



HAL
open science

Administration par voie orale des composés BCS classe II : réponses galéniques au problème de la faible solubilité aqueuse

Audrey Gierden

► **To cite this version:**

Audrey Gierden. Administration par voie orale des composés BCS classe II : réponses galéniques au problème de la faible solubilité aqueuse. Sciences pharmaceutiques. 2016. hal-01734470

HAL Id: hal-01734470

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734470>

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2016

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 janvier 2016, sur un sujet dédié à

**ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DES COMPOSES BCS
CLASSE II : REPOSES GALENIQUES AU PROBLEME DE LA
FAIBLE SOLUBILITE AQUEUSE**

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Audrey GIERDEN

Née le 19 juillet 1981

Membres du jury

Président : Mr Philippe MAINCENT, Professeur de pharmacie galénique et biopharmacie

Juges : Mme Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, DR INSERM

Mme Lucie MANACHE-ALBERICI, Pharmacien industriel

Mme Anne SAPIN-MINET, Maître de conférence en pharmacie galénique et biopharmacie

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2015-2016

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsables des échanges internationaux

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Bertrand RIHN

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Francine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY ³	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
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 DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
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 galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY ³ Guillaume SAUTREY ³	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
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

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Alexandre HARLE ³	82	Biologie cellulaire oncologique
------------------------------	----	---------------------------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

³En attente de nomination***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en 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.

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

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

Que je sois couvert 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 Mr Philippe Maincent, professeur de pharmacie galénique et biopharmacie à la faculté de pharmacie de Nancy

pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et de présider son jury, pour sa bienveillance, sa disponibilité, ses encouragements et surtout sa patience.

A Madame Lucie Manache-Alberici, pharmacien industriel

pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse, pour ses précieux conseils, le temps qu'elle m'a accordé et surtout son amitié.

A Madame Sylvie Gigleux, DR INSERM

pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse.

A Madame Anne Sapin-Minet, maître de conférence du laboratoire de pharmacie galénique et biopharmacie à la faculté de pharmacie de Nancy

pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse.

A Madame Roudayna Diab, maître de conférence du laboratoire de pharmacie galénique et biopharmacie à la faculté de pharmacie de Nancy

pour ses corrections claires et rapides.

A l'équipe du PSD de Sanofi-Aventis à Budapest

pour m'avoir si chaleureusement accueillie et intégrée malgré la barrière de la langue, pour m'avoir donné goût à la galénique.

A la Therapeutic Research Unit de M.S. Roberts du Princess Alexandra Hospital à Brisbane

pour leur accueil et le partage de nos expériences tant humaines que scientifiques.

A ma famille...

pour m'avoir donné envie de devenir pharmacien.

A mes amis...

avec qui j'ai grandi d'amphi en salle de TP, de cité U en appartement d'étudiant...

Liste des Abréviations

ABC : ATP binding cassette

ADME : administration, distribution, métabolisme et excrétion

AH : acide hydroxycarboxylique

ATP : adénosine triphosphate

AUC : area under the curve (aire sous la courbe)

BACPT : 7-butyl-10-aminocamptothécine

BCRP : breast cancer resistance protein

BCS : biopharmaceutical classification system (système de classification biopharmaceutique)

BDDCS : Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System

CD : cyclodextrine

C_{max} : concentration maximale

CMC : concentration micellaire critique (partie I); Carboxymethyl cellulose (partie II)

CsA :ciclosporine A

CTS : courant thermo stimulé

CYP P450 : cytochrome P450

Da : dalton

DLS : dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DOC-Na : Docusate de sodium

DP : degré de polymérisation

DS : degré de substitution

DSC : differential scanning calorimetry (calorimétrie à balayage différentiel)

DVS : dynamic vapour sorption (adsorption de vapeur dynamique)

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EPAS : Evaporative Precipitation into Aqueous Solution (précipitation évaporative dans une solution aqueuse)

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid (fluide intestinal simulé à jeun)

FDA : Food and Drug Administration

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid (fluide intestinal simulé nourri)

GRAS : Generally Recognised As Safe (généralement reconnu comme sûr)

10HCPT : 10-hydroxycamptothécine

HLB : Hydrophile-Lipophile Balance (Balance hydrophile/lipophile)

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A

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

HPMC : HydroxyPropyl MéthylCellulose

HPT1 : Human Peptide Transporter 1

ICH : International Conference on Harmonisation

IM : intramusculaire

IV : intraveineuse

IVIVC : corrélation *in vivo/ in vitro*

IVIVR : relation *in vivo/ in vitro*

LCT : Long Chains Triglycerides

LDH : lactate déshydrogénase

LFDS : Low Frequency Dielectric Spectroscopy

LUV : Large Unilamellar vesicles (grands liposomes unilamellaires)

MCT : MonoCarboxylate Transporter (partie I); Medium Chains Triglycerides (partie II)

MDR1 : Multi Drug Resistance 1

MLV : Multilamellar Vesicle (grands liposomes multilamellaires)

MRP: Multidrug Resistance associated Protein

MS : Degré molaire moyen de substitution

MVV : MultiVesicular Vesicles (liposomes multivesiculaires)

NP : NanoParticule

OATP : Organic Anion Transporting Polypeptide

OCT : Organic Cation Transporter

PAMAM : polyamidoamine

PAT: Proton/Amino acid Transporters

PCA : Precipitation with a Compressed Antisolvent

PEG : polyéthylène glycol

PEPT : peptide transporter 1

PG : propylène glycol

PGA : Poly(acide glycolique)

Pgp : glycoprotéine P

PLA : acide polylactique

PLA-TPGS NPs : nanoparticules d'acide polylactique-vitamine E TPGS

PLA-TPGS/MMT NPs : nanoparticules de poly(lactide)-vitamine E TPGS/montmorillonite

PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique)

PLGA/MMT Nps : nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique)-montmorillonite

PM : poids moléculaire

PVP : polyvinyl pyrrolidone

RESAS : Rapid expansion from supercritical to aqueous solution

RH : relative humidity

SEDDS : Self Emulsifying Drug Delivery System

SEOF : Self-emulsifying oil formulations

SEM : Scanning electron microscopy : microscopie à balayage électronique

SFL : spray freezing into liquid

SLC : solute carrier

SLN : solid lipid nanoparticules

SMEDDS : Self micro Emulsifying Drug Delivery System

S-SEDDS : supersaturated Self Emulsifying Drug Delivery System

SUV : Small unilamellar vesicles (petits liposomes unilamellaires)

TPGS : D- α -Tocopheryl Polyéthylène Glycol 1000 Succinate

UGTs : UDP-glucuronosyltransférases

USP : United States Pharmacopeia

UV : ultra violet

Résumé :

Un principe actif administré par voie orale est absorbé au niveau de la membrane intestinale. Le milieu digestif étant aqueux, le composé doit présenter une certaine hydro-solubilité afin de passer à l'état moléculaire et ainsi de pouvoir traverser la membrane intestinale par diffusion trans ou para-cellulaire, ou grâce aux nombreuses protéines de transport présentes dans la membrane. Cependant, certaines de ces protéines (Pgp) peuvent limiter ou empêcher l'absorption du composé qui peut aussi être métabolisé par les enzymes présentes dans la cellule.

Nous étudierons les caractéristiques physico-chimiques influant sur l'absorption d'un principe actif ainsi que les différentes techniques permettant de caractériser les composés et les formulations développées.

Il existe un outil de pronostic, appelé le Système de Classification Biopharmaceutique (Biopharmaceutical Classification System ou BCS), permettant d'estimer le comportement d'un composé ainsi que les facteurs influant sur son absorption par voie orale, en fonction de sa solubilité aqueuse et de sa perméabilité intestinale. Un composé BCS classe II présente une faible solubilité aqueuse mais une haute perméabilité intestinale et la dissolution dans l'environnement digestif est alors l'étape limitante de l'absorption. Dans ce cas le but de la formulation est d'amener le composé dans un état de solubilité maximale au niveau de la membrane intestinale.

Il existe de nombreuses stratégies permettant d'améliorer la solubilité d'un principe actif : emploi de cyclodextrines, de dispersions solides dans des matrices hydrophiles (type PEG), de la micronisation, d'émulsions, de micro-émulsions et de systèmes auto-émulsifiants, ainsi que l'emploi de nanoparticules. Nous étudierons leurs techniques de production ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
RÉSUMÉ :	5
INTRODUCTION	10
PARTIE 1 : ABSORPTION INTESTINALE	13
1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA MEMBRANE INTESTINALE	15
1.1 <i>pH</i>	15
1.2 <i>Transporteurs</i>	15
1.2.1 Protéines ABC	16
1.2.1.1 Glycoprotéine P (Pgp)	16
1.2.1.2 BCRP	19
1.2.1.3 MRP2	19
1.2.2 Protéines SLC	20
1.2.2.1 PEPT1	20
1.2.2.2 PAT	21
1.2.2.3 OATP2B1	22
1.2.2.4 MCT	22
1.2.2.5 OCT	22
1.2.3 Effets des transporteurs sur l'absorption intestinale des composés selon leurs classe BCS.	23
1.2.4 Effets du polymorphisme génétique des transporteurs	24
2 EFFETS DU MILIEU INTESTINAL	27
2.1 <i>Effets de l'alimentation</i>	27
2.1.1 Effets des lipides	28
2.1.2 Effets du jus de pamplemousse	28
2.2 <i>Interactions médicamenteuses</i>	29
3 EFFETS DE LA STRUCTURE CHIMIQUE ET DES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE LA MOLÉCULE	31
PARTIE 2 : PRÉFORMULATION	33
1 A QUEL MOMENT DU PROCESSUS DE RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT INTERVIENT LA PRÉFORMULATION ?	33
1.1 <i>Lors de la recherche d'une molécule</i>	33
1.1.1 Solubilité	33
1.1.2 Constante d'ionisation :pKa	34
1.1.3 Lipophilie	34
1.1.4 Propriétés tensioactives	34
1.1.5 Stabilité	35
1.1.5.1 Stabilité en solution en fonction du pH	35
1.1.5.2 Stabilité à l'état solide	36
1.1.5.3 Stabilité à l'oxydation.	36
1.1.5.4 Photostabilité	37
1.2 <i>Lors de la sélection du sel</i>	38

1.3	<i>Lors de la sélection d'un polymorphe</i>	39
2	LES ÉTUDES DE PRÉFORMULATION	41
2.1	<i>Caractérisation physico-chimique</i>	41
2.2	<i>Etudes de solubilité</i>	41
2.3	<i>Etudes de compatibilité</i>	42
3	QUELQUES TECHNIQUES UTILISÉES POUR CARACTÉRISER LES MOLÉCULES	43
3.1	<i>Diffraction par rayon X</i>	43
3.2	<i>Méthodes thermiques</i>	45
3.2.1	<i>Calorimétrie et analyse thermique</i>	45
3.2.2	<i>Analyse de DSC (calorimétrie à balayage différentiel)</i>	45
3.2.3	<i>CTS : courant thermo stimulé</i>	45
3.3	<i>Distribution de la taille des particules : méthodes utilisant un laser</i>	46
3.3.1	<i>Dispersion statique de la Lumière (Static light scattering ou SLS) « Diffraction laser »</i>	46
3.3.2	<i>Dispersion dynamique de la lumière (dynamic light scattering ou DLS)</i>	47
3.4	<i>L'adsorption de vapeur dynamique</i>	47
PARTIE 3 : SYSTÈME DE CLASSIFICATION BIOPHARMACEUTIQUE (BCS)		49
1	DÉFINITION	49
1.1	<i>Solubilité : premier paramètre de la classification</i>	50
1.2	<i>Perméabilité : second paramètre de la classification</i>	50
2	MÉTHODOLOGIE DE CLASSEMENT D'UN COMPOSÉ PHARMACEUTIQUE ET DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE DISSOLUTION DE CE COMPOSÉ	53
2.1	<i>Détermination de la solubilité</i>	53
2.2	<i>Détermination de la perméabilité:</i>	54
2.2.1	<i>Etudes pharmacocinétiques chez l'homme</i>	54
2.2.1.1	<i>Etudes d'équilibre de masse</i>	54
2.2.1.2	<i>Etudes de biodisponibilité absolue</i>	54
2.2.2	<i>Etudes de perméabilité intestinale</i>	55
2.2.3	<i>Instabilité dans le tractus gastro-intestinal</i>	57
2.3	<i>Détermination de la dissolution:</i>	58
3	ESSAI DE DISSOLUTION DES COMPOSÉS FAIBLEMENT SOLUBLES DANS L'EAU	61
3.1	<i>Principe</i>	61
3.2	<i>Choix du milieu de dissolution</i>	62
3.3	<i>Choix de l'appareil</i>	62
3.4	<i>Pouvoir de différenciation</i>	63
3.5	<i>Relations ou corrélations entre les résultats in vivo/in vitro?</i>	63
PARTIE 4 : FORMES GALÉNIQUES PERMETTANT D'AUGMENTER LA SOLUBILITÉ DES COMPOSÉS PEU HYDROSOLUBLES		65
1	LES CYCLODEXTRINES	65
1.1	<i>Définition</i>	65
1.2	<i>Facteurs influençant la formation de complexe d'inclusion</i>	67

1.2.1	Energies mises en cause	67
1.2.2	Degré de substitution	68
1.2.3	pH et état d'ionisation	68
1.2.4	Température	68
1.2.5	Méthode de préparation et additifs	70
1.2.5.1	Effets de la méthode de préparation	70
1.2.5.2	Effets d'additifs variés	71
1.3	<i>Types de complexe et effet de la dilution.</i>	72
1.4	<i>Effets des CD sur des propriétés importantes des molécules en formulation</i>	73
1.4.1	Effet sur la solubilité et la dissolution de la molécule	73
1.4.2	Effets sur la biodisponibilité de la molécule	75
1.4.3	Effet des CD sur la sécurité d'utilisation	75
1.4.4	Effets sur la stabilité des molécules	76
1.1	<i>Toxicologie</i>	78
1.2	<i>Applications des CD dans l'administration par voie orale des molécules</i>	79
1.3	<i>Quelques considérations importantes pour le choix de CD dans la formulation de médicament</i>	81
1.3.1	Disponibilité commerciale	81
1.3.2	Statut légal	81
1.3.3	Statut des brevets	81
2	LES MICRO-ÉMULSIONS	83
2.1	<i>Définition</i>	83
2.2	<i>Structure</i>	83
2.3	<i>Avantages des micro-émulsions comme système de délivrance</i>	83
2.4	<i>Inconvénients des micro-émulsions.</i>	84
3	LES SYSTÈMES AUTO-ÉMULSIFIANTS SEDDS (SELF EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM)	85
3.1	<i>Définition</i>	85
3.2	<i>Composition</i>	86
3.2.1	Huiles	86
3.2.2	Tensioactifs	87
3.2.2.1	Définition	87
3.2.2.2	Balance hydrophile/lipophile HLB	88
3.2.2.3	Utilisation dans les SEDDS	90
3.2.3	Co-solvants / co-tensioactifs	90
3.3	<i>Mécanisme de l'auto-émulsification</i>	91
3.4	<i>Caractérisation physico-chimique</i>	92
3.5	<i>Domaine d'existence des micro-émulsions</i>	93
3.6	<i>Aspect biopharmaceutique</i>	94
3.6.1	Avantages des SEEDS	94
3.6.2	Paramètres influençant l'absorption	98
3.6.2.1	Influence du véhicule huileux	100
3.6.2.2	Libération du principe actif	101
3.6.3	Aspects toxicologiques des SEDDS	102
3.6.3.1	L'altération physique de la membrane	102
3.6.3.2	Toxicité chronique et questions	102

4 NANOPARTICULES ET MICROPARTICULES.	105
4.1 <i>Les processus de production des nanoparticules</i>	105
4.1.1 Procédés top-down	106
4.1.1.1 Le broyage humide	106
4.1.1.2 L'homogénéisation à haute pression	108
4.1.2 Procédés bottom-up	110
4.1.2.1 Technologie d'émulsification	110
4.1.2.2 Précipitation avec un fluide anti solvant comprimé (PCA).	111
4.1.2.3 Expansion rapide depuis une solution de gaz liquéfié. (Rapid expansion from supercritical to aqueous solution : RESAS).	112
4.1.2.4 Lyophilisation dans un liquide super critique (SFL : spray freezing into liquid)	112
4.1.2.5 Précipitation évaporative dans une solution aqueuse (EPAS)	113
4.2 <i>Microparticules et nanoparticules utilisables comme systèmes de délivrance</i>	114
4.2.1 Liposomes	114
4.2.1.1 Méthodes de fabrication des liposomes	115
4.2.1.1.1 Fabrication des MLV	115
4.2.1.1.2 Préparation des SUV	116
4.2.1.2 Caractérisation des liposomes	118
4.2.1.2.1 Taux d'encapsulation et relargage	118
4.2.1.2.2 Stabilité des liposomes	119
4.2.2 Nanoparticules polymériques	119
4.2.3 Dendrimères	121
4.2.4 Nanoparticules lipidiques solides (SLN : Solid Lipid Nanoparticles)	124
4.2.5 Dissocubes.	125
4.2.6 Nanocrystal technology.	125
4.2.7 Nanomorph technology.	128
4.2.8 Nanoedge technology.	129
4.2.9 Nanopure technology.	130
4.2.10 Crititech technology.	130
CONCLUSION	131
TABLE DES FIGURES	133
INDEX DES TABLEAUX	136
BIBLIOGRAPHIE	137

Introduction

La sélection de molécules actives permettant une formulation nécessitant un minimum d'excipients couramment utilisés et un procédé de fabrication simplifié, et présentant une bonne biodisponibilité, rend le processus de développement d'un médicament plus rapide, moins complexe et surtout moins coûteux.

C'est pourquoi certaines propriétés physico-chimiques sont évaluées très tôt lors de la recherche des molécules actives avant même le choix de la molécule tête de série, comme par exemple la lipophilie qui affecte, entre autres, la perméabilité et la solubilité. En effet, si cette dernière n'est pas suffisante, cela peut affecter les résultats du criblage haut débit et empêcher d'atteindre des concentrations d'exposition efficaces et révélatrices dans les études toxicologiques. Dans ce mémoire thèse, nous étudierons les propriétés influençant l'absorption intestinale des composés. Nous verrons aussi comment la préformulation permet de caractériser les molécules d'intérêt et d'optimiser leur profil physico-chimique.

Aux premiers stades de la recherche, on étudie l'exposition de la cible thérapeutique à la molécule testée. On préférera une solution pour la voie orale car dans ce cas la forme physique initiale, le polymorphisme ou la distribution de la taille des particules n'ont pas d'influence sur la performance *in vivo* de la formulation. Il faut trouver un véhicule permettant d'atteindre une exposition maximale. Au fur et à mesure du développement la formulation sera modifiée au cas par cas selon les besoins des études cliniques, et en conséquence sera caractérisée non seulement pour les tests analytiques de libération des lots cliniques mais également pour améliorer la connaissance du produit.

Afin d'estimer l'absorption intestinale d'un composé, on utilise le système de classification biopharmaceutique (BCS), qui permet de classer les composés pharmaceutiques selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité intestinale. Ce récent système de classification a été développé par la FDA. C'est l'un des outils de pronostic les plus efficaces pour faciliter le développement. En effet, en combinant le BCS avec la dissolution du véhicule contenant le composé (comprimé, gélule...) on prend en compte les trois facteurs majeurs gouvernant le taux et l'ampleur de l'absorption du composé à partir des formes orales à libération immédiate : la dissolution du véhicule, la solubilité du composé et sa perméabilité intestinale. Dans le cas d'un composé BCS classe II, caractérisé par une faible solubilité aqueuse et une haute perméabilité intestinale, la dissolution dans l'environnement digestif est l'étape limitante de l'absorption. C'est donc sur la solubilisation aqueuse du composé qu'il faut agir.

Dans ce mémoire de thèse, nous nous pencherons sur l'administration d'un composé BCS classe II par voie orale. L'absorption se fait au niveau de la membrane intestinale, donc le composé doit être hydrosoluble, le milieu digestif étant aqueux. Une fois arrivé dans l'intestin, le composé peut traverser la membrane par des mécanismes passifs, diffusion trans ou paracellulaire, ou actifs, mettant en jeu les nombreuses protéines de transport présentes dans la membrane. Cependant il existe aussi des mécanismes empêchant cette absorption : celle-ci peut être limitée par la glycoprotéine P (Pgp), un transporteur d'efflux ATP-dépendant, ou par d'autres protéines de transport. De plus le composé peut être métabolisé par les enzymes présentes dans les entérocytes. L'objectif de la préformulation est d'amener le composé BCS classe II au niveau de la membrane intestinale en augmentant sa solubilité apparente.

Dans cette optique, il existe différentes techniques favorisant la dissolution des composés, telles que l'emploi de cyclodextrines, de dispersions solides dans des matrices hydrophiles (type PEG), de la micronisation, d'émulsions, de micro-émulsions et de systèmes auto-émulsifiants, ainsi que l'emploi de nanoparticules. Nous étudierons la préparation de ces diverses formes pharmaceutiques, leurs avantages et leurs inconvénients.

Partie 1 : Absorption intestinale

La majeure partie de l'absorption des médicaments administrés par voie orale se passe au niveau de l'intestin grêle. Il se divise en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Sa longueur varie de 6 à 8 mètres. Grâce à ses nombreuses villosités et aux microvillosités des entérocytes (bordures en brosse), sa surface d'échange est de 200m². Chaque jour 10 litres de liquide transitent dans l'intestin (alimentation, salive, liquide gastrique, bile, sécrétions pancréatiques et intestinales), et 9 litres sont réabsorbés (voir figure 1).

L'épithélium intestinal est un épithélium prismatique simple composé de deux types de cellules : les entérocytes et les cellules calciformes.

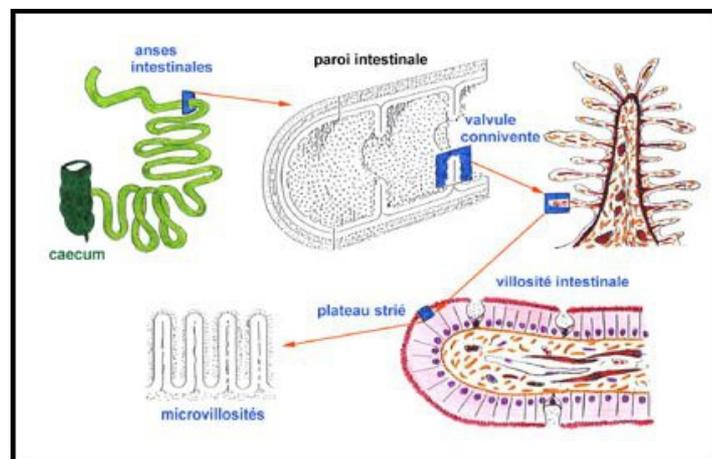


Figure 1: Situation et schémas des microvillosités dans l'intestin grêle. D'après <http://operasavon.free.fr/transport.htm>

- Il existe plusieurs mécanismes d'absorption des composés au travers de l'épithélium intestinal
- diffusion trans-cellulaire passive au travers de la membrane lipidique, qui se fait par partition dans la membrane et qui est dépendante de la lipophilie, la polarité, la capacité à créer des liens hydrogènes, et du nombre de liens mouvants (voir figure 2 (a)).
 - diffusion para-cellulaire passive par des pores aqueux au niveau des jonctions serrées entre les cellules : elle est fonction de la masse, du volume moléculaire ainsi que de la flexibilité et de la charge du composé (voir figure 2 (c)).
 - transport actif par protéine de transport vers l'intérieur la cellule soit au niveau de la membrane apicale, soit au niveau baso-latérale (voir figure 2 (b)).
 - transport actif par protéine de transport vers l'extérieur la cellule soit au niveau de la membrane apicale, soit au niveau baso-latérale (voir figure 2 (d)).

- transport d'un métabolite en direction sécrétoire après transport passif dans la cellule et métabolisation par des enzymes intracellulaires (CYP P450) (voir figure 2(e)).
- transport par endocytose ou transcytose.

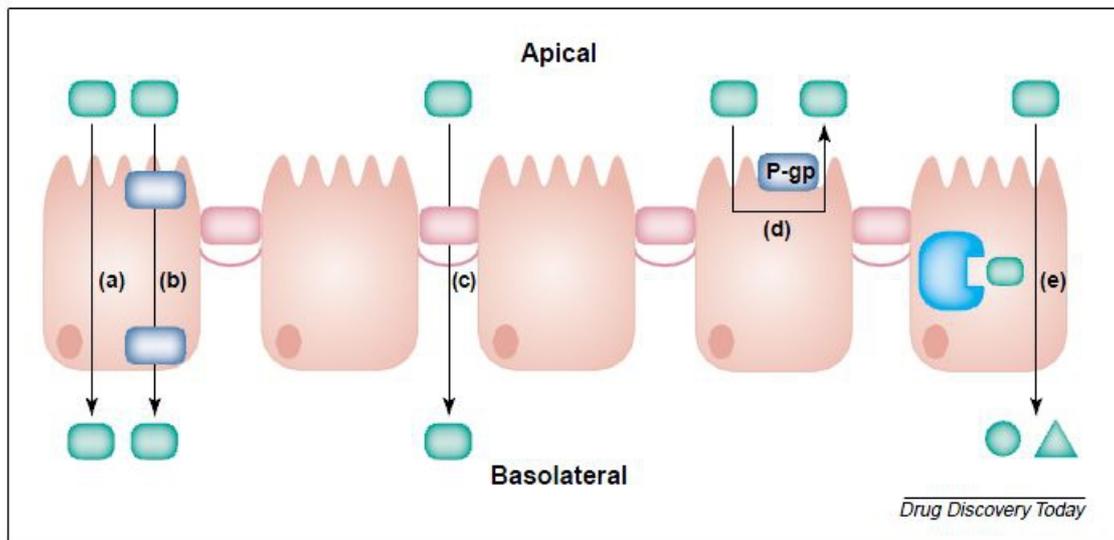


Figure 2: Les différentes voies d'absorption au niveau intestinal. L'absorption intestinale d'un composé peut se faire par : (a) diffusion trans-cellulaire passive, (b) transport actif par protéine de transport, (c) diffusion para-cellulaire passive. Cependant il existe aussi des mécanismes empêchant cette absorption : (d) celle-ci peut être limitée par la Pgp, un transporteur d'efflux ATP-dépendant, ou d'autres protéines de transport, (e) de plus le composé peut être métabolisé par les enzymes présentes dans la cellule. D'après Baliman 2005.

Une des qualités essentielles d'un médicament est donc sa capacité à traverser la membrane intestinale (absorption) pour ensuite atteindre la circulation systémique : c'est ce qu'on appelle la biodisponibilité d'un médicament.

Trois types de facteurs influencent la capacité d'un médicament à être absorbé au niveau intestinal :

- l'anatomie et la physiologie de la membrane : la surface d'absorption, le flux sanguin, la perméabilité de la membrane, les transporteurs ainsi que les enzymes cellulaires;
- le milieu intestinal : le contenu du fluide intestinal, sa teneur en lipide ainsi que la présence d'acides biliaires, le pH dans le lumen ou à la surface de la membrane jouent aussi un rôle important dans le phénomène d'absorption;
- la structure chimique et les propriétés physiques de la molécule.

1 Anatomie et physiologie de la membrane intestinale

Tout au long de l'intestin, les propriétés de la membrane intestinale changent, telles que sa composition lipidique, sa surface d'échange (voir tableau I), les transporteurs protéiques et les enzymes, ainsi que les composants et le pH du liquide intestinal [Ungell, 2005].

Tableau I: Caractéristiques biologiques et physiques du tractus gastro-intestinal humain. D'après Baliman et Chong 2005.

Caractéristiques biologique et physique du tractus digestif humain.			
Segment gastro intestinal	Surface (m ²)	Longueur (cm)	pH
Estomac	3,5	25	1,0 - 2,0
Duodénum	1,9	~35	4,0 - 5,5
Jéjunum	184	~280	5,5 - 7,0
Iléon	276	~420	7,0 - 7,5
Colon et rectum	1,3	~150	7,0 - 7,5

1.1 pH

Les variations de pH allant de 5 à 8 et le microclimat acide (en général une unité de pH de moins que dans le lumen) peuvent influencer la solubilité, le relargage ainsi que l'absorption des molécules à des degrés divers selon le pKa du composé.

Ainsi, les bases faibles seront absorbées plus efficacement dans la partie basse de l'intestin grêle où le pH est neutre à basique. Les acides, au contraire, seront absorbés plus haut dans le tube digestif où le pH est plus acide[Ungell, 2005].

L'expression des transporteurs varie aussi au long du tube digestif.

1.2 Transporteurs

L'expression des transporteurs au niveau intestinal présente une grande diversité fonctionnelle : en effet des transporteurs faisant entrer les molécules dans les entérocytes (PepT1, MCT1) ainsi que des transporteur d'efflux (MRP2, MDR1, BCRP) sont présent dans la membrane des entérocytes.

Parmi les nombreux transporteurs présents dans la membrane intestinale, ceux ayant des médicaments pour substrats appartiennent essentiellement à deux super familles de protéines : ABC (ATP binding cassette) et SLC (solute carrier).

Une étude portant sur l'expression des gènes de 36 transporteurs protéiques dans différents organes, a montré que 26 d'entre eux, soit 69%, sont exprimés dans le jéjunum et 21, soit 58% sont exprimés dans le colon. Dans cette analyse, HPT1 (Human Peptide Transporter 1) était le transporteur le plus abondamment exprimé au niveau de la muqueuse intestinale. Les gènes du transporteur d'influx PepT1 (peptide transporter 1) et des transporteurs d'efflux de types ABC, MRP2 (Multidrug Resistance associated Protein 2) et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) étaient fortement exprimés dans le tissu jéjunal. Il a aussi été observé des différences d'expression substantielles au long du tube digestif : en moyenne les niveaux d'expression des gènes étaient de 3 à 5 fois inférieurs dans le colon que dans le jéjunum, ces différences étant très significatives pour les gènes fortement exprimés MRP2, BCRP et PepT1.

1.2.1 Protéines ABC

Les protéines de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter de nombreuses molécules hors de la cellule.

1.2.1.1 Glycoprotéine P (Pgp)

La Pgp est l'un des plus importants transporteurs ABC. C'est une protéine de 170 kDa, composée de deux parties homologues comprenant chacune 6 domaines trans-membranaires et un domaine de liaison nucléotidique cytoplasmique. Elle appartient à la sous famille B des protéines ABC, d'où son nom ABCB1. Elle est le produit du gène MDR1 (multi drug resistance 1), elle a pour substrats de nombreux anti-cancéreux et est responsable de la résistance de certaines tumeurs à ces médicaments [Sharom, 2006].

Elle est présente dans la membrane apicale des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Son niveau d'expression augmente tout au long de l'intestin, atteignant un niveau maximal dans le colon [Dietrich, Geier, Oude Elferink *et al*, 2003].

Tableau II: Substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp, d'après M. Clement Jerdi , Desmeules, Dayer, 2004.

Substrats	Losartan	Phénobarbital	Saquinavir
Anticancéreux	Lovastatine	Ranitidine	
Amsacrine	Mibéfradil	Terfénadine	Antifongiques
Colchicine	Phénytoïne		Itraconazole
Docétaxel	Quinidine	Inhibiteurs	Kétoconazole
Etoposide	Talinolol	Anticancéreux	
Imatinib	Vérapamil	Etoposide	Opioides
Irinotécan		Ivermectine	Lopéramide
Ivermectine	Antiviraux	Tamoxifène	Méthadone
Paclitaxel	Amprénavir	Vinblastine	
Téniposide	Indinavir	Vincristine	Immunosuppresseurs
Topotécan	Lopinavir		Ciclosporine
Vinblastine	Nelfinavir	Antibiotiques	Tacrolimus
Vincristine	Ritonavir	Azithromycine	
Vinorelbine	Saquinavir	Clarithromycine	Antidépresseurs
Vindésine	Zidovudine	Daurorubicine	Fluoxétine
		Doxorubicine	Paroxétine
Antibiotiques	Opioides	Erythromycine	Sertraline
Actinomycine	Lopéramide		
Azithromycine	Méthadone	Cardiovasculaires	
Ciprofloxacine	Morphine	Acébutolol	Autres
Dactinomycine		Amiodarone	Bromocriptine
Daurorubicine	Immunosuppresseurs	Atorvastatine	Fexofénadine
Doxorubicine	Ciclosporine	Céliprolol	Jus de pamplemousse
Epirubicine	Sirolimus	Dipyridamole	Méfloquine
Erythromycine	Tacrolimus	Félodipine	Progestérone
Lévofloxacine		Lovastatine	Spironolactone
Mitomycine	Hormones	Mibéfradil	Terfénadine
Mitoxantrone	Cortisol	Nicardipine	
Rifampicine	Dexaméthasone	Nifédipine	Inducteurs
Sparfloxacine	Estradiol	Quinidine	Dexaméthasone
Tétracycline	Hydrocortisone	Quinine	Efavirenz
	Prednisolone	Simvastatine	Millepertuis
Cardiovasculaires	Autres	Talinolol	Résépine
Acébutolol	Cimétidine	Vérapamil	Rifampicine
Atorvastatine	Dompéridone		
Céliprolol	Fexofénadine	Antiviraux	
Digitoxine	Méfloquine	Indinavir	
Digoxine	Ondansétron	Nelfinavir	
Diltiazem		Ritonavir	

Elle joue un rôle protecteur en empêchant le passage dans le sang de molécules potentiellement dangereuses provenant de l'intestin. De très nombreux médicaments s'avèrent être des substrats de ce transporteur (voir tableau II), ce qui limite leur biodisponibilité et réduit l'efficacité du traitement [Sharom, 2006]. Découverte au début des années 1970, cette protéine a un mode de fonctionnement non élucidé : elle agirait comme un aspirateur hydrophobe, se liant aux composés non polaires qui sont répartis dans la membrane et les expulsant dans le milieu extra-cellulaire. Il est plus probable que ce soit une flippase.

La Pgp a pour substrats de nombreux de composés structurellement très dissemblables. Quelques éléments structurels semblent nécessaires pour qu'un composé puisse interagir avec la Pgp : 2 ou 3 donneurs d'électrons (accepteurs de lien hydrogène), ou unités hydrophobes, disposées de façon particulière [Sharom, 2006]. Il a été suggéré qu'il existerait plusieurs sites de fixation séparés, mais le consensus actuel est que la Pgp ne possède en fait qu'une seule grande poche de liaison flexible. Les liaisons mettraient en jeu des forces de Van de Waals et des liens hydrophobes différents pour chaque composé. Cette poche est constituée par des

domaines trans-membranaires, et a une forme d'entonnoir, le côté le plus étroit étant du côté cytoplasmique [Sharom, 2006].

Des études en microscopie de fluorescence ont permis de mettre en évidence l'existence des deux sites de transport fonctionnels au sein de la Pgp, le site R interagissant préférentiellement avec la Rhodamine 123, et le site H avec H33342 (bisbenzimidazole H33342 : fluorochrome) [Sharom, 2006]. Ces deux sites interagissent de manière allostérique entre eux de façon complexe. La liaison d'une molécule sur le site H stimule le transport d'un composant ayant une affinité pour le site R, tout en inhibant le transport d'autres molécules ayant une affinité pour le site H. Le site R a un effet réciproque. On ne sait pas si ces deux sites sont situés au même endroit dans la protéine.

La spectroscopie de fluorescence indique que ces deux sites sont situés dans un environnement très hydrophobe. Une étude montre que 2 molécules en compétition pour le transport par la Pgp peuvent se lier simultanément à la protéine. Cependant elles interagissent de façon non compétitive, elles ont toutes deux un effet négatif sur la liaison de l'autre, et diminuent de 5 fois l'affinité de liaison de l'autre molécule. Il est probable que ces molécules se lient à des sites qui se recouvrent partiellement, l'encombrement stérique expliquerait alors l'effet négatif de la liaison d'un substrat sur l'affinité de liaison d'un autre substrat [Sharom, 2006].

Les études biochimiques indiquent que c'est la reconnaissance du substrat qui stimule la liaison de l'ATP et son hydrolyse au niveau du site de liaison nucléotidique. Lors de ces deux étapes, l'état conformationnel change, il est donc probable que la liaison de l'ATP au domaine de liaison nucléotidique provoque sa dimérisation, induisant le changement de conformation permettant le passage du substrat à l'extérieur de la membrane [Chang, 2003].

Les cinétiques de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP dépendent de l'état de phase des lipides de la membrane dans laquelle la protéine est insérée. De plus les taux de transport sont élevés quand la membrane est en état de gel rigide, atteignant un maximum au point de fusion des lipides de la bi-couche, et diminuant en phase cristal liquide. La bi-couche lipidique joue aussi un rôle dans l'interaction substrat-Pgp, en effet le fort coefficient de partition des substrats de la Pgp fait qu'ils vont s'accumuler en très grande quantité dans la membrane, leur concentration membranaire pouvant être de 300 à 2000 fois celle de la phase aqueuse. De ce fait la Pgp peut avoir une faible affinité pour ses substrats mais être active car la membrane concentre ceux-ci.

La Pgp n'est pas le seul transporteur de la super famille des protéines ABC ayant des médicaments pour substrat, MRP1 (multidrug resistance associated protein, ABCC1) et 2

(ABCC2), BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2) sont aussi exprimées sur la membrane apicale des entérocytes.

1.2.1.2 BCRP

La BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) peut transporter de larges molécules hydrophobes, chargées positivement ou négativement, des cytotoxiques tels que le mitoxantrone, le topotécan, le flavopiridol, et le méthotrexate, des encres fluorescentes ainsi que des composés toxiques présents dans la nourriture. La BCRP est un transporteur ATP dépendant. C'est un demi transporteur, il requiert donc une dimérisation pour être actif [Sarkadi, Ozvegy-Laczka, Némét *et al*, 2004].

La BCRP est présente dans l'intestin grêle et le colon [Dietrich, Geier, Oude Elferink, 2003].

1.2.1.3 MRP2

La MRP2 (Multidrug Resistance associated Protein 2) a pour substrats de nombreux anions organiques, surtout des composés conjugués. Elle peut aussi transporter des composés amphipatiques (un côté polaire et un côté apolaire) neutres et des cations, en présence de glutathion réduit [Dietrich, Geier, Oude Elferink, 2003]. Ses substrats sont surtout des anticancéreux (vincristine, méthotrexate, cisplatine) et antibiotiques (rifampicine, ceftriaxone). La MRP2 possède au moins deux sites de liaison [Dietrich, Geier, Oude Elferink, 2003]. La présence d'un substrat ou un modulateur de cette protéine peut fortement modifier l'affinité d'un autre substrat pour ce transporteur, par exemple la présence de sulfanitran augmente le transport du 17 β -glucuronide oestradiol d'un facteur 30.

Il semble que la MRP2 soit fortement exprimée dans le duodénum (voir figure 3) et que son niveau d'expression diminue ensuite en direction de l'ileum terminal et qu'il soit minimal au niveau du colon [Dietrich, Geier, Oude Elferink, 2003].

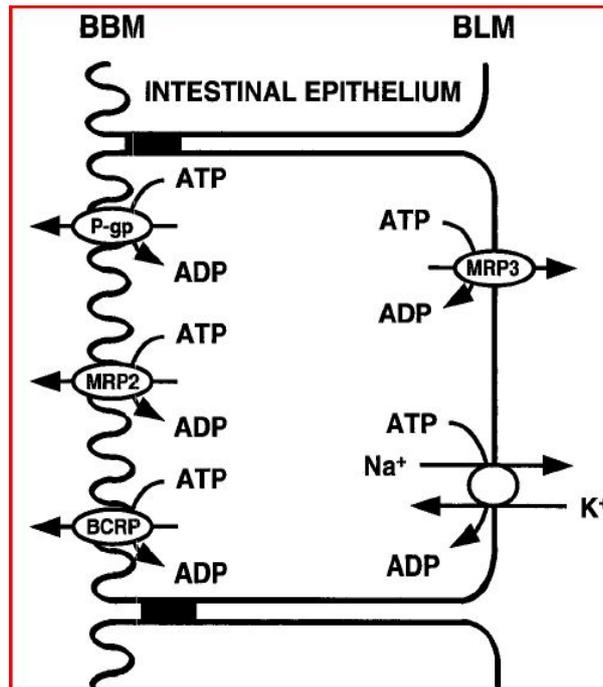


Figure 3: Transporteurs d'efflux ATP-dépendants dans l'intestin grêle : Les P-gp, BCRP et MRP2 sont exprimées au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Brush Border Membrane : BBM), la MRP3 se situe au niveau de la membrane basale des entérocytes (Basolateral Membrane : BLM). D'après Katsura et Inui, 2003.

1.2.2 Protéines SLC

La famille des protéines SLC (solute carrier) est une autre grande famille de protéines comptant de nombreux transporteurs.

1.2.2.1 PEPT1

La protéine PEPT1, codée par le gène SLC15A1, et principalement exprimée dans les membranes des bordures en brosse des entérocytes, tout au long de l'intestin, assure le transport d'oligopeptides couplé à celui de protons (voir figure 4). Elle reconnaît une gamme de composés variés, incluant des antibiotiques à β -lactames (céphalosporines, pénicillines), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (énalapril, captopril), des composés ayant une structure proche de celle des peptides tels que la bestatine (un agent antitumoral), et des molécules non peptidiques comme l'acide δ aminolevulinique, et des pro-drogues (valacyclovir et L- α -méthyldopa) [Sala-Rabanal, Loo, Hirayama, et al, 2006].

Ce transporteur fonctionne grâce aux protons et dépend du potentiel de membrane. PEPT1 a une forte affinité pour les ω -amino-acides gras et les amino-acides arylamides. C'est un transporteur à faible affinité mais forte capacité [Foltz, Meyer, Theis *et al*, 2004].

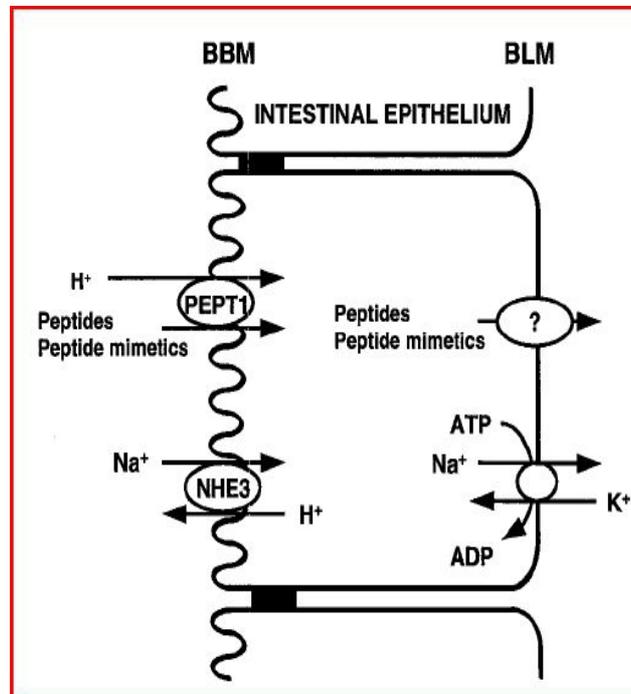


Figure 4: Transporteurs de peptides dans l'intestin. Les di- et tri-peptides, ainsi que les molécules de même structure sont absorbés au travers de la bordure en brosse des entérocytes (Brush Border Membrane : BBM) par un transporteur de peptide couplé à un proton (PEPT1). Ces molécules traversent la membrane baso-latérale (Basolateral Membrane : BLM) à l'aide d'un transporteur encore inconnu. D'après Katsura et Inui 2003.

1.2.2.2 PAT

PAT (proton amino acid transporter)(SLC36A1) est un autre co-transporteur proton/acide aminé, à faible affinité et forte capacité, dépendant du gradient de pH, présent dans la membrane des entérocytes. Il peut fonctionner selon deux modes, soit comme co-transporteur proton/acide aminé électrogénique, soit comme co-transporteur proton/anion électriquement neutre pour les acides gras à chaînes courtes [Thwaites et Anderson, 2007]. Il transporte des acides aminés zwitterioniques, ainsi que des neuromodulateurs comme la D-sérine et des antibiotiques comme la D-cyclosérine, tous deux utilisés dans le traitement de la schizophrénie. L'acide γ -amino butyrique et ses dérivés comme la vigabatrine et la gabapentine, utilisés dans le traitement de l'épilepsie, sont aussi des substrats de ce transporteur [Abbot, Grenade, Kennedy *et al*, 2006].

1.2.2.3 OATP2B1

OATP2B1 (Organic Anion Transporter Polypeptide 2B1)(SLC02B1) est un polypeptide transporteur d'anions organiques. Il est présent dans les bordures en brosse des cellules de l'épithélium intestinal (voir figure 5). Son fonctionnement est lui aussi dépendant du gradient de pH. Il a pour substrat l'atorvastatine et la pravastatine (inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) réductase), la fexofénadine (antihistaminique), le glibenclamide (antidiabétique) et la bromosulfophtaléine. Il est inhibé par le jus de pamplemousse.

1.2.2.4 MCT

MCT (monocarboxylate transporter) est aussi un co-transporteur proton/anion, ayant de nombreux substrats, dont certains communs à OATP2B1 comme les benzoates et salicylates ainsi que les inhibiteurs de la (HMG-CoA) réductase pravastatine et atorvastatine. Parmi ces substrats on trouve aussi le valproate (anticonvulsivant) et des acides gras à chaînes courtes, L- et D-lactate, pyruvate, acétate, propionate et butyrate, ainsi que les corps cétoniques acétoacétate et β -hydroxybutyrate. MCT est présent dans les bordures en brosse des entérocytes [Thwaites et Anderson, 2007] (voir figure 5).

1.2.2.5 OCT

OCT (organic cation transporter) 1 et 2 interagissent avec des composés endogènes tels que la choline, la dopamine, l'histamine, et la 5-hydroxytryptamine, mais aussi avec des antagonistes (phénoxybenzamine, cimétidine), des agonistes (clonidine, *O*-méthylisoprénaline), des bloqueurs de canaux ioniques (procainamide, quinidine, mepiperphenidol, verapamil), des substances psychoactives (desipramine), des antiviraux (acyclovir, ganciclovir), et des agents antidiabétiques (metformine, phenformine), un antimalarique (quinine) [Burckhardt, 2005], et des antiparkinsonniens (amantadine et mémanine) [Jonker et Schinkel, 2004].

Ces transporteurs sont présent au niveau de la membrane baso-latérale des entérocytes [Bleasby, Chauhan, Brown *et al*, 2000] (voir figure 5).

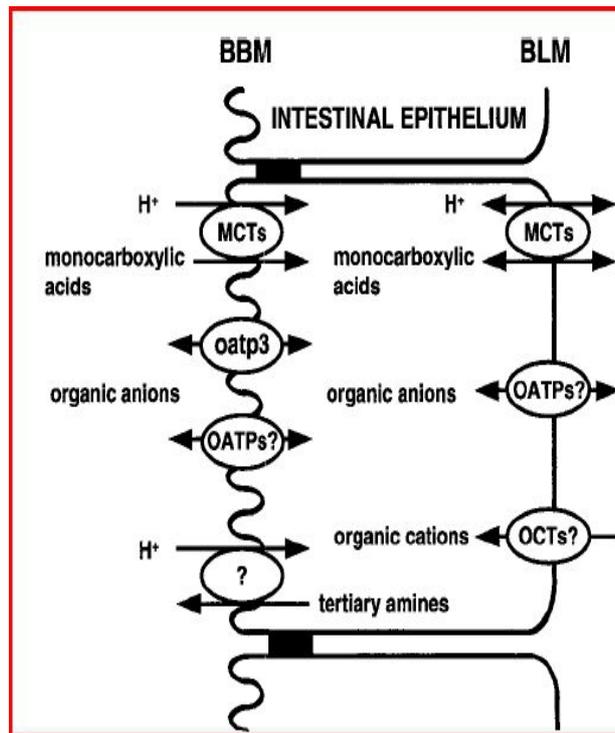


Figure 5: Transporteurs de cations et d'anions organiques dans l'intestin grêle. La localisation dans les membranes et le sens de transport de certains transporteurs ne sont pas connus. BBM : bordure en brosse de la membrane apicale, BLM : membrane baso-latérale. D'après Katsura et Inui, 2003.

1.2.3 Effets des transporteurs sur l'absorption intestinale des composés selon leurs classe BCS.

Leur effet sera minime sur les composés appartenant à la classe I : en effet, grâce à leur solubilité et leur perméabilité élevées, les concentrations atteintes dans l'intestin suffisent à saturer n'importe quel transporteur, qu'il importe ou exporte les composés. Leur effet ne sera pas cliniquement parlant, c'est le cas pour le midazolam et le vérapamil qui sont des substrats de la Pgp (voir tableau III)

En revanche, l'effet des transporteurs est prédominant pour les composés BCS classe II (voir tableau III) : leurs perméabilités étant élevées ils ne requièrent souvent pas de transporteur pour pénétrer dans les entérocytes. Néanmoins la solubilité de ces molécules est très faible et donc ne permet pas le passage d'une quantité suffisante pour saturer les transporteurs d'efflux membranaires dont elles sont les substrats. De plus, un grand nombre de ces composés sont des substrats des enzymes intestinales telles que les CYP 3A4 ainsi que les UDP-

glucuronosyltransférases (UGTs) qui ne sont pas saturées en conditions normales. Cependant, si l'expression des transporteurs d'efflux change, par induction ou inhibition, cela engendrera un changement du métabolisme intestinal des composés BCS classe II substrats des enzymes intestinales. De ce fait, les transporteurs d'efflux vont fortement affecter la biodisponibilité orale ainsi que le taux d'absorption de ces composés.

Les composés appartenant à la classe III ont une bonne solubilité permettant d'atteindre une concentration importante dans l'intestin, cependant leur faible perméabilité nécessite la présence de transporteur pour leur permettre de pénétrer dans les cellules (voir tableau III). Ce sont les transporteurs qui importent les molécules dans les entérocytes qui joueront un rôle important dans leur absorption intestinale. Cependant ils peuvent aussi être substrats de transporteur d'efflux, si une quantité suffisante pénètre dans les entérocytes.

Il est probable que les composés de la classe IV soient eux aussi des substrats des transporteurs membranaires. Leur biodisponibilité orale étant très faible on peut supposer que l'effet de ces transporteurs pourrait être significatif (voir tableau III), si une variation de 2 à 3 % de biodisponibilité peut faire une différence significative [Wu et Benet, 2005].

Tableau III: Effets des transporteurs sur l'absorption des composés en fonction de leur classe BCS. D'après Custodio 2008.

	Forte solubilité	Faible solubilité
Forte perméabilité	Classe I effet des transporteurs minimal	Classe II effet des transporteurs d'efflux prédominant
Faible perméabilité	Classe III effet des transporteurs d'absorption prédominant	Classe IV effet des transporteurs d'absorption et d'efflux pourrait être important

1.2.4 Effets du polymorphisme génétique des transporteurs

Un polymorphisme génétique variant d'un seul nucléotide, présent chez 31% de la population japonaise d'une étude [Dietrich, Geier, Oude Elferink *et al*, 2003], conduit à un changement d'acide aminé dans le transporteur OATP2B1 : ce variant présente une diminution de ses capacités de transport de 50%.

Le premier polymorphisme découvert de MDR1, est semble-t-il présent de façon homozygote chez 25% de la population caucasienne. Ce polymorphisme engendre une diminution de l'expression de MDR1 dans le duodénum. Ceci influe sur la biodisponibilité de la digoxine, mais il n'a cependant pas d'effet sur celle de la fémofénadine, un substrat connu de cette protéine.[Dietrich, Geier, Oude Elferink *et al*, 2003]

Des études sur le tacrolimus montrent des taux plasmatiques plus faibles chez les sujets présentant le génotype 3435CC pour MDR1 (expression intestinale plus importante) par rapport à ceux ayant les génotypes 3435CT ou TT. La Pgp s'exprimant aussi sur les lymphocytes, elle agit aussi sur la concentration intracellulaire du tacrolimus et joue donc sur l'efficacité de l'immuno-suppression. Une incidence plus élevée de rejets de greffe a été observée chez les sujets exprimant fortement la Pgp : la posologie chez les homozygotes pour l'allèle C doit donc être augmentée [Clement Jerdi, Desmeules, Dayer *et al*, 2004].

La phénytoïne est un anti-convulsivant présentant une forte variabilité interindividuelle au traitement, qui s'explique probablement par les polymorphismes génétiques du CYP2C9 et de la Pgp, dont elle est substrat [Clement Jerdi, Desmeules, Dayer *et al*, 2004].

2 Effets du milieu intestinal

2.1 Effets de l'alimentation

Il est bien connu que l'alimentation influe sur la biodisponibilité des médicaments. L'ingestion d'un repas provoque des changements de volume et de composition des fluides digestifs. On estime qu'un estomac à jeun contient 500 ml de fluides, contre 800 à 900 ml après un repas; l'intestin grêle contient lui environ 500 ml à jeun et de 900 à 1000 ml après un repas. Cette augmentation de volume peut augmenter la solubilité d'un composé. À jeun les sécrétions gastriques sont estimées à 300 ml et peuvent être multipliées par 5 après un repas. Elles induisent une sécrétion de bile qui va modifier le pH du milieu intestinal ce qui peut influencer sur la solubilité et donc la biodisponibilité de certains composés. La présence de bile peut augmenter la mouillabilité (angle de contact d'un liquide avec un solide) de molécules peu solubles et augmenter leur solubilisation micellaire.

Les études avec des repas riches en lipides sont recommandées par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux FDA (Food and Drug Administration), puisque les effets de telles conditions sur la physiologie gastro-intestinale amélioreraient la biodisponibilité. On pense que cela est dû à une augmentation de la solubilité du médicament, et d'autres facteurs listés par la FDA : retard de vidange gastrique, stimulation de la sécrétion biliaire, changement de pH intestinal, augmentation du débit sanguin splanchnique, et interaction physique ou chimique avec le véhicule ou le principe actif lui même [Wu et Benet, 2005].

En effet tout ce qui est susceptible de faire varier le pH et la viscosité du milieu gastrique ou intestinal peut modifier l'absorption d'un composé. Un médicament peut se complexer ou se chélater avec des ions métalliques présents dans les aliments, c'est le cas des fluoroquinolones dont la biodisponibilité diminue lorsqu'elles forment un complexe avec des ions métalliques (ciprofloxacine-aluminium). Une molécule peut aussi voir sa biodisponibilité diminuer si elle est adsorbée sur des composants du repas comme la pectine ou des fibres : c'est le cas de la pénicilline V qui se lie aux fibres alimentaires.

Il est aussi possible que les interactions entre la nourriture et les transporteurs jouent un rôle important dans les variations de biodisponibilité de certains composés.

2.1.1 Effets des lipides

Il est supposé qu'un repas riche en lipide inhibe les transporteurs. Un repas riche en lipides, peut augmenter la biodisponibilité des composés de la classe II absorbés par diffusion passive, soit en inhibant les transporteurs d'efflux, ce qui diminue non seulement le rejet de la molécule à l'extérieur de la cellule mais diminue aussi son exposition aux CYP450 qui sont proches, soit en permettant une augmentation de la solubilité du composant dans l'intestin. Le temps d'obtention du pic de concentration peut être augmenté par le retard de vidange gastrique, ou réduit par inhibition des transporteurs d'efflux. Si les deux phénomènes sont concomitants, ce sont généralement les effets du retard de vidange gastrique qui prédominent. Ainsi lorsque la ciclosporine, composé BCS classe II, est administrée avec un repas riche en graisses, sa biodisponibilité augmente par rapport à une administration avec un repas pauvre en lipides. De même la biodisponibilité du lapatinib (un anticancéreux) augmente de 325% s'il est administré avec un repas riche en lipides et non à jeun.

Cependant pour les composés dont la forte perméabilité est due à un transport actif, l'effet des lipides sur la biodisponibilité du composé dépendra du degré d'inhibition des transporteurs. Le temps d'obtention du pic de concentration sera lui augmenté en raison du retard de vidange gastrique.

Si un composé de classe III est substrat de transporteur d'afflux, comme c'est souvent le cas, il verra sa biodisponibilité diminuer. Le captopril, inhibiteur de l'enzyme de conversion, présente une diminution de niveau sérique lors qu'il est administré avec un repas. Il est possible qu'il soit aussi substrat d'un transporteur d'efflux : dans ce cas selon le degré d'inhibition des différents transporteurs, il peut voir sa biodisponibilité augmenter ou ne présenter aucun changement [Custodio, Wu, Benet et al, 2008].

2.1.2 Effets du jus de pamplemousse

Le jus de pamplemousse est un inhibiteur du cytochrome P450 3A4 (CYP450 : enzyme catalysant l'oxydation de nombreux composés organiques) : de ce fait, il permet une augmentation de la biodisponibilité des substrats de cette enzyme, parmi eux de nombreux composés BCS classe I et II, en diminuant leur métabolisme pré-systémique.

Le CYP3A4 représente 70% des CYP présent dans les entérocytes. Le jus de pamplemousse provoque une inhibition rapide et irréversible des CYP. Il réduit de 47% le niveau de CYP3A4 dans la cellule 4 heures après son ingestion, l'augmentation de biodisponibilité est maintenue jusqu'à 24 heures après l'ingestion, à ce moment 30% de l'effet du jus de pamplemousse est encore observable.

Le jus de pamplemousse est aussi un inhibiteur des transporteurs OATP et de la Pgp, cependant son action sur la Pgp est variable allant de l'activation à l'inhibition.

D'anciennes études montrent qu'*in vitro*, le jus de pamplemousse active la Pgp : on devrait donc observer une diminution de la biodisponibilité *in vivo* , une plus grande quantité de substrat étant rejetée dans la lumière de l'intestin, diminuant ainsi l'effet de l'inhibition du CYP3A4 [Kiani, Imam, 2007]. Or pour de nombreux substrats, on observe une augmentation de cette biodisponibilité : on estime que dans leur cas c'est l'effet de l'inhibition du CYP qui prime. De nouvelles études ont démontré que le jus de pamplemousse inhibe la Pgp par régulation négative et inhibition de sa fonction [Kiani, Imam, 2007]. Le jus de pamplemousse augmente la biodisponibilité de la ciclosporine, ceci est principalement dû à son action inhibitrice sur la Pgp et non sur le CYP3A4. Le jus d'orange inhibe aussi les CYP3A4 mais n'engendre pas une augmentation similaire de la biodisponibilité de la ciclosporine.

Le jus de pamplemousse inhibe aussi la protéine MRP2, protéine de la même famille et au fonctionnement semblable à celui de la Pgp, ainsi que les transporteurs OATP. En effet il diminue la biodisponibilité de la fémofénadine, un substrat non métabolisé de ce transporteur.

[Kiani, Imam, 2007]

2.2 Interactions médicamenteuses

Ces interactions sont souvent dues à l'inhibition/activation d'un transporteur ou d'une enzyme, dont un médicament est substrat, par un autre médicament. Il s'agit donc d'une compétition entre les deux médicaments vis à vis des transporteurs. À titre d'exemple, une administration orale de 400 mg de clarithromycine, inhibiteur de la Pgp, entraîne une augmentation de 70% des taux plasmatique de digoxine. En cas d'administration conjointe de digoxine avec un inhibiteur de la Pgp, il est nécessaire d'adapter la posologie de celle-ci.

De même il a été observé une augmentation des taux de statines, pouvant causer de graves effets secondaires sur les muscles, lors d'une administration avec de la ciclosporine, probablement due à l'action inhibitrice de cette dernière tant sur le CYP3A4 que sur la Pgp. La ciclosporine agit probablement également sur d'autres transporteurs car lors de son administration conjointe avec de la pravastatine, la disponibilité systémique de celle-ci augmente. Or elle n'est que faiblement métabolisée par le CYP3A4 et n'est pas substrat de la Pgp [Clement Jerdi, Desmeules, Dayer *et al*, 2004].

3 Effets de la structure chimique et des propriétés physiques de la molécule

La règle de 5 de l'absorption orale de Lipinski donne une idée des propriétés physico-chimiques d'une molécule nécessaires à l'obtention d'une bonne biodisponibilité après son administration par voie orale:

1. une masse moléculaire inférieure à 500 Da
2. une valeur de log P (coefficient de partage octanol/eau) inférieure à 5
3. un nombre de donneur d'hydrogène inférieur à 5
4. un nombre d'accepteur d'hydrogène inférieur à 10

En effet, ces propriétés ont un impact important sur la capacité des molécules à traverser des membranes lipidiques. La lipophilie a aussi un impact négatif sur la solubilité aqueuse, qui est elle même un déterminant critique de l'absorption orale d'une substance.

Une molécule non ionisée ou créant des liaisons hydrogènes présente une plus grande lipophilie. Celle-ci est souvent corrélée au coefficient de partition dans la membrane, il dépend aussi, entre autre, de la taille et de la surface polaire du composé (voir tableau IV).

Tableau IV: Effets des propriétés physico-chimiques d'une molécule sur ses propriétés biopharmaceutiques. L'importance (faible, moyenne ou forte) ainsi que la direction des flèches pour les propriétés chimiques indiquent l'effet d'une augmentation de celle-ci sur les propriétés biopharmaceutiques correspondantes. Par exemple, la dissolution d'une forme solide est diminuée (↓) par une forte lipophilie de la molécule et /ou un point de fusion de la forme solide élevé. Les flèches bidirectionnelles (↕) indiquent l'effet positif ou négatif de la propriété, par exemple les liaisons ioniques aux protéines plasmatiques ou aux phospholipides tissulaires ont des effets opposés sur le volume de distribution. D'après Humphrey 2005.

	Lipophilie	Taille moléculaire	Liens hydrogène	Ionisation	Point de fusion de la forme solide
Dissolution	Forte ↓	-	Faible ↕	Moyenne ↑	Forte ↓
Solubilité dans les fluides biologiques	Forte ↓	-	Moyenne ↑	Forte ↑	- ↓
Précipitation/ cristallisation dans les fluides biologiques		-	Faible	Moyenne ↑	Moyenne ↑
Perméation trans-cellulaire / absorption	Forte ↑	Moyenne ↓	Moyenne ↓	Moyenne ↓	-
Efflux intestinal et effet de « premier passage »	Forte ↑	Faible	Forte ↑	Faible	-
Demi-vie (volume de distribution et clairance)	Moyenne ↕	-	-	Forte ↕	-

Partie 2 : Préformulation

1 A quel moment du processus de recherche et développement intervient la préformulation ?

On estime actuellement que 40% des molécules entrant en développement sont difficilement solubles [Junghanns et Müller, 2008]. Or il n'est pas envisageable de démarrer le développement d'un candidat si sa « développabilité » galénique n'est pas possible. Il est donc primordial d'étudier celle-ci le plus tôt possible lors des étapes dites de préformulation.

1.1 Lors de la recherche d'une molécule

La sélection de molécules ayant des caractéristiques physico-chimiques appropriées, pouvant être facilement formulées de manière à obtenir une bonne biodisponibilité, permet un processus de développement pharmaceutique plus rapide, moins complexe et surtout moins coûteux.

C'est pourquoi certaines propriétés sont évaluées très tôt lors de la recherche des molécules avant même le choix de la molécule tête de série : la solubilité, la cristallinité, le potentiel d'ionisation, la lipophilie, les propriétés tensioactives sont évaluées. La stabilité dans des solutions de différents pH et la stabilité à l'état solide (dans le cas de poudres), la résistance à l'oxydation et la photostabilité sont aussi évaluées [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

1.1.1 Solubilité

Comme on le verra dans le détail du système BCS (partie 3), la solubilité est un paramètre qui conditionne la développabilité d'une molécule sur le plan galénique, analytique, mais également clinique.

La solubilité aqueuse est un facteur fondamental pour la sélection de molécules candidates. Si elle n'est pas suffisante, cela peut affecter les résultats du criblage haut débit et empêcher d'atteindre des concentrations d'exposition efficaces et révélatrices dans les études toxicologiques chez l'animal.

La solubilité dépend de l'énergie de solvation du soluté dans le solvant, elle doit dépasser celle du maillage du cristal du solide et celle nécessaire pour créer un espace dans le solvant pour le soluté. Elle ne dépend donc pas seulement des propriétés de la molécule elle-même, telles que la polarité, la lipophilie, le potentiel d'ionisation et la taille, mais aussi de celles du

solvant et du solide, telles que l'agencement du cristal et la présence de solvates [Florence et Attwood, 1998].

Deux formes cristallines d'un composé peuvent présenter des solubilités différentes, mais rarement au delà d'un facteur 2, or la différence entre les solubilités apparentes d'une forme amorphe et d'une forme cristalline peut être d'une magnitude de plusieurs ordres [Hancock et Parks, 2000; Pudipeddi et Serajuddin, 2005]. C'est pourquoi on essaie d'obtenir une forme cristalline pour les molécules candidates.

1.1.2 Constante d'ionisation :pKa

Pour un composé comportant des groupes fonctionnels acides ou basiques, la solubilité de ce composé à un pH donné est influencée par ses caractéristiques d'ionisation. En milieu aqueux, la solubilité est plus importante pour la forme ionisée que pour l'état neutre. Donc la solubilité des composés ionisables dépend du pH de la solution. De nombreux principes actifs sont des bases ou acides faibles et sont donc ionisables dans la gamme de pH du tractus gastro-intestinal. Un changement de pH change donc la solubilité et la dissolution et par conséquent l'absorption de la molécule.

D'autres considérations sont à prendre en compte pour un composé ionisable, incluant l'impact de l'ionisation sur la stabilité et la perméabilité, et la formation de zwitterions pour les composés comportant à la fois des groupements acides et basiques, pour lesquels la solubilité est la plus basse sur toute la gamme de pH au niveau du point isoélectrique [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

1.1.3 Lipophilie

La lipophilie est calculée comme le ratio entre la solubilité dans l'octanol et la solubilité dans l'eau. Elle affecte la solubilité et la perméabilité ainsi que d'autres propriétés ADME comme la liaison aux protéines plasmatiques et la distribution tissulaire. La partition d'un composé dépend de l'état d'ionisation de celui-ci et donc du pH.

1.1.4 Propriétés tensioactives

De nombreuses molécules sont tensioactives, car elles possèdent à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe, et sont donc capables de former des micelles. La tensio-activité augmente la solubilité en milieu aqueux grâce à la formation de ces micelles ou d'autres formes d'agrégats (exemples: Sandimmun® Néoral®), dans lesquels les groupements hydrophobes ne sont pas exposés au milieu aqueux. Les tensioactifs peuvent aussi déstabiliser ou détériorer les membranes et donc être toxiques [Kodavanti et Mehendale, 1990].

Si le soluté est hydrophobe, l'addition de tensioactifs à un solvant aqueux peut augmenter la solubilisation en incorporant le soluté dans des micelles. Les effets de cette solubilisation peuvent être observés avec des fluides gastro-intestinaux artificiels, qui contiennent typiquement des sels biliaires et d'autres tensioactifs [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

1.1.5 Stabilité

Les études de stabilité réalisées à ce stade ont pour but d'obtenir un aperçu de la stabilité de la molécule dans différentes situations pharmaceutiques et ainsi identifier les problèmes potentiels pouvant affecter le développement du composé. Les informations obtenues à partir de ces études peuvent être utilisées pour :

- fournir un retour aux équipes de recherche pour modifier les groupes labiles afin d'améliorer la stabilité.
- aider les scientifiques des équipes de développement à déterminer les possibilités de développement du composé.
- fournir des recommandations sur la manipulation et le stockage du composé.
- fournir des informations pour guider les stratégies de stabilisation [Gudmundsson et Venkatesh, 2004 ; Kerns, 2001 ; Di et Kerns, 2003].

Les recommandations sur les tests de stabilité sur les nouveaux composés Q1A(R2), issues des conférences internationales d'harmonisation (ICH), requièrent que les composés soient testés sous différentes conditions de stress donnant des indications sur les contraintes environnementales auxquelles la molécule sera exposée. Elles suggèrent que ces tests de stress incluent les effets du pH, de la température, de l'humidité, de la lumière et des agents oxydants [ICH, international conference on harmonization, 2003]. Ainsi, ces conditions accélérées de dégradation des molécules permettent au formulateur de vérifier rapidement la stabilité de la molécule formulée, ceci sur la base des lois cinétiques de dégradation qui permettent l'extrapolation à long terme.

1.1.5.1 Stabilité en solution en fonction du pH

La stabilité d'un composé en fonction du pH peut être testée à 37°C à pH 1, pH 4, pH 7, et pH 9 de 1 jour à un mois par analyse par HPLC. Les études devraient être initiées à des concentrations pertinentes par rapport aux doses prévues pour l'administration clinique. Ces tests sont donc effectués dans des conditions proches de cette future administration (pH physiologiques, température...), mais très souvent incompatibles avec la solubilité du composé

testé. Dans ce cas, des solvants organiques comme l'acétonitrile et le méthanol peuvent être ajoutés [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

1.1.5.2 Stabilité à l'état solide

La stabilité à l'état solide des composés en fonction de la température et de l'humidité, doit être étudiée à l'étape de la sélection du candidat au développement. Les réactions qui se produisent dans le composé à l'état solide incluent : les transformations de phase depuis l'état solide, la déshydratation/désolvation et les réactions chimiques [Byrn, Xu, Newman *et al*, 2001].

La dégradation à l'état solide des composés pharmaceutiques est souvent liée à la mobilité moléculaire. Les voies de dégradation communes incluent l'oxydation, la cyclisation, et l'hydrolyse. La stabilité chimique d'une substance à l'état solide peut être évaluée sous différentes conditions de température et d'humidité. Des échantillons pré-pesés sont mis dans des étuves à 40°C, 60°C et 25°C à 85% d'humidité relative (RH, tubes ouverts), ainsi qu'à 40°C et 75% RH (tubes ouverts) pendant 2, 4, et 8 semaines.

A des intervalles de temps prédéterminés, les échantillons sont retirés de la chambre de stabilité, dissous dans un solvant approprié et analysés par HPLC. Il est en général assez difficile d'estimer les transformations de phase de l'état solide au cours du processus de développement en raison de la quantité limitée de composé.

Les solides mentionnés ci-dessus devraient être évalués à la fin de l'étude par calorimétrie à balayage différentiel, analyse thermogravimétrique et diffractométrie par rayons X afin de déterminer si il y a des changements dans les formes polymorphiques sous les conditions testées. Les résultats préliminaires de ces études peuvent aider les scientifiques du développement à concevoir des tests de stabilité à grande échelle [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

1.1.5.3 Stabilité à l'oxydation.

L'oxydation est l'une des voies de dégradation les plus communes pour les composés organiques. L'oxydation peut se produire selon une réaction en chaîne impliquant les étapes d'initiation, propagation et terminaison. Elle est catalysée par la chaleur, la lumière, certains métaux, ou des radicaux libres. Elle peut aussi se produire par des réactions de transfert d'électrons pour former des radicaux réactifs d'anions ou de cations. A l'état solide, l'oxydation se produit où l'oxygène moléculaire diffuse au travers du maillage du cristal jusqu'aux sites labiles [Hovorka et Schöneich, 2001; Waterman, Adami, Alsante *et al*, 2002].

Certains groupes fonctionnels présentent une sensibilité particulière envers l'oxydation. Pour les réactions en chaîne, la dégradation oxydative est liée à la labilité des atomes d'hydrogène avec le cadre moléculaire. Par exemple, des cycles aromatiques substitués comme les toluènes, phénols et anisoles sont sensibles à l'abstraction de l'hydrogène car le groupe aromatique peut stabiliser le radical résultant par résonance. Pour les réactions de transfert d'électrons, l'azote (présent dans les amines), les hétéroatomes de soufre, et les anions à base d'oxygène sont des sites communs pour l'oxydation induite par transfert d'électrons, produisant des produits finaux tels que les N-oxides, sulfoxides, sulfones, et cétones [Waterman, Adami, Alsante *et al*, 2002].

1.1.5.4 Photostabilité

L'exposition de la molécule à une irradiation peut influencer sa stabilité. La photostabilité des composés devrait être testée au début du processus de recherche. Il est nécessaire de connaître la photo-réactivité du composé afin de fournir des informations sur sa manipulation, son emballage, son étiquetage, et l'utilisation du produit [Tønnesen, 2001].

Au stade de la sélection du candidat, la photostabilité devrait être évaluée à l'état solide et en solution.

Pour la photostabilité à l'état solide, la substance pré-pesée est entreposée dans des conditions de lumière de forte intensité et sous rayonnement UV à 25 °C dans une chambre de photostabilité selon les recommandations ICH (exposition de 1,2 millions de lux heure à la lumière visible et 200 W heure/m² aux UV). A la fin de l'expérience le solide est dissous dans un solvant approprié et analysé par HPLC.

Pour la photostabilité en solution, des solutions de concentrations appropriées sont stockées dans les conditions recommandées par les ICH et analysées par HPLC.

Pour les deux types de photostabilités, des échantillons protégés de la lumière, sont stockés dans les mêmes conditions et sont utilisés comme contrôles [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

Aux premiers stades de la recherche c'est l'exposition de la cible thérapeutique à la molécule testée que l'on recherche. Pour permettre d'atteindre une exposition maximale, il faut trouver un véhicule convenable. Dans le cas d'une administration par voie orale on préférera une solution car dans ce cas la forme physique initiale, le polymorphisme ou la distribution de la taille des particules n'ont pas d'influence sur la performance *in vivo* de la formulation.

Au fur et à mesure du développement, la formulation sera développée au cas par cas selon les besoins des études cliniques. Quelle que soit la formulation choisie, celle-ci sera caractérisée. Si la quantité de substance nécessaire pour les essais de formulation en vue d'études toxicologiques préliminaires est limitée, mais que par ailleurs des données sur un composé de la même famille chimique sont disponibles, la stratégie galénique va s'orienter sur la base des données existantes, sans essais spécifiques au candidat effectués préalablement. Dans ce cas il n'y aura pas de données sur la stabilité de la formulation et celle-ci sera réalisée si le candidat est ensuite testé en clinique.

Si des essais de formulation sont mis en place, le niveau de caractérisation dépendra de l'étude *in vivo* chez l'animal pour laquelle elle est réalisée : pour une administration en dose unique et si une préparation extemporanée est possible, il faudra simplement des données sur la stabilité physique évaluée visuellement afin de s'assurer de sa stabilité entre sa réalisation et son administration. Dans le cas d'études répétées, la stabilité physique et chimique, si possible sera vérifiée sur une période correspondant à la durée des études.

Toutes les suspensions développées devront être grossièrement caractérisées :

- estimation de la taille des particules par microscopie,
- évaluation de la cristallinité par diffractométrie des poudres par rayons X,
- estimation de la fraction solubilisée par HPLC
- quantification des éventuels produits de dégradation par HPLC.

L'évolution de ces paramètres devrait être suivie sur une période correspondant à la durée des études pour lesquelles elles ont été réalisées.

1.2 Lors de la sélection du sel

Dans le cas d'un composé ionisable, il peut y avoir formation d'un ou plusieurs sels. Ceux-ci peuvent présenter des qualités plus intéressantes comme une meilleure dissolution, hygroscopie, stabilité à l'état solide, ou peuvent former un polymorphe.

Ces études sont mises en place afin de définir les forces et les limitations et/ou les avantages des différents sels par rapport au composé libre, en prenant en compte les formulations envisagées.

Les études de sélection du sel s'articulent sur l'évaluation des points suivants :

- la teneur en matériel actif,
- la pureté estimée par HPLC,
- la cristallinité estimée par diffractométrie des poudres par rayons X,
- la taille et la forme des particules évaluées par microscopie,

- l'hygroscopie estimée par adsorption dynamique de vapeur,
- les polymorphismes étudiés par diffractométrie des poudres par rayons X en utilisant différentes conditions de températures et d'humidités relatives (recommandées par les ICH) ainsi que par gamme de cristallisation,
- les mesures de solubilité sont réalisées dans différents tampons (selon les conditions BCS) et dans les différents fluides gastrointestinaux simulés (FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid, FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid),
- les études de dissolution *in vitro* sont réalisées dans des conditions aussi proches que possibles de l'état physiologique afin d'anticiper le comportement des différents sels au long du tractus gastro-intestinal.

En se basant sur les données ainsi obtenues, les différents départements, développement chimique, analytique, feront une recommandation commune sur le composé qu'ils estiment devoir être développé.

Une fois celui-ci choisi, approuvé par les décideurs, une forme galénique standard ou un système de délivrance particulier (exemple comprimé gastro-résistant), sera recommandé en fonction de la dose pour la suite du développement.

La nécessité d'une micronisation, la classification BCS du composé et la nécessité d'une étude chez l'animal seront aussi évaluées.

1.3 Lors de la sélection d'un polymorphe

Selon les conditions de solvants et de températures une molécule peut cristalliser sous différentes formes.

Deux formes identiques en phase liquide et vapeur sont dites polymorphes si elles présentent une structure cristalline différente.

Environ un tiers des composés chimiques présentent un polymorphisme, or ces polymorphes n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques, ni pharmacologiques. Il est donc important de pouvoir les différencier.

2 Les études de préformulation

2.1 Caractérisation physico-chimique

Un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques, propriétés intrinsèques de la molécule, sont connues depuis la sélection du composé : la structure chimique, le poids moléculaire, le pKa, la cristallinité, la lipophilie (log P), le point de fusion (déterminé par DSC (Differential Scanning Calorimetry)), l'hygroscopicité, l'influence du pH sur la stabilité...

Certaines de ces données doivent être affinées, d'autres sont nécessaires pour la suite du développement de la molécule :

- la distribution de la taille des particules estimée par diffraction laser,
- la surface de contact spécifique obtenue par diffractométrie des poudres par rayons X,
- la triboélectricité,
- la mouillabilité,
- propriétés hygroscopiques.

D'autres paramètres peuvent être testés afin de choisir le procédé de fabrication le mieux adapté: la densité réelle et apparente, les qualités d'écoulement, la compressibilité.

Si la solubilité de la substance n'est pas satisfaisante, la faisabilité de la micronisation et ses effets devraient être évalués. Dans le cas d'une poudre abrasive cette technique n'est pas applicable car les particules arrachent le revêtement métallique de l'équipement. Dans le cas où la micronisation est possible une réduction de la taille des particules permet en effet souvent une mise en suspension de la poudre et une augmentation de la surface de contact entre la molécule et la membrane intestinale.

2.2 Etudes de solubilité

Les premiers essais de solubilité sont réalisés à 22°C dans des milieux communément utilisés :

- milieu aqueux à différents pH afin de déterminer la solubilité en fonction de celui-ci,
- fluides gastro-intestinaux simulés : FaSSIF et FeSSIF,
- milieu aqueux avec différents environnements ioniques,
- milieu aqueux avec des tensioactifs ou des cyclodextrines,

- milieux organiques : éthanol, glycols, huiles.

En effet, ces milieux sont ceux auxquels la molécule sera exposée lors de son administration et les solvants les plus couramment utilisés en formulation. Ceci permet d'évaluer le comportement de la molécule dans les milieux qu'elle devra traverser pour atteindre son site d'action, ainsi que de choisir les excipients les mieux adaptés pour sa formulation.

Les propriétés tensioactives de la molécule peuvent aussi être vérifiées en mesurant la concentration micellaire critique (CMC).

2.3 Etudes de compatibilité

Ces études aident à prédire si certains excipients sont chimiquement incompatibles avec la molécule active, une fois combinés dans une formulation.

- Les excipients :

- Sont choisis en fonction des caractéristiques physico-chimiques de la molécule active : insolubilité, complexation, etc...
- Doivent être totalement acceptés par les autorités pour l'utilisation que l'on souhaite en faire : excipients dits GRAS (Generally Recognised As Safe) ou décrits dans les monographies des pharmacopées.
- Des excipients nouveaux ou spécialisés devraient n'être testés que si les excipients conventionnels ne sont pas envisageables, car ils nécessitent de nombreuses études additionnelles.

- Plan des études de compatibilité des excipients :

- Les composés probablement non réactifs sont évalués dans une proto formulation : ainsi chaque type d'excipient doit être inclus dans les proportions dans lesquels il est habituellement employé dans une formulation typique (exemple : stéarate de magnésium rarement utilisé à plus de 2% en tant que lubrifiant pour la compression).
- Les composés potentiellement réactifs sont initialement évalués via un plan expérimental réduit.

3 Quelques techniques utilisées pour caractériser les molécules

3.1 Diffraction par rayon X

La structure tridimensionnelle des matériaux non amorphes, tels que les minéraux, est définie par des répétitions régulières de plans d'atomes formant un maillage de cristal. Quand un rayon X focalisé interagit avec ces plans d'atomes, une partie du rayon est transmise, une partie est réfractée et dispersée, et une partie est diffractée. La diffraction d'un rayon X par un solide cristallin est analogue à la diffraction de la lumière par des gouttes d'eau, produisant un arc-en-ciel. Les rayons X sont diffractés différemment par chaque minéral, en fonction du maillage cristallin et de la façon dont les atomes sont arrangés.

Les rayons X sont générés à l'intérieur d'un tube scellé sous vide. Un courant est appliqué et chauffe un filament dans le tube ; plus le courant est élevé plus le nombre d'électrons émis par le filament est important. Cette production d'électron est analogue à celle d'un tube cathodique de téléviseur. Un haut voltage, habituellement 15 à 60 kilovolts, est appliqué dans le tube et il accélère les électrons qui ensuite frappent une cible, communément faite de cuivre. Quand ces électrons frappent la cible, les rayons X sont produits.

La longueur d'onde de ces rayons est caractéristique de la cible. Ces rayons sont collimatés et dirigés sur l'échantillon, qui a été moulu en une fine poudre (particules de moins de 10 microns). Un détecteur capte le signal des rayons X, qui est ensuite intégré soit par un microprocesseur soit électroniquement, et converti en un taux de compte.

On obtient un balayage de rayon X en changeant l'angle entre la source des rayons, l'échantillon et le détecteur à une vitesse contrôlée entre des limites prédéfinies

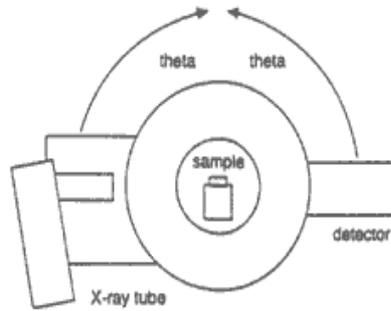


Figure 6: Schéma simplifié d'une configuration possible d'une source de rayons X, d'un détecteur de rayons X et de l'échantillon (sample) durant un scan des rayons X. dans cette configuration, le tube émetteur de rayons X (X-ray tube) et le détecteur bougent tous deux suivant l'angle thêta (θ), et l'échantillon reste stationnaire. D'après <http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html> .

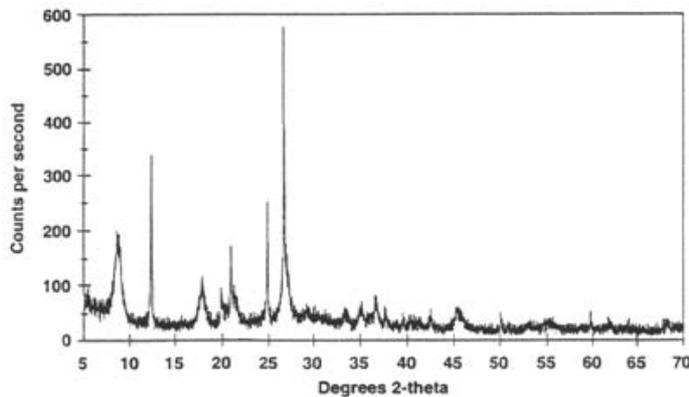


Figure 7: Exemple d'un diffractogramme par rayons X produit durant un balayage. Les pics représentent les positions où le faisceau de rayons x a été diffracté par le maillage du cristal. D'après <http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html>.

Quand un faisceau de rayons X frappe un échantillon puis est diffracté, on peut mesurer la distance entre deux plans d'atomes constituant l'échantillon en appliquant la loi de Bragg :

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Où n est l'ordre du faisceau de diffraction, λ est la longueur d'onde du faisceau incident de rayons X, d est la distance entre deux plans adjacents d'atomes (espacement d), et θ est l'angle d'incidence du faisceau de rayons X. Connaissant λ et pouvant mesurer θ , nous pouvons calculer les espacements d . La géométrie d'une unité de mesure par rayon X est dessinée afin de permettre cette mesure (fig. 7). Les données caractéristiques d'espacement d ainsi obtenues, fournissent une empreinte digitale unique du ou des minéraux présents dans l'échantillon. Si elle est correctement interprétée, par comparaison avec des dessins et

mesures de référence standards, cette empreinte permet une identification du matériel testé [<http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html>].

3.2 Méthodes thermiques

3.2.1 Calorimétrie et analyse thermique

Ces techniques permettent de mesurer les flux de chaleur, la masse, le courant de dépolarisation... Le pic du changement de phase peut être endo ou exothermique, il met en évidence le point de fusion et l'enthalpie (énergie nécessaire pour faire fondre la poudre) de la réaction. Si le pic est étroit l'échantillon est pur, si le pic est plus large il y a une impureté. Il est possible de comparer le produit fabriqué avec un échantillon de pureté connue.

En solution, différentes formes de la molécule peuvent être présentes : cristal, amorphe, solvate ou hydrate. Il est nécessaire de contrôler le polymorphisme, chaque forme ayant un comportement différent. La molécule existant avec la plus petite énergie libre de GIBBS est la forme plus stable.

3.2.2 Analyse de DSC (calorimétrie à balayage différentiel)

Cette technique permet d'observer l'évolution des propriétés thermodynamiques d'un échantillon pendant un traitement thermique en mesurant les échanges de chaleur entre l'échantillon et l'équipement mesurant la quantité d'énergie absorbée ou libérée lors des transitions de phases (fusion, transition vitreuse, recristallisation...).

En présence d'un mélange de substances cristallisée et amorphe, la DSC permet d'analyser le pourcentage de substance amorphe : elle montre la transition du verre, puis la recristallisation de la phase amorphe. Il convient de noter que si le pourcentage des phases amorphes est bas, un DSC très sensible est nécessaire afin de détecter le pic de cristallisation.

3.2.3 CTS : courant thermo stimulé

Il permet d'étudier la mobilité de certaines parties de la molécule. La molécule est mise entre 2 électrodes à une température et une pression données. On applique alors un champ électrique, ainsi tous les dipôles dans la molécule s'orientent d'eux même selon le champ : la molécule est polarisée. On gèle l'échantillon, ainsi la molécule reste dans son état polarisé, on arrête le champ électrique, on réchauffe graduellement la molécule, et on enregistre le pic du courant de dépolarisation dû aux dipôles qui se déplacent à nouveau. Pour les chaînes courtes celui-ci a lieu à basses températures, et pour les chaînes longues à température élevée, ce qui permet de distinguer 2 formes cristallines.

Si on veut mesurer la teneur de la forme amorphe, on doit établir une courbe d'étalonnage analysant différents mélanges de rapport connu entre la forme cristalline de A et la forme amorphe, ainsi on peut comparer l'échantillon à la courbe. Ceci permet de mesurer tout contenu amorphe supérieur à 2.5% [Andre, 2006].

3.3 Distribution de la taille des particules : méthodes utilisant un laser

3.3.1 Dispersion statique de la Lumière (Static light scattering ou SLS) « Diffraction laser »

Lorsqu'on projette un faisceau laser sur un échantillon on observe derrière celui-ci une image de cercles concentriques. En effet les particules dispersent le faisceau laser sous un angle qui dépend de leur rayon de courbure. Les grandes particules induisent un petit angle de dispersion de ce fait les anneaux sont très proches. Les petites particules induisent un grand angle de dispersion de ce fait les anneaux sont plus espacés. La théorie de Mie permet de calculer la taille des particules à partir de la distance des anneaux (ou de l'angle de diffraction correspondant).

Pour estimer la distribution de taille il faut comparer le signal de dispersion global et les signaux de dispersion de particules de la taille définie, la meilleure association de ces derniers donnant l'image la plus proche du signal de dispersion global, donne la répartition de taille de l'échantillon. Cette technique permet de mesurer le diamètre, la D50, la D 10, la D90, l'étendue de la distribution de taille, le pourcentage de particules grosses ou fines.

On a besoin d'échantillons très représentatifs : il est nécessaire d'éviter l'agglomération des particules très fines lors de leur préparation. Pour cela il faut :

- connaître les propriétés chimiques de la substance,
- choisir un bon milieu dispersif pour la stabilité de solution,
- choisir la bonne vitesse d'agitation,
- « ultra-soniquer » la poudre pendant l'essai pour éviter l'agglomération,
- peut-être réaliser une préparation spécifique,
- adapter le niveau de pression,
- ajouter des produits externes pour augmenter la fluidité, si nécessaire.

3.3.2 Dispersion dynamique de la lumière (dynamic light scattering ou DLS)

Quand un faisceau de lumière traverse une dispersion colloïdale, les particules ou les gouttelettes dispersent une partie de la lumière dans toutes les directions. Quand les particules sont très petites comparées à la longueur d'onde de la lumière, l'intensité de la lumière dispersée est uniforme dans toutes les directions. Si la lumière est cohérente et monochromatique, comme celle d'un laser par exemple, il est possible d'observer des fluctuations dépendant du temps dans l'intensité de la lumière dispersée en utilisant un détecteur approprié tel qu'un photomultiplicateur capable d'opérer en mode comptage de photon [<http://www.brookhaven.co.uk/dynamic-light-scattering.html>].

Cette technique permet de mesurer l'effet de la dimension des particules, du solvant et de la température, sur les mouvements browniens, on mesure le décalage de fréquence des signaux de dispersion : les petites particules induisent des fréquences élevées parce que leur vitesse de déplacement est très haute, les grandes particules induisent de plus basses fréquences parce que leurs mouvements sont plus lents. La DLS peut mesurer des échantillons de concentration élevée allant de 1ppm jusqu'à 40% en masse [<http://www.brookhaven.co.uk/dynamic-light-scattering.html>].

Mais s'il est encore nécessaire de diluer l'échantillon, il faut bien se rendre compte que cela affectera souvent la taille des agrégats. Si l'échantillon doit être dilué, il faut vérifier les différences de propriétés chimiques et de comportement entre l'échantillon dilué et la préparation originale, idem si on ajoute un additif, le pH et la viscosité de l'échantillon influençant également les résultats.

Ces deux méthodes, SLS et DLS, sont rapides : cela prend seulement 1 minute pour examiner un échantillon, elles ont de bonnes statistiques : beaucoup de particules sont analysées, la répétabilité est excellente, la déviation est inférieure à 2%. Ces méthodes mesurent des sphères équivalentes ce qui signifie une moyenne entre les différentes positions dans lesquelles les particules se trouvent, ainsi que les différentes formes des particules. La plupart du temps, ces méthodes mesurent l'agglomération.

3.4 L'adsorption de vapeur dynamique

Cette technique permet d'étudier les domaines de stabilité pour une température donnée et les changements d'hydratation des composés (passage de formes anhydres à hydratées ou d'hydrates à des hydrates supérieurs).

L'appareil emploie un gaz porteur sec, habituellement l'azote, et l'utilisateur peut choisir une de deux sources quelconques de vapeurs. La commande précise du rapport de flux des gaz porteurs saturés et secs est permise avec la commande du débit d'écoulement combinée avec l'utilisation de la surveillance en temps réel de la concentration de la vapeur en eau et en produits organiques. Une concentration connue de la vapeur choisie circule alors sur un échantillon suspendu dans une ultra-microbalance enregistruse, qui mesure le changement de poids provoqué par sorption (adhésion à la surface de l'échantillon) ou désorption de la molécule de vapeur. Ce sont ces états dynamiques d'écoulement qui permettent aux processus d'adsorption/désorption d'être étudiés si rapidement.

L'échantillon peut être préchauffé cela peut accélérer la durée de cycle d'analyse comme dans le cas de l'absorption en bloc ou le séchage des hydrates inorganiques. Ce chauffage peut être instantané ou se traduire par une hausse graduelle contrôlée de la température.

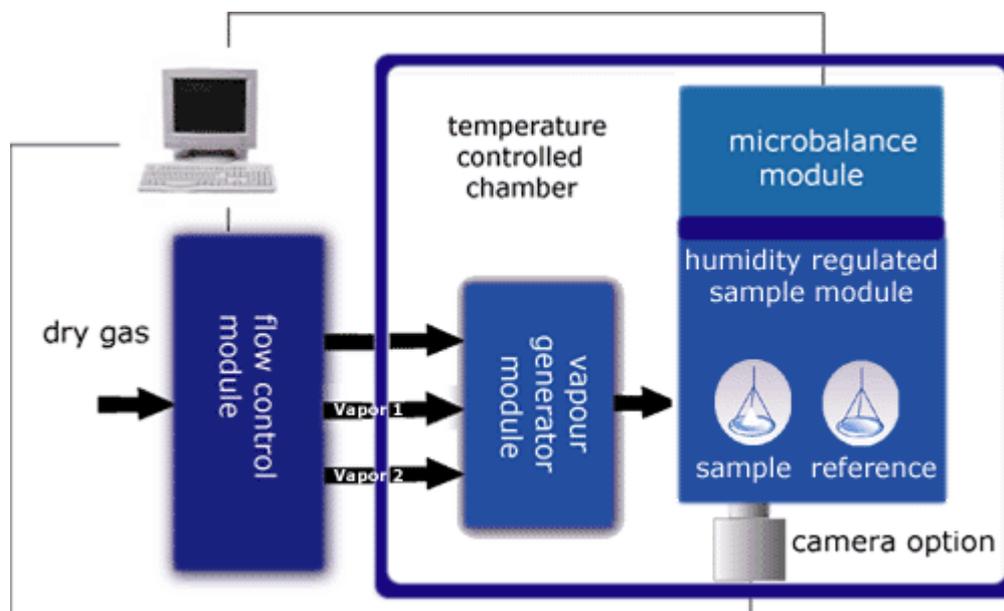


Figure 8: Schéma de fonctionnement du DVS Advantage, d'après Surface Measurements Systems Ltd 2006.

La sensibilité et la précision de l'appareil de DVS permettent l'utilisation des échantillons très petits (en général 1 à 30mg) de ce fait à l'équilibre est atteint plus rapidement [http://www.smsuk.co.uk/Products_DVS_Technique.php].

Partie 3 : Système de classification biopharmaceutique (BCS)

1 Définition

Créé par la FDA, il permet de classer les composés pharmaceutiques selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité intestinale. C'est l'un des outils de pronostic les plus efficaces facilitant le développement (le BCS a été proposé par G. Amidon en 1995). En combinant le BCS avec la dissolution du composé on prend en compte les deux facteurs majeurs gouvernant le taux et l'ampleur de l'absorption d'une molécule candidate : la dissolution et la perméabilité intestinale. En 2005, Wu et Benet ont ajouté le troisième facteur clé (l'effet de premier passage hépato-gastrointestinal), le système de classification est alors appelé Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS) En effet, connaissant ceux ci, on augmente les capacités de prédictions des effets de certaines variables, telles que la formulation, la nourriture et les maladies, qui altèrent l'absorption par voie orale des molécules [Chen, Antman, Gesenberg *et al*, 2006].

Actuellement, les composés pharmaceutiques sont regroupés selon les quatre catégories suivantes :

- BCS classe I : solubilité élevée, perméabilité élevée : ces composés sont très bien absorbés.
- BCS classe II : faible solubilité, perméabilité élevée : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de dissolution.
- BCS classe III : solubilité élevée, faible perméabilité : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de perméabilité. Pour ces composés on essaie de modifier légèrement la structure chimique.
- BCS classe IV : faible solubilité et faible perméabilité [*US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000*].

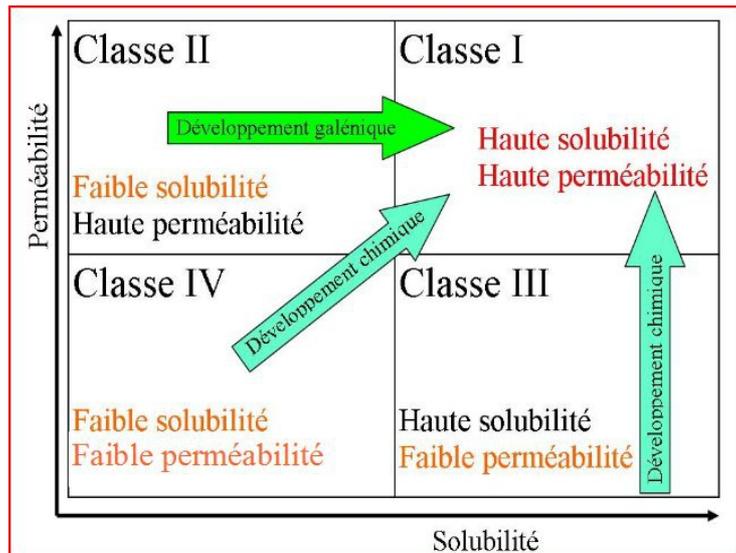


Figure 9: Représentation du système de classification biopharmaceutique montrant que l'absorption d'un composé de classe II peut être améliorée grâce à la formulation galénique. Les composés de classe III et IV peuvent voir leur absorption augmentée après modification chimique. D'après Pouton 2005.

1.1 Solubilité : premier paramètre de la classification

On classe les molécules en fonction de la solubilité de la dose la plus élevée (prévue pour administration) dans 250 ml ou moins du milieu adéquat dans une gamme de pH allant de 1 à 7,5 à 37°C sans aucune émergence de problème de stabilité. Le volume de 250 ml provient des protocoles typiques des études de bioéquivalence qui préconisent l'administration du composé pharmaceutique aux volontaires sains à jeun avec un verre d'eau.

1.2 Perméabilité : second paramètre de la classification

On classe les molécules en fonction de l'ampleur de l'absorption (fraction de dose absorbée et non biodisponibilité systémique) d'une substance pharmaceutique chez l'homme et directement sur des mesures du taux de transfert de masse à travers la membrane intestinale humaine. Alternativement, des systèmes non humains capables de prévoir l'ampleur de l'absorption du composé chez l'homme peuvent être employés (par exemple, des méthodes de culture de cellules épithéliales *in vitro*). En l'absence de preuve suggérant l'instabilité dans l'appareil gastro-intestinal, un composé est considéré comme fortement perméable quand l'ampleur de l'absorption chez l'homme est égale à 85% ou plus d'une dose administrée. Cette

mesure est basée sur une détermination d'équilibre de masse ou par rapport à une dose intraveineuse de référence.

Composé ayant une faible solubilité :

La dose la plus élevée (prévue pour administration) n'est pas soluble dans 250 ml ou moins d'une solution tampon dans une gamme de pH allant de 1 à 7,5 à 37°C.

Composé ayant une perméabilité élevée :

L'absorption de la dose administrée est égale ou supérieure à 85% chez l'homme.

Composé ayant une dissolution rapide :

85% ou plus du composé se dissolvent en 30 minutes en utilisant l'appareil à panier à une vitesse de 100 rpm (rotation par minute) ou l'appareil à palettes à 50 rpm, dans des conditions de pH similaires à celles de l'estomac (pH=1,2), ou de l'intestin (pH=4,5 et pH=6,8) [39].

2 Méthodologie de classement d'un composé pharmaceutique et détermination des caractéristiques de dissolution de ce composé

2.1 Détermination de la solubilité

Un objectif du BCS est de déterminer la solubilité à l'équilibre d'une substance dans des conditions physiologiques de pH. Le profil de solubilité en fonction du pH de la substance devrait être déterminé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ dans des solutions tampons avec une gamme de pH de 1 à 7,5. Un nombre suffisant de valeurs de pH devrait être évalué pour définir exactement le profil de solubilité. Le nombre de conditions de pH pour une détermination de solubilité peut être basé sur les caractéristiques d'ionisation de la substance soumise à ces essais. Par exemple, quand le pKa d'une molécule est compris entre 3 et 5, la solubilité devrait être déterminée à $\text{pH} = \text{pKa}$, $\text{pH} = \text{pKa} + 1$, $\text{pH} = \text{pKa} - 1$, et à $\text{pH} = 1$ et 7,5. Un minimum de trois mesures de détermination de la solubilité en chaque état de pH est recommandé. Selon la variabilité d'étude, une mesure additionnelle peut être nécessaire pour fournir une évaluation fiable de la solubilité. Les solutions tampon standard décrites dans la pharmacopée sont considérées comme appropriées dans des études de solubilité. Si ces tampons ne sont pas appropriés pour des raisons physiques ou chimiques, d'autres solutions tampon peuvent être employées. Le pH de la solution devrait être vérifié après l'addition de la molécule active à un tampon. Des alternatives à la méthode traditionnelle de flacon agitateur, telle que la titration par acide ou base, peuvent également être employées si on justifie leur capacité à prévoir la solubilité à l'équilibre de la substance. La concentration de la substance dans les tampons choisis devrait être déterminée en utilisant un essai de stabilité validé permettant de distinguer la substance de ses produits de dégradation. Si on constate que la dégradation de la substance s'effectue en fonction de la composition en solution tampon et/ou du pH, il devrait être rapporté avec d'autres données de stabilité recommandées.

La classe de solubilité devrait être déterminée en calculant le volume d'un milieu aqueux suffisant pour dissoudre la dose la plus élevée dans la gamme de pH de 1 à 7,5. Une substance devrait être classifiée comme fortement soluble quand la dose la plus élevée est soluble dans 250 ml ou moins d'un milieu aqueux dans une gamme de pH de 1 à 7,5.

2.2 Détermination de la perméabilité:

La classe de perméabilité d'une substance peut être déterminée chez l'homme en utilisant le bilan de matière, la biodisponibilité absolue, ou les approches de perfusion intestinale. Les méthodes recommandées n'impliquant pas l'homme incluent la perfusion intestinale *in vivo* ou *in situ* dans un modèle animal approprié (par exemple le rat), et/ou les méthodes *in vitro* de perméabilité en utilisant les tissus intestinaux excisés, ou les mono-couches de cellules épithéliales appropriées. Dans beaucoup de cas, une méthode simple peut être suffisante (par exemple, quand la biodisponibilité absolue est de 90% ou plus, ou quand 90% ou plus de la molécule administrée est récupéré dans les urines). Quand une méthode simple ne démontre pas d'une manière concluante une classification de perméabilité, deux méthodes différentes peuvent être recommandées. La structure chimique et/ou certains attributs physico-chimiques d'une substance (par exemple, coefficient de partition dans un système approprié) peuvent fournir des informations utiles au sujet de ses caractéristiques de perméabilité.

Le taux d'absorption chez l'homme est estimé à l'aide :

- d'études pharmacocinétiques d'équilibre de masse,
- d'études de biodisponibilités absolues.

La perméabilité intestinale est quant à elle estimée grâce à des :

- études *in vivo* de perfusion intestinale chez l'homme,
- études *in vivo* ou *in situ* de perfusion intestinale chez l'animal,
- expériences de perméation *in vitro* sur tissu intestinal humain ou animal excisé,
- expériences de perméation *in vitro* au travers d'une mono couche de cellules épithéliales.

2.2.1 Etudes pharmacocinétiques chez l'homme

2.2.1.1 Etudes d'équilibre de masse

Les études pharmacocinétiques de bilan de matière utilisant les isotopes non marqués et stables ou une substance radioactive peuvent être employées pour documenter l'ampleur de l'absorption d'une molécule. Selon la variabilité des études, le nombre des sujets devra être suffisant pour fournir une évaluation fiable de l'ampleur de l'absorption. Puisque cette méthode peut fournir des évaluations très variables de l'absorption pour beaucoup de substances, d'autres méthodes décrites ci-dessous sont préférables.

2.2.1.2 Etudes de biodisponibilité absolue

La détermination orale de la biodisponibilité employant l'administration intraveineuse comme référence peut être employée. Selon la variabilité des études, le nombre de sujet inclus dans l'étude devra être suffisant pour fournir une évaluation fiable de l'ampleur de l'absorption. Quand la biodisponibilité absolue d'une molécule s'avère être de 90% ou plus, les données additionnelles pour documenter la stabilité de la molécule dans le fluide gastro-intestinal ne sont pas nécessaires. Dans le cas contraire les études additionnelles dans les liquides FaSSIF et FeSSIF seront réalisées.

2.2.2 Etudes de perméabilité intestinale

Les études *in vivo* ou *in situ* sur un modèle animal et les méthodes *in vitro*, comme ceux qui emploient les mono-couches cultivées des cellules épithéliales animales ou humaines, sont considérés comme appropriés pour les molécules transportées passivement. La faible perméabilité observée de quelques substances chez l'homme pourrait être provoquée par le flux des molécules par l'intermédiaire des transporteurs de membrane tels que la Pgp. Quand les transporteurs de flux sont absents dans ces modèles, ou leur degré d'expression est bas comparé à celui chez l'homme, il peut y avoir une plus grande probabilité de fausse classification de perméabilité pour une molécule transportée par transporteur membranaire comparé à une molécule transportée passivement. La présence des transporteurs connus dans les systèmes d'étude choisis devrait être caractérisée. L'expression fonctionnelle des systèmes de flux (par exemple, Pgp) peut être démontrée avec des techniques telles que des études bidirectionnelles de transport, démontrant un taux plus élevé de transport dans la direction basolatérale-à-apicale par rapport à la direction apicale-à-basolatérale en utilisant les molécules ou les produits chimiques modèles choisis aux concentrations qui ne saturent pas le système de flux (par exemple, ciclosporine A, vinblastine, rhodamine 123). Un critère d'acceptation pour le flux intestinal devrait être présent dans un système d'essai mais ne peut pas toujours être mis en place. Dans ce cas il est recommandé de préférer des méthodes d'essai de perméabilité sur l'homme pour les molécules qui sont transportées par les mécanismes passifs. Les études pharmacocinétiques sur des linéarités où la proportionnalité de dose peuvent fournir des informations utiles pour évaluer la pertinence du flux observé *in vitro*. Par exemple, il peut y avoir peu de soucis liés à l'utilisation des méthodes *in vitro* pour une molécule qui a un taux de transport plus élevé dans la direction basolatérale-à-apicale à de basses concentrations en substance mais suit une pharmacocinétique linéaire chez l'homme. Pour l'application du BCS, un mécanisme de transport passif apparent peut être supposé quand une des conditions suivantes est satisfaite :

- une relation pharmacocinétique linéaire entre la dose (dans une gamme de dose clinique) et la mesure de la biodisponibilité (aire sous la courbe concentration/temps) d'une substance est démontrée chez l'homme.
- Le manque de dépendance de la perméabilité mesurée *in vivo* ou *in situ* est démontré dans un modèle animal sur la concentration initiale en substance (par exemple, 0.01, 0.1, et une fois la dose la plus élevée pouvant être dissoute dans 250 ml) dans le fluide de perfusion.
- Le manque de dépendance de la perméabilité mesurée *in vitro* par rapport à la concentration initiale en principe actif (par exemple, 0.01, 0.1, et 1 fois la dose la plus élevée pouvant être dissoute en 250 ml) est démontré en de fluide donneur et direction de transport (par exemple, aucune différence statistiquement significative dans le taux de transport entre apical-à-basolatéral et la direction basolatéral-à-apicale pour les concentrations en substance choisies) employant une méthode *in vitro* appropriée de culture de cellules ayant démontré sa capacité à exprimer les transporteur d'efflux connus (par exemple la Pgp).

Pour démontrer la pertinence d'une méthode de perméabilité destinée à l'application du BCS, un rapport de rang-ordre entre les valeurs de perméabilité lors des essais et l'ampleur des données d'absorption de la substance chez des sujets humains devra être établi en utilisant un nombre suffisant de substances modèles. Pour des études de perfusion intestinale *in vivo* chez l'homme, six substances modèles sont recommandées (exemple le comparateur le plus proche du candidat, le traitement de référence pour l'indication). Pour des études de perfusion intestinale *in vivo* ou *in situ* chez les animaux et pour des méthodes *in vitro* sur culture de cellules, vingt molécules modèles sont recommandées. Selon la variabilité d'étude, un nombre suffisant de sujets, d'animaux, d'échantillons de tissu à exciser, ou de mono-couches de cellules devront être employés dans une étude pour fournir une évaluation fiable de la perméabilité d'une substance. Ce rapport devrait permettre la différenciation précise entre les substances de basse et haute perméabilité intestinale.

Afin de démontrer l'intérêt d'une méthode de perméation pour une classification BCS, les substances modèles doivent représenter une gamme de faible (<50%), de moyenne (50%-89%), et de haute (>90%) absorption.

Après avoir démontré la pertinence d'une méthode, si on conserve le même protocole d'étude, il n'est pas nécessaire d'essayer de nouveau toutes les molécules modèles choisies. Une molécule du modèle de basse et une de haute perméabilité devrait être employées en tant qu'étalons internes (c.-à-d., inclus en fluide de perfusion ou fluide donneur avec la substance

testée). Ces deux étalons internes sont en plus du marqueur du volume de liquide (ou d'un composé zéro de perméabilité nulle tel que le PEG 4000) qui est inclus dans certains types de techniques de perfusion (par exemple, techniques de boucle bloquée). Le choix des étalons internes doit être basé sur la compatibilité avec la substance testée (c.-à-d., ils ne doivent montrer aucune interaction significative physique, chimique ou au niveau de la perméation). Quand il n'est pas possible de suivre ce protocole, la perméabilité des étalons internes devrait être déterminée dans les mêmes sujets, animaux, tissus, ou mono couches, après l'évaluation de la substance testée. Les valeurs de perméabilité des deux étalons internes ne devraient pas différer de manière significative entre différents essais, y compris ceux conduits pour démontrer la convenance de la méthode. À la fin d'un essai *in situ* ou *in vitro*, la quantité de molécule dans la membrane devra être déterminée.

Pour une méthode d'essai donnée dans des conditions définies, le choix d'un étalon interne de perméabilité élevée avec la perméabilité dans la proximité étroite à la frontière de classe de perméabilité basse/haute peut faciliter la classification d'une substance testée. Par exemple, une substance peut être déterminée comme étant fortement perméable quand sa valeur de perméabilité est égale ou supérieure à celle de l'étalon interne de perméabilité élevée.

2.2.3 Instabilité dans le tractus gastro-intestinal

La détermination de l'ampleur de l'absorption chez l'homme basée sur des études de bilan de matière employant la radioactivité totale dans les urines ne prend pas en compte l'ampleur de la dégradation d'une molécule dans le fluide gastro-intestinal avant la perméation de la membrane intestinale. En outre, quelques méthodes pour déterminer la perméabilité ont pu être basées sur la perte ou la clairance d'une molécule des fluides perfusés dans l'appareil gastro-intestinal humain et/ou animal *in vivo* ou *in situ*. La documentation justifiant le fait que la perte de substance de l'appareil gastro-intestinal résulte de la perméation intestinale de membrane, plutôt qu'un processus de dégradation, aidera à établir la perméabilité. La stabilité dans l'appareil gastro-intestinal peut être documentée en utilisant les fluides gastriques et intestinaux obtenus à partir des sujets humains. Des solutions de substance à tester en ces fluides doivent être incubées à 37°C pendant une période représentant le temps de contact *in vivo* de la substance avec ces fluides ; par exemple, 1 heure dans liquide gastrique et 3 heures dans le fluide intestinal. Les concentrations en substance doivent alors être déterminées en utilisant une méthode d'essai de stabilité validée. La dégradation significative (>5%) d'une substance dans ce protocole pourrait suggérer l'instabilité potentielle. L'obtention des fluides gastro-intestinaux humains exige l'intubation et peut être difficile dans certains cas. Ils

peuvent être remplacés par des fluides gastro-intestinaux des modèles animaux appropriés et/ou des fluides simulés tels que les fluides gastriques et intestinaux USP [*US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000*].

2.3 Détermination de la dissolution:

L'essai de dissolution doit être effectué dans l'appareil à panier à 100 t/min ou un appareil à palettes) à 50 t/min en utilisant 900 ml des milieux de dissolution suivants :

- (1) HCl 0.1 N ou fluide gastrique simulé sans enzymes ;
- (2) un tampon de pH 4.5 ;
- (3) un tampon de pH 6.8 ou un fluide intestinal simulé sans enzymes.

Pour des capsules et des comprimés avec un enrobage de gélatine, les fluides gastriques et intestinaux simulés, avec des enzymes, peuvent être employés.

L'appareillage d'essai de dissolution utilisé dans cette évaluation doit répondre aux exigences des monographies de la pharmacopée. Le choix de l'appareil d'essai de dissolution pendant le développement de la molécule doit être basé sur une comparaison de la dissolution *in vitro* et des données pharmacocinétiques *in vivo* disponibles pour le produit. L'appareil à panier est généralement préféré pour les capsules et les produits qui tendent à flotter, et l'appareil à palettes est généralement préféré pour des comprimés.

Pour quelques formes galéniques de comprimé, la dissolution *in vitro* (mais pas *in vivo*) peut être lente ceci est dû à la façon dont le produit se désagrège au fond du récipient de dissolution. Dans de telles situations, l'appareil à panier peut être préféré à l'appareil à palette. Si les conditions d'essai doivent être modifiées pour refléter au mieux la dissolution *in vivo* rapide (par exemple, utilisation d'une vitesse de rotation différente), de telles modifications peuvent être justifiées en comparant la dissolution *in vitro* avec des données d'absorption *in vivo* (par exemple, une étude de la biodisponibilité relative en utilisant une simple solution aqueuse comme produit de référence).

Au minimum 12 unités de dosage d'une formulation galénique doivent être évaluées pour soumettre une demande de dispense d'étude de bioéquivalence, c'est à dire une étude mettant en évidence l'obtention de mêmes effets dans les mêmes proportions. Des échantillons doivent être prélevés à un nombre suffisant d'intervalles pour caractériser le profil de dissolution de la formulation galénique (par exemple, 10, 15, 20, et 30 minutes).

En comparant les produits d'essai et de référence, des profils de dissolution devraient être comparés en utilisant un facteur de similitude (F2). Le facteur de similitude est une

transformation réciproque logarithmique de racine carrée de la somme de l'erreur carrée et est une mesure de la similitude de dissolution entre les deux courbes en pour cent (%).

$$F_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\}$$

Deux profils de dissolution sont considérés semblables quand la valeur F_2 est supérieure ou égale à 50.

3 Essai de dissolution des composés faiblement solubles dans l'eau

3.1 Principe

L'essai de dissolution détermine la quantité cumulée de substance qui passe dans la solution en fonction du temps, impliquant au moins deux étapes consécutives : la libération du composé de la matrice de formulation (désintégration), suivie de la dissolution de la substance (solubilisation des particules) dans le milieu liquide. (voir figure 10)

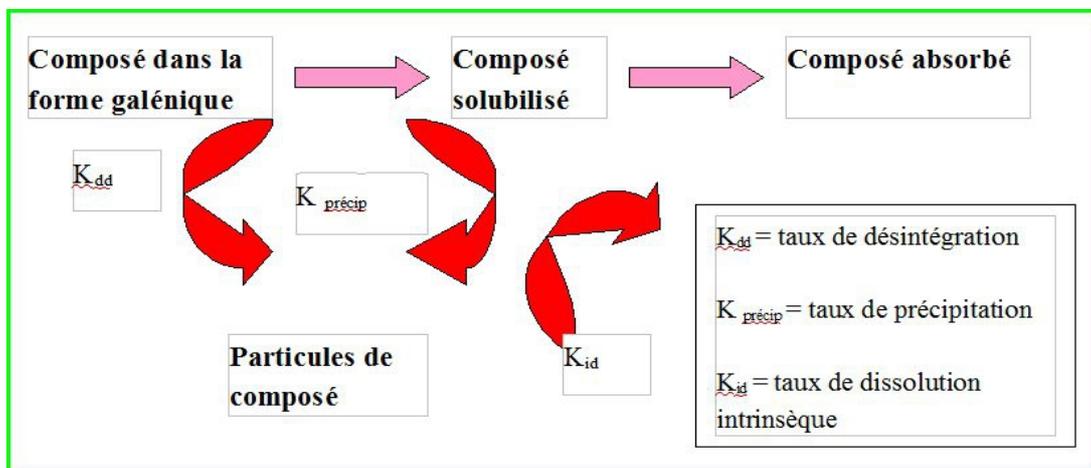


Figure 10: Processus de dissolution d'une substance dans une forme galénique. D'après Brown 2004

Quand le taux de désintégration K_{dd} est supérieur au taux intrinsèque de dissolution K_{id} :

La dissolution dépend de la dissolution intrinsèque, donc les caractéristiques physiques de la molécule sont importantes. Il pourrait être intéressant de réduire la taille des particules de la substance pour obtenir une plus grande surface de contact, et augmenter la solubilité de la molécule, il y a souvent une différence cinétique entre l'absorption et la précipitation *in vivo*.

Quand le taux de désintégration K_{dd} est inférieur au taux intrinsèque de dissolution K_{id} :

La dissolution dépend de la désintégration, dans ce cas-ci les propriétés cohésives de la formulation sont importantes. Avec une bonne formulation le composé a un meilleur profil de solubilité, mais les deux étapes de la dissolution peuvent se concurrencer. Il faut vérifier la limite de la dissolution et rechercher si un changement du milieu de dissolution peut l'améliorer.

Quand le taux de désintégration K_{dd} est égal au taux intrinsèque de dissolution K_{id} : La dissolution dépend des deux facteurs : les caractéristiques de la molécule et de la formulation sont importants [Brown, Chokshi, Nickerson, *et al*, 2004].

3.2 Choix du milieu de dissolution

Le choix du milieu dépendra du but de l'essai. Pour examiner la qualité de lot à lot, il est basé sur les données de solubilité et la gamme de dose de la formulation galénique pour s'assurer que les "conditions sink" sont réunies. Le terme "condition sink" est défini comme étant un volume de milieu au moins trois fois plus important que celui nécessaire pour obtenir une solution saturée de la substance. Un milieu qui ne fournit pas les conditions sink peut être justifiable, s'il s'avère plus discriminant ou s'il fournit des données fiables qui ne peuvent être obtenues autrement qu'avec l'addition d'agents tensioactifs.

D'autre part, quand l'essai de dissolution est employé pour mettre en évidence les propriétés biopharmaceutiques de la forme galénique, il est plus important que l'essai proposé simule étroitement l'environnement de la région gastro-intestinale qu'il ne permette d'obtenir les conditions sink. Il pourrait être utile de mesurer le pH avant l'essai afin de vérifier si celui-ci change après la dissolution.

Le choix du milieu le plus approprié pour des essais de contrôle de qualité de routine est basé sur des critères connus, la rugosité, la stabilité de l'analyte dans le milieu d'essai, et la correspondance avec le comportement de produit *in vivo*.

Des milieux aqueux sans agent tensioactif sont préférables, mais un agent tensioactif peut être ajouté afin d'augmenter la probabilité d'établir le comportement *in vivo*. L'agent tensioactif peut être employé comme agent mouillant, ou solubiliser la substance quand la concentration critique en micelle (CMC) est atteinte. La quantité d'agent tensioactif nécessaire à une solubilisation adéquate dépend de sa CMC et du degré auquel le composé se divise dans les micelles. Typiquement une relation linéaire existe entre la solubilité et la concentration en agent tensioactif au-dessus de la CMC. Si un composé est ionisable, la concentration en agent tensioactif et le pH peuvent être changés simultanément, changeant ainsi les caractéristiques de solubilité du milieu de dissolution [Brown, Chokshi, Nickerson, *et al*, 2004].

3.3 Choix de l'appareil

On utilise un appareil à panier ou à palettes (voir figure 11) :

- panier : 50 à 100 t/min
- palette : 50 à 75 t/min

- médias : 500 à 1000ml avec des récipients standard, 2000 ml à 4000 ml avec de plus grands récipients qui peuvent être avantageux pour les composés ayant une faible solubilité. Pour les substances très puissantes et les composés à doses thérapeutiques très faibles, l'utilisation des récipients de 100 à 250 ml doit être explorée.

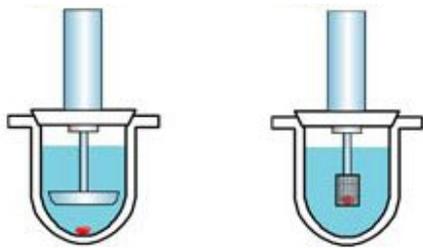


Figure 11: Schémas des appareils décrits par les pharmacopées européenne et américaine pour les tests de dissolution : à droite appareil à palette, à gauche appareil à panier. D'après <http://www.jascofrance.fr/>

3.4 Pouvoir de différenciation

Il détermine si une méthode de dissolution peut distinguer des changements de produits. Pour le découvrir, il faut tester des formulations avec des différences résultant de changements des caractéristiques de la substance : taille, forme cristallisée; formulation galénique (type de remplissage, taux d'excipient, processus de fabrication et équipements utilisés) ; les conditions influant sur la stabilité : la température et humidité. En réalisant ces tests, les changements de formulation galénique sont évalués par rapport aux changements des données de dissolution. Si les données montrent une différence mesurable pour les variables principales, alors la méthode peut être considérée comme un essai distinctif pour des variables critiques de fabrication. Cependant il est important de se rappeler qu'elle peut refléter ou non ce qui se passe *in vivo*.

3.5 Relations ou corrélations entre les résultats *in vivo/in vitro*?

L'essai de dissolution pour un composé de faible solubilité est l'occasion d'établir une méthode qui permettrait une prédiction aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Une distinction doit être faite entre relation *in vivo/ in vitro* (IVIVR) et des corrélations entre ces deux types d'expérimentations (IVIVC).

Une relation est un terme large englobant une association qualitative et même semi-quantitative entre les données *in vivo* et les mesures *in vitro*.

Une corrélation, d'autre part, est un modèle mathématique prédictif, qui exige une évaluation de la prévisibilité et un degré de validation.

Une IVIVC doit être explorée pour les formulations à libération prolongée dans lesquelles la technologie de formulation contrôle la vitesse de libération. Pour les formulations à libération immédiate des composés de BCS classe II (faible solubilité, perméabilité élevée), il peut être possible d'établir une IVIVC si c'est le taux de dissolution qui commande l'absorption.

[Brown, Chokshi, Nickerson, *et al*, 2004]

Partie 4 : Formes galéniques permettant d'augmenter la solubilité des composés peu hydrosolubles

L'amélioration de l'absorption par voie orale des principes actifs non hydrosolubles est un perpétuel défi pour la galénique. Différentes stratégies permettent d'optimiser la formulation de telles molécules par augmentation de leur solubilité dans les milieux digestifs.

La voie orale constitue la voie d'administration préférentielle pour les traitements chroniques, mais de nombreuses molécules présentent une faible biodisponibilité orale du fait de leur faible solubilité aqueuse. Pour cette classe de composés, comme la classe II de la classification BCS caractérisée par une faible solubilité et une haute perméabilité, la dissolution dans l'environnement digestif est l'étape limitante de l'absorption. Il existe différentes techniques dites «d'hydrophilisation» afin de favoriser leur dissolution :

- l'emploi de cyclodextrines,
- les dispersions solides dans des matrices hydrophiles (type PEG)
- la micronisation
- les émulsions, micro-émulsions et systèmes auto-émulsifiants
- l'emploi de nanoparticules
- la réalisation de prodrogues hydrosolubles (mais cette technique est du domaine de la chimie, nous n'en parlerons pas dans cet exposé)
- la formation de sels ou de complexes solubles

Remarque: les formes galéniques décrites dans cette partie sont illustrées par des exemples de spécialités commercialisées dont le principe actif est un composé BCS classe II.

1 Les cyclodextrines

1.1 Définition

Les cyclodextrines (CD) sont des molécules obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon. Elles se présentent sous forme d'oligomères cycliques du glucose (voir figure 12) et comportent de 6 à 12 unités de D-glucopyranose liées en α 1-4 [Bellanger, Djedaïni-Pilard, Berthault *et al*, 2009].

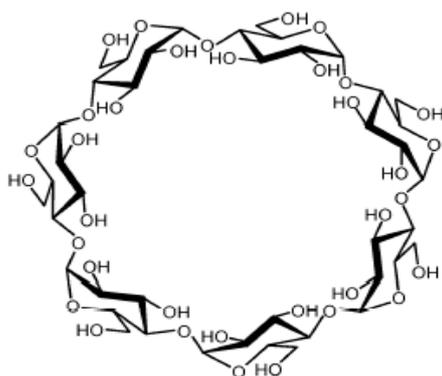


Figure 12: structure chimique d'une cyclodextrine. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005

Les plus abondantes sont les hexamères (α -cyclodextrine), heptamères (β -cyclodextrine) et octamères (γ -cyclodextrine), qui diffèrent par leur diamètre et leur solubilité. En dessous de 6 unités, elles ne peuvent pas se former à cause de l'encombrement stérique, au delà de 8 unités de glucose, elles sont très difficiles à purifier [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005]. Cependant Endo *et al* ont mis au point une méthode d'isolation et de purification pour plusieurs sortes de CD de grand diamètre et ont obtenu une quantité relativement importante de CD δ (Cyclomaltonose) avec 9 unités de glucose [Endo, Nagase, Ueda *et al*, 1997].

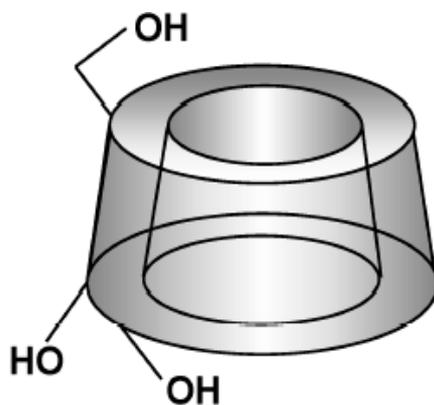


Figure 13: forme torique d'une cyclodextrine. d'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005 .

Ces molécules se présentent sous la forme d'un abat-jour (figure 13). Tous les groupements polaires (hydroxyles OH) des unités de glucopyranose sont localisés à l'extérieur du tore, le rendant relativement hydrophile. La cavité est lipophile car elle est tapissée d'atomes de carbone et d'hydrogène. Le caractère amphiphile des CD leur permet d'accueillir une molécule dite «invitée» dans leur cavité, formant des complexes d'inclusion solubles dans l'eau [Bellanger, Djedaïni-Pilard, Berthault *et al*, 2009 ; Weiss, 2002].

Les CD naturelles, en particulier les β CD, sont peu solubles dans l'eau. Cependant la substitution de n'importe quel groupement OH augmente fortement leur solubilité aqueuse [Loftsson, Brewster, Masson *et al*, 2004].

Les CD ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal, bien qu'elles interagissent avec le cholestérol et les lipides constituant les membranes biologiques. Leurs anneaux macrocycliques ne sont pas affectés lors de leur passage dans l'estomac et l'intestin grêle, elles sont dégradées dans le colon et le gros intestin [Weiss, 2002].

De ce fait l'encapsulation dans les cyclodextrines permet de protéger des molécules fragiles ou d'assurer leur libération lente et contrôlée [Bellanger, Djedaïni-Pilard, Berthault *et al*, 2009].

1.2 Facteurs influençant la formation de complexe d'inclusion

En solution aqueuse, une molécule invitée lipophile remplace la molécule d'eau à l'intérieur de la cavité lipophile de la CD formant un «complexe d'inclusion».

L'équilibre d'association d'une molécule et d'une CD formant un complexe 1:1 peut être représenté comme ceci :



Le type de CD influence la formation ainsi que les performances des complexes molécules/CD. Pour qu'un complexe se forme, les dimensions de la cavité doivent être suffisantes pour recevoir une molécule [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.2.1 Energies mises en cause.

En solution aqueuse, la cavité des CD est occupée par des molécules d'eau est dans un état énergétique non-favorable (interaction polaire-apolaire), ce qui permet une substitution aisée par des molécules invitées de moindre polarité que l'eau.

De nombreuses interactions entrent en jeu lors de la formation de complexes molécule/CD :

- Adaptation stérique : par des changements conformationnels de la molécule invitée et/ou de la cyclodextrine (conformation induite) lors du processus d'inclusion.
- Formation de liaisons hydrogène.
- Interactions de Van der Waals : forces de dispersion de London et interactions dipôle-dipôle induit.
- Interactions hydrophobes, dipôle-dipôle, de transfert de charges.
- Relargage de molécules d'eau à «haute-enthalpie» de la cavité de la cyclodextrine.

- Relargage de molécules de solvant de la cavité de la cyclodextrine avec un gain d'entropie.

- Relâchement des tensions du macrocycle [Weiss, 2002].

Ainsi, le phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente mais uniquement des forces d'interactions faibles.

La modification chimique des CD avec des substituants chargés peut diminuer la complexation. Ils fournissent une source de liaisons hydrogènes pour les molécules d'eau, diminuant la différence d'énergie entre celles incluses et la solution.

La présence de groupes sulfonates encombrants, fortement chargés, et hydratés près de l'entrée de cavité des CD empêche l'approche des molécules hydrophobes [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.2.2 Degré de substitution

C'est le nombre moyen d'hydroxyles substitués par unité de glucopyranose d'anneau de CD.

En fonction des conditions de production, un substituant peut occuper différentes positions sur la molécule de CD parent, changeant ses propriétés physico-chimiques.

Le degré de substitution influe sur la solubilité aqueuse de la CD et sur l'accessibilité de sa cavité pour la molécule invitée [Loftsson, Brewster, Masson *et al*, 2004].

1.2.3 pH et état d'ionisation

Lorsque la CD et la molécule invitée portent des charges opposées, la complexation peut être meilleure qu'avec une CD neutre. Elle peut être diminuée si elles portent des charges de même signe. La CD-(2-hydroxy-3-[triméthylammonio] propyl)β cationique agit comme un excellent solvant avec de nombreuses substances acides formant des anions.

Dans le cas des molécules ionisables, la présence de charge joue un rôle significatif dans la formation de complexe, c'est pourquoi un changement de pH dans la solution peut faire varier la constante du complexe.

1.2.4 Température

Dans la majorité des cas, une augmentation de la température diminue la constante de stabilité apparente du complexe en réduisant les forces d'interactions (van der Waals et hydrophobiques) entre la molécule et la CD. Cependant, les changements de températures peuvent n'avoir qu'un effet négligeable quand les interactions entropiques molécules/CD prédominent (c'est à dire, résultant de la libération de molécules d'eau hydratées autour des charges des molécules invitées et hôtes au travers du complexe d'inclusion).

Quelques exemples de facteurs affectant la complexation :

Tableau V: Facteurs influençant la formation du complexe d'inclusion. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Facteur	Molécule	CD étudiée	Observations
Type de CD	Albendazole, Mébendazole, Ricobendazole	β -, HP- β -, M- β -CD	Meilleure augmentation de la solubilité avec les CD substituées.
	Féno profène	α -, β -, γ -, HP- β -CD	Meilleure constante de stabilité des valeurs d'intérêt pharmaceutique seulement avec les complexes β - β CD et CD HP- β .
	Kétoprofène	M- β -, β -CD	Meilleure dissolution avec le complexe de CD- M- β
	Cocaïne	α -, β -, γ - CD	Liaison de la molécule avec une affinité raisonnable seulement avec β CD en solution aqueuse.
Taille de la cavité	Gliclazide	β -, α - CD	Taille de la cavité suffisante pour la complexation avec β -CD mais celle des α -CD est insuffisante pour inclure les anneaux de gliclazide.
	Digitoxine	δ - CD	Augmentation de la solubilité due à une inclusion partielle de la molécule dans la cavité de la CD.
	Composés Macrocycliques CMC	α -, β -, γ -, δ - CD	Formation de complexes des petits CMC avec α - et β -CD, et formation de complexes des grands CMC avec CD γ et δ relativement stables.
	Ibuproxam	α -, β -, γ - CD	Augmentation effective du taux de dissolution seulement avec les β - et γ -CD mais la cavité des α -CD était moins adaptée.
	Prochloro-methazine	β -, HP- β -, DM- β -CD	Diminution de la solubilité due à l'incapacité des cavités des CD d'inclure le cycle de la phénothiazine.
pH et état d'ionisation	DY- 9760e	SBE- β -CD	Forte interaction molécule/CD en région acide, à pH 4.
	NSC-639829	SBE- β -CD	Augmentation de la solubilité de la molécule cationique à pH 1.
	ETH-615	HP- β -, RM- β -, CM- β -, SBE- β - HTMAP- β - CDs	Augmentation de la solubilité avec la CD-RM- β non chargée. Les constantes de stabilité des complexes étaient basses avec les molécules très polaires à pH 5 due à une capacité moindre à entrer dans la cavité des CD, mais constantes élevées avec les formes anioniques moins polaires à pH 10.
	Piroxicam	β -CD	complexation effective à pH faible
	Levemopamil HCl	HP- β -CD	Augmentation de la solubilité (mg/mL) elle était multipliée par 3 avec la molécule chargée (de 7.88 à 25.62 à pH 4) et 525 fois avec la forme neutre (0.0026 à 1.37 à pH 10.6).
	Ziprasdone mesylate	SBE- β -CD	Complexation favorisée avec la paire ionique par rapport à la forme ionique dissociée.
	Sulindac Mébendazole	β -CD HP- β -CD	Complexation plus facile avec la forme non ionisée. Forme non ionisée moins incluse que forme ionisée.
Température	DY-9760e	SBE- β -CD	Le changement de température présente un effet négligeable sur la constante de stabilité.
	Sulindac	β -CD	L'augmentation de la température diminue la constante de stabilité apparente.

	Phénolphthaléine	β -CD	L'augmentation de la température diminue la constante d'association.
	Danazol	SBE- β -CD	L'augmentation de la température diminue la constante de stabilité

1.2.5 Méthode de préparation et additifs

L'influence d'une méthode dépend de la nature de la molécule invitée et de la CD. Dans de nombreux cas, le séchage par atomisation et la lyophilisation sont très efficaces pour la complexation. Cependant, la méthode de préparation n'a montré aucune influence sur le taux de dissolution du complexe tolbutamide/ β -CD [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

Ajoutés en faible quantité, les polymères solubles dans l'eau ou les agents d'appariement d'ions améliorent l'effet solubilisant des CD en augmentant la constante de stabilité apparente du complexe d'inclusion [Loftsson, Brewster, Masson *et al*, 2004]. Ainsi, la Carboxy-méthyl-cellulose (CMC) augmente la biodisponibilité du triclosan dans des pâtes de dentifrices contenant des β -CD en formant un complexe de molécule/CD/CMC avec capacité de substitution améliorée.

La complexation et la formation simultanée de sel avec l'acide hydroxycarboxylique AH augmente significativement le pouvoir de solubilisation des CD pour des amines peu solubles dans l'eau en formant des systèmes molécule/CD/AH à multiples composants [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.2.5.1 Effets de la méthode de préparation

Tableau VI: Effets de la méthode de préparation. D'après Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005

Molécule	CD	Effets
Albendazole, Mebendazole, Ribendazole	β -, HP- β -, et M- β -CD	Inclusion de complexation avec la lyophilisation mais pas avec la co-précipitation
Kétoprofène	β -, DM- β -CD	Meilleure dissolution avec le co-lyophilisat et les produits scellés et chauffés qu'avec ceux ayant été malaxés.
Ibuproxam	α -, β -, γ -CD	Avec les CD β et γ , le séchage par atomisation et le chauffage sous scellée assurent une vraie complexation mais le malaxage était inefficace.
Nimésulide	β -CD	La dissolution de la molécule était plus élevée avec le malaxage qu'avec la co-évaporation.
Méthoxybutopate	β -CD, HP- β -CD	La dispersion solide a donné la complexation la plus efficace, le malaxage étant inefficace. Avec le séchage par atomisation la complexation complète s'est produite seulement quand le rapport molaire de molécule/CD était 1:4.

Vitamine D ₂	β-CD	Le malaxage a donné un bon rendement, le séchage par atomisation a donné une complexation complète et une meilleure dissolution
Oxazépan	DM-β-CD	Le comportement de dissolution était meilleur avec les systèmes séchés par atomisation que malaxés.
Sulfaméthoxazole	β -, HP-β-CDs	Taux accru de dissolution avec les complexes solides préparés par la lyophilisation.
Glibenclamide	β-CD	Dissolution supérieure avec le mélange moulu, le mélange physique, et le produit malaxé.
Ténoxicam	β-CD	Une méthode de neutralisation montre une meilleure dissolution et stabilité de complexe que des méthodes dissolvantes et de malaxation.

1.2.5.2 Effets d'additifs variés

Tableau VII: Effets d'additifs variés. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Effet	Molécule	CD	Additifs	
Effet solubilisant des CD accru (avec des polymères solubles dans l'eau et des agents appartenant d'ion)	ETH-615	CM-β-CD, SBE-β-CD, HP-β-CD, RM-β-CD and HTMAPCD	polymère cationique hexadiméthrine bromide (0.25%)	
		Acetazolamide, Prazepam, Sulfaméthoxazole	HP-β-CD HPMC, PVP, CMC	
		Meloxicam	β-CD	PVP (0.1 to 0.25%)
		Tropicamide	HP-β-CD	HPMC (0.1%)
		Naproxène	β-, M-β-, HP-β-CDs	Sodium CMC, HPMC, PVP K30, PEG 6000
		Naphthoquinone	HP-β-CD	PVP K30
		Augmente la solubilité intrinsèque	Clotrimazole	β-CD
Diminue la solubilité intrinsèque	Clotrimazole	β-CD	agents formant la structure de l'eau, sorbitol, et fructose	
Effet inhibiteur sur l'association molécule/CD	Phénolphthaléine	β-CD	Tétrahydrofurane	

1.3 Types de complexe et effet de la dilution.

Afin d'étudier les complexes d'inclusion on utilise la méthode de la solubilité de phase décrite par Higuchi et Connors [Challa, Ahuja, Ali et al, 2005] : on observe la concentration de molécule dissoute en fonction de la concentration en CD. On obtient un diagramme de solubilité de phase.

Il en existe deux types : A et B (figure 14). Les courbes de type A indiquent la formation de complexes d'inclusion solubles, alors que les courbes de type B suggèrent la formation de complexes d'inclusion ayant une faible solubilité au delà de certaines concentrations et cyclodextrines.

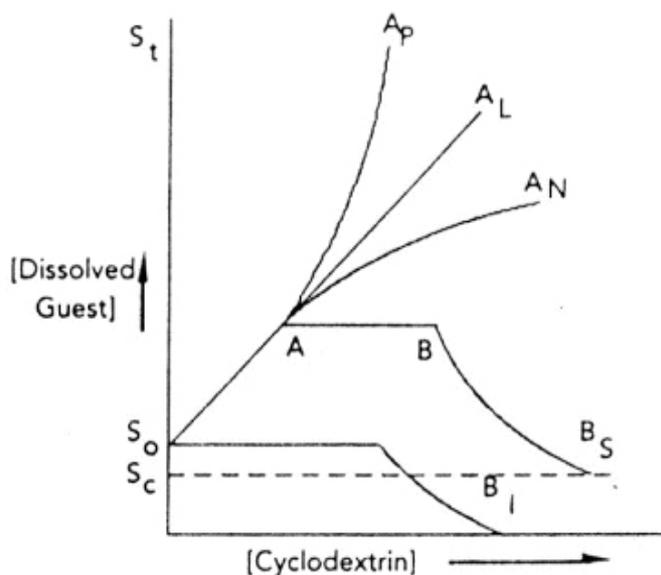


Figure 14: Diagramme théorique des profils de solubilité de phase.

Abréviations : S_0 :solubilité intrinsèque; S_c :solubilité cyclodextrine ;

profils : A_L :augmentation linéaire de la solubilité; A_p :isotherme positivement déviant; A_N :isotherme négativement déviant; AB_s :complexe ayant une solubilité limitée B_i :complexe insoluble ; D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Les réponses de type AB_s font référence des complexes ayant une solubilité limitée et les courbes de type B_i à des complexes insolubles.

Les courbes de type A sont divisées en trois types :

- A_L représentant une augmentation linéaire de la solubilité de la molécule en fonction de la concentration en CD.
- A_p représentant des isothermes positivement déviant.
- A_N représentant des isothermes négativement déviant.

Les β CD donnent souvent lieu à des courbes de type B en raison de leur faible solubilité aqueuse, alors que les β CD chimiquement modifiées telles que les HP- β -CD (hydroxypropyl) et SBE- β -CD (sulfobutyl éther) forment habituellement des complexes solubles et présentent donc des courbes de type A.

Dans le cas d'un complexe 1:1 en utilisant l'équation suivante on peut déterminer l'équilibre de liaison ou la constante d'association, K, depuis la pente de la portion linéaire de la courbe.

$$K_{a:b} = \text{pente } S_0 / (1 - \text{pente})$$

Où S_0 est la solubilité intrinsèque de la molécule étudiée dans ces conditions.

Pour de nombreux complexes molécule/CD, les valeurs des constantes d'association vont de 100 à 20000 M^{-1} . Il a été démontré que même avec les molécules étroitement liées, une dilution au centième réduisait le pourcentage de molécule liée de 100% à 30%. Or, une dilution au centième est facilement atteinte lors d'une injection ou d'une dilution dans les fluides gastriques ou intestinaux, ce qui permet la libération de la molécule qui peut ainsi pénétrer au travers des membranes biologiques.

Le ratio molécule libre/molécule complexée lors de la dilution d'un complexe molécule/CD peu soluble dans l'eau dépend du comportement de solubilité de phase du système. La dilution n'engendrera pas la précipitation de la molécule lorsque la relation entre la solubilité de la molécule et la concentration en CD est linéaire [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005]. C'est pourquoi l'effet de la dilution doit être étudié avant l'utilisation clinique de produit contenant des complexes molécule/CD.

1.4 Effets des CD sur des propriétés importantes des molécules en formulation

1.4.1 Effet sur la solubilité et la dissolution de la molécule

Les CD jouent un rôle très important dans la formulation des molécules faiblement hydrosolubles, améliorant leur solubilité apparente et/ou leur dissolution par la complexation d'inclusion. Parmi les CD disponibles sur le marché, les CD méthylées avec une substitution molaire relativement basse semblent être les meilleures.

Ainsi, l'itraconazole est pratiquement insoluble dans l'eau (dans une solution aqueuse de pH neutre sa concentration est de 1 ng/mL) : en ajoutant des HP- β CD, elle passe à 10mg/mL [Loftsson, Brewster, Masson *et al*, 2004].

À l'état solide, les CD transforment les molécules sous forme cristalline en une dispersion amorphe de complexe d'inclusion [Loftsson, Brewster, Masson *et al*, 2004].

En raison de leur capacité à former les complexes d'inclusion *in situ* (dans le milieu de dissolution), les CD peuvent augmenter la dissolution de la molécule même lorsqu'il n'y a aucune complexation à l'état solide.

Les groupements OH situés sur l'extérieur de la couronne peuvent aussi former des liaisons hydrogènes avec d'autres molécules [Loftsson et Duchêne, 2007]. Les CD peuvent être utilisées comme solvant sans qu'il y ait formation de complexe d'inclusion CD/molécule invitée, améliorant la dispersion des comprimés fortement dosés en principe actifs et pour lesquels l'utilisation d'un complexe molécule/CD est difficile (exemple : le paracétamol) [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

Tableau VIII: Exemples de solubilité et de dissolution améliorée par les CD. D'après Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005.

CD	Molécules
β -CD	Nimésulide, Sulfométhiazole, Lorazépam, Kétoprofène, Griséofulvine, Praziquantel, Chlorthalidone, Etodolac, Piroxicam, Itraconazole, Ibuprofène
α -CD	Praziquantel
γ -CD	Praziquantel, Oméprazole, Digoxine
HP- β -CD	Albendazole, DY-9760e, ETH-615, Lévémopamil HCl, Sulfométhiazole, Kétoprofène, Griséofulvine, Itraconazole, Carbamazépine Zolpidem, Phénytoïne, Rutine
DM- β -CD	Naproxène, Camptothésine
SBE- β -CD	DY- 9760e, Danazol, Fluastérone, Spiranolactone
RM- β -CD	ETH-615, Tacrolimus
β -CD (AC- β -CD)acétylées aléatoirement, amorphe	Naproxène

Les CD peuvent également agir en tant que promoteur de la libération : par exemple β -CD augmente le taux de libération du naproxène et du kétoprofène à partir des résines acryliques inertes et de matrices gonflables hydrophiles de comprimés. La β -CD augmente également la libération de la théophylline d'une matrice d'HPMC en augmentant le taux apparent de solubilité et de dissolution de la molécule [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.4.2 Effets sur la biodisponibilité de la molécule

Les CD augmentent la disponibilité biologique des molécules peu solubles (BCS classe II) en augmentant leur solubilité, leur dissolution, et/ou leur perméabilité. Les CD augmentent la perméabilité des molécules insolubles et hydrophobes en rendant la molécule disponible sur la surface de la barrière biologique : elles pénètrent dans la membrane sans perturber ses

couches lipidiques. Dans ce cas, il est important d'utiliser une quantité précise de CD pour solubiliser la molécule dans le véhicule aqueux, puisque l'excès peut diminuer la disponibilité de la molécule. Pour une suspension d'hydrocortisone dans une solution de RM- β -CD, l'augmentation de la concentration de CD augmente le flux d'hydrocortisone passant au travers de la membrane si la concentration en RM- β -CD est faible. En revanche si la concentration est élevée, ce flux diminue.

[<http://www.jascofrance.fr/spectro/disso/index.phpPHPSESSID=0aeb3cdb586443ff2dc3175e4aba6ae1>]

L'emploi de CD permet d'améliorer la biodisponibilité orale de nombreuses molécules BCS classe II telles que la carbamazépine, la digoxine, le glibenclamide, le miconazole, la nifédipine, la nitrendipine, la spiranolactone, le tolbutamide.

La biodisponibilité de l'itraconazole est négligeable lors de l'administration d'une solution orale aqueuse, en revanche elle est de 55% si l'itraconazole est dans une solution à base de HP- β -CD [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

Dans le cas des molécules hydrosolubles, les CD augmentent leur perméabilité en agissant directement sur les membranes et augmentent l'absorption de la molécule et/ou sa biodisponibilité.

Les CD améliorent aussi la biodisponibilité en stabilisant les molécules labiles par augmentation du temps de contact entre celle-ci et le site d'absorption [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.4.3 Effet des CD sur la sécurité d'utilisation

Les CD ont été employées pour diminuer l'irritation provoquée par certaines molécules. La formulation de la phénytoïne avec HP- β -CD réduit considérablement l'irritation des tissus, par comparaison à une injection commerciale dans un modèle de souris BALB/c. Le complexe d'inclusion avec des CD réduit également l'irritation oculaire de la molécule en limitant la concentration en médicament libre sur le secteur précornéen à un niveau non irritant [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

Grâce aux CD, l'efficacité des molécules (réduction de la dose requise pour l'activité thérapeutique optimale) est accrue grâce à l'augmentation de leur solubilité. Par ailleurs, la toxicité des molécules est diminuée au niveau du site d'absorption car elles sont administrées à des doses inférieures.

La β CD augmente l'activité anti-virale du ganciclovir et a réduit sa toxicité. Les toxicités associées à la cristallisation des molécules faiblement hydrosolubles dans des formulations

parentérales peuvent souvent être réduites par la formation de complexes solubles avec des CD.

Un enfermement des molécules dans une CD empêche leur contact direct avec les membranes biologiques, réduisant ainsi leurs effets secondaires (en diminuant l'entrée de molécule dans les cellules des tissus non ciblés) et l'irritation locale sans perte drastique d'effet thérapeutique. Un complexe d'inclusion avec une HP- β -CD réduit les effets secondaires de l'aminobenzoate 2-éthyl hexylique-p-diméthylque (un filtre UV) en limitant l'interaction du filtre UV avec la peau. Dans une étude clinique, le complexe d'inclusion de piroxicam/ β -CD montre une meilleure tolérance avec une incidence et une sévérité des effets secondaires gastro-intestinaux plus limitées que le piroxicam libre. HP- β -CD allège l'effet irritant intrinsèque sur les vaisseaux sanguins observé lors de l'administration IV de l'hémioxalate CKD-732. SBE- β -CD inhibe la cytotoxicité contre les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine induite par le DY-9760e et supprime de manière significative les dommages vasculaires induits par la molécule chez le lapin. [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005]

1.4.4 Effets sur la stabilité des molécules

La complexation avec la CD permet l'encapsulation des molécules labiles et les isole ainsi contre de divers processus de dégradation.

Les CD peuvent améliorer la stabilité de plusieurs molécules labiles face à la déshydratation, l'hydrolyse, l'oxydation, ou encore la photo décomposition et augmenter ainsi leur durée de conservation. Le tableau IX récapitule des effets des CD sur la stabilité des molécules invitées. L'amélioration de la stabilité induite par les CD peut être un résultat de l'inhibition d'interaction de la molécule avec des véhicules et/ou de l'inhibition de la dégradation enzymatique de la molécule au niveau du site d'absorption. SBE- β -CD a montré une plus grande amélioration de stabilité de beaucoup de molécules chimiquement instables que d'autres CD [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

Tableau IX: Effets des CD sur la stabilité de la molécule. D'après Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005.

Effet	Molécule	CD
↑Photostabilité	Prométhazine	HP- β -CD, DM- β -CD
	DY-9760e	SBE- β -CD
	2-éthyl hexyl p-diméthyl aminobenzoate	HP- β -CD
↑ durée de conservation avec la dissolution	Glibenclamide	β -CD

inchangée, évaluée à 4 années		
↑ stabilité thermique à l'état solide	Diclofénac sodium	β-CD
↑Stabilité contre la cyclisation intramoléculaire à l'état solide	Quinaril	β-CD, HP-β-CD
↑Stabilité face à l'hydrolyse acide et à la photo décomposition	Doxorubicine	HP-β-CD, HP-γ-CD
↑Stabilité contre l'hydrolyse	pro molécules acyl ester du Ganciclovir	HP-β-CD
	Digoxine	γ-CD
	Rutine	HP-β-CD
	Camptothésine	RDM-β-CD
	Melphalan et Carmustine	SBE-β-CD, HP-β-CD
	Paclitaxel	γ-CD, HP-γ-CD, HP-β-CD
↑ Déacétylation ou dégradation	Spiranolactone	SBE-α-CD, SBE-β-CD, HP-β-CD, γ-CD,β-CD
↑Photoréactivité	Flutamide	β-CD

La complexation avec des CD réduit l'effet de catalyse du groupe azoté, comme le montre l'effet stabilisateur de l'halogène et des groupes de cyanogène sur la photodégradation de dérivés 1.4 de dihydropyrimidine. HP-β-CD réduit de manière significative la photodégradation du 2-éthyl p-diméthyl hexyl aminobenzoate en solution, plus que dans une émulsion. Les CD améliorent la photostabilité de la triméprazine (quand le pH de la solution est réduit) et de la prométhazine. Les CD augmentent également la stabilité à l'état solide et la durée de conservation de certaines molécules. Les CD augmentent la stabilité physique des vecteurs viraux pour la thérapie génique, et les formulations contenant du saccharose.

L'hydrolyse des molécules encapsulées dans des CD étant plus lente que celle des molécules libres, la stabilité du complexe molécule/CD, joue un rôle significatif en déterminant l'ampleur de la protection. Ainsi, des concentrations très basses de HP-β-CD (1% ou moins), formant un complexe plus instable physiquement, ne protègent pas suffisamment le taxol.

L'effet de la complexation sur la stabilité de la molécule peut être représenté par l'équation suivante :

$$1/k_0 - k_{obs} = 1/K_c (k_0 - k_c) [CD] + 1(k_0 - k_c)$$

où le k_0 est la constante du taux de dégradation de la molécule libre,

k_{obs} est la constante de vitesse de dégradation observé en présence de CD,

k_c est la constante de vitesse de dégradation de la molécule dans la CD,

K_c est la constante de stabilité pour le complexe,

[CD] est la concentration de CD.

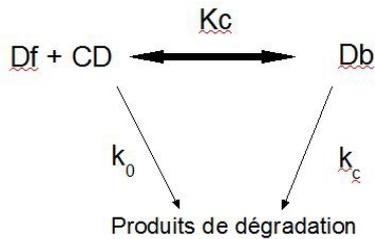


Figure 15: Modèle simple représentant l'effet de la constante de stabilité du complexe sur la dégradation de la molécule. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Dans des conditions spécifiques, la complexation avec certaines CD peut accélérer la dégradation de la molécule. Les CD catalysent la déacétylation et la dégradation de la spironolactone, l'effet est qualitativement corrélé avec l'état d'ionisation des groupes hydroxyles sur les CD. Les changements structurels des molécules de complexation avec les CD accélèrent également la dégradation. La β CD n'améliore pas la photo stabilité de l'ofloxacine en raison d'une inclusion partielle de la partie méthyl pipérazinylique dans la CD [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.1 Toxicologie

Les CD perturbent l'intégrité des membranes, et solubilisent les lipides membranaires des érythrocytes humains en formant des complexes d'inclusion, entraînant une augmentation de l'absorption et de la toxicité des molécules hydrosolubles. En effet, les CD déséquilibrent la membrane en éliminant des phospholipides, principalement de la phosphatidylcholine et des sphingomyélines, de la moitié externe de la bi-couche lipidique. Cette élimination peut également contribuer en partie à la formation des stomatocytes par un recourbement vers l'intérieur des membranes. En raison de leur capacité à éliminer le cholestérol, les CD peuvent augmenter la fluidité d'une membrane, induire son invagination et causer la lyse des cellules. Les CD induisent la lyse des membranes artificielles composées de lécithine et de cholestérol par un processus semblable à celui des détergents qui s'incorporent d'abord aux membranes, puis extraient les composants de membrane dans des micelles et causent la solubilisation ou la lyse de la membrane. Cependant, à la différence des détergents, les CD solubilisent des composants de membrane sans entrer dans la membrane, par conséquent les effets des CD peuvent être moyens et réversibles. En présence de CD, le nouveau compartiment contenant des lipides dans la phase aqueuse avec les composants extraits de la

surface érythrocytaire s'équilibre librement avec la surface de cellules par un processus réversible.

Comparé à d'autres agents promoteurs de l'absorption généralement utilisés dans des formulations nasales, les CD exercent un effet plutôt doux et réversible sur la fréquence de battement ciliaire de la trachée d'embryon de poulet et du tissu adénoïde nasal humain *in vitro* d'une manière dépendant de la concentration. Les DM- β -CD provoquent l'augmentation de l'absorption nasale d'énoxaparine en solubilisant des composants de la membrane et en ouvrant les tight junctions, mais leur effet est réversible après 6 heures. Une étude a signalé que la membrane rectale récupère probablement sa fonction de barrière environ 24 heures après administration de β CD (au moins 30 mg). Même à des doses élevées, les effets de HP- β -CD sur des reins sont réversibles et semblables à ceux des agents osmotiques actuellement utilisés dans formulations parentérales.

Les complexations du miconazole, de l'éconazole et du clotrimazole avec HP- β -CD et des CD naturelles augmentent la toxicité de ces molécules sur un modèle de culture de cellules buccales humaines (TR146) en causant la super saturation des molécules.

Les HP- β -CD montrent un meilleur profil oral de sûreté que les β -CD et tout autre CD parentes, mais les données disponibles sur la sûreté orale des CD méthylées sont limitées. Cependant, pour une administration par voie orale, toutes les CD peuvent être considérées comme pratiquement non-toxiques en raison du manque d'absorption des CD dans le tube digestif.

1.2 Applications des CD dans l'administration par voie orale des molécules

L'emploi de CD dans une formulation améliore la biodisponibilité grâce à une solubilité accrue, ainsi que la cinétique et l'ampleur de la dissolution. Les CD améliorent la stabilité de la molécule dans la formulation et au niveau du site d'absorption, dans l'appareil gastro-intestinal (tableau X). La complexation avec des CD modifie également le temps de libération de la molécule pendant le transit intestinal. Les CD permettent aussi de réduire l'irritation induite par la molécule. Une préparation orale d'itraconazole, Sporanox®, contenant 40% (masse/vol) de HP- β -CD, réduisant l'irritation, a été commercialisée aux Etats-Unis et en Europe.

La complexation peut également masquer le goût désagréable des molécules. La complexation avec des CD supprime le goût amer du bromure d'oxyphénonium.

Tableau X: Applications des CD dans la délivrance orale des molécules. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Effet	CD	Molécules
↑ Biodisponibilité en ↑ les taux de solubilité et de dissolution	β-CD	Kétoprofène, Griseofulvin, Terfénadine
	HP-β-CD	Albendazole, Kétoprofène, Phénytoïne, Gliclazide
	SBE7-β-CD	Spiranolactone
	DM-β-CD	Tacrolimus
	M-β-CD	Albendazole
	ME-β-CD	Phénytoïne
↑ Intensité ou durée de l'effet thérapeutique	β-CD	Terfénadine, Tolbutamide
	HP-β-CD	Tolbutamide, Amylobarbitone
↑ Perméabilité	HP-β-CD	Flutamide
↑ Stabilité gastro-intestinale	γ-CD	Digoxine
	HP-β-CD	Rutine
↑ Biodisponibilité sublinguale	HP-β-CD	Clomipramine, Testostérone
↑ Biodisponibilité buccale	SBE7-β-CD, HP-β-CD	Danazol

Les CD améliorent la perméabilité intestinale, principalement en augmentant la disponibilité de médicament libre au niveau de la surface absorbante. Ainsi, elles augmentent l'activité de la molécule lors de l'administration orale. La complexation avec des CD augmente l'activité anthelminthique de l'albendazole et fournit une concentration plasmatique élevée en métabolite actif [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

La sûreté relative, l'efficacité en termes de complexation, le coût, et l'acceptation dans les Pharmacopées sont quelques facteurs importants à considérer en choisissant une CD pour la complexation de molécule.

La monographie de β-CD fait déjà l'objet de monographies [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005].

1.3 Quelques considérations importantes pour le choix de CD dans la formulation de médicament

1.3.1 Disponibilité commerciale

Les CD naturelles et hydroxypropylique, hydroxyléthylique, sulfobutylique, et divers dérivés méthylés de CD sont disponibles à l'échelle industrielle. D'autres dérivés de CD sont disponibles à l'échelle de laboratoire, ou peuvent être synthétisés en laboratoire.

1.3.2 Statut légal

Tableau XI: Législations concernant les CD. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.

Approbation agro-alimentaire				Monographies Pharmacopées		
Produit	États-unis	Europe	Japon	USP/NF	Ph.Eur	JP
α -CD	en préparation	prévu	oui	non	oui	oui
β -CD	GRAS	additif alimentaire	oui	oui	oui	oui
γ -CD	GRAS	en attente	oui	non	en cours	non

1.3.3 Statut des brevets

Connues depuis plusieurs années, les CD naturelles ne devraient pas être considérées en tant que matières brevetables. Cependant, il existe de multiples brevets protégeant des complexes spécifiques de molécules avec des CD naturelles, en particulier avec des β -CD. Les HP- β -CD ne sont pas brevetées, sauf aux USA jusqu'en 2019 [van Hoogevest, Liu, Fahr *et al*, 2001], d'autres dérivés hydroxyalkylés de β -CD sont connus depuis presque 20 ans et leurs brevets d'origine ont expiré [Challa, Ahuja, Ali *et al*, 2005; Dong, 2005].

cyclodextrin/Drug	Route of dosing	Market	Trade names
SE7-β-CD (CAPTISOL)			
Zipradidone	IM	Europe, USA	Zeldox, Geodon
Voriconazole	IV	Europe, USA	Vfend
α-CD			
PG1, Alprostadil	IV	Europe, Japan, USA	Prostanding, Edex, Prostavasin,
OP-1206	Oral	Japan	Opalmon
Cefotiam hexetil HCl	Oral	Japan	Pansporin T
β-CD			
Piroxicam	Oral, Rectal	Europe	Brexin, Cycladol, Brexidol
PGE2	Buccal	Japan	Prostarmon, E
Benexate	Oral	Japan	Ulgut, Lonmiel
Iodine	Topical	Japan	Mena-Galgle
Dexamethasone Glyteer	Dermal	Japan	Glymesason
Nitroglycerin	Buccal	Japan	Nitropen
Nimesulide	Oral	Europe	Nimedex, Mesulid Fast
Tiaprofenic acid	Oral	Europe	Surgamyl
Omeprazole	Oral	Europe	Ombeta
ME 1207 Cephalosporin	Oral	Japan	Meiact
γ-CD (None)			
HP-β-CD (Encapsin)			
Itraconazole	Oral, IV	Europe, USA	Sporanox
Cisapride	Rectal	Europe	Prepusid
Mitomycin	IV	USA	Mitozytrex

Figure 16: CD entrant dans la composition de médicaments commercialisés. D'après Dong 2005.

2 Les micro-émulsions

2.1 Définition

Les micro-émulsions sont des systèmes composés d'eau, d'huile et de tensioactif, qui sont transparents, simples (une seule phase apparente), optiquement isotropiques et thermodynamiquement stables.

2.2 Structure

Il existe deux types de micro-émulsions dépendant de leur composition :

- huile dans eau dénommée lipophile/hydrophile (L/H), où l'eau est la phase continue,
- eau dans huile dénommée hydrophile/lipophile (H/L), où l'huile est la phase continue

La tension de surface dans une micro-émulsion est très faible c'est la raison de la formation spontanée, sans application de force extérieure, et de la petite taille des gouttelettes de la phase dispersée ainsi que de la stabilité thermodynamique.

2.3 Avantages des micro-émulsions comme système de délivrance

L'utilisation de micro-émulsion permet l'amélioration de l'effet thérapeutique ainsi que la réduction du volume du véhicule, ce qui minimise les effets secondaires toxiques.

Les micro-émulsions augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire grâce à la présence de tensioactifs.

Elles facilitent l'administration de la molécule aux enfants et aux adultes éprouvant des difficultés à avaler les formes galéniques solides.

Les micro-émulsions sont faciles à préparer, transparentes, stables peuvent être filtrées et présentent une faible viscosité. Elles permettent aussi d'encapsuler des molécules ayant des balances hydrophile/lipophile différentes dans le même système.

Néoral® (ciclosporine A), Sandimmun® (ciclosporine A) et Fénogal® (fénofibrate) sont des spécialités commercialisées sous forme de microémulsions contenues dans des gélules (Fénogal®) ou capsules molles (Néoral®)[Nanjwade, Patel, Udhani *et al*, 2011].

2.4 Inconvénients des micro-émulsions.

La nécessité d'utiliser des ingrédients acceptés par les autorités de santé limite le choix des composants ce qui entraîne des difficultés de formulation.

La concentration en tensioactif et en co-tensioactif doit aussi être maintenue basse pour des raisons toxicologiques.

3 Les systèmes auto-émulsifiants SEDDS (Self Emulsifying Drug Delivery System)

3.1 Définition

Ce sont des solutions isotropiques d'huiles et de tensioactifs, formant des émulsions ou des micro-émulsions hydrophiles après une légère agitation lorsqu'elles sont mises en contact avec un milieu aqueux. La forme eau dans huile existe aussi, mais elle n'est pas utile pour solubiliser des composés très peu solubles dans l'eau.

Ces systèmes peuvent être liquides ou semi solides selon les excipients employés. Ils peuvent être administrés par voie orale, en effet la mobilité de l'estomac et de l'intestin est suffisante pour fournir l'agitation nécessaire au processus d'émulsification *in vivo* [Garrigue, 2001-2002].

Une émulsification efficace est arbitrairement définie comme un système donnant une émulsion dont les gouttelettes ont une taille inférieure à 5 micromètres [Shah, Carvajal, Patel *et al*, 1994]. En deçà, on obtient un SMEDDS (Self Micro Emulsifying Drug Delivery System) c'est à dire un système donnant une micro-émulsion, dont les gouttelettes sont inférieures à 50 nm. Ces micro-émulsions sont des dispersions huile dans eau thermodynamiquement stables, isotropiques et limpides [Constantinides, 1995; Meinzer, Mueller, Vonderscher *et al*, 1995]. Cette limpidité succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux d'une émulsion et sert de critère pour fixer les limites du domaine d'existence des micro-émulsions.

Ces systèmes sont le plus souvent décrits dans des diagrammes pseudo ternaires (voir figure 20) afin de permettre une représentation efficace et simple.

Les SEDDS permettent la formation de fins globules lipidiques chargés de principe actif dans le compartiment gastro-intestinal, offrant ainsi une très grande surface de contact, surtout pour les micro-émulsions (exemple : surface développée de 600m² pour 1ml de SMEDDS donnant des gouttelettes de 10nm). Ces systèmes permettent donc une importante augmentation de la biodisponibilité de principes actifs lipophiles.

Dans une approche de formulation destinée à la voie orale, les systèmes auto-émulsifiants fournissent de meilleurs résultats que les émulsions, quant à l'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs lipophiles (formulation de la ciclosporine A).

L'emploi des SEDDS présente beaucoup d'intérêts technologiques :

- formation spontanée à température ambiante,

- haut pouvoir solubilisant et dispersant des principes actifs,
- possibilité de stérilisation par filtration (pour les molécules injectables thermolabiles),
- transposition à l'échelle industrielle aisée et coûts de production faibles,
- présentation dans des gélules ou capsules molles avec auto-émulsification *in vivo*.

Il existe néanmoins quelques inconvénients :

- l'utilisation massive de tensioactifs pose un problème toxicologique (valeurs seuils faibles souvent bien inférieures à celles nécessaires dans la formulation),
- les capacités de solvant d'une formulation huileuse ne deviennent importantes que pour les molécules de lipophilie marquée ($\log P > 4$),
- le manque de données concernant la stabilité des principes actifs dans ces systèmes par rapport à la stabilité dans une forme cristalline [Kim et Ku, 2000].

Un type particulier de SEDDS est le Système auto-émulsifiant supersaturé ou S-SEDDS, qui est conçu de façon à contenir une quantité réduite de tensioactif et à permettre l'obtention d'un état supersaturé *in vivo* grâce à l'utilisation de polymères cellulosiques tels que l'HPMC.

3.2 Composition

Une formulation huile/eau implique l'utilisation de 3 à 5 composants de base :

- Huile
- Tensioactif
- Co-solvant
- Electrolyte

Les SEDDS sont formulés en l'absence d'eau en mélangeant une huile avec un tensioactif non ionique ou des glycérides polyglycosylés et une molécule liposoluble afin de former une solution huileuse isotropique.

3.2.1 Huiles

Des triglycérides à chaînes moyennes (MCT) et longues (LCT) sont utilisés pour formuler des SEDDS. Les huiles non modifiées constituent les bases les plus «naturelles» pour le véhicule huileux, mais en raison de leur faible capacité à solubiliser les principes actifs lipophiles et de leur difficulté à donner des systèmes auto-émulsionnants, elles sont peu utilisées dans les SEDDS. En revanche les huiles végétales modifiées ou hydrolysées ont contribué au succès de ces systèmes de part leurs avantages tant sur un plan physiologique qu'au niveau de la formulation [Karim, Gokhale ,Cole *et al*, 1994]. Ces excipients donnent de

bons systèmes avec un grand nombre de tensioactifs non ioniques. Les produits de dégradation ressemblent aux produits finaux de la digestion intestinale des huiles naturelles. Les MCT sont moins attractifs que leurs dérivés semi-synthétiques qui présentent des propriétés tensioactives par leur amphiphilie [Karim, Gokhale, Cole *et al*, 1994; Charman SA, Charman WN, Rogge *et al*, 1992].

Les MCT dérivés de l'huile de noix de coco sont particulièrement attractifs pour la formulation des SEDDS car ce sont des produits alimentaires reconnus comme sûrs par la FDA. Ils sont compatibles avec une large gamme de composés [<http://www.coconutresearchcenter.org/article10612.htm>]. Dans ces cas, le tensioactif le plus lipophile peut alors jouer le rôle de l'huile hydrophile dans la formulation [Constantinides, 1995].

Le choix du véhicule huileux conditionne aussi la viscosité ou la consistance du système avant administration. En effet, la nature de celui-ci ainsi que celle du tensioactif détermine l'état solide ou liquide de la préparation : par exemple les Gélucires®, brevetés par Gattefossé, donnent des matrices auto-émulsionnantes semi-solides à l'inverse des véhicules huileux liquides comme les MCT ou de l'huile de ricin.

Une préparation liquide à température ambiante rend le remplissage des gélules plus aisé [Falson-Rieg, Faivre, Pirot *et al*, 2004].

3.2.2 Tensioactifs

3.2.2.1 Définition

Une substance est dite tensioactive lorsque, même à faible concentration, elle agit à une interface (eau/huile, eau/air) en abaissant la tension interfaciale. L'activité de ces substances est liée à leur structure chimique. Un tensioactif est un amphiphile à longue chaîne comprenant deux parties :

- l'une à caractère hydrophobe : généralement une longue chaîne hydrocarbonée, comportant parfois des motifs internes tels qu'un noyau aromatique, une insaturation.

- l'autre à caractère hydrophile : la tête polaire, qui peut être anionique (exemple : sulfonate), cationique (exemple : ammonium quaternaire), zwitterionique (exemple : bétaïnique) ou encore non ionique (figure n°17) [Puisieux et Seiller, 1983].

Dans le cas d'une émulsion, le tensioactif se place à l'interface entre les phases aqueuse et huileuse (figure n°18).

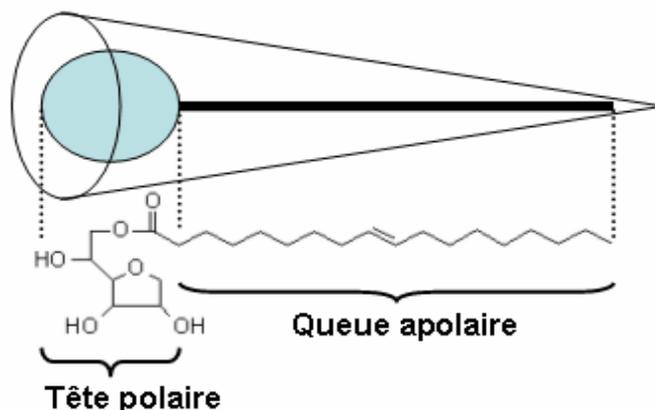


Figure 17: Tensioactif non ionique (Span 80) composé d'une chaîne d'acide gras (queue apolaire) et d'un noyau sorbitol (tête polaire). D'après Garrigue, 2002.

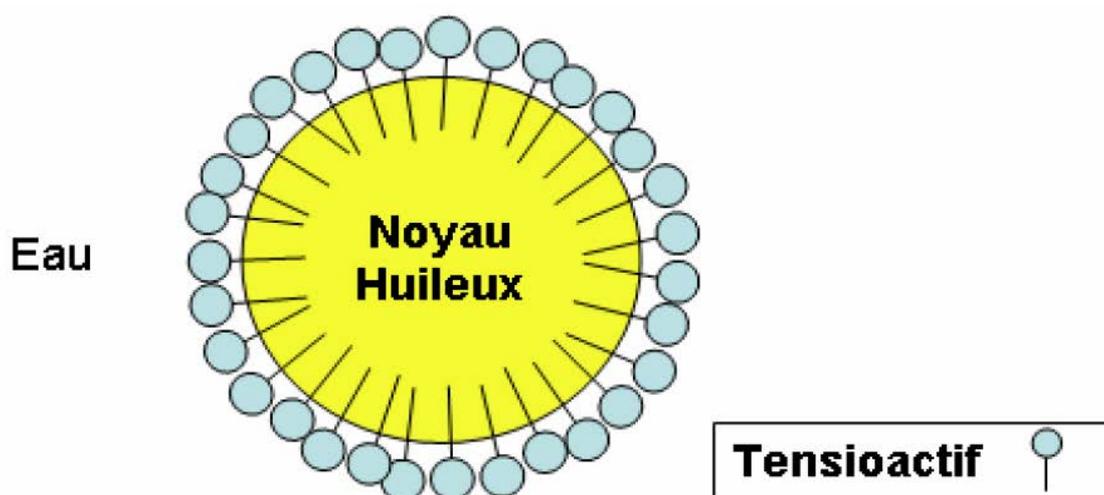


Figure 18: Schéma d'une gouttelette d'émulsion. D'après Garrigue, 2002.

3.2.2.2 Balance hydrophile/lipophile HLB

Définition

C'est un système de classification des tensioactifs mis au point par Griffin en 1949. La valeur de la HLB d'un tensioactif est une fonction directe de l'importance de la partie hydrophile dans sa molécule. Elle est élevée lorsque la fraction hydrophile est prédominante. Elle est faible si la molécule est plus lipophile qu'hydrophile.

Les tensioactifs ont une masse moléculaire $MM > 200$ et une HLB compris entre 1 et 20 voir l'équation de Willam Griffin. La valeur du HLB peut aller jusqu'à 40 pour les tensioactifs

ioniques comme c'est le cas du lauryl sulfate de sodium. Les substances de $MM < 200$ sont trop petites pour présenter deux pôles lipophiles et hydrophiles distincts [Le Hir, 2001].

Détermination du HLB d'un tensioactif

On peut déterminer la HLB d'une molécule à l'aide des équations ou expérimentalement.

La première formule est la suivante :

$$HLB = E/5 \quad [\text{Le Hir, 2001}]$$

Où E est le pourcentage en masse d'oxyde d'éthylène dans la molécule.

Cette formule est utilisable pour les éthers et esters de PEG.

Une autre formule est celle ci :

$$HLB = 20(1 - (S/A)) \quad [\text{Le Hir, 2001}]$$

Avec S = indice de saponification du tensioactif

A = indice d'acide de l'acide combiné dans le tensioactif.

Cette formule est utilisable pour les divers esters de polyols.

Méthode expérimentale : le principe repose sur deux points de base :

- la HLB est une grandeur additive, avec seulement 2 tensioactifs on peut préparer toute une gamme de mélanges de HLB différentes.
- Selon Griffin, une huile ne donne une émulsion laiteuse, fluide et stable qu'avec un émulsionnant ou un mélange d'émulsionnant bien déterminé. On appelle cette valeur HLB *critique* ou HLB *optimale* de l'huile considérée.

Pour déterminer la HLB d'un tensioactif, il suffit de faire une gamme d'émulsions avec de l'eau, une huile de HLB critique connue, un tensioactif de HLB connue et le tensioactif dont on cherche la HLB. Une émulsion sera plus fluide et plus stable que les autres : ce sera celle pour laquelle la HLB du mélange de tensioactif sera égal au HLB critique de l'huile, connaissant la HLB de l'autre tensioactif et les proportions des tensioactifs dans le mélange, on pourra calculer la HLB du premier tensioactif.

On peut admettre les domaines d'utilisation approximatifs des tensioactifs en fonction de leur HLB :

Emulsionnants L/H (lipophile/hydrophile) = 3 à 6

Mouillants = 7 à 9

Antimoussants < 8 (surtout 1,5 à 3)

Emulsionnants H/L (hydrophile/lipophile) = 8 à 18

Détergents = 13 à 15

Solubilisants = 15 à 18

3.2.2.3 Utilisation dans les SEDDS

On utilise des tensioactifs non ioniques avec une HLB relativement élevée. Les agents émulsifiants dérivés d'agents d'origine naturelle sont considérés comme étant moins toxiques que les synthétiques et sont par conséquent recommandés pour la préparation des SEDDS, [Constantinides, 1995; Hauss, Fogal, Ficorilli *et al*, 1998; Yuasa, Sekiya, Ozeki *et al*, 1994] malgré leur capacité limitée à l'auto-émulsification. Les tensioactifs non ioniques sont connus pour être moins toxiques que les tensioactifs ioniques, mais ils pourraient provoquer des changements modérés, toutefois réversibles, dans la perméabilité de la barrière intestinale [Wakerly, Pouton, Meakin *et al*, 1986; Swenson, Milisen, Curatolo, 1994]. La concentration usuelle de tensioactifs dans les SEDDS requise pour la formation d'une émulsion stable dans le tractus intestinal varie entre 30 et 60 % (masse/masse) de la formulation. L'aspect sécurité/innocuité du tensioactif doit donc être considéré avec grande précaution dans chaque cas.

La haute valeur de HLB et par conséquent l'hydrophilie du tensioactif est capitale pour la formation instantanée des gouttelettes d'huiles dans l'eau. Les tensioactifs sont amphiphiles par nature et peuvent donc solubiliser des quantités relativement importantes de principes actifs lipophiles. Cette propriété est de première importance, notamment si on veut éviter une précipitation du principe actif dans le lumen intestinal et conserver la forme solubilisée, vitale pour une absorption efficace [Serajuddin, Sheen, Mufson *et al*, 1988].

3.2.3 Co-solvants / co-tensioactifs

Des solvants organiques, compatibles avec une administration orale (éthanol, propylène glycol (PG), polyéthylène glycol (PEG)...) peuvent aider à dissoudre de plus grandes quantités de principe actif ou de tensioactif au sein du véhicule lipidique: ce sont des co-solvants.

Ces solvants jouent parfois aussi le rôle de co-tensioactif dans les SEDDS ou même de promoteurs d'absorption (Transcutol® ou di-éthylène-glycol-monoéthyl-éther). C'est souvent la présence du co-tensioactif qui permet d'atteindre le domaine de la micro-émulsion. La différence d'efficacité entre plusieurs co-tensioactifs dépend de la longueur des chaînes carbonées. Ruth *et al* montrent que le butanol est 7 fois plus efficace que l'éthanol en terme de quantité pour former une micro-émulsion [Ruth, Attwood, Ktisis *et al*, 1995]. Pour obtenir

le rayon de courbure propice à la formation de gouttelettes huileuses dans une phase externe de nature hydrophile, l'alcool doit s'insérer à l'interface (figure 19). De cette façon la rigidité du film interfacial se trouve réduite, ce qui favorise la courbure. L'insertion de l'alcool à l'interface dépend de son caractère hydrophile.

Par exemple, la solubilité de l'éthanol dans l'eau est meilleure que celle du butanol. L'éthanol présente ainsi un coefficient de distribution interface/eau inférieur à celui du butanol. Il faudra par conséquent des quantités plus importantes d'éthanol pour obtenir une interface dont les propriétés mécaniques sont les mêmes que celles obtenues en utilisant du butanol.

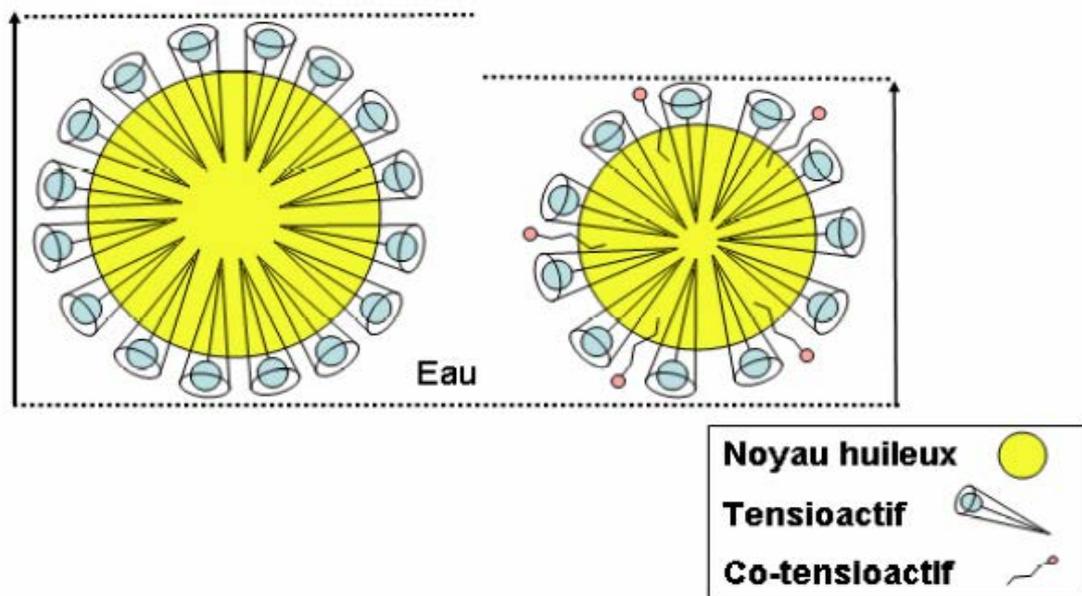


Figure 19: Schéma représentant l'action du co-tensioactif sur le rayon de courbure et sur la taille de la gouttelette d'émulsion, d'après Garrigue 2002.

L'utilisation des solvants organiques pose des problèmes d'incorporation dans les formes de type gélule, l'éthanol et d'autres solvants volatils migrant au sein de l'enveloppe de gélatine [Constantinides, 1995].

3.3 Mécanisme de l'auto-émulsification

Le processus de l'auto-émulsification n'est pas encore totalement élucidé. Elle a lieu lorsque le changement de l'entropie du système en faveur de la dispersion est plus grand que l'énergie requise pour augmenter la surface de la dispersion. En outre, l'énergie libre de formation d'une émulsion conventionnelle est directement proportionnelle à l'énergie requise pour créer une nouvelle surface entre deux phases.

Avec le temps les deux phases vont tendre vers la séparation de façon à réduire l'aire interfaciale et par conséquent l'énergie libre du système. Ainsi les émulsions sont stabilisées par des tensioactifs conventionnels, qui forment une monocouche autour des gouttelettes de l'émulsion et de ce fait réduisent l'énergie interfaciale tout en fournissant une barrière à la coalescence. Dans le cas des systèmes auto-émulsionnants, l'énergie libre requise pour former une émulsion est soit très faible et positive, soit négative (dans ce cas, le processus d'émulsification est spontané, sinon il requiert une faible agitation) [Craig, Barker, Banning *et al*, 1995]. L'émulsification nécessitant un très petit apport d'énergie implique des phénomènes de déstabilisation à travers la contraction de régions interfaciales locales, [Dabros, Yeung, Masliyah *et al*, 1999] c'est à dire une structure interfaciale qui ne présente pas de résistance au cisaillement.

3.4 Caractérisation physico-chimique

Quelques méthodes ont été proposées afin de caractériser les performances d'auto-émulsification. L'approche visuelle permet d'obtenir des informations sur la facilité et le résultat de l'émulsification, mais un nombre plus important de critères est nécessaire pour obtenir une évaluation correcte et pour pouvoir faire des comparaisons efficaces.

Les performances des SEDDS peuvent être estimées en considérant la rapidité d'émulsification et la distribution de la taille des particules. Des mesures de turbidité permettent d'identifier les SEDDS appropriés : ceux dont la dispersion se fait en un temps reproductible et pour lesquels l'équilibre est atteint rapidement [Pouton, 1985].

La polarité des gouttelettes de l'émulsion et leur taille sont des caractéristiques importantes [Shah, Carvajal, Patel *et al*, 1994]. Leur polarité est gouvernée par leur HLB, la longueur des chaînes et le degré d'insaturation de l'acide gras, la masse moléculaire de la composante hydrophile ainsi que la concentration en tensioactifs. La polarité reflète l'affinité de la molécule pour l'huile et / ou l'eau et le type de forces formées. La polarité va promouvoir la rapidité de libération dans la phase aqueuse. Les propriétés chimiques des SEDDS avec et sans principes actifs en utilisant la LFDS (Low Frequency Dielectric Spectroscopy), doivent être étudiées pour évaluer l'impact de l'inclusion du principe actif [Craig, Barker, Banning *et al*, 1995; Craig, 1993].

La taille de gouttelettes de l'émulsion est considérée comme un facteur décisif de la performance de l'émulsification, car celle-ci influe sur la rapidité et le taux de libération de la molécule ainsi que sur son absorption [Shah, Carvajal, Patel *et al*, 1994; Tarr et Yalkowsky, 1989].

Des formulations huileuses auto-émulsifiantes et chargées positivement (SEOF : Self-emulsifying oil formulations), récemment développées, introduisent un nouveau paramètre dans la caractérisation des SEDDS : le potentiel de surface des gouttelettes [Gershanik et Benita, 1996; Gershanik, Benzeno, Benita *et al*, 1998]. Ce potentiel est en général négatif, en raison de l'utilisation d'acides gras libres présents dans le mélange (groupement carboxylique). L'incorporation de petites quantités de lipides cationiques (2,5 à 3%) comme l'oléylamine ou la stéarylamine dans le mélange huile/tensioactif permet de renverser la nature de la charge, ce qui aboutit à la formation de gouttelettes présentant un potentiel positif (groupement amine). Ce potentiel positif est conservé après incorporation du principe actif [Gershanik et Benita, 1996 ; Gershanik, Benzeno, Benita *et al*, 1998 ; Gershanik, Haltner, Lehr *et al*, 2000].

3.5 Domaine d'existence des micro-émulsions

C'est la transparence, succédant spontanément et brutalement à l'aspect laiteux d'une émulsion qui sert de critère pour fixer les limites des domaines d'existence des micro-émulsions. Pour étudier ces domaines, il faut réaliser des diagrammes de phase quaternaires (figure 20) où les quatre composants des micro-émulsions sont représentés. Ces diagrammes tridimensionnels n'étant pas facilement utilisables et lisibles, des diagrammes pseudo ternaires leur sont préférés (figure 21). Ces derniers permettent de représenter graphiquement les mélanges optimaux conduisant à la formation de micro-émulsions. D'autres propriétés comme les aspects de stabilité, d'efficacité d'auto-émulsification peuvent également être reportées sur ce type de diagramme favorisant ainsi la sélection de formulations optimales.

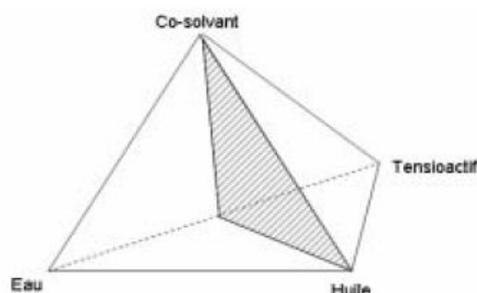


Figure 20: Diagramme de phase quaternaire d'après Le Hir, 2001.

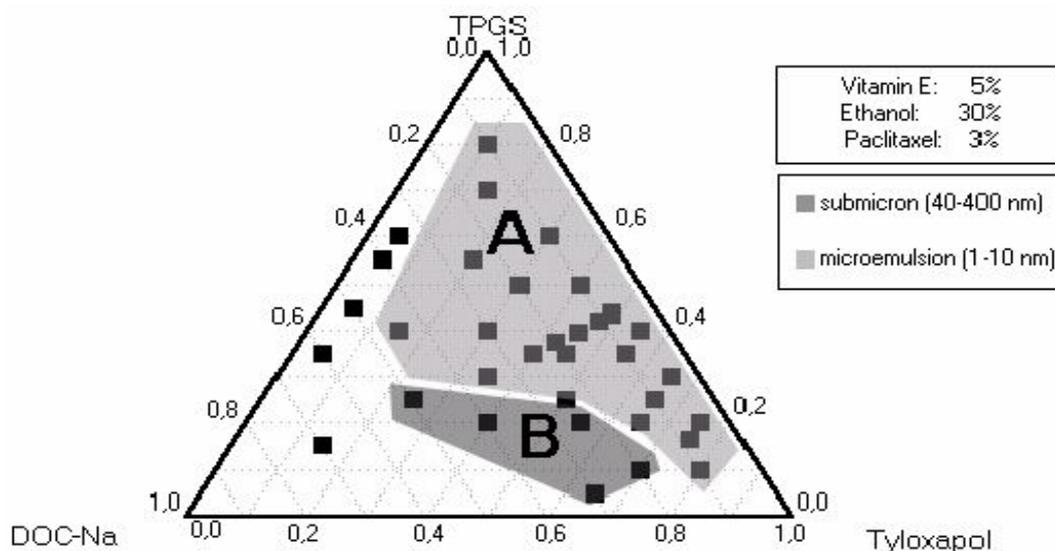


Figure 21: Diagramme de phase pseudo ternaire d'une formulation auto-émulsionnante de paclitaxel à 3% représentant respectivement en gris clair et gris foncé, les zones de micro émulsions (taille inférieure à 10 nm) et d'émulsions sub microniques (taille inférieure au micron).

Abréviations : DOC-Na : Docusate de sodium ; TPGS : D- α -Tocopheryl Polyéthylène Glycol 1000 Succinate. D'après Lambert, Garrigue, Razafindratsita et al, 2002.

Il faut également préciser l'évolution des domaines de micro-émulsion dans le temps. En effet, bien que la stabilité physique de la micro-émulsion ne pose généralement pas de problème, des critères comme la non précipitation du principe actif doivent être pris en compte dans les heures qui suivent le processus d'auto-émulsification. Il est possible qu'un co-solvant présente une affinité pour la phase aqueuse. Sa migration dans la phase aqueuse pourrait alors engendrer la précipitation de la molécule par baisse du pouvoir solubilisant global. La stabilité de l'émulsion formée devrait être de 4 à 6 heures ce qui correspond largement au temps de séjour dans le tractus gastro-intestinal [Garrigue, 2002].

3.6 Aspect biopharmaceutique

3.6.1 Avantages des SEEDS

Les SEEDS permettent d'améliorer la solubilité aqueuse des principes actifs et d'augmenter leur biodisponibilité. Ces formulations diminuent aussi de l'effet des sécrétions biliaires sur absorption des molécules. De plus, elles isolent le principe actif le protégeant des enzymes mais aussi l'empêchant d'irriter les membranes qu'il traverse.

Dans une formulation de SEDDS, des triglycérides à chaînes moyennes MCT, du diglycéril monooléate, de l'huile de ricin polyoxyéthylène hydrogéné (HCO 40) et de l'éthanol sont utilisés respectivement comme une huile, un tensioactif lipophile, un tensioactif hydrophile et un solubilisant, et sont considérés comme formant le mélange avec un ratio de 25/5/45/25 (poids / % poids). Avec six types de composés très faiblement solubles dans l'eau comme l'ibuprofène, le kétoprofène, le tolbutamide, AG-041R, BO-653, et ER-1258, la solubilité obtenue était de 340 à 98000 fois celle dans l'eau, et l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques des composés chez des rats et des chiens beagles étaient équivalentes à celles obtenue après administration d'une solution ou d'une micro-émulsion L/H, ou augmentée de 1,5 à 78 fois par rapport à l'administration d'une suspension. L'effet promoteur de l'absorption gastro-intestinale, basé sur une amélioration de la solubilité a bien été démontré [Araya, Nagao, Tomita *et al*, 2005 a].

Une autre étude reprenant la même formulation de SEDDS met en évidence la capacité de cette formulation à réduire le risque que la différence d'absorption interindividuelle du composé soit due au flux de sécrétions biliaires à leur maximum. Ce risque va en décroissant selon l'ordre suivant : solution huileuse > suspension > SEDDS. En effet les ratios des AUC chez les rats non traités par rapport aux rats avec une fistule biliaire sont respectivement de 5,1; 12,1; 3,0 pour les suspensions, solution huileuse et SEDDS. Ceci démontre l'effet stabilisateur du SEDDS sur l'absorption gastro-intestinale d'un composé très peu hydrosoluble [Araya, Nagao, Tomita *et al*, 2005 b].

L'absorption d'ontazolast chez le rat a été étudiée en fonction de la nature du système lipidique d'administration [Haus, Fogal, Ficorilli *et al*, 1998]. La biodisponibilité de cet anti-inflammatoire lipophile est significativement augmentée par toutes les formulations lipidiques (émulsion, solution huileuse, SEDDS liquide et semi solide) par rapport à la suspension.

L'exemple majeur illustrant la supériorité d'efficacité entre une émulsion et un système auto-émulsifiant est celui de la formulation de la ciclosporine A (CsA), Sandimmun®, commercialisée par Sandoz sous la forme émulsion destinée aux voies orale et veineuse. Sandoz a par la suite mis sur le marché la forme auto-émulsionnante, Néoral®, pour laquelle la biodisponibilité relative de la ciclosporine A, est selon la dose, accrue de 174 à 239%. Outre l'amélioration de l'absorption, cette formulation a permis de réduire les variations inter et intra individuelles et d'obtenir une meilleure linéarité dose/exposition. Ceci se traduit par une meilleure sécurité d'emploi pour cette molécule dont l'index thérapeutique est faible.

L'approche historique du développement de cette formulation permet de mieux comprendre les enjeux et bénéfices de la reformulation de la ciclosporine :

La formulation originale à 20% de CsA dans de l'huile d'olive, elle, a vite été remplacée par une deuxième formulation commerciale bioéquivalente (Sandimmun®) à 10 %, de caractère organoleptique plus agréable. Celle-ci contient le principe actif, du LCT (huile de maïs), des LCT éthylénées (huile de maïs éthylénée, Labrafil M2125 CS, HLB 3-4) (tensioactifs), du glycérol et de l'éthanol déshydraté (12,7%). Elle est administrée comme une émulsion orale préparée dans de l'eau, du jus de fruit (sauf le jus de pamplemousse) ou du lait, ou présentée dans une capsule de gélatine. Dans le dernier cas, la formulation fournit une émulsion brute huile dans eau *in situ*. Les performances biopharmaceutiques de Sandimmun® sont cependant relativement faibles, parce que l'absorption est variable (biodisponibilité comprise entre 7 et 90 % et T_{max} compris entre 1,5 et 22 heures), incomplète et affectée par l'alimentation [Gupta, Manfro, Tomlanovich *et al*, 1990 ; Ptachcinski, Burckart, Venkataramanan *et al*, 1986 ; -Ptachcinski, Venkataramanan, Burckart *et al*, 1986 ; Frey, Horber, Frey *et al*, 1988 ; Behrens, Fricker, Bodoky *et al*, 1996]; ce qui n'est pas souhaitable pour une molécule dont l'index thérapeutique est étroit.

L'amélioration de la reproductibilité du profil plasmatique a également été démontrée pour d'autres principes actifs, notamment lors de l'étude avec WIN 54954, un anti-viral développé par Sterling-Whintrop [Charman SA, Charman WN, Rogge *et al*, 1992]. Dans des études d'absorption chez le chien pour un dérivé naphthalène, les SEDDS ont donné une C_{max} et une AUC trois fois plus grandes que celles obtenues avec tous les autres systèmes oraux liquides ou solides.

La nature et le degré de lipophilie du principe actif jouent un rôle majeur dans l'amélioration de l'absorption. La lipophilie favorise la perméation au travers des membranes biologiques, mais la localisation de l'élément solubilisé, à l'interface ou dans le cœur des gouttelettes huileuses, intervient également. Dans le cas d'une molécule fortement apolaire il est légitime de penser qu'il se produit une inclusion totale de la molécule dans le cœur hydrophobe de la gouttelette d'émulsion. En revanche des composés amphiphiles ou de lipophilie modérée ($\log P < 4$) pourraient s'incorporer au sein de la barrière formée par les molécules de tensioactifs. La localisation du principe actif dans les gouttelettes huileuses est certainement, comme dans le cas d'une solubilisation micellaire, différente selon les composés et peut jouer un rôle dans les mécanismes d'absorption. Cette localisation peut être précisée à partir des caractéristiques des spectres d'absorption UV visible (si la molécule absorbe à ces longueurs d'onde).

Un autre avantage de ces systèmes provient de l'effet type encapsulation qui est engendré. On a par exemple pu observer la baisse du pouvoir irritant de certains principes actifs qui ne sont plus en contact direct avec la paroi gastro-intestinale après ingestion, mais dispersés au

sein de fines gouttelettes huileuses qui quittent rapidement l'estomac et assurent une large distribution de la molécule dans le tractus gastro-intestinal. Un dernier avantage concerne la protection contre l'hydrolyse enzymatique avec notamment une perspective de formulation de peptides lipophiles.

Le célécoxib est un composé BCS classe II, dont la faible solubilité dans l'eau entraîne une grande variabilité d'absorption après une administration orale. De plus, ses faibles densité et compressibilité, ainsi que ses médiocres propriétés d'écoulement compliquent l'élaboration d'une forme solide. Une formulation de SMEDDS a été étudiée et optimisée et se compose de 49.5% PEG-8 glycérides caprylique/caprique, 40.5% d'un mélange de Tween20 et d'ester mono caprylique de propylène glycol (3 : 1) et de 10% de célécoxib. Cette formulation SMEDDS augmente le taux et l'ampleur de l'absorption de façon considérable : en effet, la biodisponibilité de cette formulation est de 132% par rapport à la gélule conventionnelle. La biodisponibilité améliorée du célécoxib est probablement due à l'augmentation de la solubilisation ainsi qu'à la dispersion rapide et efficace de la molécule dans le tractus gastro-intestinal. Cette formulation est stable et empêche la précipitation du célécoxib durant un laps de temps suffisant pour permettre l'absorption. Le SMEDDS développé est constitué d'une moindre quantité d'huile, ce qui le rend moins susceptible au retard de vidange gastrique, avec pour conséquence une absorption plus rapide.[Subramanian, Ray, Ghosal *et al*, 2004]

Un S-SEDDS de paclitaxel, anticancéreux, a été développé en utilisant de l'HPMC comme inhibiteur de la précipitation avec une formulation de SEDDS conventionnelle. Lors d'une dilution *in vitro* de la formulation S-SEDDS, il y a formation d'une micro-émulsion suivie d'une lente cristallisation du paclitaxel. Ceci indique que le système est supersaturé en paclitaxel cristal, et l'état supersaturé est prolongé par la présence d'HPMC dans la formulation. En l'absence d'HPMC, la formulation SEDDS subit une précipitation rapide, entraînant une faible concentration de paclitaxel. Une étude pharmacocinétique a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley, afin d'estimer l'exposition après l'administration d'une dose de 10 mg/kg dans les formulations SEDDS sans HPMC et S-SEDDS avec HPMC. La formulation S-SEDDS a montré une C_{max} dix fois supérieure et une biodisponibilité orale cinq fois supérieure par rapport à la formulation orale Taxol®, et la formulation SEDDS sans HPMC (figure 22). L'administration concomitante de CsA (inhibiteur des P-gp et des CYP 3A4), a encore augmenté sa biodisponibilité orale. Ceci montre que l'exposition orale au paclitaxel peut être augmentée substantiellement via l'approche S-SEDDS [Gao, Rush, Pfund *et al*, 2003].

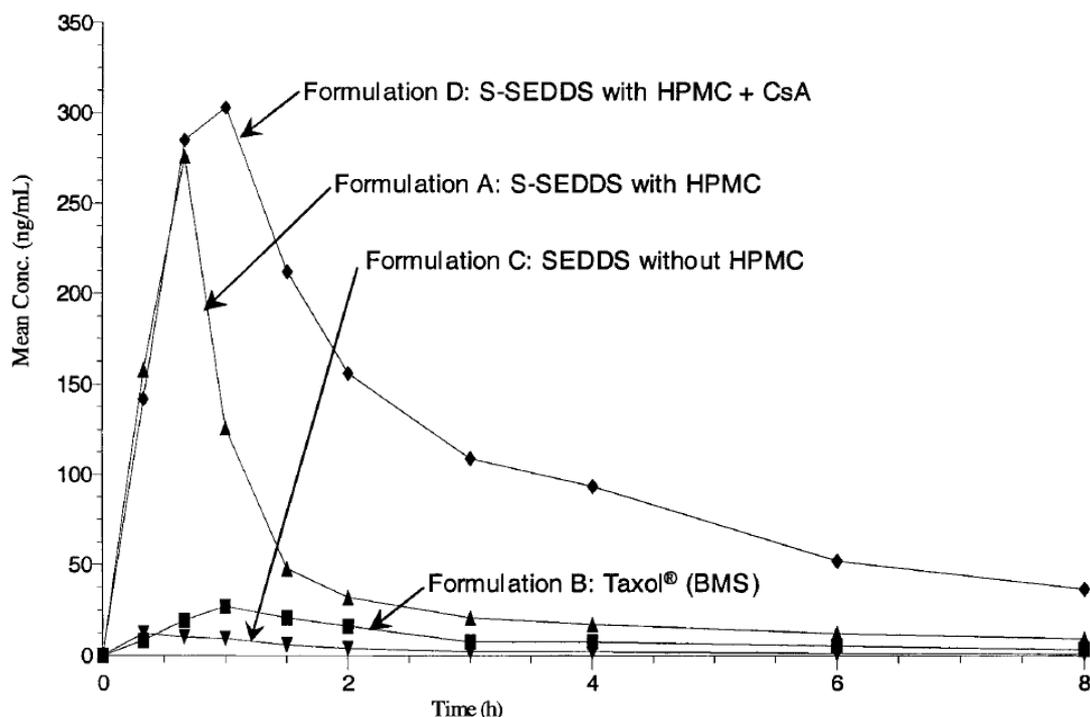


Figure 22: Concentration plasmatique du paclitaxel en fonction du temps chez le rat après administration orale de 10mg/kg de paclitaxel utilisant les 4 formulations indiquées. D'après Gao, Rush, Pfund et al, 2003.

Une formulation optimisée de co enzyme Q10 SEDDS composée de 65% (v/v) de Labrasol, 25% (v/v) de Labrafil M 1944 CS et 10% (v/v) de Capryol 90, permet d'obtenir un profil de libération optimal dans l'eau du CoQ10. Une étude pharmacocinétique faite chez le rat met en évidence une augmentation significative de la Cmax et de l'aire sous la courbe pour la formulation SEDDS par rapport à la formulation en poudre.[Balakrishnan, Lee, Oh *et al*, 2009]

3.6.2 Paramètres influençant l'absorption

La formulation est soit diluée préalablement à l'ingestion, soit s'effectue spontanément dans les fluides biologiques de l'estomac et de l'intestin si l'huile est ingérée directement. Suite à cette dispersion, le principe actif doit être libéré depuis les gouttelettes et absorbé. Pendant le transit des gouttelettes dans le tractus digestif, celles-ci peuvent subir l'action de la digestion des lipides. Les gouttelettes évoluent dans un environnement particulier dont il faut tenir compte pour comprendre leur devenir. L'ensemble de ces paramètres préalables à l'absorption ou régissant celle-ci doit être identifié : barrières et promoteurs d'absorption, interactions avec le milieu (sels biliaries, micelles, enzymes) (figure n°23).

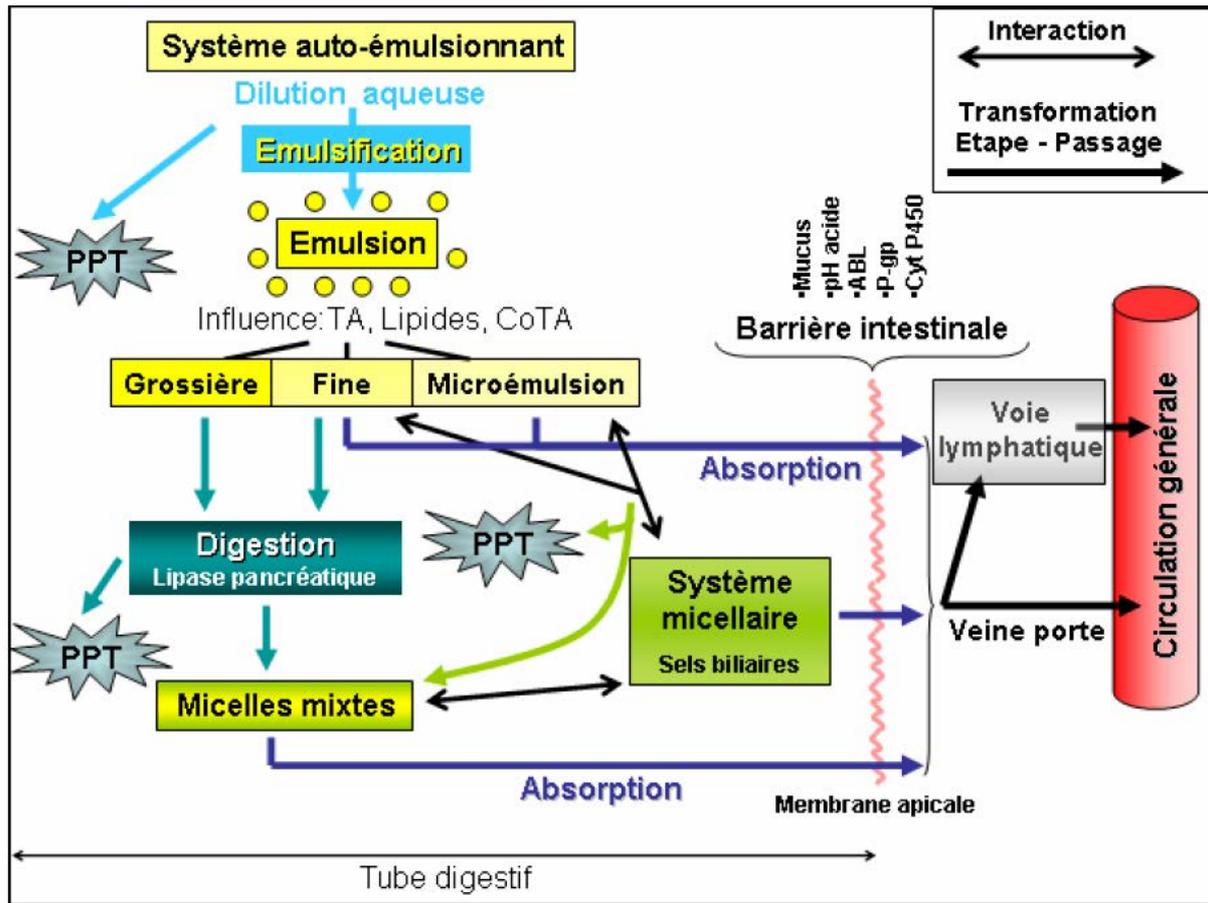


Figure 23: Schéma du devenir *in vivo* des SEDDS après ingestion.

Abréviations : PPT : Précipitation ; TA : tensioactif ; CoTA : co-tensioactif. D'après Garrigue 2002 .

Un certain nombre de paramètres sont répertoriés dans le tableau XII : la taille, l'impact de la dilution et de la digestion en fonction du type de système auto émulsionnant utilisé. En effet, Pouton [Pouton, 2000] a identifié « arbitrairement » 4 types de formulations selon leurs compositions et la forte complexité du devenir *in vivo* de ces systèmes. Les formulations de types II, III a et III b sont des systèmes auto-émulsionnants. La formulation de type I correspond au simple véhicule huileux. De la composition va dépendre la taille de l'émulsion formée, mais aussi son devenir. Chaque paramètre influençant l'absorption doit être envisagé par rapport au type de formulation utilisée.

Tableau XII: Paramètres influençant l'absorption selon le type de formulation. D'après Pouton, 2000.

Paramètres	Type I	Type II	Type IIIa	Type IIIb
Composition typique en triglycérides ou en mélange de glycérides (%)	100	40-80	40-80	<20
Composition typique en tensioactif (%)	---	20-60 (HLB<12)	20-60 (HLB>12)	20-50 (HLB>11)
Co-solvants hydrophiles	---	---	0-40	50-100
Taille des particules de dispersion (nm)	grossière	100-250	100-250	50-100
Impact de la dispersion aqueuse	limité	Pouvoir solvant non affecté	Pouvoir solvant affecté	Importants changements de phases et perte potentielle du pouvoir solvant
Impact de la digestion	Requis crucial	Non crucial mais peut se produire	Non crucial mais peut être inhibé	Non requis et non enclin à se produire

3.6.2.1 Influence du véhicule huileux

L'effet de la nature du véhicule huileux sur les paramètres pharmacocinétiques peut être discuté en fonction de la composition lipidique et de l'efficacité du système. Cet effet est très complexe en raison de la diversité des mécanismes par lesquels les lipides agissent. Parmi ces mécanismes, interviennent une augmentation de la vitesse de dissolution et solubilisation de la molécule active dans les fluides intestinaux, et la lipophilie. Des facteurs comme la longueur de la chaîne d'acides gras, le degré d'insaturation ou le volume de lipides administré conditionnent l'absorption de la molécule et sa distribution sanguine et lymphatique. Le système peut même, selon sa nature, promouvoir la libération du contenu de la vésicule biliaire ou ralentir la vidange gastrique.

Trois processus majeurs se produisent dans l'intestin : les grosses gouttelettes huileuses sont émulsifiées par les sels biliaires, le cholestérol, la lécithine et l'isolécithine pour former des gouttelettes de plus faible diamètre. Ces gouttelettes sont alors métabolisées par la lipase pancréatique. Les différents fragments des gouttelettes huileuses forment alors des micelles mixtes (figure 25).

Bien qu'il soit reconnu dans la littérature que les micro- et nanoparticules puissent pénétrer à travers la muqueuse gastro-intestinale, il n'y a aucune preuve que des gouttelettes d'émulsion puissent passer ainsi dans le compartiment sanguin. Ces gouttelettes subissent des remaniements structuraux dans le tractus digestif : elles pourraient être cassées puis reformées. Les micelles mixtes et la micro-émulsion peuvent pénétrer dans la couche aqueuse à la surface de la membrane intestinale puis être absorbés par différentes voies : pinocytose, diffusion, endocytose. Le principe actif rejoint la circulation sanguine par la veine porte ou le système lymphatique.

Le devenir gastro-intestinal de ces systèmes intervient de façon majeure sur leur efficacité. La présence d'une phase huileuse dans les SEDDS et les SMEDDS® ainsi que dans les micro-émulsions, implique leur interaction avec le système de digestion et d'absorption des triglycérides (lipase pancréatique, co-lipase et sels biliaires). La libération et l'absorption du principe actif, à partir de la forme galénique, dépendent de cette interaction. Les lipides ne pouvant être digérés (huiles minérales comme l'huile de paraffine), ne sont pas absorbés par les entérocytes et peuvent donc limiter l'absorption des principes actifs avec lesquels ils sont administrés. A l'inverse, les lipides tels que les triglycérides, les acides gras, les phospholipides, le cholestérol ou leurs dérivés synthétiques sont digérés et absorbés, ce qui permet d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs co-administrés.

3.6.2.2 Libération du principe actif

La libération du principe actif se produit dès l'émulsification puis tout au long de son transport dans le tractus digestif. Shah *et al.* [Shah, Carvajal, Patel *et al*, 1994] suggèrent que l'efficacité de la libération du principe actif à partir des SEDDS dépend principalement de la taille et de la polarité des gouttelettes résultantes : plus celles-ci sont petites et polaires, plus rapidement se produit la libération en phase aqueuse. Plus il y a de tensioactif et plus la tendance s'oriente vers une petite taille des gouttelettes et une libération rapide du principe actif. La polarité optimale peut être obtenue par combinaison des tensioactifs et des huiles. En ce qui concerne les systèmes micro-émulsionnants, la polarité n'est pas un facteur dominant car le principe actif peut parvenir jusqu'aux capillaires en étant toujours incorporé dans la micro-émulsion. Un excès de tensioactifs peut aussi favoriser une dispersion efficace de la molécule dans le lumen par un processus de solubilisation en plus de sa répartition dans une phase huileuse. La molécule solubilisée ne précipite pas dans le lumen et subit une absorption rapide qui est indépendante du processus de digestion lipidique. La présence d'un noyau

huileux n'est pas toujours un pré requis pour obtenir le meilleur effet de solubilisation. Dans certains cas, le tensioactif peut être préférable.

3.6.3 Aspects toxicologiques des SEDDS

3.6.3.1 *L'altération physique de la membrane*

Afin de voir si l'augmentation de la perméabilité membranaire est corrélée à l'altération locale de l'intestin, Swenson *et al.* [Swenson ES, Milisen WB & Curatolo *et al*, 1994] ont utilisé une variété de tensioactifs dont les sels biliaires, les composés non ioniques (polysorbate 80) et anioniques (sodium dodécyl sulfate). Cette étude *in vivo* (modèle de perfusion d'intestin de rat) suivant le taux plasmatique et la constante d'absorption, utilise la molécule polaire de rouge neutre. On mesure les concentrations de la lactate déshydrogénase (LDH) et des phospholipides dans les perfusats car ce sont des indicateurs biochimiques et histologiques de l'altération physique de la membrane . Un examen histologique des zones perfusées est en outre effectué.

Les résultats de cette étude indiquent que l'altération locale et l'augmentation de l'absorption sont en effet liées. Cependant, les marqueurs reviennent rapidement à la normale (1 à 2 heures), l'effet d'altération membranaire est donc réversible, celle ci peut donc être réparée [Garrigue, 2002].

3.6.3.2 *Toxicité chronique et questions*

La présence en quantités importantes de tensioactifs implique nécessairement une certaine toxicité. Il est possible de réaliser des études de cytotoxicité *in vitro* dans le but de sélectionner les formulations de SEDDS les moins toxiques.

Lors de l'utilisation de tensioactifs dans une formulation orale et notamment celle des SEDDS et SMEDDS, de nombreuses questions se posent en terme de toxicité:

-les tensioactifs provoquent ils une irritation, altèrent ils la membrane intestinale, leur action est elle réversible? Qu'en est-il d'une administration répétée? Agissent ils aussi sur l'absorption d'autres composants que le principe actif, tels que ceux entrant dans la formulation ou ceux du contenu intestinal?

- comment le mélange de tensioactifs est-il métabolisé ?

Il est possible d'évaluer l'irritation des tissus par un examen visuel de l'ensemble du tractus digestif. L'absence de lésions indique en général qu'il n'y a pas d'altération des tissus, mais un examen histologique est tout de même requis pour définir plus précisément la toxicité locale aiguë et l'altération mucosale [Garrigue, 2002].

Suite à l'emploi des tensioactifs, des enzymes, des lipides phosphates ou du LDH peuvent être libérés en plus grande quantité et constituent des marqueurs cellulaires de l'altération mucosale. A la suppression du tensioactif, ces marqueurs biochimiques et histologiques retrouvent leurs valeurs normales, ce qui suggère une réversibilité de l'action du véhicule et la capacité des cellules épithéliales à réparer rapidement les lésions. Bien que ces résultats soient encourageants, il est important de noter que toutes les études réalisées jusqu'ici concernent les effets à court terme et il reste à préciser ces effets par des études de toxicité orale chronique réalisées préférentiellement avec des gélules de gélatine sur un modèle animal approprié. Les SEDDS sont des systèmes d'administration destinés à la voie orale principalement. Or, la voie orale est la voie de premier choix pour les traitements chroniques ou de long terme ; ainsi la tolérance à long terme est un enjeu important pour leur développement.

4 Nanoparticules et microparticules.

Selon la norme ISO TS/27687, les nanoparticules sont des particules dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, certaines sont utilisées comme agent de délivrance de principes actifs [Lockman, Mumper, Khan *et al*, 2002].

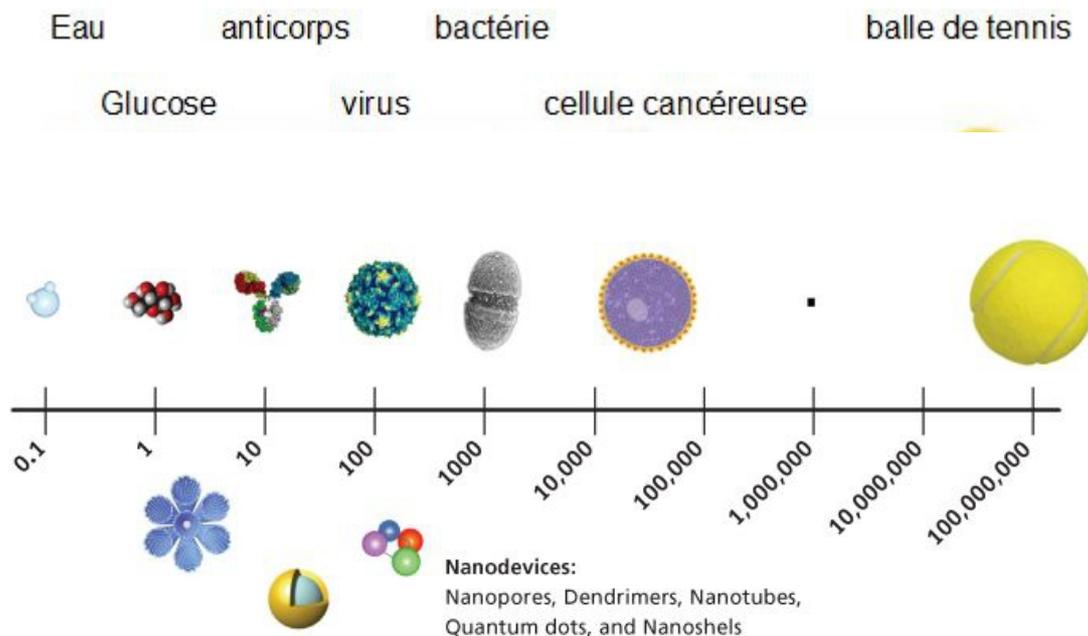


Figure 24: Echelle nanométrique. D'après FDA 2007.

La réduction de taille des particules de principe actif à l'échelle nanométrique augmente la vitesse de dissolution et la solubilité de saturation, ce qui améliore les performances *in vivo* de la molécule [Rabinow, 2004; Patravale, Date, Kulkarni *et al*, 2004].

Il existe de nombreux type de nanoparticules.

4.1 Les processus de production des nanoparticules

Les Nanoparticules peuvent être produites soit par des procédés basés sur la dispersion (impliquant de casser de grandes particules à l'échelle micrométrique, en nanoparticules) top-down, ou des procédés basés sur la précipitation (impliquant la nucléation de particules depuis l'état moléculaire) bottom-up.

Idéalement, ces procédés devraient :

- être simples, continus et efficaces
- être applicables à l'échelle industrielle
- éliminer efficacement la plupart des particules micronisées

- être acceptable pour les autorités
- requérir une quantité de principe actif variable.

Différents procédés comme la granulation humide, l'homogénéisation à haute pression, l'émulsification, la précipitation, l'expansion rapide et la lyophilisation peuvent être utilisés afin de produire des nanoparticules.

4.1.1 Procédés top-down

4.1.1.1 Le broyage humide

Le broyage humide est un procédé basé sur l'usure. La substance est d'abord dispersée dans une solution de tensioactif aqueuse. La suspension résultante est soumise à un broyage humide utilisant un broyeur à boulet en présence du milieu de broyage [Merisko-Liversidge, Liversidge, Cooper *et al*, 2003 ; Liversidge, Cundy, Bishop *et al*, 1992] (figure 25). Les impacts entre les particules de principe actif et le milieu de broyage génèrent assez d'énergie pour transformer les cristaux de principe actif en nanoparticules (figure 26).

Le milieu de meulage est généralement composé de verre, d'oxyde de zirconium stabilisé avec du silicate de zirconium, ou de résine fortement réticulée de polystyrène sous une forme sphérique (0.4–3.0-mm de diamètre). La température maintenue au cours du processus est inférieure à 40°C et la pression atteint 1,38 bar. Le temps de broyage varie de quelques heures à quelques jours selon la dureté de la substance.

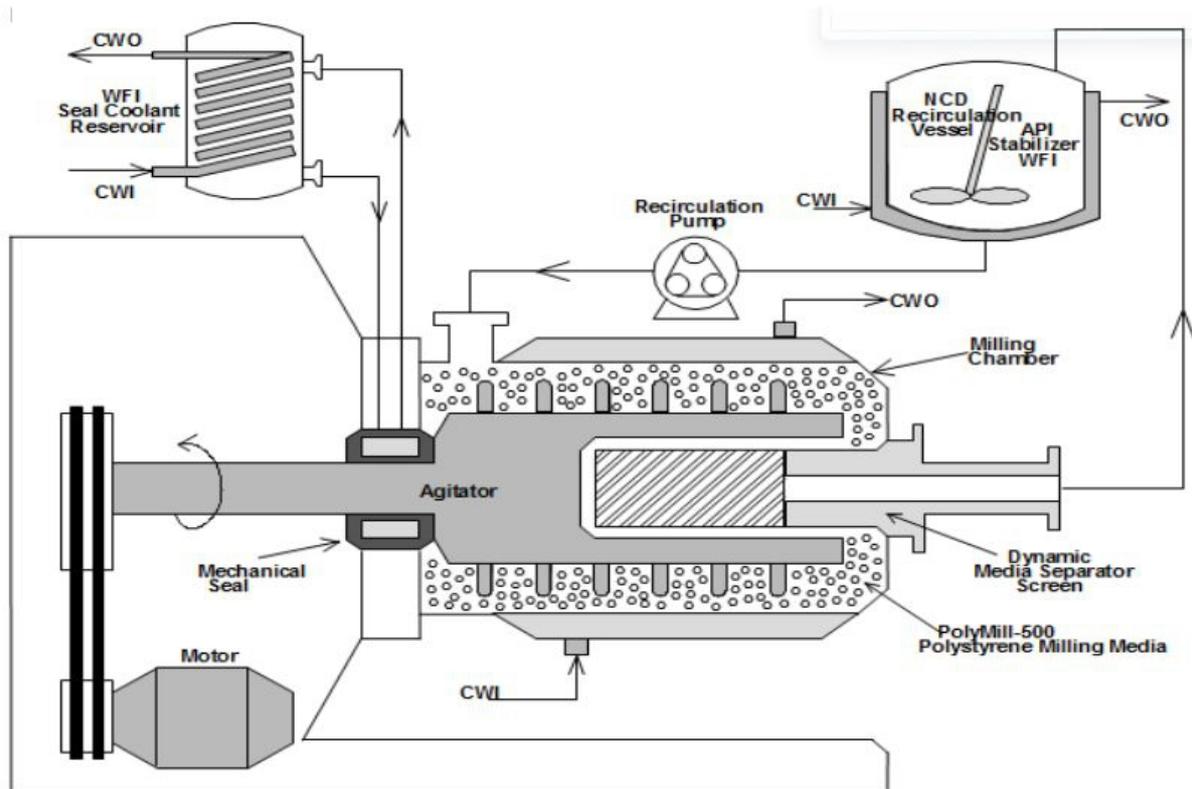


Figure 25: Schéma d'un système de broyage humide. D'après Ruddy 2008 .

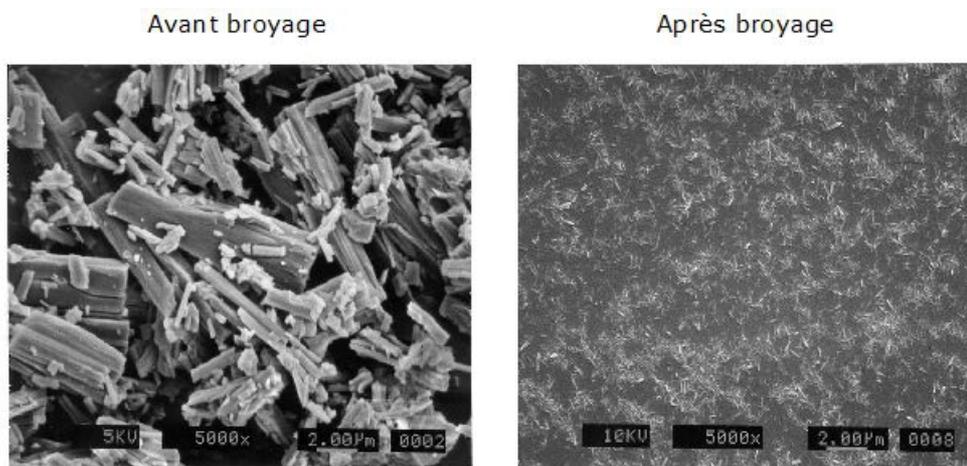


Figure 26: Aspect des particules avant et après broyage humide (SEM).

D'après Ruddy 2008 .

Dans une étude menée par Liversidge et Cundy, la biodisponibilité du danazol, un inhibiteur gonadotrope ayant une faible biodisponibilité, augmente lorsqu'il est administré à des sujets sous forme d'une nanosuspension préparée par broyage humide, en effet sa biodisponibilité absolue est de 82,3%, alors que celle de la forme commerciale du danazol en suspension est de 5,2% [Liversidge, Cundy, Bishop *et al*, 1992].

Une étude comparant des nanocristaux de naproxène préparés par broyage humide, avec Naprosyne® (suspension de naproxène, Roche) et Anaprox® (comprimés de naproxène, Roche). Elle révèle que le temps requis pour atteindre la concentration maximale est diminué de près de 50% pour la dispersion de nanocristaux. De plus l'AUC augmente de 2,5 à 4,5 fois au cours de la première heure de l'étude [Merisko-Liversidge, Liversidge, Cooper *et al*, 2003; Liversidge et Cundy, 1995].

Une limitation de ce procédé est le risque de contamination du produit par abrasion sur les billes du broyeur. Les autres limitations sont des possibilités de production limitées on ne peut produire que par lots et on peut observer des variations dans la distribution de la taille des particules[Müller, Jacobs, Kayser *et al*, 2001].

4.1.1.2 L'homogénéisation à haute pression

Ce procédé est basé sur le principe de cavitation, c'est à dire la formation, la croissance et l'implosion de bulles de vapeur dans un liquide [Merisko-Liversidge, Liversidge, Cooper *et al*, 2003; Müller, Jacobs, Kayser *et al*, 2001 ; Muller, Becker, Kruss *et al*, 1999 ; Muller et Peters , 1998 ; Krause et Müller, 2001]. Dans ce procédé, une pré-suspension de principe actif (contenant des particules de taille micrométrique) est préparée en soumettant le principe actif à un microniseur à air comprimé en présence d'une solution aqueuse de tensioactif. La pré-suspension est soumise à l'homogénéisation haute pression : elle passe au travers d'un espace homogénéisateur d'environ 25 mm. Les forces de cavitation sont créées, elles sont suffisamment élevées pour désintégrer les microparticules de principe actif en nanoparticules lorsque la suspension quitte l'espace et que la pression de l'air retourne à la normale. La pression d'homogénéisation et le nombre de cycles d'homogénéisation sont les paramètres clés de l'optimisation du procédé. La pression d'homogénéisation varie entre 100 et 1500 bar et le nombre de cycles peut être de 3, 5 ou 10 selon la dureté du principe actif, la taille des particules désirée et l'homogénéité requise pour le produit [Jacobs, Kayser, Müller *et al*, 2000 ; Muller, Bohm, Grau *et al*, 2000 a ; Muller, Bohm, Grau *et al*, 2000 b].

Le principal avantage de l'homogénéisation haute pression est d'être utilisable à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle car les homogénéisateurs haute pression sont disponibles en différentes tailles. De plus, l'homogénéisation peut créer une contamination nanoparticulaire négligeable (issue d'un matériau en contact avec la molécule), ce qui est l'un des objectifs les plus importants du procédé de production de nanoparticules.

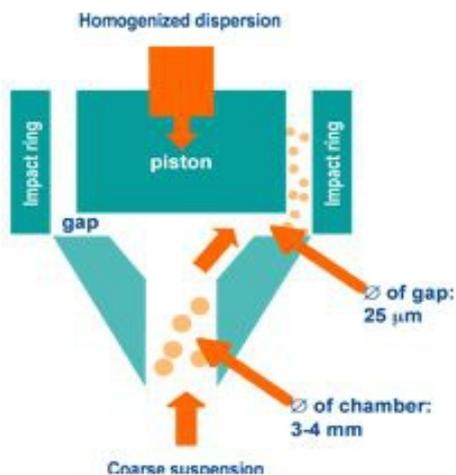


Figure 28: Schéma de l'homogénéisation à haute pression. D'après Elan 2009.

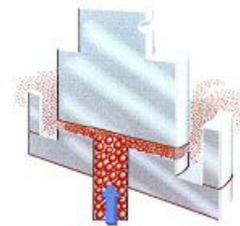


Figure 27: Homogénéisation à haute pression. D'après GEA 2009.

Scholer *et al* ont montré que la biodisponibilité de l'atovaquone, un principe actif utilisé dans le traitement de la leishmaniose, augmente en le formulant en nanosuspension [Schöler, Krause, Kayser *et al*, 2001]. Comparée à des doses équivalentes d'atovaquone micronisée, la nanosuspension réduit l'infectiosité de 40 à 15% à une concentration réduite de 7,5mg/kg. La charge en principe actif passe de 22,5mg/kg pour la molécule micronisée, à 7,5mg/kg pour la nanosuspension, et l'activité a est multipliée par 2,5 [Schöler, Krause, Kayser *et al*, 2001].

Kayser *et al*. ont montré que la biodisponibilité de l'amphotéricine B, un antifongique très efficace, augmente lorsque le principe actif est sous forme de nanosuspension, par rapport à l'amphotéricine commerciale (micronisée) administrée par voie orale et les liposomes d'amphotéricine administrés par voie intraveineuse [Kayser, Olbrich, Yardley *et al*, 2003].

Dans une étude récente, les caractéristiques de dissolution de la nifédipine, sous forme de nanoparticules préparées par homogénéisation haute pression, étaient significativement augmentées par rapport à la formule commerciale. En effet après 60 minutes, 95% des nanoparticules de principe actif étaient dissoutes contre 5% du principe actif dans le cas de la formulation commerciale [Hecq, Deleers, Fanara *et al*, 2005].

Les nano-suspensions éliminent également la possibilité de maturation d'Ostwald (c.-à-d., la croissance des plus grandes particules aux dépens des plus petites), facilitant de ce fait la stabilité physique à long terme en suspension aqueuse. La maturation d'Ostwald est provoquée par les diverses solubilités de saturation des particules de différentes tailles, qui sont proches les unes des autres, et le gradient de concentration entre elles. Les molécules de la solution plus fortement concentrée autour des particules très petites se répandent à

proximité de plus grandes particules où la concentration est inférieure. Cet effet mène à la super saturation, à la cristallisation du principe actif, et, ainsi, à la croissance des plus grandes particules. La maturation d'Ostwald ne se produit pas dans les nanosuspensions parce que le procédé d'homogénéisation produit seulement des particules de dimensions uniformes [Müller, Jacobs, Kayser *et al*, 2001].

L'une des limitations de ce procédé est la pression utilisée : en effet, celle-ci est tellement élevée, que dans certains cas la structure du cristal change de forme, ce qui engendre une augmentation de la fraction amorphe [Muller et Bohm, 1998]. Ces variations dans la cristallinité peuvent engendrer une instabilité et donc la perte du produit.

4.1.2 Procédés bottom-up

4.1.2.1 Technologie d'émulsification

L'émulsification peut aussi être utilisée afin de préparer des suspensions de nanoparticules. Dans ce procédé, une solution de principe actif dans un solvant organique est dispersée dans la phase aqueuse contenant un tensioactif. L'étape suivante est l'évaporation du solvant organique sous pression réduite, ce qui entraîne la précipitation des particules de principe actif formant ainsi une suspension de nanoparticules stabilisée par l'addition de tensioactif.

La suspension de nanoparticules peut aussi être obtenue en diluant une émulsion préparée par des méthodes conventionnelles, ayant pour résultat la diffusion complète de la phase interne dans la phase externe menant à une suspension de nanoparticules. En réalisant une nanosuspension par émulsification, la dissolution du mitotane, un anticancéreux, a été multipliée par cinq par rapport à la formulation commerciale [Trotta, Gallarate, Pattarino *et al*, 2001].

L'utilisation de la micro-émulsion comme base pour la production de nanosuspension a aussi été rapportée dans la littérature. La dissolution de la griséofulvine a été augmentée trois fois par rapport à la formulation commerciale dans la nanosuspension réalisée par micro émulsion [Trotta, Gallarate, Carlotti *et al*, 2003].

Cette technologie de micro-émulsification ne peut cependant pas être utilisée pour les molécules étant à la fois très peu solubles dans l'eau et dans les milieux organiques. De plus, l'utilisation des solvants organiques pose des problèmes environnementaux.

4.1.2.2 Précipitation avec un fluide anti solvant comprimé (PCA).

Dans ce procédé (breveté par RTP Pharmaceuticals et dont la licence est accordée à SkyePharma Plc), du dioxyde de carbone supercritique est mélangé à des solvants organiques contenant le principe actif. Les solvants se répandent dans le dioxyde de carbone supercritique, augmentant ainsi la concentration du soluté dans la solution, la rendant super saturée, et causant la précipitation du soluté ou sa cristallisation hors de la solution. Les micro et nanoparticules sont formées après la précipitation du principe actif par transfert de masse à cause de l'extraction des solvants organiques dans le dioxyde de carbone super critique et la diffusion du dioxyde de carbone dans les gouttelettes [Liversidge, Cundy, Bishop *et al*, 1992; Liversidge G & Cundy, 1995]. Un taux de transfert de masse élevé est important afin de minimiser l'agglomération des particules et de réduire le temps de séchage [Chattopadhyay et Gupta, 2002].

Hanna et York ont essayé d'augmenter le transfert de masse en utilisant une buse coaxiale avec une chambre de mélange. Dans ce procédé, le principe actif dans les solvants organiques interagit avec le dioxyde de carbone comprimé dans la chambre de mélange avant la dispersion et s'écoule ensuite au travers d'un orifice restreint dans un récipient de formation de particules. Les forces de friction élevées qui sont générées causent la désintégration de la solution en gouttelettes [Hanna et York, 1998].

Ce procédé a été modifié par Subramaniam *et al.* qui ont utilisé un procédé basé sur une buse ultrasonique pour produire des nanoparticules dans une gamme de taille étroite [Subramaniam, Ray, Ghosal *et al*, 2004]. Une étape clé dans la formation de nanoparticules est d'augmenter le transfert de masse entre les gouttelettes et l'anti-solvant avant que les gouttelettes fusionnent pour former de plus grosses gouttelettes. Avec une buse à ultrasons, les ondes sonores aident la désintégration de l'anti-solvant en petites gouttelettes, augmentant de ce fait la surface d'interface. De plus, les turbulences créées par les ondes sonores focalisées augmentent aussi le taux de transfert de masse entre les gouttelettes et le dioxyde de carbone. Les ondes sonores, plus que les forces d'inertie ou de friction, sont exploitées pour la formation des gouttelettes. C'est pourquoi le diamètre du conduit dans lequel le spray de solution est introduit peut être plus large que celui des buses capillaires ou à micro orifices [Subramaniam, Saim, Rajewski *et al*, 1997]. Ce diamètre plus large permet un débit de solution plus élevé et réduit la probabilité de boucher la buse, et améliore donc énormément l'efficacité de fabrication.

4.1.2.3 Expansion rapide depuis une solution de gaz liquéfié. (Rapid expansion from supercritical to aqueous solution : RESAS).

Dans ce procédé, une solution ou une dispersion de phospholipides ou d'autre tensioactif convenable est formée dans un fluide supercritique. Puis la nucléation rapide du principe actif est induite dans le fluide super critique contenant le tensioactif. Ce procédé permet un contact rapide entre le principe actif dissout dans le fluide super critique et le tensioactif ce qui inhibe la croissance des particules nouvellement formées [Young, Johnston, Mishima *et al*, 1999 ; Turk, Helfgen, Hils *et al*, 2002].

C'est ce procédé qu'ont utilisé Young *et al* pour préparer des nanoparticules de ciclosporine dans une gamme de taille allant de 500 à 700 nm [Young, Mawson, Johnston *et al*, 2000]. Une solution de Tween 80 était utilisée comme tensioactif afin d'éviter la floculation et l'agglomération des nanoparticules. Les chercheurs ont rapporté que les particules de ciclosporine formées par ce procédé pouvaient être stabilisées pour des concentrations en principe actif aussi élevées que 6,2 et 37,5 mg/mL dans des solutions de Tween 80 à 1 et 5% (m/m).

Ce procédé a été combiné à celui d'homogénéisation haute pression par Pace *et al* pour préparer une nanosuspension physiquement stable. Dans ce procédé, les principes actifs peu solubles et le modificateur de surface ont d'abord été dissous dans un gaz solvant, liquéfié et comprimé, qui a ensuite été répandu dans une solution aqueuse contenant un tensioactif. La suspension ainsi formée a été ensuite soumise à un procédé d'homogénéisation haute pression pour produire une nanosuspension stable [Pace, Vachon, Mishra *et al*, 2001].

4.1.2.4 Lyophilisation dans un liquide super critique (SFL : spray freezing into liquid)

Dans ce procédé, développé à l'Université du Texas à Austin et commercialisé par Dow Chemical Company, une solution de co-solvant aqueux, organique ou aqueux organique, une émulsion aqueuse organique, ou une suspension de principe actif est atomisée dans un liquide cryogénique comme de l'azote liquide pour produire des particules gelées qui seront lyophilisées pour obtenir une poudre s'écoulant librement [Williams, Johnston, Young *et al*, 2005 ; Rogers, Hu, Yu *et al*, 2002 ; Rogers, Nelsen, Hu *et al*, 2002 ; Rogers, Nelsen, Sarkari *et al*, 2003 ; Hu, Johnston, Williams *et al*, 2003]. La vitesse de congélation rapide causée par la basse température de l'azote liquide et le haut degré d'atomisation résultant de

l'empiètement se produisant entre la solution de principe actif et le liquide cryogénique mènent à la formation de nanoparticules amorphes. Séparées de l'azote liquide, la solution de principe actif peut aussi être atomisée dans un fluide compressé de dioxyde de carbone, d'hélium, de propane ou d'autres liquides cryogéniques tels que l'argon ou les hydrofluoroéthers. Les nanoparticules de danazol très puissantes contenues dans de plus grands agrégats structurés ont été produites par ce procédé [Hu, Johnston, Williams *et al*, 2004 a].

Les poudres lyophilisées dans un liquide super critique présentent des taux de dissolution significativement augmentés. Le danazol micronisé présente un faible taux de dissolution, seul 30% du danazol est dissout en 2 min, alors que dans le cas de la poudre lyophilisée ce taux s'élève à 95% en 2 min. Dans une récente étude, une poudre de danazol/PVP K-15 avec une grande surface de contact et une température de transition de verre élevée restait amorphe et présentait une dissolution rapide après 6 mois de stockage [Hu, Johnston, Williams *et al*, 2004 b].

4.1.2.5 Précipitation évaporative dans une solution aqueuse (EPAS)

Ce procédé a aussi été développé par l'Université du Texas à Austin et commercialisé par Dow Chemical Company. Dans ce procédé, la solution de principe actif dans un solvant organique liquide à faible point d'ébullition est chauffée sous pression à une température supérieure à celle du point d'ébullition normal du solvant, puis atomisée dans une solution aqueuse chauffée contenant un tensioactif stabilisateur [Dixon, Johnston, Brodemier *et al*, 1993]. Le tensioactif peut aussi être ajouté au solvant organique ainsi qu'une solution aqueuse pour inhiber la cristallisation et la croissance de particules formant des noyaux.

Ce procédé a été utilisé afin de produire une suspension de nanoparticules de ciclosporine A et de danazol présentant des taux de dissolution élevés.

Les suspensions de nanoparticules réalisées par ce procédé peuvent être incorporées dans des formes galéniques destinées à la voie parentérale ou être séchées pour produire des formes orales [Sarkari, Brown, Chen *et al*, 2002 ; Chen, Vaughn, Yacaman *et al*, 2004].

Dans une étude récente, les particules de danazol produites par EPAS et SFL donnent des poudres amorphes avec une température de transition de verre élevée et des valeurs d'angle de contact faibles. Les taux de dissolution étaient plus rapides pour les particules obtenues par SFL, mais les deux techniques augmentaient le taux de dissolution du principe actif [Vaughn, Gao, Yacaman *et al*, 2005].

4.2 Microparticules et nanoparticules utilisables comme systèmes de délivrance

4.2.1 Liposomes

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques de très petit diamètre, constitués d'un noyau aqueux emprisonné par une ou plusieurs bicouches de lipides naturels ou synthétiques, capables d'encapsuler des molécules lipophiles, dans la bicouche lipidique, ou hydrophiles, dans le compartiment aqueux. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire et d'une double chaîne hydro-carbonnée. Lorsqu'ils sont hydratés, ils forment des structures en feuillets dites phases lamellaires. De part leurs compositions, ils sont biocompatibles et biodégradables.

Les liposomes sont classés en fonction de leur nombre de bicouches lipidiques, leur taille ainsi que leur méthode de fabrication.

- Petits liposomes unilamellaires (Small unilamellar vesicles (SUV)) : ne comportant qu'une bicouche lipidique et d'une taille comprise entre 25 et 100nm.
- Grands liposomes unilamellaires (Large Unilamellar vesicles (LUV)) : de 100 à 400 nm et ne comportant qu'une seule bicouche lipidique.
- Grands liposomes multilamellaires, (multilamellar vesicle (MLV)) : de 200 nm à plusieurs microns, ils sont constitués de plusieurs bicouches lipidiques concentriques.
- Liposomes multivesiculaires (multivesicular vesicles (MVV)) : formés par plusieurs vésicules non concentriques [Falson-Rieg, Faivre, Pirot *et al*, 2004].

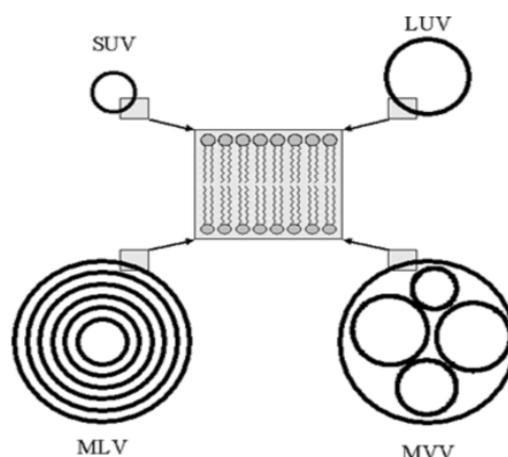


Figure 29: Schéma des différents types de liposomes. D'après Daniels 2005

-

4.2.1.1 Méthodes de fabrication des liposomes

Il existe de nombreuses techniques de préparation des liposomes, cependant trois étapes sont communes à toutes les méthodes :

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

Le mode de dispersion des lipides dans le milieu aqueux avant la coalescence est la principale divergence entre les différentes méthodes. Celle-ci peut être effectuée de trois manières différentes :

- la dispersion physique,
- la dispersion en deux phases,
- la solubilisation par un détergent [Falson-Rieg, Faivre, Pirot *et al*, 2004].

4.2.1.1.1 Fabrication des MLV

Les MLV peuvent être préparés par la méthode de Bangham, un processus de dispersion mécanique par agitation. Dans un ballon de grand volume, on fait évaporer le solvant organique volatil dans lequel les lipides sont dissous. On obtient ainsi un dépôt de lipides secs, formant un film étendu et très mince ce qui permettra d'obtenir après hydratation un volume interne important. On verse la solution aqueuse contenant les molécules à encapsuler sur le film lipidique, en maintenant une agitation régulière et une température supérieure à la température de transition de phase du lipide. On obtient alors des liposomes. L'ajout de bille de verre de 0,5 à 3mm de diamètre facilite la dispersion des phospholipides.

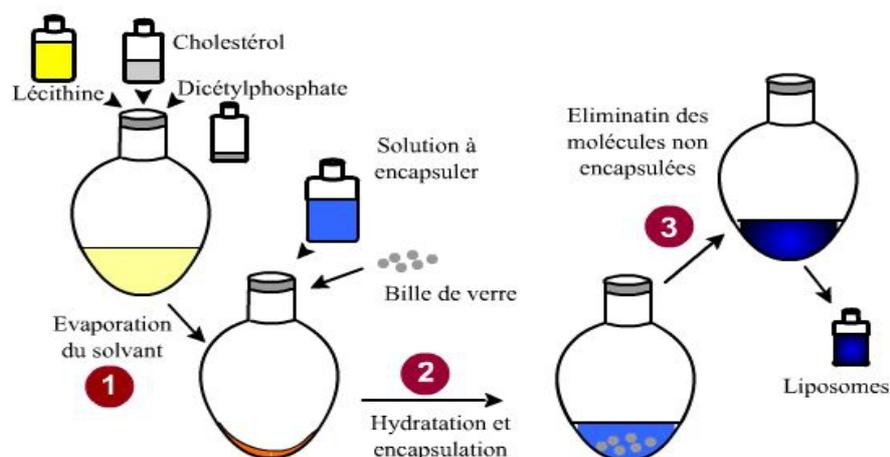


Figure 30: Fabrication des MLV. D'après espacescience.com 2008.

4.2.1.1.2 Préparation des SUV

Il est possible de préparer des SUV en plaçant une sonde à ultrasons dans une préparation de MLV, ou de placer cette solution dans un bain à ultrasons. Cependant la sonde provoque un échauffement de la suspension et parfois un relargage de particules métalliques peut contaminer la préparation. Ces phénomènes peuvent dénaturer les phospholipides.

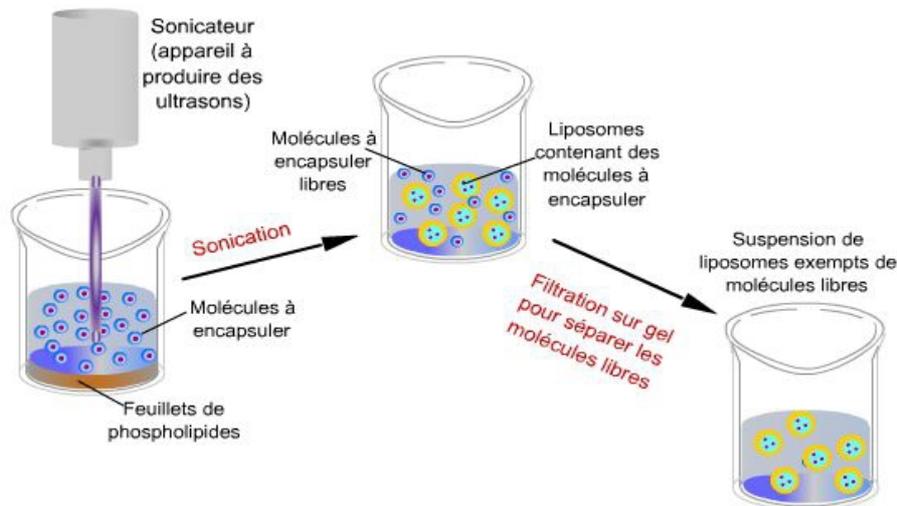


Figure 31: Fabrication des SUV par sonication. D'après espacescience.com 2008.

L'utilisation d'une presse de French permet d'obtenir des vésicules d'un diamètre supérieur à celui des vésicules obtenues par sonication. En effet, l'extrusion des MLV sous forte pression (1500 à 2500 atmosphères) à 4°C conduit après un seul passage à des vésicules de 25 nm à 50 nm [<http://www.espacesciences.com/SMO/Liposomes/Cours.htm>].

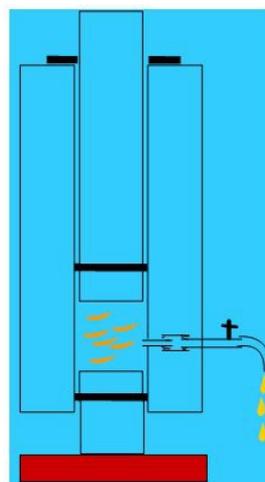


Figure 32: Schéma d'une presse de French. D'après espacescience.com 2008.

Les SUV peuvent aussi être préparés par microfluidisation. Une suspension de MLV est envoyée dans une chambre d'interaction sous forte pression (700 atm) à travers un filtre de porosité 5 μm . A l'entrée de la chambre, les fluides sont séparés en deux canaux qui s'entrechoquent à des vitesses importantes ($>500\text{m/s}$) à l'autre extrémité. Ceci provoque la rupture des grosses vésicules et la formation de SUV. Afin d'obtenir des SUV de diamètre compris entre 100 et 200 nm, plusieurs passages sont nécessaires.

Enfin, les liposomes se forment spontanément lors de l'injection d'une solution éthanolique ou étherée de phospholipides dans une solution aqueuse. L'éthanol et l'eau forment une seule phase immédiatement après l'injection, et les phospholipides se dispersent. Le volume d'éthanol devant être très faible par rapport à celui de la solution aqueuse, la suspension de liposomes ainsi obtenue est très diluée. Dans le cas où les lipides sont dissous dans l'éther, la solution aqueuse doit être chauffée à $55^{\circ}\text{-}60^{\circ}\text{C}$. La vaporisation de l'éther conduit à la formation de liposomes. Divers paramètres tels que la concentration des phospholipides dissous, la vitesse d'injection ainsi que la vitesse d'agitation jouent sur le diamètre des vésicules ainsi formées. Selon les conditions expérimentales on obtient des SUV ou des LUV.

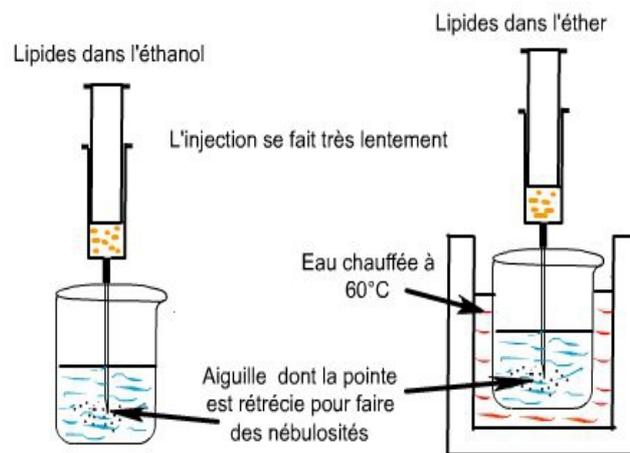


Figure 33: Fabrication spontanée de liposomes par injection d'une solution éthanolique ou étherée de phospholipides dans une solution aqueuse. D'après *espacescience.com* 2008.

Les SUV peuvent aussi être obtenus à partir de dispersions aqueuses de micelles mixtes de phospholipides et de détergents. En éliminant le détergent, les micelles vont s'enrichir en phospholipides, ce qui va conduire à la formation de vésicules unilamellaires.

Après la préparation des liposomes, il est nécessaire de les caractériser.

4.2.1.2 Caractérisation des liposomes

Les paramètres permettant de caractériser les liposomes sont leur taille, le nombre de bicouches, leurs perméabilité et fluidité membranaire, leur volume aqueux ainsi que leur capacité d'encapsulation.

4.2.1.2.1 Taux d'encapsulation et relargage

Un principe actif lipophile s'insérera au niveau des chaînes hydrocarbonées des phospholipides de la bicouche du liposome, un principe actif hydrophile sera dissous dans le coeur aqueux du liposome. Avant même de pouvoir étudier le taux d'encapsulation du principe actif dans les liposomes, il est nécessaire d'éliminer l'excès de molécules n'ayant pas été encapsulées. Pour ce faire, il est possible d'utiliser une méthode de centrifugation associée à une filtration sur gel.

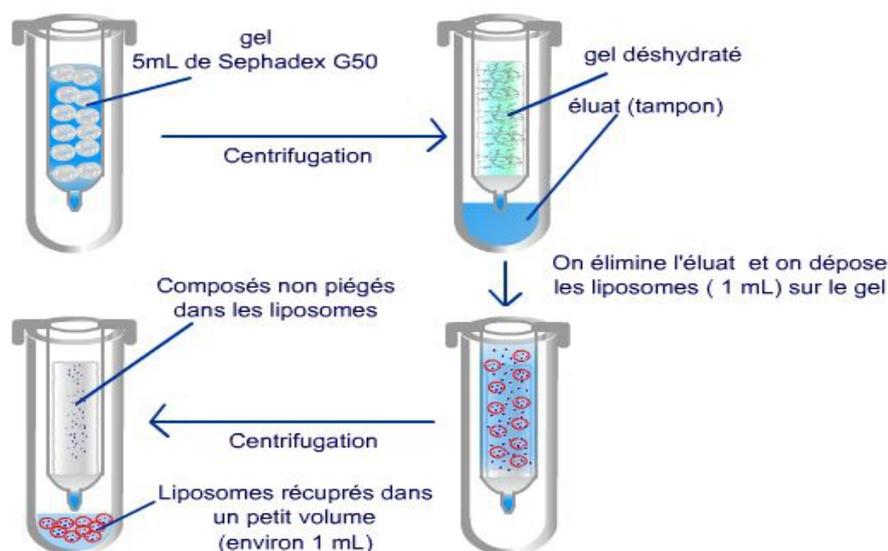


Figure 34: Détermination du pourcentage de capture : Centrifugation associée à une exclusion sur gel. D'après *espacesciences.com* 2008.

La détermination du pourcentage de relargage peut se faire en piégeant un marqueur coloré (fluorescent, radioactif ou une enzyme) dans les liposomes. Celle-ci se fait en fonction du temps et des conditions du milieu [Falson-Rieg, Faivre, Pirot *et al*, 2004].

La taille des liposomes peut être estimée par diffraction laser ou diffusion dynamique de la lumière.

4.2.1.2.2 Stabilité des liposomes

Les liposomes sont sensibles à l'oxydation et à l'hydrolyse. L'hydrolyse des phosphatidylcholines augmente la perméabilité des liposomes. Afin de protéger les liposomes des ces dégradations chimiques il est intéressant de les exposer le moins possible à l'oxygène, en utilisant un gaz inerte, de préférer des phospholipides saturés, d'ajouter un anti-oxydant comme l' α -tocophérol, de complexer les métaux lourds avec de l'EDTA et de conserver la suspension de liposomes à l'abri de la lumière. Il est aussi possible de conserver les liposomes sous forme sèche en les lyophilisant, car l'eau est un important facteur d'instabilité. Un cryoprotecteur (glucose, tréhalose) occupe alors la place des molécules d'eau liées aux groupements hydrophiles des phospholipides en phase aqueuse. Lorsque le principe actif est inséré dans la bicouche lipidique la réhydratation du lyophilisat est facile, le principe actif se solubilise dans la bicouche. En revanche, la reconstitution d'un principe actif soluble dans l'eau est plus problématique, celui-ci se partageant entre la phase aqueuse externe et l'intérieur des liposomes. Sur un plan physique on peut observer une fuite du principe actif, une modification de la distribution de la taille des liposomes, des phénomènes d'agrégation ou de fusion, et la sédimentation des vésicules. Ces phénomènes dépendent de la stabilité des membranes qui varie en fonction de leurs propriétés mécaniques et thermodynamiques. [Shah, Carvajal, Patel *et al*, 1994]

4.2.2 Nanoparticules polymériques

L'utilisation de nanoparticules polymériques permet non seulement d'augmenter la biodisponibilité de certains principes actifs mais aussi d'en accélérer l'absorption, de rallonger leur demi-vie. Les nanoparticules polymériques permettent aussi un relargage soutenu du composé et une diminution de sa toxicité.

De nombreux polymères synthétiques ou naturels ont été étudiés afin de préparer des nanoparticules. Parmi eux l'acide polylactique (PLA), le polyacide glycolique (PGA), et leur co-polymère (PLGA) ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur biocompatibilité et leur biodégradabilité [Olivier, 2005]. Les nanoparticules sont des vecteurs potentiels pour de nombreuses classes thérapeutiques : les anti-cancéreux, les anti-hypertenseurs, des hormones; et les macro-molécules comme des acides nucléiques, les protéines, les peptides, et les antibiotiques.

Une étude sur l'administration par voie orale d'anticancéreux prenant le Docetaxel comme modèle, porte sur plusieurs types de polymères : nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA NPs), nanoparticules de poly(lactide)-vitamine E TPGS (PLA-TPGS

NPs), nanoparticules de poly(acide lactique-co-glycolique)-montmorillonite (PLGA/MMT NPs) et des nanoparticules de poly(lactide)-vitamine E TPGS/montmorillonite (PLA-TPGS/MMT Nps). L'étude pharmacocinétique menée chez le rat montre que lors d'une administration par voie orale, les formulations de nanoparticules PLA-TPGS/MMT et PLA-TPGS peuvent présenter des demi vies 26.4 et 20.6 fois plus longues que celle du Taxotere (médicament de référence) administré en I.V. à la même dose de 10mg/kg. Les formulations de nanoparticules permettent un relargage soutenu de principe actif jusqu'à 3 semaines, contre 22 heures pour le Taxotere administré en IV. La biodisponibilité orale est de 3.59% pour le Taxotere, 78% pour la formulation de nanoparticules PLA-TPGS/MMT, et 91% pour la formulation de nanoparticules PLA-TPGS NP [Feng, Mei, Anitha *et al*, 2009].

Une autre étude montre qu'une formulation à base de PLGA permet une augmentation de la biodisponibilité de la mifepristone [He, Horn, Hussain *et al*, 2007].

Dans une étude clinique, l'administration par voie orale de nanoparticules polymériques de célécoxib :éthyl cellulose :caséine 37,5:37,5:25 (figure 35) permettent une exposition systémique plus importante qu'avec les gélules de Celebrex® commercialisées . Le pic de concentration plasmatique est aussi plus rapidement atteint: 45 minutes au lieu de 3 heures (voir figure 36) [Morgen, Bloom, Beyerinck *et al*, 2012].

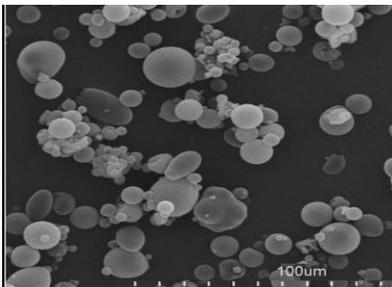


Figure 35: SEM de nanoparticules polymériques de célécoxib :éthyl cellulose :caséine 37,5:37,5:25. D'après Morgen, Bloom, Beyerinck *et al*, 2012 .

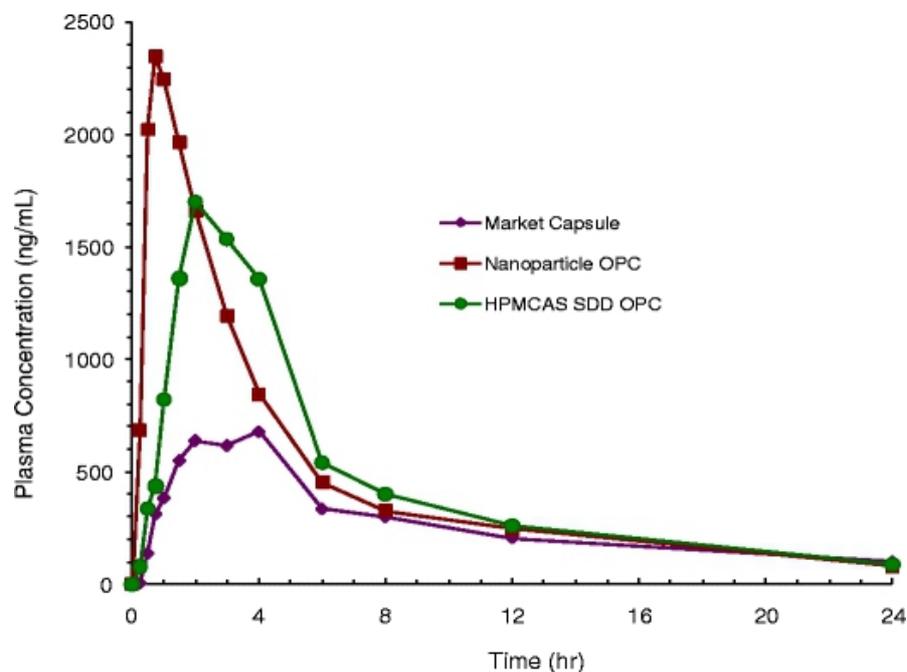


Figure 36: Concentrations plasmatiques en celecoxib en fonction du temps après administration par voie orale de Célébrex® (market capsule), nanoparticules de célecoxib :éthyl cellulose :caséine 37,5:37,5:25 en suspension (nanoparticules OPC), nanoparticules de célecoxib:HPMCAS-L 50:50 en suspension (HPMCAS SDD OPC). D'après Morgen, Bloom, Beyerinck et al, 2012.

Les nanogels sont composés d'un réseau de segments de polymères entrecroisés avec des segments de PEG. Ces nanogels permettent une simplicité de formulation, une forte capacité de chargement en principe actif, une stabilité de dispersion exceptionnelle, et une durée de conservation importante grâce à la lyophilisation.[Vinogradov, 2007]

L' arjunglucoside I, une molécule contre la leishmaniose, a été incorporée dans un nanogel composé de copolymères de N-isopropylacrylamide et N-vinyl pyrrolidone entrecroisés aléatoirement. Cette formulation présente des effets thérapeutiques deux fois supérieurs contre les parasites par rapport au principe actif libre, et une activité similaire aux nanoparticules de poly(acide lactique)(PLA). Le nanogel et les nanoparticules réduisent de façon presque identique l'hépatotoxicité et la néphro-toxicité de la molécule [Vinogradov, 2006].

4.2.3 Dendrimères

Ce sont des composés macro moléculaires formés d'une série branches (chaînes de polymères) autour d'un noyau dont la taille et la forme peuvent être modifiés. Ils sont constitués de

monomères de type AB_n , à chaque étape de polymérisation, le nombre de groupes fonctionnels périphériques double ou triple. Ils peuvent être constitués de différents types de polymères tels que des polyamidoamine (PAMAM), poly (acide L-glutamique), polyéthylèneimine, polypropylèneimine, et polyéthylène glycol. Les dendrimères améliorent la solubilité et la pénétration cellulaire.

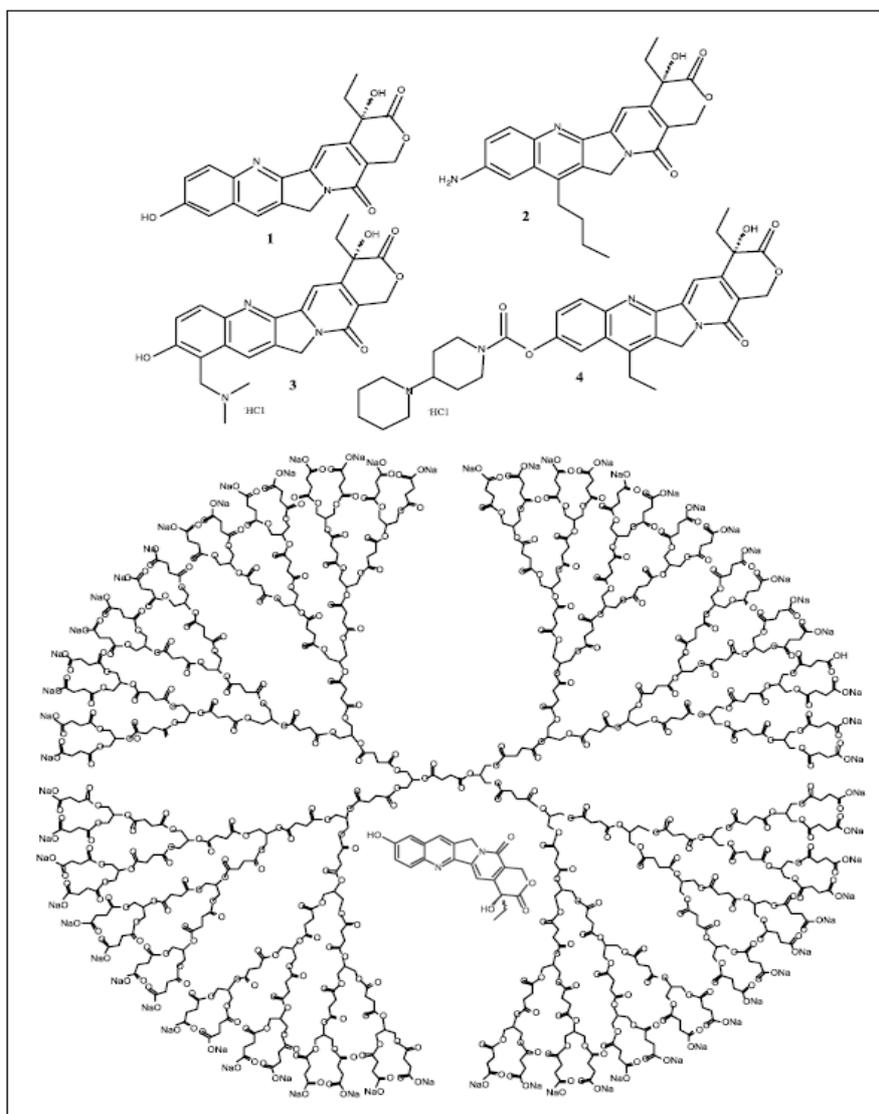


Figure 37: haut : (1) 10-hydroxycamptothécine (10HCPT), (2) 7-butyl-10-aminocamptothécine (BACPT), (3) topotecan (Hycamtin), et (4) irinotecan (Camptosar).

Bas: 10HCPT (1) encapsulé dans un dendrimère [G4.5]-PGLSA-COONa, (il n'est pas dessiné à l'échelle). D'après Morgan, Nakanishi, Kroll et al, 2006.

Deux molécules anticancéreuses peu solubles ($<25 \mu\text{mol/L}$), la 10-hydroxycamptothécine (10HCPT) et la 7-butyl-10-aminocamptothécine (BACPT), ont été encapsulées dans un dendrimère de [G4.5]-PGLSA-COONa. Cette encapsulation permet d'atteindre une solubilité

de 440 $\mu\text{mol/L}$ pour la BACPT. Les études de cytotoxicité réalisées sur quatre lignées de cellules cancéreuses, montrent une toxicité accrue des formes encapsulées par rapport aux formes libres dissoutes dans du DMSO(fig) la concentration IC_{50} diminue de 2 à 7 fois selon les lignées cellulaires pour la 10HCPT et jusqu'à 5,7 fois sur les cellules SF268 pour la BACPT , ainsi qu'une pénétration cellulaire plus importante [Morgan, Nakanishi, Kroll *et al*, 2006].

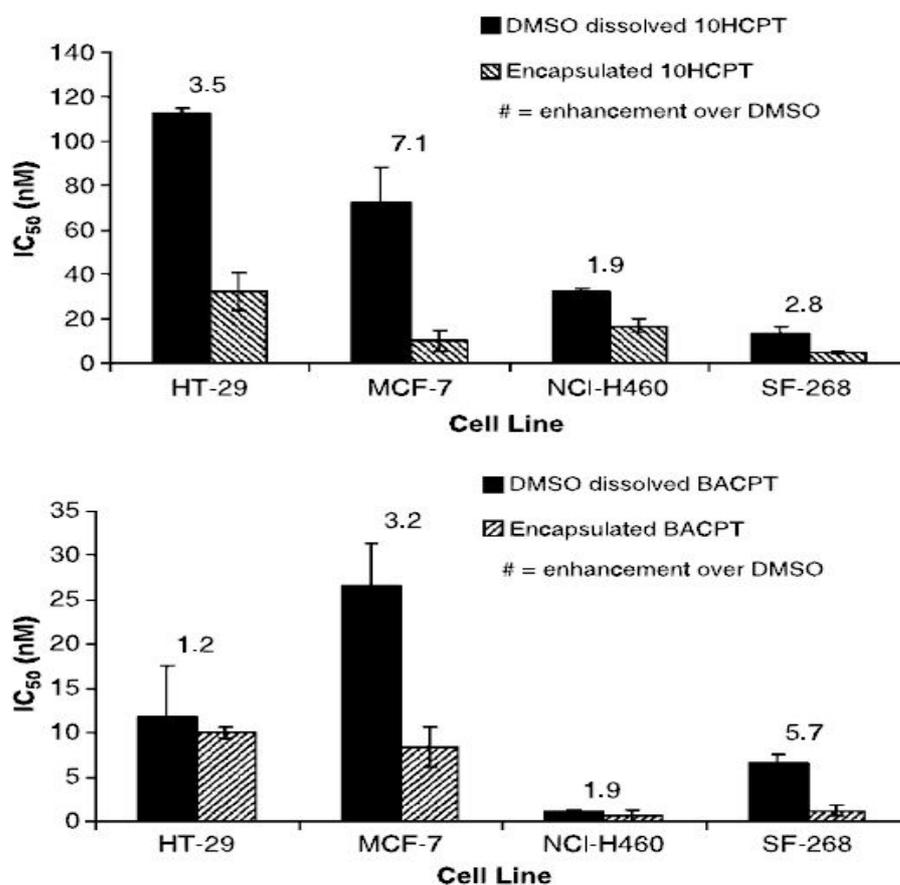


Figure 38: haut : Activité anticancéreuse de la 10HCPT encapsulée dans le dendrimère versus 10HCPT dissoute dans du DMSO exprimé en IC_{50} (en nanomolaire)

bas : activité anticancéreuse de la BACPT encapsulée dans le dendrimère versus BACPT dissoute dans du DMSO exprimé en IC_{50} (en nanomolaire), SD (n=3). D'après Morgan, Nakanishi, Kroll *et al*, 2006.

4.2.4 Nanoparticules lipidiques solides (SLN : Solid Lipid Nanoparticles)

La dispersion de principe actif dans une matrice de lipides solides existe depuis les années 1960.

Le processus de fabrication des SLN est facile, efficace, évite l'utilisation de solvants organiques, et permet une transposition facile à l'échelle industrielle. Leur composition est aussi un avantage : ils sont composés de lipides physiologiques. Cependant, ceux-ci formant une matrice parfaite, leur taux de chargement est diminué. La seconde génération de nanoparticules lipidiques, les NLC (Nanostructured Lipid Carriers), est préparée non pas à partir de lipides solides, mais d'un mélange de lipides solides dans des huiles dans des proportions permettant la solidité de la préparation à 40°C. Les NLC permettent une plus grande flexibilité dans la modulation de la libération du principe actif, un meilleur taux de chargement et évitent les fuites de principe actif [Martins, Sarmiento, Ferreira *et al*, 2007].

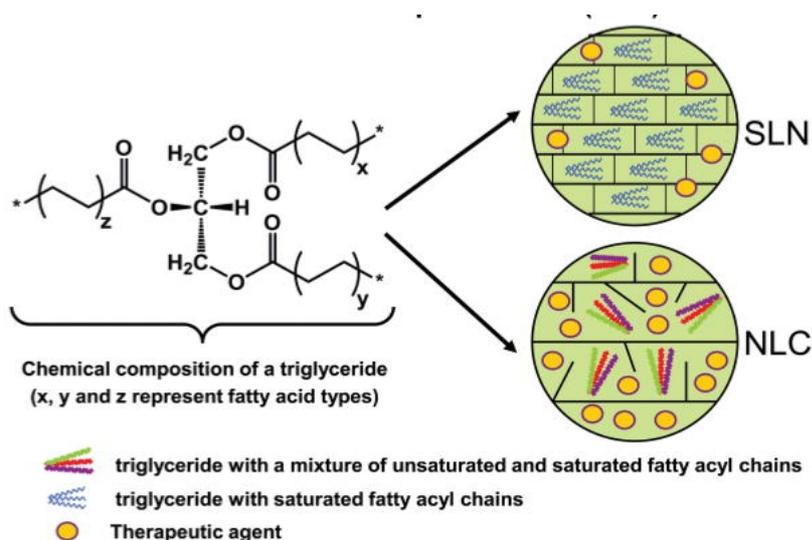


Figure 39: schémas SLN et NLC. D'après Puri, Loomis, Smith *et al*, 2009.

Plusieurs produits à base de SLN sont commercialisés (voir tableau XIII), Gris-PEG de Novartis, de la griséofulvine dans une matrice de PEG 8000, et Cesamet® de Lilly, du nabilone dans une dispersion de povidone [Prajapati, Patel R, Patel R *et al*, 2007].

Tableau XIII: Spécialités commercialisées à base de SLN. D'après Peter van Hoogevest, Liu, Fahr et al, 2011.

Nom commercial	Principe actif	Compagnie
Sporanox®	Itraconazol	J and J
Intelence®	Etravirine	Tibotec
Prograf®	Tacrolimus	Fujisawa
Crestor®	Rosuvastatine	AstraZeneca
GrisPEG	Griseofulvine	Pedinol Pharmacal, Inc
Cesamet®	Nabilone	Valeant Pharmaceuticals International
Kaletra®	Lopinavir et ritonavir	Abbott

4.2.5 Dissocubes.

Ce sont des nanoparticules cristallines de substance active. Elles sont produites à l'aide d'une technologie brevetée par SkyePharma Plc, basée sur une homogénéisation haute pression (APV Micron LAB 40, APV Deutschland GmbH). Les avantages principaux de cette technologie sont la facilité de passer à l'échelle industrielle, de faibles variations d'un lot à l'autre et une production stérile pour les administrations parentérales [Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006].

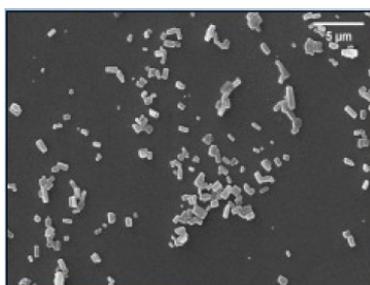


Figure 40: DissoCubes (SEM). D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006

4.2.6 Nanocrystal technology.

Cette technologie (Elan Corporation) permettant la fabrication de nanocristaux peut être utilisée pour formuler et améliorer l'activité d'un composé faiblement soluble dans l'eau et les caractéristiques du produit fini. Les produits issus de la technologie Nanocrystal peuvent être

inclus dans des formes orales (figure 41).

Trade name	Therapeutic use	Applied technology	Pharma company	Administration route
Rapamune® (Rapamycin, Sirolimus)	Immunosuppressive	élan nanosystems	Wyeth Pharmaceuticals	Oral
Emend® (Aprepitant)	Antiemetic	élan nanosystems	Merck & Co.	Oral
Tricor® (Fenofibrate)	Hypercholesterolemia	élan nanosystems	Abbott Laboratories	Oral
Triglide® (Fenofibrate)	Hypercholesterolemia	IDD-P® technology	Produced by SkyePharma marketed by Sciele Pharma Inc. (Atlanta, CA, USA).	Oral
Megace ES® (Megestrol acetate)	Antianorexic	élan nanosystems	ParPharmaceutical Companies Inc (Spring Valley, NY, USA)	Oral
Avinza® (Morphine sulfate)	Psychostimulant drug	élan nanosystems	King Pharmaceuticals	Oral
Focalin® XR (Dexamethyl-phenidate HCl)		élan nanosystems	Novartis	Oral
Ritalin® LA (Methylphenidate HCl)		élan nanosystems	Novartis	Oral
Zanaflex Capsules™ (Tizanidine HCl)	Muscle relaxant	élan nanosystems	Acorda	Oral

Figure 41: spécialités commercialisées contenant des nanocristaux. D'après Shegokar et Müller, 2010.

Une dispersion colloïdale de nanocristaux de naproxène est comparée aux formes orales disponibles dans le commerce. Celles-ci nécessitent 3 heures pour atteindre une concentration plasmatique maximale lorsqu'elles sont administrées en présence de nourriture. La suspension colloïdale de nanocristaux atteint une concentration plasmatique maximale en moins de 20 minutes, soit 12 fois plus rapidement.[Elan, 2009]

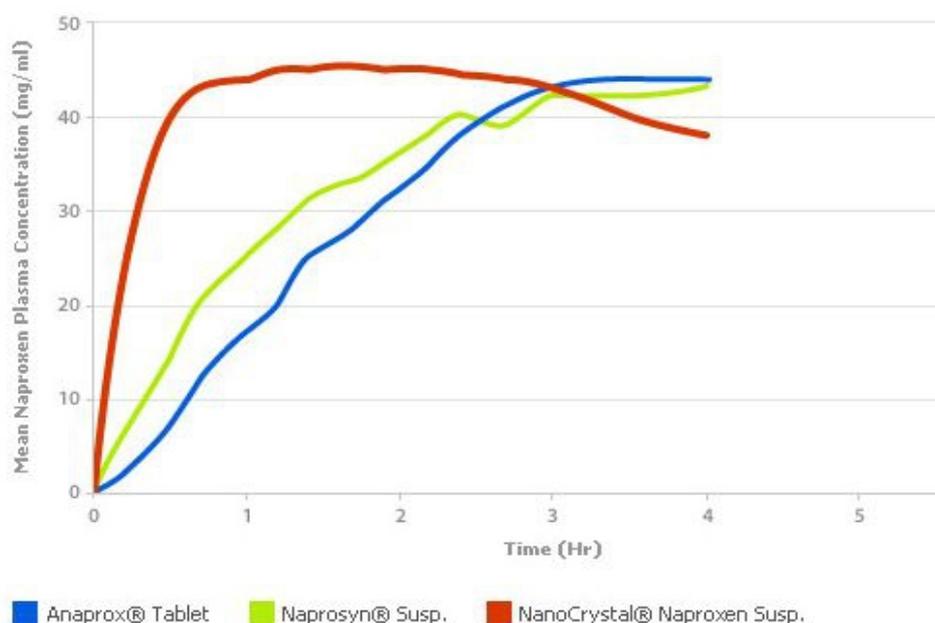


Figure 42: Concentration plasmatique moyenne en Naproxène en fonction du temps après administration par voie orale. D'après Elan 2009.

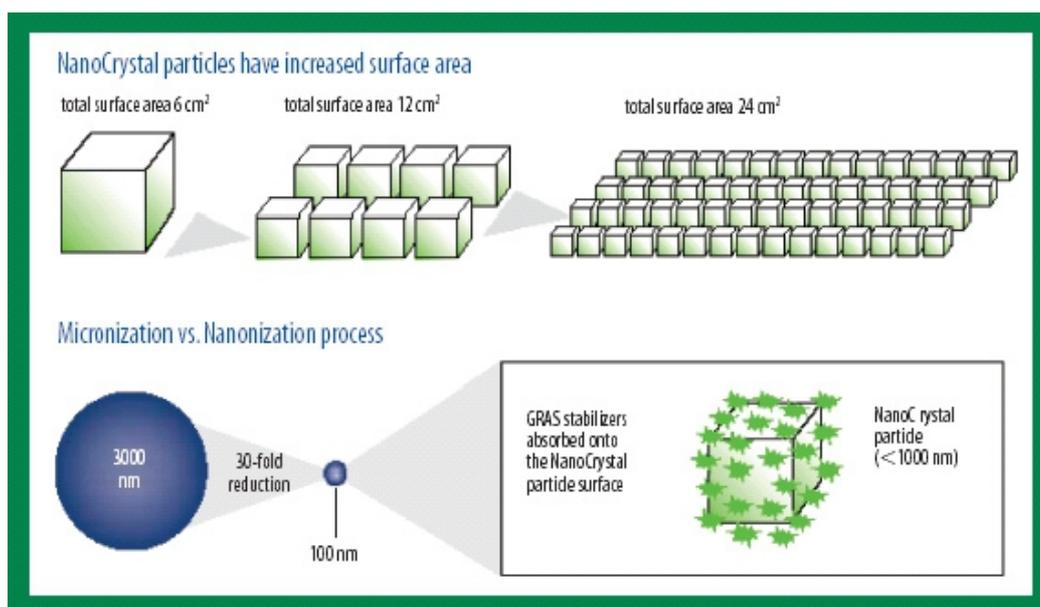
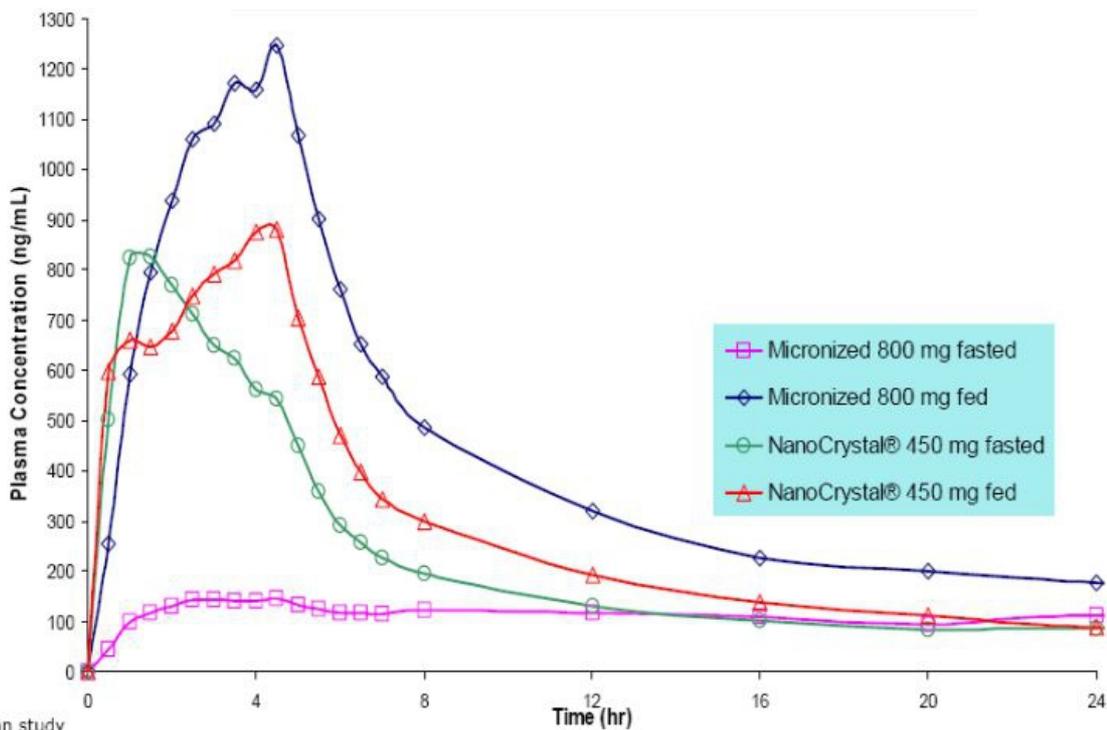


Figure 43: Augmentation de la surface des nanocristaux par rapport à des formes micronisées. D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006.

Le premier produit contenant des nanocristaux obtenus grâce à la technologie Nanocrystal aux USA a été approuvé en août 2000 par la FDA, il s'agit de la première forme orale solide de l'immunosuppresseur Rapamune® (sirolimus) de Wyeth. Auparavant, Rapamune® était disponible en solution orale en bouteille ou sachet. La solution orale imposait une conservation au réfrigérateur et devait être reconstituée dans de l'eau ou du jus d'orange avant l'administration.

Megace® ES (megestrol) a été approuvé en juillet 2004 par la FDA : il est recommandé dans le traitement de l'anorexie, la cachexie et les pertes de poids inexplicables chez les patients sidéens. Il utilise la technologie Nanocrystal pour améliorer le taux de dissolution et la biodisponibilité de la suspension orale d'acétate de megestrol (voir figure 43). Les patients sous Megace® ES en prennent une cuillère à café par jour soit un quart du volume du produit original. Megace est aussi 16 fois moins visqueux que le produit original, ce qui facilite son administration [146]. La formulation micronisée est très mal absorbée à jeun, grâce à la formulation Nanocrystal l'effet de la présence de nourriture est presque annulé. Auparavant, les patients devaient prendre le Megace® ES au cours d'un repas, ils peuvent désormais le prendre à jeun.



Source: Elan study

Figure 44: Concentration plasmatique du megestrol en fonction du temps : diminution de cet effet sur la forme Nanocrystal. D'après Elan 2009.

L'Emend® est un antiémétique utilisé dans le traitement des nausées et vomissements induits par chimiothérapie. L'utilisation de nanocristaux entraîne une augmentation de la biodisponibilité de 600%.

L'absorption du fénofibrate est jusqu'à 35% plus importante chez les patients ayant mangé que chez les patients à jeun. Le tricolor® nanocristaux de fénofibrate, permet de s'affranchir des effets de la nourriture sur l'absorption du principe actif [Junghanns et Müller, 2008].

4.2.7 Nanomorph technology.

Cette technologie, fait passer des principes actifs ayant une faible solubilité aqueuse d'un état cristallin grossier à l'état de nanoparticules amorphes (figure 45).

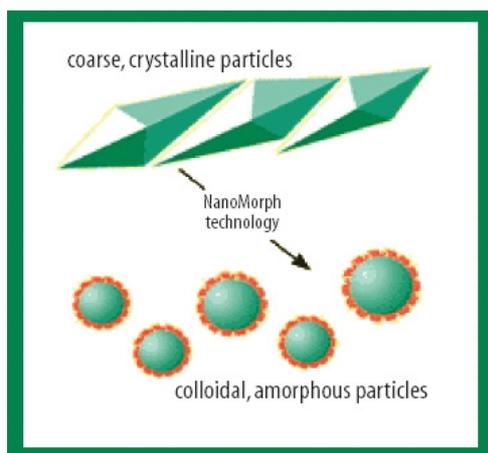


Figure 45: Développement de particules colloïdales amorphes utilisant la technologie nanomorph. D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006.

La technologie Nanomorph est basée sur un concept de dissolution-précipitation qui opère en utilisant des solvants miscibles dans l'eau pour la dissolution, suivi d'une précipitation par une solution de polymères aqueuse. Dans cette technologie, la suspension de principe actif est amenée dans une chambre, où elle est rapidement mélangée avec un autre solvant. Immédiatement, la suspension de principe actif est convertie en une vraie solution moléculaire. L'addition d'une solution de polymère aqueuse induit la précipitation du principe actif. Le polymère garde les particules de principe actif dans leur état de nanoparticules et évite leur agrégation et leur croissance. Des poudres sèches redispersibles dans l'eau peuvent être obtenues.

4.2.8 Nanoedge technology.

Baxter Healthcare Corporation

C'est une boîte à outils pour la formulation des composés peu hydrosolubles. Basée sur l'homogénéisation directe, la micro précipitation et les émulsions lipidiques, elle est utile pour les principes actifs ayant un point d'ébullition élevé ainsi qu'un coefficient de partition octanol/eau, Log P élevé (>4).

Le principe actif est premièrement dissout dans un solvant miscible à l'eau par micro précipitation afin de former une solution. Puis on prépare une pré suspension en ajoutant un deuxième solvant à la solution on donne de l'énergie, sous forme d'ultrasons, d'homogénéisation, d'homogénéisation à contre courant, de microfluidisation, ou toute autre méthode créant des forces d'impact, de cisaillement ou de cavitation. Cette énergie permet de former des particules de taille allant de 400 nm à 2 µm [Kharb V, Bhatia M, Dureja et al,

2006.].

La technologie Nanoedge permet l'obtention de particules de très petite taille (<1000 nm), fortement chargées en principe actif (10–200 mg/mL), stables à long terme (jusqu'à 2 ans à température ambiante et jusqu'à 5 °C), ainsi que l'élimination des co-solvants, la réduction des quantités de tensioactifs et l'utilisation de tensioactifs surs et bien tolérés.

4.2.9 Nanopure technology.

Mise au point par PharmaSol GmbH, cette technologie transforme des composés peu solubles dans l'eau en nanocristaux par homogénéisation à haute pression. La poudre de principe actif est dispersée dans un milieu non aqueux (ex: PEG 600, Miglyol 812), ou à teneur réduite en eau (ex: mélange eau/éthanol), la pré-suspension ainsi obtenue est homogénéisée avec un homogénéisateur à piston. Les particules formées ont une gamme de taille moyenne allant de 200 à 600 nm. Les dispersions réalisées dans un milieu non aqueux peuvent être directement mises dans des gélules [Kharb V, Bhatia M, Dureja *et al*, 2006].

4.2.10 Crititech technology.

Cette technologie est basée sur le principe de précipitation avec un fluide anti-solvant comprimé. L'énergie ultrasonique produite par une buse convergente-divergente ou un oscillateur électromécanique permet de briser les gouttelettes en gouttelettes de même taille. Cependant les gouttelettes tendent à fusionner en gouttelettes plus grandes, cette technique seule ne suffit donc pas pour former des nanoparticules, c'est pourquoi dans ce procédé, le solvant chargé de principe actif est pulvérisé en un jet de dioxyde de carbone super critique, entraînant un transfert de masse suffisamment rapide pour que les particules précipitent ou cristallisent avant que les gouttelettes ne fusionnent. De plus cette technologie permet un traitement continu des composés et ce en système clos, ce qui permet une récupération totale des solvants et du dioxyde de carbone afin de les réutiliser ou d'en disposer de façon sûre [Kharb V, Bhatia M, Dureja *et al*, 2006].

Conclusion

Les deux problèmes majeurs d'une formulation destinée à la voie orale sont la solubilisation aqueuse et la perméabilité intestinale de la molécule d'intérêt.

Dans le cas d'un composé BCS classe II, caractérisé par une faible solubilité aqueuse et une haute perméabilité intestinale, la dissolution dans l'environnement digestif est l'étape limitante de l'absorption.

L'utilisation de cyclodextrines, SEDDS, liposomes ou diverses nanoparticules lors de l'étape de préformulation permet de solubiliser le principe actif BCS classe II, autorisant ainsi leur passage en quantité suffisante dans la membrane intestinale de façon à saturer les transporteurs d'efflux membranaires ainsi que les enzymes présentes dans les entérocytes dont ils sont les substrats.

De plus, elles permettent d'encapsuler des molécules ayant des balances hydrophile/lipophile différentes dans le même système. Elles permettent aussi la réduction du volume du véhicule, ce qui minimise les effets secondaires toxiques.

En outre, ces formes pharmaceutiques permettent d'améliorer la biodisponibilité du composé ainsi que de diminuer sa variabilité inter et intra-individuelle, et d'obtenir une meilleure linéarité dose/exposition. Ceci se traduit par une meilleure sécurité d'emploi d'autant plus que cette molécule aura une marge thérapeutique étroite. Elles permettent aussi de limiter l'effet de la nourriture sur l'absorption des composés.

Une fois passé la barrière intestinale, le composé doit encore franchir de nombreux obstacles avant d'atteindre son site d'action. En effet il doit survivre au premier passage hépatique ou à la liaison avec des protéines du plasma sanguin. Sur son chemin il peut aussi causer des dommages en agissant à d'autres endroits que le site d'action prévu. Les formes pharmaceutiques évoquées dans cette thèse pourraient aussi être utilisées afin de protéger non seulement la molécule active des dégradations qu'elle peut subir avant d'atteindre son objectif, mais aussi empêcher que la molécule n'agisse ailleurs, provoquant ainsi des effets secondaires. En effet, l'encapsulation de la molécule permet d'éviter le contact direct avec des enzymes ou la liaison avec des protéines présentes dans les milieux traversés entre la membrane intestinale et son site d'action. De plus il est possible de cibler le site d'action en greffant des marqueurs spécifiques sur les nanoparticules porteuses, en particulier si le site d'action est une tumeur.

L'avenir de la recherche pharmaceutique ne passe peut être pas uniquement par la découverte de nouvelles molécules mais aussi par une meilleure exploitation de celles déjà connues. En

effet, une meilleure absorption, une diminution des variabilités inter individuelles, une administration plus facile, une diminution ou même une suppression des effets secondaires de ces molécules seraient un grand bénéfice pour les patients. Le diagnostic des polymorphismes des transporteurs membranaires pourrait lui, permettre d'adapter la posologie de certaines molécules à marge thérapeutique étroite, substrats de ces transporteurs.

Table des figures

Figure 1: Situation et schémas des microvillosités dans l'intestin grêle. D'après http://operasavon.free.fr/transport.htm	13
Figure 2: Les différentes voies d'absorption au niveau intestinal. L'absorption intestinale d'un composé peut se faire par : (a) diffusion trans-cellulaire passive, (b) transport actif par protéine de transport, (c) diffusion para-cellulaire passive. Cependant il existe aussi des mécanismes empêchant cette absorption : (d) celle-ci peut être limitée par la Pgp, un transporteur d'efflux ATP-dépendant, ou d'autres protéines de transport, (e) de plus le composé peut être métabolisé par les enzymes présentes dans la cellule. D'après Baliman 2005.....	14
Figure 3: Transporteurs d'efflux ATP-dépendants dans l'intestin grêle : Les P-gp, BCRP et MRP2 sont exprimées au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Brush Border Membrane : BBM), la MRP3 se situe au niveau de la membrane basale des entérocytes (Basolateral Membrane : BLM). D'après Katsura et Inui, 2003.....	20
Figure 4: Transporteurs de peptides dans l'intestin. Les di- et tri-peptides, ainsi que les molécules de même structure sont absorbés au travers de la bordure en brosse des entérocytes (Brush Border Membrane : BBM) par un transporteur de peptide couplé à un proton (PEPT1). Ces molécules traversent la membrane baso-latérale (Basolateral Membrane : BLM) à l'aide d'un transporteur encore inconnu. D'après Katsura et Inui 2003.....	21
Figure 5: Transporteurs de cations et d'anions organiques dans l'intestin grêle. La localisation dans les membranes et le sens de transport de certains transporteurs ne sont pas connus. BBM : bordure en brosse de la membrane apicale, BLM : membrane baso-latérale. D'après Katsura et Inui, 2003.....	23
Figure 6: Schéma simplifié d'une configuration possible d'une source de rayons X, d'un détecteur de rayons X et de l'échantillon (sample) durant un scan des rayons X. dans cette configuration, le tube émetteur de rayons X (X-ray tube) et le détecteur bougent tous deux suivant l'angle θ , et l'échantillon reste stationnaire. D'après http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html	44
Figure 7: Exemple d'un diffractogramme par rayons X produit durant un balayage. Les pics représentent les positions où le faisceau de rayons x a été diffracté par le maillage du cristal.D'après http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html	44
Figure 8: Schéma de fonctionnement du DVS Advantage, d'après Surface Measurements Systems Ltd 2006.....	48

Figure 9: Représentation du système de classification biopharmaceutique montrant que l'absorption d'un composé de classe II peut être améliorée grâce à la formulation galénique. Les composés de classe III et IV peuvent voir leur absorption augmentée après modification chimique. D'après Pouton 2005.....	50
Figure 10: Processus de dissolution d'une substance dans une forme galénique. D'après Brown 2004.....	61
Figure 11: Schémas des appareils décrits par les pharmacopées européenne et américaine pour les tests de dissolution : à droite appareil à palette, à gauche appareil à panier. D'après http://www.jascofrance.fr/	63
Figure 12: structure chimique d'une cyclodextrine. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005....	66
Figure 13: forme torique d'une cyclodextrine. d'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005	66
Figure 14: Diagramme théorique des profils de solubilité de phase.....	72
Figure 15: Modèle simple représentant l'effet de la constante de stabilité du complexe sur la dégradation de la molécule. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	78
Figure 16: CD entrant dans la composition de médicaments commercialisés. D'après Dong 2005.....	82
Figure 17: Tensioactif non ionique (Span 80) composé d'une chaîne d'acide gras (queue apolaire) et d'un noyau sorbitol (tête polaire). D'après Garrigue, 2002.....	88
Figure 18: Schéma d'une gouttelette d'émulsion. D'après Garrigue, 2002.....	88
Figure 19: Schéma représentant l'action du co-tensioactif sur le rayon de courbure et sur la taille de la gouttelette d'émulsion, d'après Garrigue 2002.....	91
Figure 20: Diagramme de phase quaternaire d'après Le Hir, 2001.....	93
Figure 21: Diagramme de phase pseudo ternaire d'une formulation auto-émulsionnante de paclitaxel à 3% représentant respectivement en gris clair et gris foncé, les zones de micro émulsions (taille inférieure à 10 nm) et d'émulsions sub microniques (taille inférieure au micron).....	94
Figure 22: Concentration plasmatique du paclitaxel en fonction du temps chez le rat après administration orale de 10mg/kg de paclitaxel utilisant les 4 formulations indiquées. D'après Gao, Rush, Pfund et al, 2003.....	98
Figure 23: Schéma du devenir in vivo des SEDDS après ingestion.....	99
Figure 24: Echelle nanométrique. D'après FDA 2007.....	105
Figure 25: Schéma d'un système de broyage humide. D'après Ruddy 2008	107
Figure 26: Aspect des particules avant et après broyage humide (SEM). D'après Ruddy 2008	107

Figure 27: Homogénéisation à haute pression. D'après GEA 2009.....	109
Figure 28: Schéma de l'homogénéisation à haute pression. D'après Elan 2009.....	109
Figure 29: Schéma des différents types de liposomes. D'après Daniels 2005.....	114
Figure 30: Fabrication des MLV. D'après espacescience.com 2008.....	115
Figure 31: Fabrication des SUV par sonication. D'après espacescience.com 2008.....	116
Figure 32: Schéma d'une presse de French. D'après espacescience.com 2008.....	116
Figure 33: Fabrication spontanée de liposomes par injection d'une solution éthanolique ou éthérée de phospholipides dans une solution aqueuse. D'après espacescience.com 2008.....	117
Figure 34: Détermination du pourcentage de capture : Centrifugation associée à une exclusion sur gel. D'après espacesciences.com 2008.....	118
Figure 35: SEM de nanoparticules polymériques de célécoxib :éthyl cellulose :caséine 37,5:37,5:25. D'après Morgen, Bloom, Beyerinck et al, 2012	120
Figure 36: Concentrations plasmatiques en celecoxib en fonction du temps après administration par voie orale de Célébrex® (market capsule), nanoparticules de célécoxib :éthyl cellulose :caséine 37,5:37,5:25 en suspension (nanoparticules OPC), nanoparticules de célécoxib:HPMCAS-L 50:50 en suspension (HPMCAS SDD OPC). D'après Morgen, Bloom, Beyerinck et al, 2012.....	121
Figure 37: haut : (1) 10-hydroxycamptothécine (10HCPT), (2) 7-butyl-10- aminocamptothécine (BACPT), (3) topotecan (Hycamtin), et (4) irinotecan (Camptosar)....	122
Figure 38: haut : Activité anticancéreuse de la 10HCPT encapsulée dans le dendrimère versus 10HCPT dissoute dans du DMSO exprimé en IC50 (en nanomolaire)	123
Figure 39: schémas SLN et NLC. D'après Puri, Loomis, Smith et al, 2009.....	124
Figure 40: DissoCubes (SEM). D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006.....	125
Figure 41: spécialités commercialisées contenant des nanocristaux. D'après Shegokar et Müller, 2010.....	126
Figure 42: Concentration plasmatique moyenne en Naproxène en fonction du temps après administration par voie orale. D'après Elan 2009.....	126
Figure 43: Augmentation de la surface des nanocristaux par rapport à des formes micronisées. D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006.....	127
Figure 44: Concentration plasmatique du megestrol en fonction du temps : diminution de cet effet sur la forme Nanocrystal. D'après Elan 2009.....	128
Figure 45: Développement de particules colloïdales amorphes utilisant la technologie nanomorph. D'après Kharb V, Bhatia M, Dureja et al, 2006.....	129

Index des tableaux

Tableau I: Caractéristiques biologiques et physiques du tractus gastro-intestinal humain. D'après Baliman et Chong 2005.....	15
Tableau II: Substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp, d'après M. Clement Jerdi , Desmeules, Dayer, 2004.....	17
Tableau III: Effets des transporteurs sur l'absorption des composés en fonction de leur classe BCS. D'après Custodio 2008.....	24
Tableau IV: Effets des propriétés physico-chimiques d'une molécule sur ses propriétés biopharmaceutiques. L'importance (faible, moyenne ou forte) ainsi que la direction des flèches pour les propriétés chimiques indiquent l'effet d'une augmentation de celle ci sur les propriétés biopharmaceutiques correspondantes. Par exemple, la dissolution d'une forme solide est diminuée () par une forte lipophilie de la molécule et /ou un point de fusion de la forme solide élevé. Les flèches bidirectionnelles () indiquent l'effet positif ou négatif de la propriété, par exemple les liaisons ioniques aux protéines plasmatiques ou aux phospholipides tissulaires ont des effets opposés sur le volume de distribution. D'après Humphrey 2005.....	32
Tableau V: Facteurs influençant la formation du complexe d'inclusion. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	69
Tableau VI: Effets de la méthode de préparation. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	70
Tableau VII: Effets d'additifs variés. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	71
Tableau VIII: Exemples de solubilité et de dissolution améliorée par les CD. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	74
Tableau IX: Effets des CD sur la stabilité de la molécule. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	76
Tableau X: Applications des CD dans la délivrance orale des molécules. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	80
Tableau XI: Législations concernant les CD. D'après Challa, Ahuja, Ali et al, 2005.....	81
Tableau XII: Paramètres influençant l'absorption selon le type de formulation. D'après Pouton, 2000.....	100
Tableau XIII: Spécialités commercialisées à base de SLN. D'après Peter van Hoogvest, Liu, Fahr et al, 2011.....	125

Bibliographie

Abbot EL, Grenade DS, Kennedy DJ, Gatfield KM & Thwaites DT. Vigabatrin transport across the human intestinal epithelial (caco-2) brush-border membrane is via the h⁺-coupled amino-acid transporter hpat1. *Br J Pharmacol* (2006) vol **147**: p.298-306.

Andre R. Which solutions for polymorphism, stability, phase transition, crystallinity, denaturation of protein, protein ligand interaction, excipient interaction. *SETARAM, conference francelab* (2006) **French Institute of Budapest**.

Araya H, Nagao S, Tomita M & Hayashi M. The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (sedds) type o/w microemulsion i: enhancing effects on oral bioavailability of poorly water soluble compounds in rats and beagle dogs. *Drug Metab Pharmacokinet* (2005 a) vol **20**: p.244-256.

Araya H, Nagao S, Tomita M & Hayashi M. The novel formulation design of self emulsifying drug delivery system type ow microemulsion ii : stable gastrointestinal absorption of poorly water soluble new compound er-1258, in bile-fistula rats.. *Drug Metab. Pharmacokinet.* (2005 b) vol **20**: p.257-267.

Balakrishnan P, Lee B, Oh DH, Kim JO, Lee Y, Kim Det al. Enhanced oral bioavailability of coenzyme q(10) by self-emulsifying drug delivery systems. *Int J Pharm* (2009) vol **374**: p.66-72.

Baliman P & Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today* (2005) vol **10**: p.335-343.

Behrens D, Fricker R, Bodoky A, Drewe J, Harder F & Heberer M. Comparison of cyclosporin a absorption from lct and mct solutions following intrajejunal administration in conscious dogs. *J Pharm Sci* (1996) vol **85**: p.666-668.

Bellanger N, Djedaïni-Pilard F, Berthault P & Perly B , http://iramis.cea.fr/ComScience/Phases/phases_09/p9article1.html , accédé le 15 nov 2009.

Bleasby K, Chauhan S & Brown CD. Characterization of mpp⁺ secretion across human intestinal caco-2 cell monolayers: role of p-glycoprotein and a novel na⁽⁺⁾-dependent organic cation transport mechanism. *Br J Pharmacol* (2000) vol **129**: p.619-625.

Brown C, Chokshi H, Nickerson B, Reed R, Rohrs B & Shah P. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm. Technol.* (2004) p.56-65.

Burckhardt G. Polyspecific organic cation transport: insights into the substrate binding site. *Mol Pharmacol* (2005) vol **67**: p.1391-1392.

Byrn SR, Xu W & Newman AW. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) vol **48**: p.115-136.

Challa R, Ahuja A, Ali J & Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech* (2005) vol **6**: p.E329-57.

Chang G. Multidrug resistance abc transporters. *FEBS Lett* (2003) vol **555**: p.102-105.

Charman SA, Charman WN, Rogge MC, Wilson TD, Dutko FJ & Pouton CW. Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharm Res* (1992) vol **9**: p.87-93.

Chattopadhyay P & Gupta R. Protein nanoparticles formation by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. *AIChE J* (2002) vol **48**: p.235-244.

Chen X, Antman MD, Gesenberg C & Gudmundsson OS. Discovery pharmaceuticals-challenges and opportunities. *AAPS J* (2006) vol **8**: p.E402-8.

Chen X, Vaughn JM, Yacaman MJ, Williams RO3 & Johnston KP. Rapid dissolution of high-potency danazol particles produced by evaporative precipitation into aqueous solution. *J Pharm Sci* (2004) vol **93**: p.1867-1878.

Clement Jerdi M, Desmeules J & Dayer P. La glycoprotéine p : un transporteur de médicaments à ne pas négliger. *Revue Médicale Suisse* (2004) vol **524**: .

Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* (1995) vol **12**: p.1561-1572.

Craig D. The use of self emulsifying systems as a means of improving drug delivery. *bulletin technique Gattefossé* (1993) vol **86**.

Craig D, Barker D, Banning D & Booth S. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy..*Int J Pharm* (1995) vol **114**: p.103-110.

Custodio JM, Wu C & Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* (2008) vol **60**: p.717-733.

Dabros T, Yeung A, Masliyah J & Czarnecki J. Emulsification through area contraction. *J Colloid Interface Sci* (1999) vol **210**: p.222-224.

Daniels r,http://www.azonano.com/Details.asp?ArticleID=1243#_What_are_the_Different%20Types%20of%20Lip , 2005. accédé le 10 jan 2010

Di L & Kerns EH. Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr Opin Chem Biol* (2003) vol **7**: p.402-408.

Dietrich CG, Geier A & Oude Elferink RPJ. Abc of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* (2003) vol **52**: p.1788-1795.

Dixon D, Johnston K & Brodemier R. Polymeric materials formed by precipitation with a compressed fluid antisolvent. *AIChE J.* (1993) vol **39**: p.127-139.

Dong W. Multiparticulate drug delivery system for lipophilic drugs and macromolecule drugs. (2005).

Elan, <http://www.elandrugtechnologies.com/nav/21/>, accédé le 22 mai 2009.

Endo T, Nagase H, Ueda H, Kobayashi S & Nagai T. Isolation, purification, and characterization of cyclomaltodecaose (curly epsilon-cyclodextrin), cyclomaltoundecaose (zeta-cyclodextrin) and cyclomaltotridecaose (é-cyclodextrin).. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (1997) vol **45**: p.532-536.

Falson-Rieg F, Faivre V & Pirot F. Nouvelles formes médicamenteuses. Tec & Doc Lavoisier (Ed.)(2004).

FDA, <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/UCM153731.pdf> , accédé le 20 nov 2009.

Feng S, Mei L, Anitha P, Gan CW & Zhou W. Poly(lactide)-vitamin e derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel. *Biomaterials* (2009) vol **30**: p.3297-3306.

Florence A & Attwood D. Physicochemical principles of pharmacy. Macmillan Press, (1998)

Foltz M, Meyer A, Theis S, Demuth H & Daniel H. A rapid in vitro screening for delivery of peptide-derived peptidase inhibitors as potential drug candidates via epithelial peptide transporters. *J Pharmacol Exp Ther* (2004) vol **310**: p.695-702.

Frey FJ, Horber FF & Frey BM. Trough levels and concentration time curves of ciclosporine in patients undergoing renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* (1988) vol **43**: p.55-62.

Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich Wet al. Development of a supersaturable sedds (s-sedds) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* (2003) vol **92**: p.2386-2398.

Garrigue JS. Les systèmes autoémulsionnants pour l'administration orale de principes actifs lipophiles : influence de la formulation sur les aspects biopharmaceutiques. Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry. (2001-2002).

GEA, <http://www.niro-soavi.fr/soavifr/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw5q4hrd>, accédé le 27 mai 2009.

Gershanik T & Benita S. Positively charged self-emulsifying oil formulation for improving oral bioavailability of progesterone. *Pharm Dev Technol* (1996) vol **1**: p.147-157.

Gershanik T, Benzeno S & Benita S. Interaction of a self-emulsifying lipid drug delivery system with the everted rat intestinal mucosa as a function of droplet size and surface charge. *Pharm Res* (1998) vol **15**: p.863-869.

Gershanik T, Haltner E, Lehr CM & Benita S. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *Int J Pharm* (2000) vol **211**: p.29-36.

Gudmundsson O & Venkatesh S. Strategies for in silico and experimental screening of physicochemical properties. In *Pharmaceutical profit in drug discovery for lead selection*. Borchardt R, Kerns E, Lipinski C, Thakker D & Wang B (Eds.). (2004) : p.393- 412.

Gupta SK, Manfro RC, Tomlanovich SJ, Gambertoglio JG, Garovoy MR & Benet LZ. Effect of food on the pharmacokinetics of ciclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* (1990) vol **30**: p.643-653.

Hancock BC & Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?. *Pharm Res* (2000) vol **17**: p.397-404.

Hanna M & York P. Method & apparatus for the formation of particles. *US Patent, 5 851 453* (1998) vol: .

Hauss DJ, Fogal SE, Ficorilli JV, Price CA, Roy T, Jayaraj AA et al. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble ltb4 inhibitor. *J Pharm Sci* (1998) vol **87**: p.164-169.

He W, Horn SW & Hussain MD. Improved bioavailability of orally administered mifepristone from plga nanoparticles. *Int J Pharm* (2007) vol **334**: p.173-178.

Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H & Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm* (2005) vol **299**: p.167-177.

van Hoogevest P, Liu X & Fahr A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opin Drug Deliv* (2011) vol**8**: p.1481-1500.

Hovorka S & Schöneich C. Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition. *J Pharm Sci* (2001) vol **90**: p.253-269.

<http://operasavon.free.fr/transport.htm> , , accédé le 28 mai 2009.

<http://pubs.usgs.gov/info/diffraction/html/index.html>, accédé le 7 jan 2010.

<http://www.brookhaven.co.uk/dynamic-light-scattering.html>, accédé le 7 janvier 2010.

<http://www.coconutresearchcenter.org/article10612.htm>, accédé le 3 nov 2009.

<http://www.espacesciences.com/SMO/Liposomes/Cours.htm>, accédé le 10 nov 2009

<http://www.jascofrance.fr/spectro/disso/index.phpPHPSESSID=0aeb3cdb586443ff2dc3175e4aba6ae1>, accédé le 30 mai 2012

<http://www.skyepharma.com/technology/oral-technology/particle-engineering-technologies/>, accédé le 27 mai 2009.

http://www.smsuk.co.uk/Products_DVS_Technique.php, accédé le 12 juil 2009.

Hu J, Johnston KP & Williams RO3. Spray freezing into liquid (sfl) particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: organic solvent versus organic/aqueous co-solvent systems. *Eur J Pharm Sci* (2003) vol **20**: p.295-303.

Hu J, Johnston KP & Williams RO3. Rapid dissolving high potency danazol powders produced by spray freezing into liquid process. *Int J Pharm* (2004 a) vol **271**: p.145-154.

Hu J, Johnston KP & Williams RO3. Stable amorphous danazol nanostructured powders with rapid dissolution rates produced by spray freezing into liquid. *Drug Dev Ind Pharm* (2004 b) vol **30**: p.695-704.

Humphrey M. Interface between drug discovery, adme and pharmaceutical development. *bulletin technique gattefossé* (2005) vol **98**: p.65-74.

ICH. Stability testing of new drug substances and products. *Geneva, Switzerland : IFPMA* (2003).

Jacobs C, Kayser O & Müller RH. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *Int J Pharm* (2000) vol **196**: p.161-164.

Jonker JW & Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: oct1, 2, and 3 (slc22a1-3). *J Pharmacol Exp Ther* (2004) vol **308**: p.2-9.

Junghanns JAH & Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine* (2008) vol**3**: p.295-309.

Karim A, Gokhale R & Cole J. 1.hiv protease inhibitor sc-52151: a novel method of optimizing bioavailability profile via a microemulsion drug delivery system. *Pharm Res* (1994) vol **S 368**.

Katsura T & Inui K. Intestinal absorption of drugs mediated by drug transporters: mechanisms and regulation. *Drug Metab Pharmacokinet* (2003) vol **18**: p.1-15.

Kayser O, Olbrich C, Yardley V, Kiderlen AF & Croft SL. Formulation of amphotericin b as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm* (2003) vol **254**: p.73-75.

Kerns EH. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *J Pharm Sci* (2001) vol **90**: p.1838-1858.

Kharb V, Bhatia M, Dureja H & Kaushik D. Nanoparticle technology for the delivery of poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutical Technology* (2006) vol **30**: p.82-92.

Kiani J & Imam SZ. Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs. *Nutr J* (2007) vol **6**: p.33.

Kim JY & Ku YS. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *Int J Pharm* (2000) vol **194**: p.81-89.

Kodavanti UP & Mehendale HM. Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder. *Pharmacol Rev* (1990) vol **42**: p.327-354.

Krause KP & Müller RH. Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenisation. *Int J Pharm* (2001) vol **214**: p.21-24.

Lambert G, Garrigue J, Razafindratsita A, Gursoy RN, Yang S & Benita S. Self-emulsifying drug delivery system for poorly soluble drugs (taxoids and oral paclitaxel formulation), brevet (2002).

Le Hir A. *Abrégés de pharmacie galénique*. Masson, (2001).

Liversidge G & Conzentino P. Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. *Int. J. Pharm.* (1995) vol **125**: p.309-313.

Liversidge G & Cundy K. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: i. absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* (1995) vol **125**: p.91-97.

Liversidge G, Cundy K, Bishop J & Czekai D. Surface modified drug nanoparticles. *free patent* (1992) <http://www.freepatentsonline.com/5145684.html>.

Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA & Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* (2002) vol **28**: p.1-13.

Loftsson T, Brewster M & Masson M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. *Am J Drug Deliv* (2004) vol **2** (4): p.261-275.

Loftsson T & Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* (2007) vol **329**: p.1-11.

Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC & Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* (2007) vol **2**: p.595-607.

Meinzer A, Mueller E & Vonderscher J. 1.microemulsion- a suitable galenical approach for the absorption enhancement of low soluble compounds?. *bulletin technique Gattefossé* (1995) p.21-26.

Merisko-Liversidge E, Liversidge GG & Cooper ER. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci* (2003) vol **18**: p.113-120.

Morgan MT, Nakanishi Y, Kroll DJ, Griset AP, Carnahan MA, Wathier Met al. Dendrimer-encapsulated camptothecins: increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro. *Cancer Res* (2006) vol **66**: p.11913-11921.

Morgen M, Bloom C, Beyerinck R, Bello A, Song W, Wilkinson Ket al. Polymeric nanoparticles for increased oral bioavailability and rapid absorption using celecoxib as a model of a low-solubility, high-permeability drug. *Pharm Res* (2012) vol **29**: p.427-440

Muller R, Becker R, Kruss B & Peters K. Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution. brevet US Patent 5,858,410 (1999)

Muller R & Bohm B. Nanosuspensions. In *Emulsions & nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Muller R, Bentia S & Bohm B (Eds.). (1998) : p.149-174.

Muller R, Bohm B & Grau M. Nanosuspensions: a formulation approach for poorly soluble and poorly bioavailable drugs. In *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. Wise D (Ed.). (2000 a) : p.345-357.

Muller R, Bohm B & Grau M. Nanosuspension for the formulation of poorly soluble drugs. In *Pharmaceutical emulsion and suspension*. Neilloud F & Marti-Mestres G (Eds.). (2000 b) : p.383-407.

Muller R & Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: i. preparation by a size reduction technique. *Int. J. Pharm.* (1998) vol **160**: p.229-237.

Müller RH, Jacobs C & Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) vol **47**: p.3-19.

Nanjwade BK, Patel DJ, Udhani RA & Manvi FV. Functions of lipids for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Sci Pharm* (2011) vol**79**: p.705-72

Olivier J. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* (2005) vol **2**: p.108-119.

Pace G, Vachon M, Mishra A, Henrikson I & Krukoni V. Processes to generate submicron particles of water-insoluble compounds. *US Patent 6,177,103* (2001) <http://www.patentstorm.us/patents/6177103/claims.html>.

Patravale VB, Date AA & Kulkarni RM. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol* (2004) vol **56**: p.827-840.

Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* (2000) vol **11 Suppl 2**: p.S93-8.

Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for administration. *Bulletin technique Gattefossé* (2005) vol **98**: p.39-51.

Pouton CW. Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *Int J Pharm* (1985) vol **27**: p.335-348.

Prajapati B, Patel R, Patel R & Patel GEA. Beefing up bioavailability. *Pharmaceutical formulation and quality* (2007) vol **february march**.

Ptachcinski RJ, Burckart GJ & Venkataramanan R. ciclosporine concentration determinations for monitoring and pharmacokinetic studies. *J Clin Pharmacol* (1986) vol **26**: p.358-366.

Ptachcinski RJ, Venkataramanan R & Burckart GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* (1986) vol **11**: p.107-132.

Pudipeddi M & Serajuddin ATM. Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci* (2005) vol **94**: p.929-939.

Puisieux F & Seiller M. Agents de surface et émulsions. . LAVOISIER, (1983).

Puri A, Loomis K, Smith B, Lee J, Yavlovich A, Heldman E et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (2009) vol **26**: p.523-580

Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* (2004) vol**3**: p.785-796.

Rogers TL, Hu J, Yu Z, Johnston KP & Williams RO3. A novel particle engineering technology: spray-freezing into liquid. *Int J Pharm* (2002) vol **242**: p.93-100.

Rogers TL, Nelsen AC, Hu J, Brown JN, Sarkari M, Young TJ et al. A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid. *Eur J Pharm Biopharm* (2002) vol **54**: p.271-280.

Rogers TL, Nelsen AC, Sarkari M, Young TJ, Johnston KP & Williams RO3. Enhanced aqueous dissolution of a poorly water soluble drug by novel particle engineering technology: spray-freezing into liquid with atmospheric freeze-drying. *Pharm Res* (2003) vol **20**: p.485-493.

Ruddy S. Nanoparticle technology : leveraging rapid dissolution to improve performance of poorly water-soluble drugs. *FDA Advisory Committee for Pharmaceutical Science and Clinical Pharmacology* (2008).

Ruth h, Attwood D, Ktisis D & Taylor C. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm* (1995) vol **116**: p.253-261.

Sala-Rabanal M, Loo DDF, Hirayama BA, Turk E & Wright EM. Molecular interactions between dipeptides, drugs and the human intestinal h⁺ -oligopeptide cotransporter hpept1. *J Physiol* (2006) vol **574**: p.149-166.

Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Németh K & Váradi A. Abcg2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* (2004) vol **567**: p.116-120.

Sarkari M, Brown J, Chen X, Swinnea S, Williams RO3 & Johnston KP. Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution. *Int J Pharm* (2002) vol **243**: p.17-31.

Schöler N, Krause K, Kayser O, Müller RH, Borner K, Hahn H et al. Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* (2001) vol **45**: p.1771-1779.

Serajuddin AT, Sheen PC, Mufson D, Bernstein DF & Augustine MA. Effect of vehicle amphiphilicity on the dissolution and bioavailability of a poorly water-soluble drug from solid dispersions. *J Pharm Sci* (1988) vol **77**: p.414-417.

Shah NH, Carvajal WN, Patel CI & Infeld MH. 1.self-emulsifying drug delivery systems (sedds) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int J Pharm* (1994) vol **106**: p.15-23.

Sharom FJ. Shedding light on drug transport: structure and function of the p-glycoprotein multidrug transporter (abcb1). *Biochem Cell Biol* (2006) vol **84**: p.979-992.

Shegokar R & Müller RH. Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm* (2010) vol **399**: p.129-139

Subramaniam B, Saim S, Rajewski R & Stella V. Methods for a particle precipitation and coating using near-critical and supercritical antisolvents. *US Patent 5,833,891* (1997) <http://www.patentstorm.us/patents/5833891.html>

Subramanian N, Ray S, Ghosal SK, Bhadra R & Moulik SP. Formulation design of self-microemulsifying drug delivery systems for improved oral bioavailability of célécoxib. *Biol Pharm Bull* (2004) vol **27**: p.1993-1999.

Swenson ES, Milisen WB & Curatolo W. Intestinal permeability enhancement: structure-activity and structure-toxicity relationships for nonylphenoxypolyoxyethylene surfactant permeability enhancers. *Pharm Res* (1994) vol **11**: p.1501-1504.

Tarr BD & Yalkowsky SH. Enhanced intestinal absorption of ciclosporine in rats through the reduction of emulsion droplet size. *Pharm Res* (1989) vol **6**: p.40-43.

Thwaites DT & Anderson CMH. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol* (2007) vol **92**: p.603-619.

Tønnesen HH. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *Int J Pharm* (2001) vol **225**: p.1-14.

Trotta M, Gallarate M, Carlotti ME & Morel S. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. *Int J Pharm* (2003) vol **254**: p.235-242.

Trotta M, Gallarate M, Pattarino F & Morel S. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *J Control Release* (2001) vol **76**: p.119-128.

Turk M, Helfgen B, Hils P, Lietzow R & Schaber K. Micronization of pharmaceutical substances by the rapid expansion of supercritical solutions (ress): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. *J. Supercrit. Fluids* (2002) vol **22**: p.75-84.

Ungell A. Prediction of human drug absorption using in silico and in vitro techniques. *bulletin technique gattefossé* (2005) vo **198**: p.19-30.

US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Guidance for industry : waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system.(2000).

Vaughn JM, Gao X, Yacaman M, Johnston KP & Williams RO3. Comparison of powder produced by evaporative precipitation into aqueous solution (epas) and spray freezing into liquid (sfl) technologies using novel z-contrast stem and complimentary techniques. *Eur J Pharm Biopharm* (2005) vol **60**: p.81-89.

Vinogradov SV. Colloidal microgels in drug delivery applications. *Curr Pharm Des* (2006) vol **12**: p.4703-4712.

Vinogradov SV. Polymeric nanogel formulations of nucleoside analogs. *Expert Opin Drug Deliv* (2007) vol **4**: p.5-17.

Wakerly M, Pouton C, Meakin B & Morton F. Self-emulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixtures. *ACS Symp. Ser* (1986) p.242-255.

Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Hong J, Landis MS, Lombardo Fet al. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharm Dev Technol* (2002) vol **7**: p.1-32.

Weiss S. Complexes cyclodextrines/ester de vitamine a : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée. FACULTE DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY. (2002).

Williams I, Johnston K, Young T, Rogers T, Barron M, Yu Zet al. Process for production of nanoparticles and microparticles by spray freezing in to liquid. *US Patent 6,862,890* (2005) <http://www.patentstorm.us/patents/6862890.html>

Wu C & Benet LZ. Predicting drug disposition via application of bcs: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* (2005) vol **22**: p.11-23.

Young TJ, Johnston KP, Mishima K & Tanaka H. Encapsulation of lysozyme in a biodegradable polymer by precipitation with a vapor-over-liquid antisolvent. *J Pharm Sci* (1999) vol **88**: p.640-650.

Young TJ, Mawson S, Johnston KP, Henriksen IB, Pace GW & Mishra AK. Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to produce submicron suspensions of water-insoluble drugs. *Biotechnol Prog* (2000) vol **16**: p.402-407.

Yuasa H, Sekiya M, Ozeki S & Watanabe J. Evaluation of milk fat-globule membrane (mfgm) emulsion for oral administration: absorption of alpha-linolenic acid in rats and the effect of emulsion droplet size. *Biol Pharm Bull* (1994) vol **17**: p.756-758.

N° d'identification :

TITRE

**ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DES COMPOSES BCS CLASSE II :
REPONSES GALENIQUES AU PROBLEME DE LA FAIBLE SOLUBILITE
AQUEUSE**

Thèse soutenue le 29 janvier 2016

Par Audrey Gierden

RESUME :

Un principe actif administré par voie orale est absorbé au niveau de la membrane intestinale. Le milieu digestif étant aqueux, le composé doit présenter une certaine hydro-solubilité afin de passer à l'état moléculaire et ainsi de pouvoir traverser la membrane intestinale par diffusion trans ou para-cellulaire, ou grâce aux nombreuses protéines de transport présentes dans la membrane. Cependant, certaines de ces protéines (Pgp) peuvent limiter ou empêcher l'absorption du composé qui peut aussi être métabolisé par les enzymes présentes dans la cellule.

Nous étudierons les caractéristiques physico-chimiques influant sur l'absorption d'un principe actif ainsi que les différentes techniques permettant de caractériser les composés et les formulations développées.

Il existe un outil de pronostic, appelé le Système de Classification Biopharmaceutique (Biopharmaceutical Classification System ou BCS), permettant d'estimer le comportement d'un composé ainsi que les facteurs influant sur son absorption par voie orale, en fonction de sa solubilité aqueuse et de sa perméabilité intestinale. Un composé BCS classe II présente une faible solubilité aqueuse mais une haute perméabilité intestinale et la dissolution dans l'environnement digestif est alors l'étape limitante de l'absorption. Dans ce cas le but de la formulation est d'amener le composé dans un état de solubilité maximale au niveau de la membrane intestinale.

Il existe de nombreuses stratégies permettant d'améliorer la solubilité d'un principe actif : emploi de cyclodextrines, de dispersions solides dans des matrices hydrophiles (type PEG), de la micronisation, d'émulsions, de micro-émulsions et de systèmes auto-émulsifiants, ainsi que l'emploi de nanoparticules. Nous étudierons leurs techniques de production ainsi que leurs avantages et inconvénients.

MOTS CLES : GLYCOPROTEINE P, MDR1, SYSTEME DE CLASSIFICATION BIOPHARMACEUTIQUE, NANOPARTICULES, CYCLODEXTRINES, SEDDS

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
PROFESSEUR PHILIPPE MAINCENT	PHARMACIE GALENIQUE ET BIOPHARMACIE	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

2 – Hygiène/Environnement

3 – Médicament

4 – Alimentation – Nutrition

5 - Biologie

6 – Pratique professionnelle

DÉMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29 JANVIER 2016

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Audrey GIERDEN

Sujet : Administration par voie orale des composés BCS classe II ; réponses galéniques au problème de la faible solubilité aqueuse

Jury :

Président : M. Philippe Maincent, Professeur
Directeur : M. Philippe Maincent, Professeur
Juges : Mme Anne Sapin-Miner, Maître de Conférences
Mme Sylvie Gigeux, DR Inserm
Mme Lucie Manache-Alherici, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 4 Décembre 2015

Le Président du Jury

M. Philippe Maincent

Directeur de Thèse

M. Philippe Maincent

Vu et approuvé,

Nancy, le 11.12.15.

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le - 5 JAN. 2015

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pour le Président et par délégation
Le Vice-Président

Martial DELIGNON

Pierre MUTZENHART

N° d'enregistrement : 9081.