniques permettent en outre de limiter la présence de solvants résiduels dans les particules finales, de travailler avec des procédés en une seule étape sous des conditions de travail douces, de limiter l'utilisation de solvants potentiellement dangereux, et enfin de recycler les solvants utilisés.

**MOTS-CLES :** dioxyde de carbone, supercritique, biodisponibilité, médicament, formulation galénique, dissolution, absorption, principe actif, solubilité, micronisation, encapsulation, liposome, cyclodextrine

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr Danielle BARTH	LRGP	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/> 3

**Thèmes :**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation/Nutrition  
6 – Pratique professionnelle