HAL
open science

Particules Janus pour des applications industrielles : stabilités et incorporation de principes actifs

Caroline Twarog

To cite this version:

Caroline Twarog. Particules Janus pour des applications industrielles : stabilités et incorporation de principes actifs. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01932273

HAL Id: hal-01932273

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932273v1

Submitted on 23 Nov 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

T H È S E

Présentée et soutenue publiquement

Le **27 Janvier 2017** sur un sujet dédié à :

PARTICULES *JANUS*
POUR DES APPLICATIONS INDUSTRIELLES :
STABILITÉS ET INCORPORATION DE PRINCIPES ACTIFS

Pour obtenir le

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par

Caroline TWAROG

Née le 04 Septembre 1992 à VERDUN (55)

Membres du Jury

Président et Co-Directeur :	Mr. Philippe MAINCENT,	Professeur des Universités Université de Lorraine, Nancy
Directeur :	Mr. Vincent FAIVRE,	Maître de Conférences des Universités Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry
Juges :	Mme. Anne SAPIN – MINET,	Maître de Conférences des Universités, Université de Lorraine, Nancy
	Mme. Marie SOCHA – BORY	Maître de Conférences des Universités, Université de Lorraine, Nancy Praticien Hospitalier, CHU Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

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	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable Pharma Plus ENSGSI	Igor CLAROT
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Jean-Claude BLOCK
Max HENRY
Alain MARSURA ¤
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES
Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

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
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

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	*81*	*Santé publique et Epidémiologie*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Igor CLAROT ¤	*85*	*Chimie analytique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique, Audioprothèse*
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*
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*
Alexandre HARLE ¤	*82*	*Biologie cellulaire oncologique*
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*
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*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*

Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86/01*	*Droit en Santé*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Marianne PARENT ⌑	*85*	*Pharmacie galénique*
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	*85*	*Chimie analytique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Sabrina TOUCHET ⌑	*86*	*Pharmacochimie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

⌑ *En attente de nomination*

**<u>Disciplines du Conseil National des Universités</u> :*

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

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 mon directeur de thèse,
Monsieur Vincent FAIVRE*,*
Je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir accompagnée dans cette dernière ligne droite de mes années de pharmacie. Merci encore pour votre disponibilité et votre aide tout au long de la rédaction de ce manuscrit ainsi que pour le partage de vos précieuses connaissances. J'ai eu la chance de découvrir une nouvelle thématique de la galénique innovante à vos cotés.

A mon co-directeur et président de thèse,
Monsieur Philippe MAINCENT,
Merci d'avoir accepté de représenter la faculté « Maison Mère » de Nancy où j'ai réalisé mes études de pharmacie. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire lors de mon stage d'initiation à la recherche, ce fut pour moi la découverte de la galénique innovante : le début d'une grande aventure.

Aux membres du jury de thèse,
Madame Anne SAPIN – MINET,
Merci d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail. Vous m'avez encadrée lors de mon premier stage de recherche, j'ai beaucoup appris à vos côtés, vous m'avez confortée dans ma voie.
Madame Marie SOCHA – BORY,
Je vous remercie d'avoir évalué mon SIR il y a 4 ans déjà et d'être présente aujourd'hui comme jury de thèse. J'ai été touchée que vous ayez répondu si rapidement, et avec enthousiasme, à mon invitation.

A Monsieur Laurent DE GIVRY et Madame Amélie AUBRY,
Merci pour votre accueil au sein de la société Sederma. Cette collaboration basée sur le développement d'une formulation cosmétique fut pour moi enrichissante.

***A l'ensemble de l'équipe Physico-chimie des Systèmes Polyphasés de l'Institut Galien Paris-Sud*,**
Merci pour votre accueil et votre aide durant le travail expérimental effectué pendant mon stage de Master 2 dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit. Merci pour cette expérience

scientifique mais également humaine, je me souviendrais de l'ambiance agréable et sympathique au cours de ces six mois passés à vos côtés.

A tous mes encadrants de stages,
Je vous remercie pour vos connaissances, vos conseils précieux et votre bonne humeur qui m'ont poussé à poursuivre mes études par un doctorat en recherche.

A ma Maman et mon Papa,
Vous avez toujours été là pour moi, à me soutenir, et ce, malgré la distance. Merci pour votre patience, et vos efforts de compréhension pendant ces six années d'étude de pharmacie. Vous m'avez aidée à me surpasser. J'espère que vous êtes fiers de mon parcours. C'est avec une immense joie aujourd'hui que je prête le serment de Galien devant vous. Merci d'avoir toujours cru en moi, je vous aime.

A ma sœur,
Aurélie, tu m'as suivie et encouragée comme jamais depuis le concours difficile de la première année jusqu'à la fin de mes études. Nous formons une équipe de choc et notre bateau nous l'aurons un jour. Merci pour tout.

A Mamie Monique, Pépé et Papy,
Toute petite vous me voyez jouer dans vos jardins, à concocter mes « potions magiques » pour soigner les arbres. Aujourd'hui, c'est entourée de votre amour que je suis devenue pharmacien. A Mamie Bernadette, j'aurais aimé que tu sois à mes côtés aujourd'hui, tu me manques tellement.

A mes amis, de la faculté de Nancy, de la faculté de Châtenay, d'ici et d'ailleurs, merci pour toutes les rigolades et les bons moments passés.

A Simon,
C'est avec toi que j'ai traversé en tandem ces merveilleuses études depuis maintenant 5 ans. A notre réussite, nos diplômes de pharmaciens et nos futurs projets. Merci d'être là, d'être toi. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 1

TABLE DES FIGURES 4

TABLE DES TABLEAUX 7

ABRÉVIATIONS 8

INTRODUCTION 9

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 11

I. Physiologie de la peau humaine 12

A. La peau et ses enjeux 12

B. Structure de l'épiderme humain 12

1. Le *stratum corneum* 13

2. Le film hydrolipidique de surface 15

3. L'épiderme viable 16

C. Composition du derme 17

D. Composition de l'hypoderme 17

E. Les annexes cutanées 18

F. Les voies de pénétration cutanée 19

1. La voie transépidermale 19

2. La voie des annexes cutanées 20

II. Utilisation de peptides en cosmétiques 22

A. La cosméceutique : une cosmétique fonctionnelle 22

B. Mécanisme d'action des peptides signaux 24

1. La matrice extracellulaire du derme 24

2. Le collagène 24

3. Les matrikines 26

C. Obstacles à l'utilisation de peptides en dermocosmétique 28

1. Stabilité et analyse 28

2. Toxicité et coût 28

3. Pénétration cutanée 28

III. La vectorisation de substances actives par les systèmes lipidiques 30

A. Les systèmes vésiculaires 30
1. Les liposomes 30
2. Les Transferosomes et les Ethosomes 31
3. Les Niosomes 32
B. Les nanoparticules lipidiques 32
1. Nanoémulsions lipidiques 33
2. Nanoparticules lipidiques solides et nanoparticules lipidiques nanostructurées 33
C. Les systèmes lipidiques auto-assemblés 34
1. Polymorphisme des lipides et mésophases 34
2. La famille des ISAsomes 35
3. Applications des mésophases pour la délivrance de médicaments 36

IV. Systèmes lipidiques multicompartimentés anisotropes 37

A. Les nanoparticules de type *Janus* 37
1. Introduction 37
2. Les différents types de nanoparticules *Janus* 38
3. Matériaux 39
4. Stratégie de synthèse 39
5. Applications à la délivrance de médicaments 40

V. Le système *Janus* développé au laboratoire 42

A. Généralités de l'invention 42
B. Les contraintes industrielles pour la fabrication de particules *Janus* 43
1. Procédés transposables à l'échelle industrielle 44
2. Stabilité physique des nanoparticules *Janus* 44
3. Stabilité microbiologique des nanoparticules *Janus* 45
4. Le *sourcing* fournisseur pour les matières premières 46

PARTIE II : APPROCHE EXPERIMENTALE 47

I. Introduction 48

II. Matériels 48

III. Méthodes 48

A. Fabrication des nanodispersions par le procédé d'homogénéisation haute pression à chaud 48
1. Principe de l'Homogénéisation Haute Pression (HHP) 49
2. Protocole de fabrication 50
3. Paramètres explorés 51

B. Evaluation des propriétés physico-chimiques des nanodispersions 52
1. Mesure de la distribution de taille des nanoparticules *Janus*.....52
2. Structure des nanoparticules 53
3. Diffraction des Rayons X.....54
4. Mesure de la tension interfaciale par la méthode de la goutte montante.....55
5. Etude de la densité 57

IV. Résultats et Discussion 58

A. Modification du procédé de fabrication des nanoparticules *Janus*.....58
1. Temps de circulation au sein de l'homogénéisateur.....58
2. Quantité du lot produit.....59
B. Modification de la formule initiale du brevet des nanoparticules Janus.....61
1. Origine des matières premières 61
2. Stabilité microbiologique des nanoparticules *Janus* 62
3. Stabilité physique des nanoparticules *Janus*.....67
C. Incorporation d'un principe actif hydrophile 73

V. Conclusions et Perspectives 75

VI. Bibliographie 76

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la peau humaine constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. 12

Figure 2 : Schéma de l'anatomie de l'épiderme humain composé de la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. 13

Figure 3 : Organisation des couches par le phénomène de kératinisation. 14

Figure 4 : Comparaison schématique de la structure de la couche cornée et d'un mur de pierre 15

Figure 5 : Schéma des quatre populations cellulaires composant l'épiderme viable. 16

Figure 6 : Schéma des annexes de la peau: Glandes sudorales eccrines et apocrines, des follicules pileux et glandes sébacées. 18

Figure 7 : Fonctionnement de sécrétion du sébum à partir des glandes sébacées 19

Figure 8 : Schéma de la pénétration cutanée de molécules par la voie transépidermale regroupant la voie intracellulaire (A) et la voie intercellulaire (B) ou par la voie des annexes cutanées (C).....20

Figure 9 : Pénétration cutanée de molécules par la voie des annexes cutanées. 21

Figure 10 : Création de la fibre de collagène à partir de chaine d'acides aminés. 25

Figure 11 : Biopsie de peau humaine en coloration Masson-Trichrome x100. (A) Peau jeune composée d'épais faisceaux de collagène, (B) Peau âgée composée de fibres de collagène minces et lâches 25

Figure 12 : Mode d'action biologique des matrikines dans le cas de la réparation tissulaire 27

Figure 13 : Classification des liposomes suivant leur lamellarité.....31

Figure 14 : Représentation schématique de systèmes lipidiques. (A) Liposome conventionnel, (B) Transfersome, (C) Niosome et (D) Ethosome.....32

Figure 15 : Représentation schématique des nanoparticules lipidiques solides (SLN) et des nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC). 33

Figure 16 : Diagramme des phases cristal liquide d'un amphiphile dispersé dans un solvant 35

Figure 17 : Structure schématique de la phase cubique (A) et la phase hexagonale (B) avec la localisation possible des molécules.....36

Figure 18 : Représentation du dieu romain « *Janus* ».....37

Figure 19 : Représentation des différents types de géométries rencontrées pour les particules *Janus*. 38

Figure 20 : Structure des nanoparticules *Janus*.....38

Figure 21 : Méthodes d'obtention des nanoparticules *Janus* 40

Figure 22 : Morphologie des nanoparticules *Janus* compartimentées observées par microscopie électronique à transmission cryoscopique. 42

Figure 23 : Morphologie des nanoparticules *Janus* compartimentées observées par microscopie électronique à transmission cryoscopique. 42

Figure 24 : Schéma de la partie centrale d'un homogénéisateur à haute pression avec la valve où la fragmentation en gouttelettes très fines a lieu. 44

Figure 25 : Fragmentation des gouttes d'huile dans l'eau par agitation à l'ultra turrax T25. .49

Figure 26 : Homogénéisateur haute pression à chaud utilisé au laboratoire. 50

Figure 27 : Protocole de préparation des nanoparticules multi-compartimentées *Janus* selon les trois étapes suivantes: (1) Emulsification par ultra-turrax à 55°C, (2) Réduction de taille par homogénéisation haute pression à la même température, (3) Refroidissement à température ambiante 51

Figure 28 : Schéma illustrant le principe d'une guillotine à déclenchement manuel 54

Figure 29 : Schéma du montage d'un tensiomètre à goutte (cas de la goutte montante).1-banc optique, 2-source lumineuse,3-cuve thermostatée remplie d'huile et aiguille avec goutte pendante, 4-seringue remplie de la phase aqueuse, 5-moteur contrôlant le piston de la seringue, 6-lentille télécentrique calibrée, 7-caméra CCD, 8-moniteur vidéo et ordinateur 57

Figure 30 : Evolution de la distribution de taille des nanoparticules *Janus* formulées en trois cycles d'homogénéisation conservées à 4°C, température ambiante et 40°C. .59

Figure 31 : Morphologie des nanoparticules observées par cryo-TEM pour le lot de formulé en trois passages à l'homogénéisateur (A) après fabrication et (B) après conservation pendant deux mois à température ambiante. 59

Figure 32 : Morphologie des nanoparticules obtenues en cryo-TEM pour le lot formulé en trois passages à l'homogénéisateur en quantité (A) 320 g et (B) 1 kg. 60

Figure 33 : Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du Dubcare GPE® (A) ou Dubcare Olga SF® (B) comme substituant de la phase lipidique. 62

Figure 34 : Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation d'un système tampon acide citrique / citrate trisodique. 63

Figure 35 : Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du mélange salicylate de sodium et benzoate de sodium. 64

Figure 36 : Influence des conservateurs sur l'organisation structurale du Phospholipon 90G®. Diagramme de diffraction des rayons X aux petits angles enregistré à partir de Phospholipon 90G® en excès d'eau (80% en masse H_2O) (noir), mélange SP/BZ à 0,1/0,3% (rose) à 25°C, BZ et SP à 0,3% (jaune), BZ et SP à 0,6% (rouge). 65

Figure 37 : Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du mélange SP/BZ (A) ou du BZ seul en concentration 0,6% (B). 67

Figure 38 : Modélisation de la courbe représentant l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la température pour une goutte de Labrafil 1944® formée dans l'eau selon les deux polynômes du 2ème degré.....68

Figure 39 : Morphologie des nanoparticules formulées avec le mélange Dubcare GPE® et l'huile de noyaux d'abricot en ratio 50/50. 70

Figure 40 : Morphologie des nanoparticules formulées avec le mélange Labrafil 1944® et l'oléate de PEG-8 en ratio 98,5 / 1,5. 71

Figure 41 : Morphologie des nanoparticules formulées en présence du principe actif.....73

Figure 42 : Morphologie des nanoparticules formulées en présence du principe actif et du système tampon……...74

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition de la phase lipophile du film hydrolipidique.....15

Tableau II : Les différentes catégories de peptide utilisés dans les produits cosmétiques et leur mécanisme d'action. 23

Tableau III : Formule de base des nanoparticules multi-compartimentées *Janus* développées au laboratoire avec la description des composants, leur proportion et leur rôle. 43

Tableau IV : Description des paramètres modifiés lors de la fabrication des nanoparticules et leur plage de variation.....51

Tableau V : Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées en 5 minutes ou 3 passages au sein de l'homogénéisateur. 58

Tableau VI : Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées à partir du Labrafil 1944®, du Dubcare GPE® ou du Dubcare Olga SF®.....61

Tableau VII : Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées en fonction de la nature du conservateur et leurs concentrations finales dans la suspension.....66

Tableau VIII : Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte de Labrafil 1944®, de Dubcare GPE® ou de Dubcare Olga SF® formée dans l'eau. 69

Tableau IX : Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte du mélange Dubcare GPE® / huile de noyaux d'abricot ratio 50/50 et 75/25) formée dans l'eau. 70

Tableau X : Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte composée de Labrafil 1944®, d'huile de noyaux d'abricot et de PEG-8 formée dans l'eau. 71

Tableau XI : Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte de Labrafil 1944® formée dans une solution aqueuse contenant le système tampon et le conservateur. 72

ABRÉVIATIONS

CCD	*Charge-Coupled Device*
CNRS	Centre Nationale de la Recherche Scientifique
Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique en transmission
DRX	Diffractométrie des rayons X
FDA	*Food and Drug Administration*
HLB	*Hydrophilic - Lipophilic Balance*
HHP	Homogénéisation Haute Pression
ISAsome	*Internally Self-Assembled somes*
LMV	*Large Unilamellar Vesicle*
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie Electronique en Transmission
NLC	*Nanostructured Lipid Carriers*
NMF	*Natural Moisturizing Factors*
PCSP	Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés
PdI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PIT	*Phase Inversion Temperature*
q	Vecteur de diffusion
SAXS	*Small angle X-ray scattering*
SLN	*Solid Lipid Nanoparticles*
SUV	*Small Unilamellar Vesicle*
UMR	Unité Mixte de Recherche
WAXS	*Wide angle X-ray scattering*

INTRODUCTION

Chez l'Homme, le vieillissement est un processus naturel complexe inéluctable. Plus particulièrement, le vieillissement de la peau résulte de processus biologiques liés au passage du temps et aux facteurs environnementaux (exposition aux UV, pollution atmosphérique, consommation de tabac…). Ce phénomène naturel est marqué par l'apparition de signes de l'âge tels que les rides, les tâches brunes. De nombreux produits cosmétiques sont développés afin de retarder voire faire régresser les signes cutanés liés à l'âge. L'utilisation de crème anti-âge génère des attentes très fortes quant à l'efficacité du produit. Cependant, les molécules actives se heurtent dès leur application à un grand obstacle : la barrière cutanée.

Ainsi, la première section de ce manuscrit présente une revue bibliographique constituée de cinq chapitres.

Le chapitre I de ce manuscrit amène quelques rappels d'histologie et de physiologie des différentes couches cutanées afin de comprendre leur rôle de barrière vis-à-vis des agents extérieurs. Les différentes voies de pénétration d'une molécule active sont également présentées.

Le chapitre II aborde les produits cosmétiques innovants ou « cosméceutiques » et plus particulièrement les peptides biomimétiques qui sont incorporés dans les crèmes anti-âge. Le mécanisme d'action de ces peptides qui porte sur le renouvellement cellulaire est décrit ainsi que les obstacles rencontrés pour leur mise sur le marché.

La cosmétique moderne utilise depuis plusieurs années des vecteurs pour augmenter l'efficacité de principes actifs administrés par voie topique. **Le chapitre III** expose la vectorisation de molécules actives par les systèmes lipidiques comme les systèmes vésiculaires, les nanoparticules lipidiques et les systèmes auto-assemblés.

Le chapitre IV permet une introduction générale sur les systèmes lipidiques multicompartimentés de type *Janus*. Ensuite, **le chapitre V** introduit de façon plus spécifique les nanoparticules lipidiques compartimentées *Janus* brevetées par le laboratoire de physico-chimie des système polyphasés de l'Institut Galien Paris-Sud (Faivre *et al.* 2014).

La deuxième section du manuscrit correspond à la section expérimentale.
Du fait de son originalité et son procédé de fabrication à priori transposable à grande échelle, ce nouveau système a fait l'objet d'une collaboration avec un industriel cosmétique.

L’objectif du projet est de produire des nanoparticules *Janus* chargées en substances actives hydrophiles (de nature peptidique) et lipophiles tout en respectant le cahier des charges défini. Ce travail a été réalisé au sein de l’UMR CNRS 8612, équipe physico-chimie des systèmes polyphasés à l’Université Paris-Saclay. Les contraintes de fabrication seront également détaillées.

Partie I

Etude Bibliographique

I. Physiologie de la peau humaine

A. La peau et ses enjeux

La peau, aussi appelée tégument, est l'organe le plus important du corps humain. En effet, avec une surface totale d'environ 1,8 m² pour une épaisseur moyenne de trois millimètres, il s'agit de l'interface la plus vaste entre le corps humain et l'environnement extérieur (Hadgraft 2001). En raison de sa composition et de sa structure particulière, les fonctions de la peau sont nombreuses. Elle joue un rôle essentiel de protection contre les agressions mécaniques, thermiques, lumineuses et elle prévient des pertes hydriques et de l'entrée d'éléments étrangers dans l'organisme. Une coupe histologique de la peau met en évidence sa structure stratifiée présentant trois couches principales de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

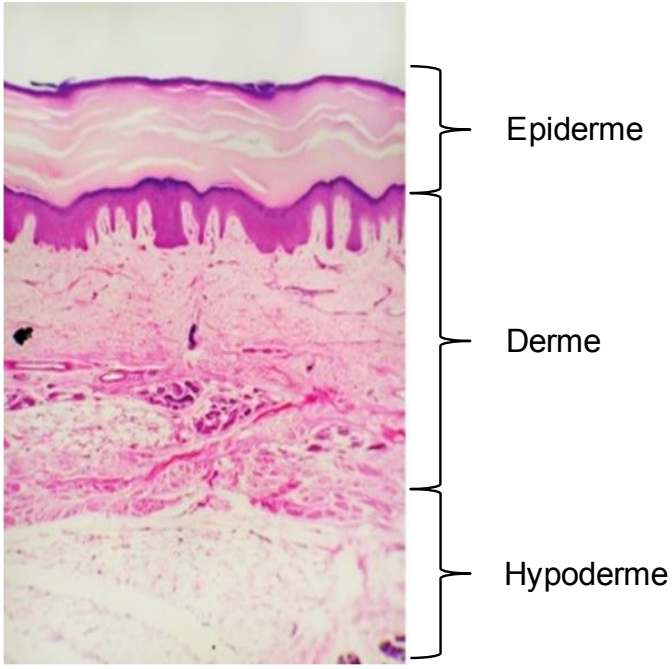

Figure 1 : *Structure de la peau humaine constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.*

Peu d'agents chimiques et biologiques sont capables de pénétrer l'épiderme. Il constitue la barrière principale à la diffusion de l'eau et protège les tissus sous-jacents des agressions par les xénobiotiques et les radiations ultraviolettes (Feingold 2008).

B. Structure de l'épiderme humain

L'épiderme est l'épithélium de revêtement le plus externe de la peau humaine. Au cours de leur migration depuis la couche basale de l'épiderme vers la surface épidermique, les cellules

se différencient formant les quatre assises de l'épiderme que sont, de l'intérieur vers l'extérieur (Figure 2) :

- La couche basale ou *stratum germinativum*
- La couche épineuse ou *stratum spinosum*
- La couche granuleuse ou *stratum granulosum*
- La couche cornée ou *stratum corneum*

Ainsi, l'épiderme comprend d'une part l'épiderme vivant constitué de plusieurs couches de cellules, les kéranocytes, et d'autre part la couche cornée ou *stratum corneum* constituée de cellules mortes, les cornéocytes. Des trois couches constituant la peau, l'épiderme est la seule à ne pas être vascularisée (Martini *et al.* 2003).

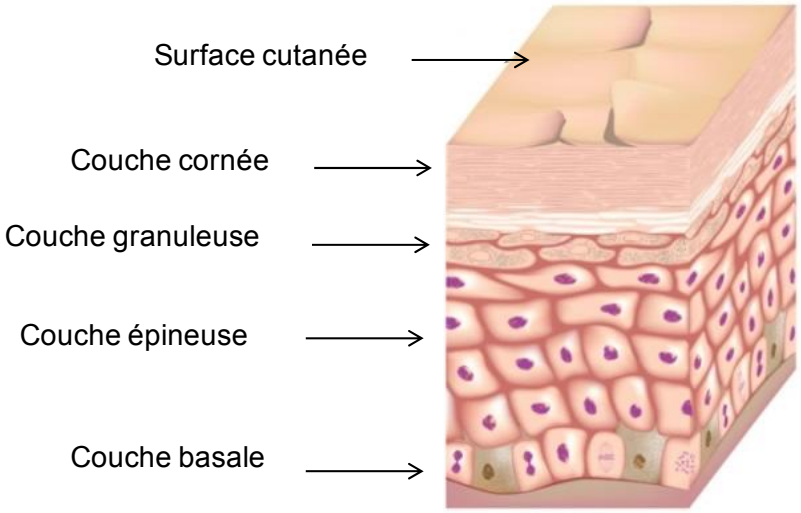

Figure 2 : *Schéma de l'anatomie de l'épiderme humain composé de la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale.*

1. Le *stratum corneum*

Cette couche cornée est organisée par superposition de 10 à 25 couches de cornéocytes orientés parallèlement à la surface de la peau (Menon *et al.* 2012). Ces cellules anucléées et complètement kératinisées proviennent de kératinocytes qui lors de leur migration depuis les couches profondes vers la surface de la peau vont s'aplatir et perdre leur noyau pour se transformer en cornéocytes : c'est le phénomène de kératinisation (Figure 3). La durée de cette transformation est de quatre semaines environ et varie selon les conditions physiopathologiques.

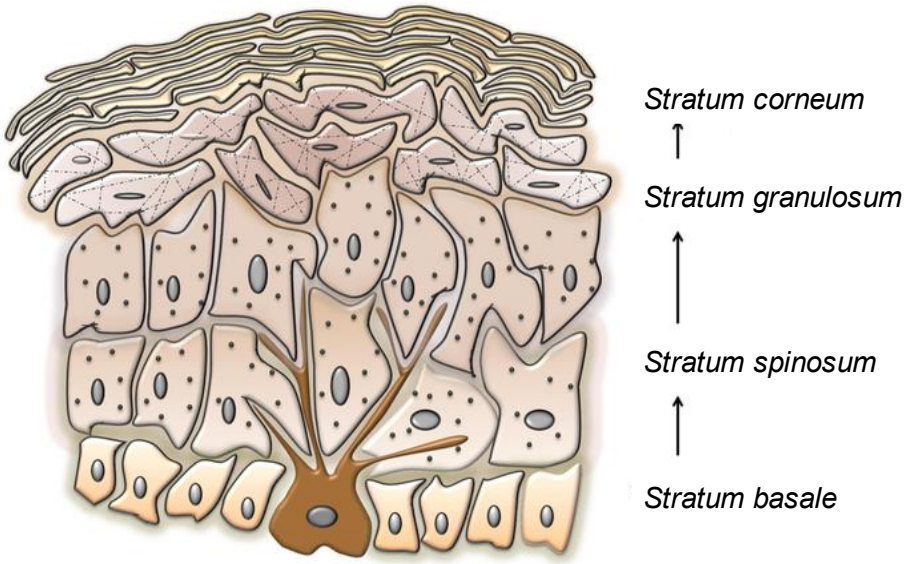

Figure 3 : *Organisation des couches par le phénomène de kératinisation.*

Cette différentiation épidermique conduit également à un enrichissement lipidique progressif indispensable au contrôle de la perte en eau et donc à la régulation de l'hydratation cutanée. La matrice lipidique qui unit les cornéocytes est constituée de bicouches lipidiques qui se composent d'environ 50% de céramides, 25% de cholestérol et 15% d'acides gras polyinsaturés et d'éléments lipidiques mineurs (Feingold 2008). La majorité de ces lipides sont synthétisés par les kératinocytes dans la partie supérieure de la couche épineuse et dans la couche granuleuse. Ces lipides sont arrangés en structures lamellaires, très stables et constituant une barrière efficace contre toute pénétration de l'extérieur (Feingold 2008). Ces bicouches lipidiques adjacentes assurent l'organisation dense et imperméable du *stratum corneum.*

La cohésion entre les cornéocytes est également assurée par la présence de structures protéiques résistantes appelées cornéodesmosomes. Cette organisation globale de la couche cornée est souvent représentée par un mur de briques (cornéocytes) jointées par du ciment (lipides) (Figure 4). La desquamation des cornéocytes, c'est-à-dire la mue de la peau, est régulée par la cohésion entre les cellules rendue possible grâce au ciment lipidique et à la présence des cornéodesmosomes.

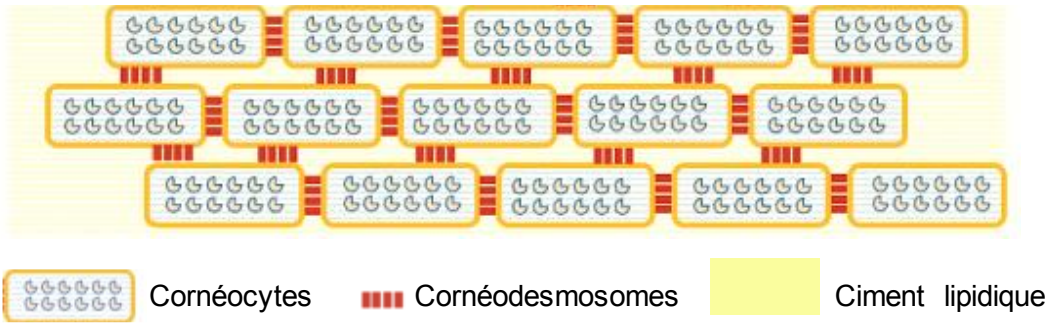

Figure 4 : *Comparaison schématique de la structure de la couche cornée et d'un mur de pierre (Delmiglio 2016).*

2. Le film hydrolipidique de surface

Le *stratum corneum* est recouvert d'un film hydrolipidique formant une émulsion naturelle eau dans huile. L'eau provient du derme et va être retenue par les cornéocytes grâce à un phénomène d'osmose et d'attraction par des éléments hygroscopiques intracellulaires regroupés sous le nom de NMF (*Natural Moisturizing Factors)* ou facteur naturel d'hydratation. Elle provient également de l'eau de l'atmosphère qui se dépose sur la peau et des sécrétions sudorales. La partie lipidique provient de la sécrétion sébacée (96% des lipides), de la sueur et des produits de dégradation des kératinocytes issus de la desquamation. Le Tableau I présente la composition de la phase lipophile du film hydrolipidique.

Tableau I : *Composition de la phase lipophile du film hydrolipidique (Agache et al. 1981).*

Constituants	Proportion (%)	Origine
Triglycérides	43	Sébum +++ Epiderme +
Acides gras libres	16	Sébum +++ Epiderme +
Cires	25	Sébum
Squalènes	12	Sébum
Cholestérol (libre et estérifié)	4	Epiderme

De par sa composition en acides gras qui lui confère un pH entre 5 et 6, le film hydrolipidique joue un rôle dans le maintien du pH acide de la peau. Sa composante lipophile crée une barrière à l'évaporation de l'eau et freine ainsi la perte insensible en eau. Ainsi, il joue un rôle dans l'établissement de la barrière cutanée en limitant également la pénétration de substances hydrophiles (Martini *et al.* 2003b). Les substances chimiques ne peuvent se frayer un chemin à travers cette structure qu'en ayant la capacité à s'intégrer à la membrane des cellules ou en s'intégrant au ciment lipophile afin de passer entre les cellules.

3. L'épiderme viable

En dessous de la couche cornée, se trouve un épiderme « viable » représenté schématiquement par la Figure 5. La résistance de cet épiderme à la diffusion de substances extérieures est très faible comparativement à la couche cornée (Van Smeden *et al.* 2014).

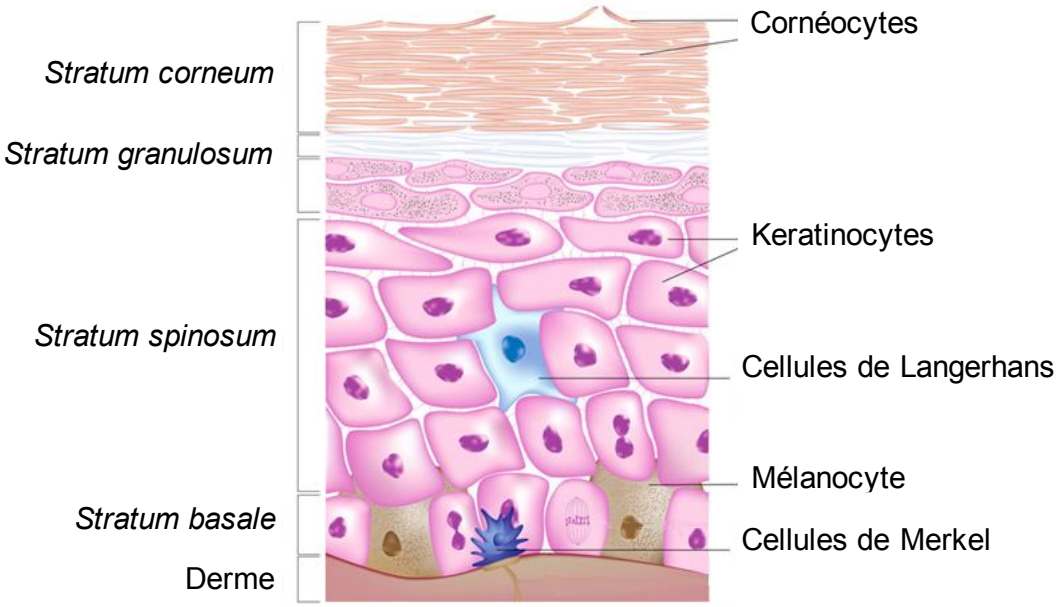

Figure 5 : *Schéma des quatre populations cellulaires composant l'épiderme viable.*

Il est composé de différents types de cellules :

- Les kératinocytes :

Ces cellules représentent 80% des cellules épidermiques et permettent grâce à leur différenciation, l'organisation stratifiée de l'épiderme.

- Les mélanocytes :

Ce sont des cellules liées à la pigmentation de la peau et des poils et se trouvent uniquement dans la couche la plus profonde de l'épiderme. Ils sécrètent de la mélanine, un pigment coloré brun-noir qui s'incorpore dans les kératinocytes via les mélanosomes. La mélanine protège l'ADN des cellules épidermiques contre les rayons ultraviolets et donne à la peau sa couleur caractéristique.

- Les cellules de Langherans :

Elles sont chargées de détecter les antigènes ayant pénétrer dans l'épiderme et de les capturer. Après avoir capté l'antigène, les cellules de Langherans quittent l'épiderme et rejoignent les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T. Ainsi, ces cellules initient et propagent les réponses immunitaires.

- Les cellules de Merkel :

Ces cellules peuvent être isolées ou regroupées en amas entre les kératinocytes. Ce sont des cellules toujours au contact d'une terminaison nerveuse permettant un rôle de mécanorécepteur impliquées dans la fonction du toucher (Boulay 2007). La résistance de cet épiderme à la diffusion de substances extérieures est très faible comparativement à la couche cornée (Van Smeden *et al.* 2014).

C. Composition du derme

Juste au-dessous de l'épiderme, le derme forme la plus épaisse des couches de la peau. Ce tissu conjonctif est constitué de deux parties que sont le derme papillaire et le derme réticulaire.

- Le derme papillaire se trouve à la jonction dermo-épidermique. Il est lâche, très vascularisé et riche en fines fibres de collagène entrelacées et orientées perpendiculairement à l'épiderme. Cette partie du derme est élastique et fragile.

- Le derme réticulaire se trouve plus en profondeur et représente environ 80% de l'épaisseur totale du derme. Ses fibres de collagène sont grossières, en faisceaux épais et irréguliers qui s'entrecroisent parallèlement par rapport à la surface de la peau. Il constitue la partie résistante de la peau.

Contrairement à l'épiderme, le derme est très vascularisé et l'on y retrouve les glandes sudorales et sébacées. Le derme permet d'apporter les nutriments, l'immunité et d'autres supports à l'épiderme mais aussi d'avoir un rôle dans la régulation de la température, de la pression et de la douleur. Il est composé de fibroblastes qui participent à la synthèse des macromolécules et des glycoprotéines entrant dans la constitution de la matrice extracellulaire (MEC). Ces macromolécules sont des fibres de collagène, d'élastine et de fibronectine baignant dans un gel formé par les glycosaminoglycanes captant l'eau.

D. Composition de l'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Ce tissu fibro-adipeux est essentiellement composé d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides, regroupés en lobules. Il joue le rôle d'isolant thermique, de réserve énergétique et de protection contre les chocs. L'hypoderme est une couche mal différenciée où se trouvent les glandes sudorales qui fabriquent et expulsent la sueur via de petits canaux.

E. Les annexes cutanées

De façon générale, les annexes cutanées ont un rôle de protection et de thermorégulation. Il existe quatre annexes cutanées : les glandes sudoripares eccrines, les glandes sudoripares apocrines, les follicules pileux associés aux glandes sébacées et les ongles (Figure 6).

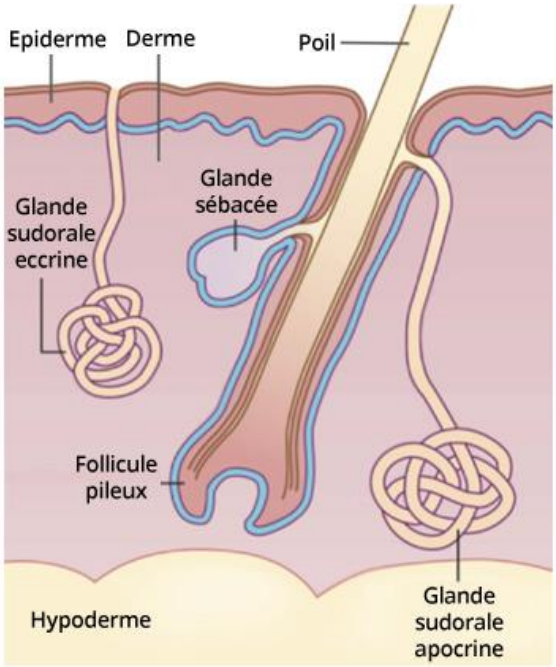

Figure 6 : *Schéma des annexes de la peau : glandes sudorales eccrines et apocrines, follicules pileux et glandes sébacées.*

Les glandes sudoripares sont les plus nombreuses annexes cutanées, distribuées sur tout le corps à une densité d'environ 400 glandes par cm². Elles sont responsables de la sécrétion de la sueur lorsque la température augmente.

- Les glandes sudoripares eccrines sont constituées d'un peloton sécréteur logé dans le derme profond et d'un canal excréteur qui traverse verticalement le derme et l'épiderme. Ces glandes sont indépendantes du poil et débouchent directement à la surface de la peau par un pore.
- Les glandes sudoripares apocrines s'ouvrent toujours dans un follicule pileux. Elles sont dotées d'un canal excréteur court qui s'abouche dans le canal pilaire.

Les glandes sébacées sont des glandes ramifiées dont la sécrétion se fait par le détachement et la mort des cellules remplies des produits de sécrétion. Elles sont reliées aux follicules pileux. Les cellules matures (sébocytes) sont chargées de lipides et se désintègrent en convergeant vers le centre de la glande pour constituer le produit de sécrétion (sébum) (Figure 7).

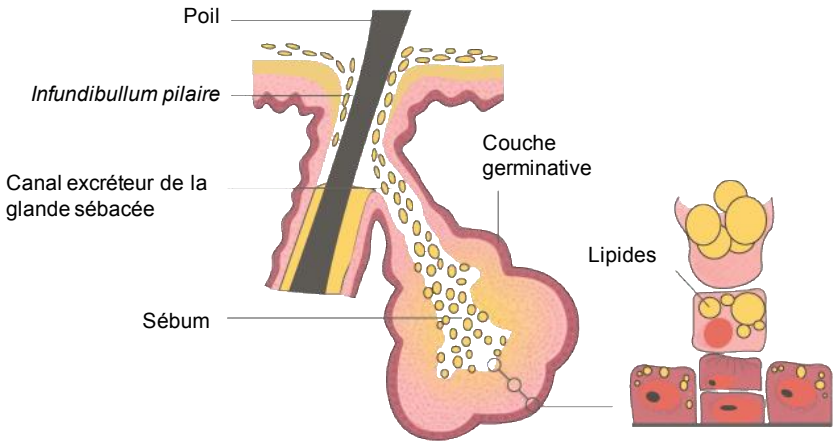

Figure 7 : *Fonctionnement de sécrétion du sébum à partir des glandes sébacées de la peau.*

Le sébum recouvre ensuite le poil et le cheveu afin de les lubrifier pour éviter la sécheresse et la casse. Il prévient également l'évaporation excessive de l'eau à la surface de l'épiderme.

F. Les voies de pénétration cutanée

Bien que la peau constitue une véritable barrière au passage de molécules extérieures, celle-ci n'est toutefois pas absolue. En effet, la peau est perméable à pratiquement toutes les substances mais à un degré de perméabilité varié. La pénétration d'une substance à travers la peau correspond en terme physique à une diffusion passive à travers chaque structure du tégument : couche cornée, épiderme, derme et annexes cutanées. Pour toute molécule appliquée sur la peau, on distingue deux voies de pénétration, la voie via les annexes cutanées et la voie transépidermale (Figure 8).

1. La voie transépidermale

La majorité de la surface cutanée est occupée par la couche cornée, les annexes cutanées n'occupent qu'une faible surface. Dans ces conditions, la perméabilité de la peau repose principalement sur la structure chimique de la couche cornée et son organisation structurale. Deux voies distinctes sont possibles et représentées par la Figure 8. Les molécules peuvent pénétrer à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée (voie intercellulaire) ou pénétrer directement dans les cornéocytes (voie intracellulaire).

- Le passage intercellulaire à travers le *stratum corneum* se fait par diffusion dans les lipides intercellulaires. Même si le chemin parcouru est plus long et tortueux, cette voie est la plus rapide pour de nombreux composés car leur coefficient de diffusion dans le milieu intercellulaire est plus grand. Il s'agit d'un milieu lipidique continu, structuré en bicouches. Il offre donc à la fois des régions hydrophiles et lipophiles qui correspondent

aux voies de passage des composés lipophiles et hydrophiles.

- Le passage transcellulaire est plus rarement emprunté. Il ferait intervenir la voie des cornéodesmosomes qui réalisent des pontages entre les cellules et peuvent, étant donné leur nature protéique, devenir suffisamment amphiphiles. Les substances empruntant cette voie doivent être capable de s'intégrer à la double couche de phospholipides constituants les membranes cellulaires pour pouvoir y pénétrer.

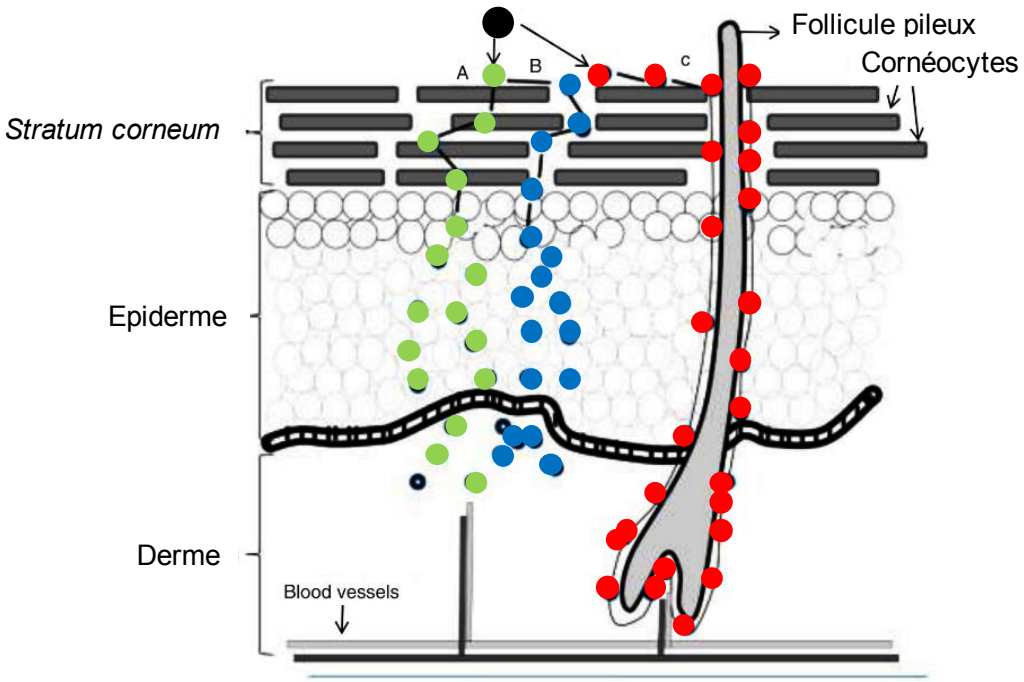

Figure 8 : *Schéma de la pénétration cutanée de molécules par la voie transépidermale regroupant la voie intracellulaire (A) et la voie intercellulaire (B) ou par la voie des annexes cutanées (C). (Valenzuela et al. 2012).*

2. La voie des annexes cutanées

La couche cornée est traversée par les follicules pilosébacés et les glandes sudoripares. Ces structures offrent des zones de moindre résistance pour la pénétration des molécules. Les annexes cutanées ont été considérées comme insignifiantes comme voie de pénétration car elles ne représentent que 1% de la surface cutanée. Toutefois, cette voie présente une importance pour les composés très hydrophiles, à haut poids moléculaire, les ions et pour les systèmes d'encapsulation comme les nanoparticules, les cyclodextrines et les liposomes (Schaefer *et al.* 2008). La voie annexielle est représentée par la Figure 9 et correspond :

- Au passage transfolliculaire. Les follicules pilosébacés sont situés dans les invaginations profondes de l'épiderme, ils peuvent conduire les molécules jusqu'au

derme réticulaire. Les appareils pilosébacés n'ont pas une couche cornée très développée d'où une pénétration facilitée à ce niveau.

- Au passage par le canal sudoripare des glandes eccrines. Celui-ci est possible mais rarement démontré et minime puisque les substances pénétrant doivent diffuser contre le flux de sueur qui se dirige vers la surface cutanée (Hadgraft 2001). C'est le passage utilisé pour le chlorure d'aluminium qui pénètre dans les conduits sudoraux et diminue l'écoulement de la sueur en les obsturant d'où son emploi en tant qu'anti transpirant.

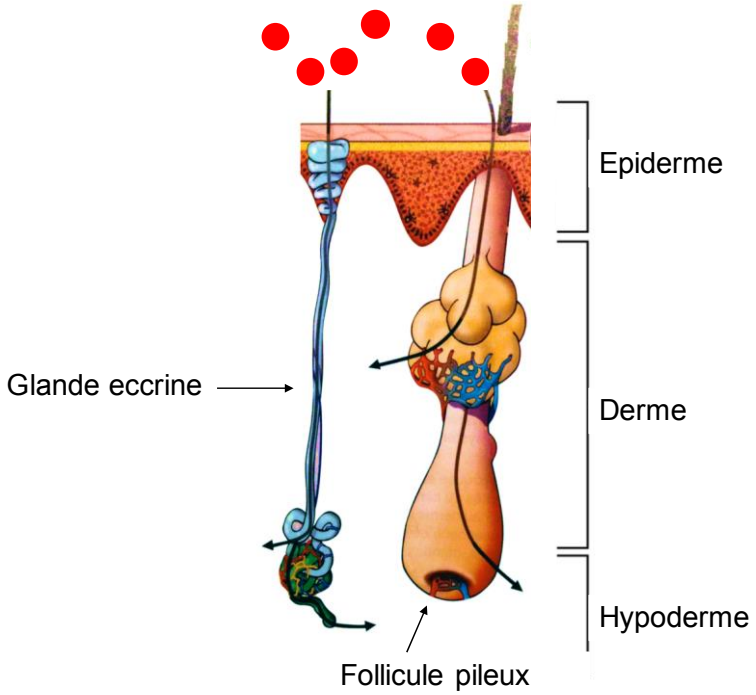

Figure 9 : *Pénétration cutanée de molécules par la voie des annexes cutanées.*

II. Utilisation de peptides en cosmétiques

A. La cosméceutique : une cosmétique fonctionnelle

L'innovation en industrie cosmétique consiste notamment à traiter non plus les symptômes mais directement la cause du déséquilibre au niveau de la peau. Ainsi, de nombreux produits cosmétiques sont maintenant capables de fournir un bénéfice physiologique au consommateur. En effet, ces produits démontrent une activité biologique capable de maintenir ou rétablir le bon état physiologique de la peau d'où leur appellation de « cosméceutiques » (Zhang *et al.* 2009). Ce ne sont pas des médicaments puisque l'action n'est pas dirigée vers une pathologie, le but est de mimer les mécanismes de réparations naturelles par action de ces peptides biomimétiques. Cette conception de la cosmétologie est orientée de sorte à relancer le métabolisme cutané. Les cosméceutiques sont trouvés sous différentes forme comme par exemple les antioxydants, les facteurs de croissances, les hydroxyacides ou encore les peptides (Bermann 2007). Le domaine pour lequel les cosméceutiques ont démontré de grands bénéfices est dans le traitement du vieillissement de la peau. Par ailleurs, une des stratégies utilisées pour diminuer les signes de l'âge est le recours aux peptides bioactifs en application topique (Zhang *et al.* 2009).

Plus de 25 peptides différents pouvant être inclus dans les produits cosmétiques sont déjà présents sur le marché aux Etats-Unis et beaucoup d'autres sont actuellement en développement (Zhang et Falla 2009). Les peptides sont ainsi utilisés pour traiter les symptômes et les signes du vieillissement cutané. Ils sont fréquemment utilisés dans ce but et sont regroupés en 4 catégories différentes (Tableau II) (Gorouhi *et al.* 2009) :

- Les peptides inhibiteurs d'enzymes
- Les peptides inhibiteurs de neurotransmetteurs
- Les peptides signaux
- Les peptides transporteurs

Tableau II : *Les différentes catégories de peptides utilisés dans les produits cosmétiques et leur mécanisme d'action.*

Classe	Mécanisme de l'action anti-âge	Exemple
Peptides transporteurs	Faciliter le passage cutané d'oligo-élément tel que le cuivre nécessaire pour les processus enzymatique et la cicatrisation	GHK (glycyl-L-histidyl-L-lysine)
Peptides signaux	Déclencher une fonction directement par liaison au récepteur en stimulant la production de collagène par les fibroblastes, la prolifération d'élastine, glycosaminoglycanes, protéoglycane et fibronectine.	Syn®-coll Decorinyl ™
Peptides inhibiteurs de neurotransmetteurs	Diminuer la contraction des muscles faciaux, et par conséquent l'apparition des rides.	Vialox® Syn®-ake
Peptides inhibiteurs d'enzymes	Inhiber directement ou indirectement une enzyme liée au processus anti-âge.	Glycine et protéine de soja (Preregen®)

B. Mécanisme d'action des peptides signaux

Le derme apporte un soutien nutritionnel et fonctionnel à l'épiderme. Pour une peau humaine normale, les protéines de structure telle que le collagène ou l'élastine représentent 70-80% et 2-4 % respectivement de la masse sèche du derme (Waller *et al.* 2006). Au cours du temps, ce sont ces protéines qui vont se détériorer laissant apparaitre les signes du vieillissement cutané. Le derme est donc la cible des produits cosmétiques anti-âge où le contrôle de la différenciation, prolifération et stimulation du collagène est important (Bermann 2007).

1. La matrice extracellulaire du derme

La matrice extracellulaire est définie par l'ensemble des macromolécules extracellulaires. Elle est composée de protéoglycanes et d'acide hyaluronique, de glycoprotéines, et de fibres, principalement des fibres de collagène et des fibres d'élastine. Ces macromolécules interagissent entre elles pour former un assemblage complexe dont les propriétés dépendent de sa composition et de son arrangement. Les fibres de collagène et les fibres élastiques permettent la formation d'un réseau dense résistant aux tensions alors que les protéoglycanes et glycoprotéines sont à l'origine d'un réseau plus lâche résistant aux forces de compression. La matrice extracellulaire assure ainsi de nombreux rôles comme le soutien des cellules et procure ses propriétés mécaniques à la peau. Son organisation et sa composition fournissent aux cellules un environnement propice à leur survie, leur prolifération et leur migration. La matrice extracellulaire résulte d'un équilibre entre synthèse et dégradation de ses composants. Cependant, les macromolécules matricielles telles que le collagène ou l'élastine sont capables de réguler de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération ou la synthèse des protéines.

2. Le collagène

Le collagène est une protéine présente dans la matrice extracellulaire de l'épiderme qui confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. La molécule de base, appelée tropocollagène est composée de trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) enroulées autour d'un axe central. L'ensemble forme une superhélice qui correspond aux fibres de collagène (Figure 10). Cette macromolécule est synthétisée par des types cellulaires variés tels que les fibroblastes du derme, les chondrocytes du cartilage ou bien les ostéoblastes des os. Ainsi, il existe jusqu'à 25 types de collagène et ce sont les types I (80 à 85%) et III (8-11%) qui sont les plus présents dans la matrice extracellulaire du derme.

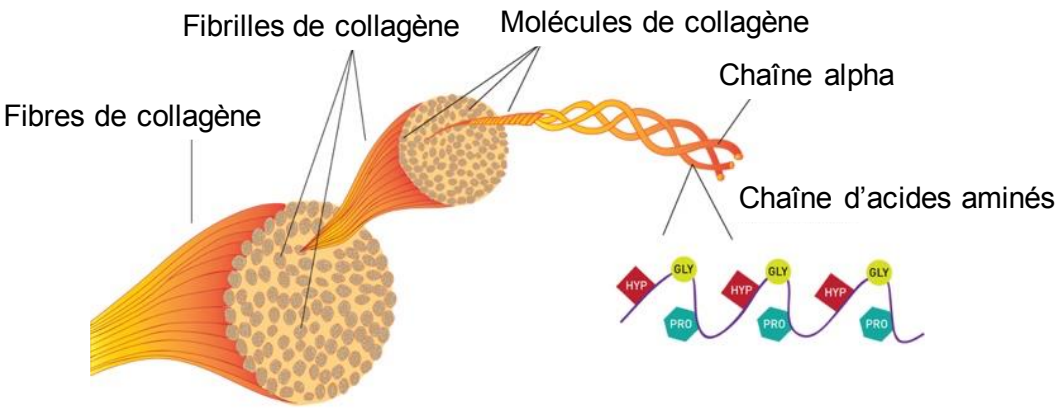

Figure 10 : *Création de la fibre de collagène à partir de chaines d'acides aminés.*

Chez l'enfant et l'adulte jeune, le collagène natif acido-soluble est extensible, souple, élastique et a une grande capacité de rétention d'eau (Waller *et al.* 2006). Chez l'adulte, apparaît une insolubilisation progressive et une augmentation de la résistance mécanique des fibres : c'est le collagène natif insoluble (Figure 11) (Moftah *et al.* 2012), (Schaefer *et al.* 2008). Ainsi, lors du vieillissement cutané, la production de collagène par les fibroblastes est ralentie et la réticulation des fibres de collagène les rend insolubles et moins résistantes.

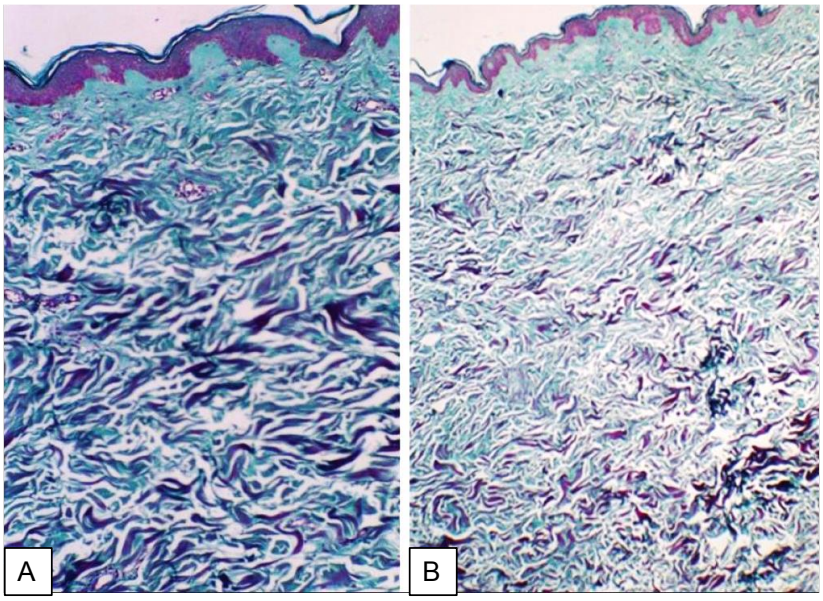

Figure 11 : *Biopsie de peau humaine en coloration Masson-Trichrome x100. (A) Peau jeune composée d'épais faisceaux de collagène, (B) Peau âgée composée de fibres de collagène minces et lâches (Moftah et al. 2012).*

3. Les matrikines

Suite à la protéolyse partielle du collagène, des fragments peptidiques insolubles, de quelques acides aminés, sont libérés dans la matrice extracellulaire (Maquart *et al.* 2004). Ces peptides qui sont des sous domaines spécifiques du collagène vont alors exercer une activité biologique. Ils stimulent les fibroblastes pour la production de nouveau collagène et permettent le remodelage tissulaire. Ainsi, la matrice extracellulaire contient ses propres informations contribuant à sa réparation. Le terme « matrikine » a été proposé pour désigner ces peptides dérivés de la matrice extracellulaire qui régulent la connexion des tissus entre eux. La plupart des macromolécules de la MEC incluant le collagène mais aussi l'élastine et la fibronectine peuvent mener à la formation de matrikines (Maquart *et al.* 2004). Ainsi, la matrice extracellulaire est un réseau enchevêtré de macromolécules variées, en étroite relation avec les cellules qu'elle environne.

a) Action des matrikines

Les matrikines ne sont pas de simples fragments de dégradation protéique mais exercent une activité biologique variée. Il en existe deux sortes :

- Les matrikines naturelles qui sont déjà présentes dans la MEC.
- Les matrikines cryptiques ou « matricryptines » qui sont libérées uniquement suite à la protéolyse de macromolécules de la MEC. En d'autres termes, c'est la modification conformationnelle de la protéine qui engendre la libération de matrikines (Davis *et al.* 2000).

Il s'agit finalement d'une classe de ligand capable d'interagir avec les récepteurs spécifiques à la surface de cellules tels des facteurs de croissance. Les matrikines peuvent interagir, par exemple, avec la famille des intégrines provoquant une cascade de signalisation cellulaire et mener à des évènements divers comme l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire, la synthèse de protéine ou encore l'apoptose. De façon plus générale, l'action des matrikines *in vivo* consiste à déclencher la migration de cellules vers le site endommagé par chimiotactisme puis à stimuler la néosynthèse de nouvelles molécules (Figure 12).

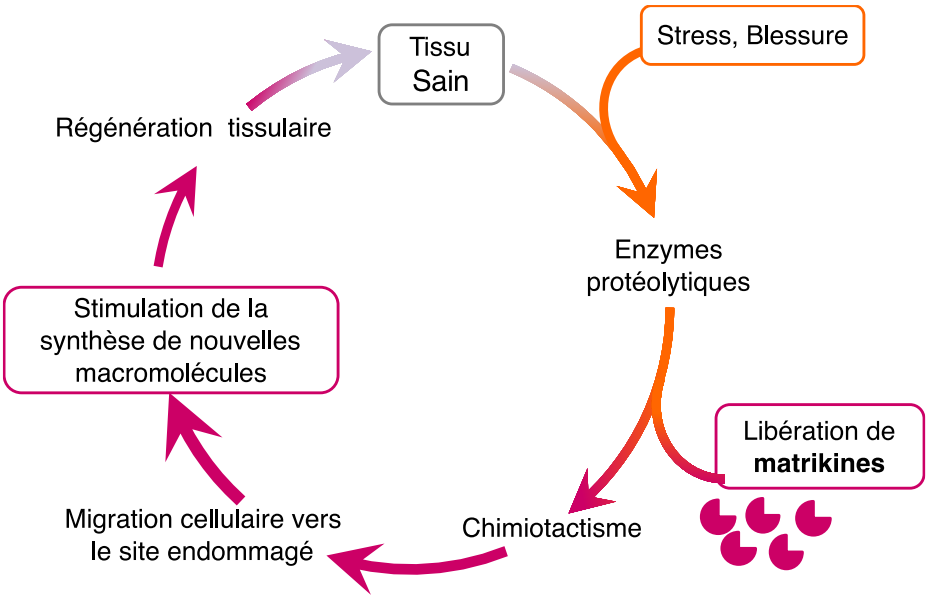

Figure 12 : *Mode d'action biologique des matrikines dans le cas de la réparation tissulaire. Une protéine cellulaire est lysée en fragments par hydrolyse enzymatique. Les matrikines libérées vont agir comme des chimio-attractants, et stimuler le déclenchement de la néosynthèse de nouvelles protéines.*

b) Exemple d'application des matrikines

Les matrikines issues des chaînes de collagène I, V et IX démontrent une action prépondérante dans le renouvellement et la réparation tissulaire (Maquart *et al.* 2004). Ainsi, en dermatologie, le tripeptide-1 (glycyl-L-histidyl-L-lysine ou GHK) est utilisé comme peptide transporteur. En effet, le peptide GHK complexé avec du cuivre a été montré comme un potentiel activateur de la cicatrisation dans le cas des ulcères diabétiques (Jones *et al.* 2013). C'est également un peptide signal qui favorise la création de fibres de collagène, stimule la synthèse d'élastine, de protéoglycanes et de glycoaminoglycanes (Siméon *et al.* 2000). En cancérologie, de nombreuses matrikines dérivées des collagènes de membrane basale sont capables de réguler la croissance tumorale, et leurs analogues structuraux, susceptibles d'être utilisés comme agents anti-cancéreux (Tran *et al.* 2005). En cosmétologie, par exemple, le palmitoyl pentapeptide-4 (Pal-KTTKS) constitué d'une chaîne de 5 acides aminés couplés à l'acide palmitique est commercialisé sous le nom de marque Matrixyl® (Jones *et al.* 2013). Ce pentapeptide commercialisé par Sederma reproduit la séquence du propeptide issu du collagène humain de type I.

L'usage de peptides biomimétiques en cosmétique a pour but de mimer l'action des matrikines portant sur le renouvellement cellulaire, et notamment activer la synthèse de nouvelles macromolécules de collagène (Lintner *et al.* 2000). Par conséquent, l'inclusion de ces peptides dans des préparations cutanées permet d'obtenir des produits ayant des revendications variées telles que lutter contre les rides ou contre les vergetures (Pickart *et al.* 2015).

C. Obstacles à l'utilisation de peptides en dermocosmétique

L'utilisation de peptides dans un produit dermocosmétique peut se révéler difficile. Les difficultés rencontrées peuvent être des problèmes liés à la stabilité, la toxicité, l'analyse, le coût et surtout la pénétration cutanée du peptide.

1. Stabilité et analyse

Les peptides ont une stabilité chimique limitée. Dans un environnement aqueux, que l'on retrouve souvent dans les produits cosmétiques, une hydrolyse peut survenir. Généralement, plus la longueur du peptide est importante, plus il devient fragile. Le choix des excipients et des stabilisants peut aider à surmonter cet obstacle.

Lorsque le peptide est présent dans un produit fini en concentration très faible de l'ordre du micromolaire ou moins, il peut être difficile de détecter sa présence 6 mois après formulation. Des techniques analytiques sont utilisées comme la spectrométrie de masse, la spectrométrie par fluorescence et doivent être développées spécifiquement à chaque peptide. Cependant, cela n'est pas toujours possible et/ou très couteux et cette étape s'avère parfois limitante dans le développement d'un nouveau produit cosmétique.

2. Toxicité et coût

De façon générale, plus le peptide est petit, moins il est susceptible de déclencher des effets indésirables. Les peptides, au contraire des protéines, ne sont pas assez grands pour déclencher des réactions allergiques mais des effets cellulaires indésirables peuvent apparaitre si la séquence est inconnue. Par conséquent, il est préférable d'utiliser des peptides présentant une séquence biomimétique d'acides aminés. La toxicité sera d'autant plus faible si le peptide est de composition quasiment identique aux peptides humains. Néanmoins, des évaluations de sécurité portant sur le nouveau peptide sont toutefois nécessaires, plus particulièrement s'il est modifié par acylation ou estérification.Les peptides aux séquences bien définies et de haute pureté (>90%) sont coûteux à produire. Même si l'extraction à partir d'hydrolysats de protéines est théoriquement possible, la plupart des peptides utilisés en cosmétique sont de nature synthétique. Ils sont créés étape par étape. L'efficacité très élevée des peptides compense leur coût élevé de production et rend leur utilisation possible dans les produits cosmétiques.

3. Pénétration cutanée

Le *stratum corneum* n'est pas la cible à atteindre pour les peptides. En effet, le peptide doit diffuser au travers de la barrière cutanée, jusqu'au site d'action situé dans l'épiderme viable, en empruntant une des voies de pénétration transcutanée (Fang *et al.* 2006). Pourtant, même

les petites molécules sont trop hydrophiles et chargées électriquement pour pénétrer au delà de la première ou seconde couche du *stratum corneum.* Plus le nombre d'acides aminés composant le peptide augmente, moins il est susceptible d'atteindre les couches profondes de la peau. Il existe différentes stratégies permettant d'améliorer la délivrance de peptides dans le derme.

Une des stratégies peut être l'utilisation des promoteurs d'absorption cutanée afin de déstabiliser la structure du *stratum corneum*. Ce sont principalement des solvants organiques et des tensioactifs (azone, pyrrolidone, acides gras, dimethylsulfoxide) (Williams *et al.* 2012). Ces substances, par leur action sur la kératine, déstabilisent l'enveloppe membranaire des cornéocytes. Elles ont aussi une action de fluidification voire de solubilisation des lipides. Cependant, cette approche est toutefois limitée pour les peptides de grande taille et des études sont nécessaires pour s'assurer que le promoteur ne dénature pas le peptide. Bien que de nombreux promoteurs d'absorption aient démontrés leur efficacité, leur utilisation reste limitée en raison d'irritations de la peau survenant à de haute concentration. Une autre stratégie utilisée dans le but d'améliorer le passage des peptides au travers de la peau est l'utilisation de promoteur d'absorption cutanée de type physique. Ces méthodes telles que la iontophorèse, sonophorèse ou électroporation permettent de modifier transitoirement la perméabilité du *stratum corneum*.

Pour améliorer le passage du peptide, celui-ci peut être également modifié chimiquement. Lintner *et al.* ont démontré que le greffage d'une chaine lipophile (acide gras de longueur suffisante) à un petit peptide peut augmenter le taux de pénétration par un facteur de 100 ou plus (Lintner *et al.* 2000). Cependant, cette technique présente des limites puisque plus la chaine du peptide est longue, moins l'acide gras sera efficace pour aider à la pénétration. Une autre limitation provient des interférences des activités biologiques que peut provoquer l'acylation du peptide.

Enfin, l'administration par voie topique de peptide peut se faire à l'aide de systèmes colloïdaux composés de lipides. Il existe une grande variété d'excipients lipidiques approuvés par les autorités de santé qui permettent de concevoir des véhicules lipidiques adaptés au principe actif utilisé et à sa voie d'administration. Pour une application cutanée, les vecteurs lipidiques occupent une place de choix en raison de leur composition en lipides très proche de la composition naturelle de la peau. Tirant parti de cette similitude avec la peau, une multitude de vecteurs lipidiques sont aujourd'hui référencés dans la littérature. Parmi ceux-ci, il est possible de mentionner les systèmes vésiculaires, par exemple les liposomes, les nanoparticules à base de lipides ou les systèmes lipidiques auto-assemblés. Ainsi, les applications topiques d'objets nanostructurés représentent une voie intéressante.

III. La vectorisation de substances actives par les systèmes lipidiques

Les nanotechnologies sont utilisées dans plusieurs domaines tels que l'électronique, la cosmétique et la santé. En cosmétique, de nombreuses stratégies innovantes reposent sur l'utilisation de systèmes colloïdaux permettant de pénétrer cette barrière cutanée pour une action plus efficace des substances actives. Dans le domaine des cosmétiques, les vecteurs sont très divers avec comme exemple, les liposomes, les éthosomes, les nanoparticules lipidiques solides (Uchechi *et al.* 2014). Les avantages de ces systèmes nanoparticulaires sont nombreux et parmi eux : une meilleure protection des substances actives, une pénétration accrue en profondeur dans le derme et des effets au long cours. L'utilisation de vecteurs comme cargo permet également de contrer les problèmes de physico-chimie et d'augmenter la concentration dermique des nouvelles molécules lipophiles. Les systèmes colloïdaux à base de lipides sont des systèmes organiques composés de phospholipides, glycérides, cholestérol ou de tout autre corps gras biocompatible et biodégradable. Du fait de la biocompatibilité de ces composants avec la peau, ces vecteurs lipidiques se retrouvent dans le domaine cosmétique pour des applications topiques. Ils se classent en plusieurs grandes familles : les systèmes vésiculaires, les nanoparticules lipidiques, les systèmes lipidiques auto-assemblés.

A. Les systèmes vésiculaires

De façon générale, les vésicules colloïdales sont formées d'un cœur aqueux entouré d'une ou plusieurs bicouches de lipides.

1. Les liposomes

Concernant les liposomes, leur paroi lamellaire est constituée essentiellement de phospholipides (Figure 14A). Ces vésicules sphériques peuvent contenir aussi bien des molécules lipophiles emprisonnées dans les bicouches lipidiques qu'hydrophiles dans le cœur aqueux ou même amphiphile (Uchechi *et al.* 2014). Suivant le nombre de feuillets phospholipidiques, leur diamètre peut varier d'environ 15 nm pour les SUV (*Small Unilamellar Vesicle*) à 3500 nm pour les LUV (*Large Unilamellar Vesicle*) (Figure 13) (Bozzuto *et al.* 2015).

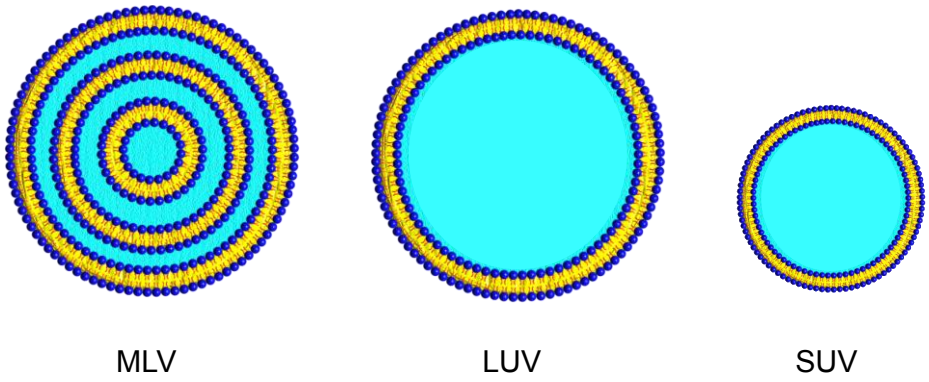

Figure 13 : *Classification des liposomes suivant leur lamellarité (Pandey et al. 2016).*

Le premier produit disponible sur le marché contenant des liposomes pour une application topique était « Capture » de chez Dior en 1986. De nos jours, des centaines de produits contiennent des liposomes. Les liposomes présentent de nombreux avantages pour une délivrance topique : ils sont biocompatibles, biodégradables, fournissent une libération modifiée de l'actif encapsulé et favorisent la stabilité de l'actif. Bien que l'utilisation de ce vecteur soit répandue dans le domaine de la cosmétique, il a été démontré que les liposomes conventionnels s'accumulent dans les couches cornéocytaires du *stratum corneum,* ne permettant pas un transport transdermique optimal (Honeywell-Nguyen *et al.* 2002). Par ailleurs, les liposomes présentent certains inconvénients comme une production à l'échelle industrielle délicate ou une instabilité physique et chimique provenant des phospholipides pouvant nécessiter leur lyophilisation. Une des solutions est l'utilisation non plus de phospholipides mais de surfactants de synthèse pour former la double couche.

2. Les Transferosomes et les Ethosomes

Les liposomes déformables, aussi appelés transferosomes, ont été développés pour contrer la rigidité des parois du liposome qui le rend fragile et peu disposé à diffuser. Les principaux constituants des transferosomes sont des phospholipides, des tensioactifs monocaténaires et de l'eau. Ces vésicules sont composées d'une bicouche lipidique unique avec une taille de 150 ± 50 nm en moyenne (Figure 14B).

L'ajout d'un tensioactif permet d'augmenter la déformabilité du vecteur menant à une meilleure pénétration dans la barrière cutanée (Cevc *et al.* 2002). Le mécanisme de promotion de la pénétration cutanée par les transferosomes implique de nombreux processus.

Enfin, afin d'obtenir une meilleure pénétration cutanée, des alcools ont été ajoutés à la formule de base des transfersomes menant à une nouvelle famille de vecteurs : les éthosomes (Figure 14D). La présence d'alcool permet d'améliorer le passage des vésicules en rendant les lipides

du *stratum corneum* plus fluides avec une organisation déstabilisée (Touitou *et al.* 2000).

3. Les Niosomes

Une autre génération de vésicules, les niosomes, est dotée non plus d'une bicouche phospholipidique mais d'une bicouche de surfactants non ioniques synthétiques. La stabilité des formulations de niosomes dépend de plusieurs facteurs comme leur méthode de préparation, la température de stockage, la nature de la substance active encapsulée, les tensioactifs introduits ainsi que les divers additifs incorporés. Les niosomes offrent certains avantages sur les liposomes. Notamment ces vésicules ne subissent pas de dégradations oxydatives (Figure 14C).

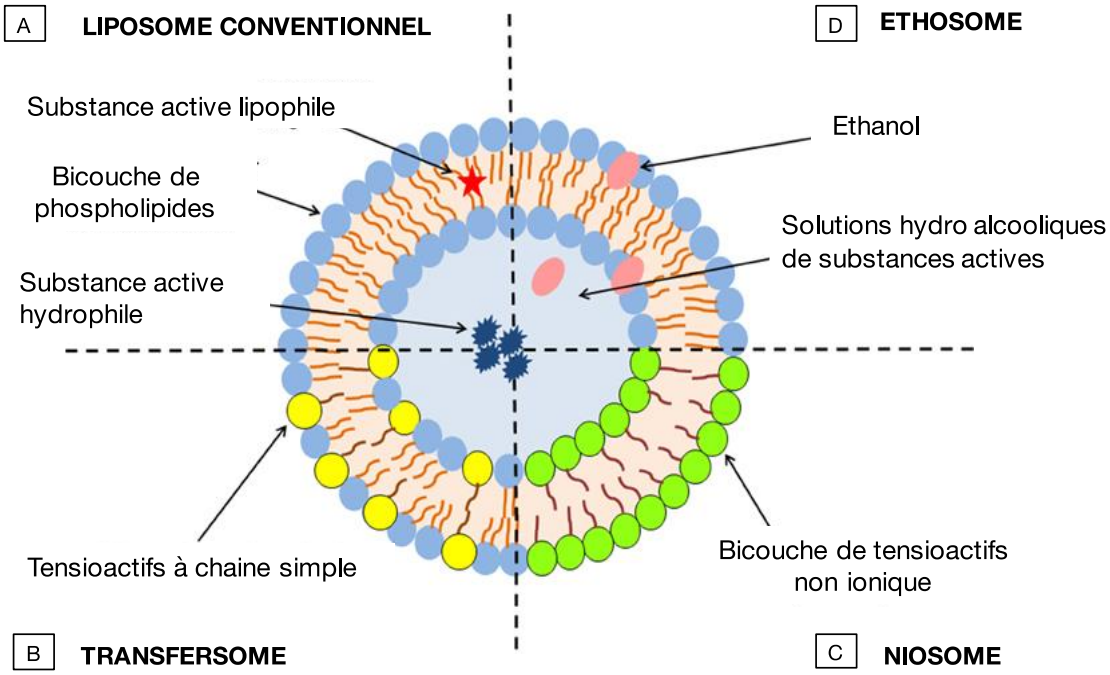

Figure 14 : *Représentation schématique de systèmes lipidiques. (A) Liposome conventionnel, (B) Transferosome, (C) Niosome et (D) Ethosome. Issu de (Hua 2015).*

D'autres vecteurs lipidiques ont été créés pour permettre une délivrance de substances actives par application topique. Ainsi à la différence des liposomes et leurs dérivés, de nouvelles nanoparticules structurées autour d'un cœur lipidique ont été décrites (Attama *et al.* 2012).

B. Les nanoparticules lipidiques

Outre les nanoémulsions lipidiques, les nanovecteurs dont le cœur est à base de lipides ont été mis au point plus récemment, à la fin des années 1990, et se retrouvent dans de nombreux produits cosmétiques et en essais cliniques pour le domaine pharmaceutique (Souto *et al.* 2008). Ils se distinguent des liposomes par leur cœur lipidique hydrophobe alors que ces

derniers ont un réservoir aqueux. En raison de la nature lipidique de la matrice, ces systèmes sont utilisés pour l'incorporation de composés très peu solubles dans l'eau.

1. Nanoémulsions lipidiques

Les nanoémulsions sont de très fines dispersions de gouttelettes d'un liquide (phase dispersée) dans un autre (phase dispersante) stabilisées par des tensioactifs. Les gouttelettes ont un diamètre moyen généralement inférieur à 100 nm. Toutefois, bien que la granulométrie très fine de ces systèmes leur confère une stabilité physique pendant le temps de stockage, ces systèmes ne peuvent incorporer que des principes actifs très lipophiles solubles dans les huiles constitutives de ces émulsions (huile de soja, d'olives) limitant ainsi leurs applications potentielles en pharmacie. En cosmétique, les nanoémulsions sont fréquemment utilisées car elles possèdent de remarquables propriétés sensorielles et biophysiques (pouvoir hydratant). Elles conduisent à une large variété de produits.

2. Nanoparticules lipidiques solides et nanoparticules lipidiques nanostructurées

A la différence des nanoémulsions, les nanoparticules lipidiques solides dites SLN *(Solid Lipid Nanoparticles*) ont un cœur lipidique solide à température ambiante (Figure 15). La matrice lipidique est formée de lipides parmi les mono-, di- et triglycérides, les acides gras, ou le cholestérol puis stabilisée par une monocouche de surfactant (Pardeike *et al.* 2009). La solidification du lipide permet d'obtenir un relargage prolongé des molécules encapsulées par diffusion. Cependant, la possible transformation polymorphique des lipides au cours du temps au sein des SLN peut conduire à l'expulsion de la substance active initialement encapsulée et à un taux d'encapsulation plus faible que pour les nanoémulsions. En cosmétologie, les SLN sont exploitées pour leurs propriétés d'adhésivité, d'occlusion et d'hydratation de la peau mais également pour l'administration et la protection de principes actifs comme le co-enzyme Q10 (Hua 2015), (Almeida *et al.* 2007).

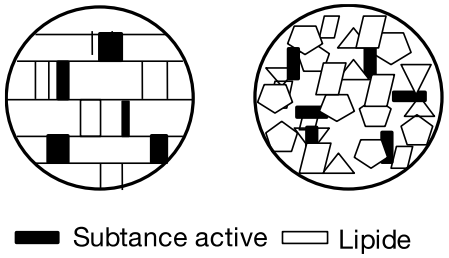

Figure 15 : *Représentation schématique des nanoparticules lipidiques solides (SLN) et des nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC).*

L'utilisation de lipides d'états différents (liquides et solides à température ambiante) lors du procédé de fabrication permet d'obtenir, à température ambiante, une matrice lipidique partiellement cristalline (Attamata *et al.* 2012). Ainsi, ces transporteurs lipidiques nanostructurés, appelés NLC (*Nanostructured Lipid Carriers*), ont pour avantage un taux d'encapsulation plus élevé comparé aux SLN (Figure 15). Les nombreuses imperfections présentes dans la matrice fournissent de l'espace à la substance active pour s'arranger sous forme moléculaire ou sous amas amorphe ce qui diminue les risques d'exclusion dans le temps (Souto *et al*. 2008). Dans le domaine cosmétique, de nombreuses préparations incorporant des SLN ou NLC ont été commercialisées ces dernières années : des crèmes à bases du coenzyme Q10, de vitamine E et de rétinol (vitamine A) notamment (Pardeike *et al.* 2009).

Bien que les nanoparticules lipidiques présentent de nombreux avantages, ces systèmes ne peuvent encapsuler que des substances actives lipophiles et non hydrophiles. Parallèlement, les vésicules lipidiques comme les liposomes et ses dérivés ont la capacité d'encapsuler des actifs hydrophiles et lipophiles. Bien que l'incorporation de molécules lipophiles au sein de la bicouche lipidique soit possible, les taux d'encapsulation restent peu élevés au risque de déstabiliser cette bicouche. Par conséquent, l'intérêt se porte vers des systèmes lipidiques auto-assemblés.

C. Les systèmes lipidiques auto-assemblés

1. Polymorphisme des lipides et mésophases

Il existe pour les lipides amphiphiles un état intermédiaire entre l'état solide et l'état liquide appelé cristal liquide. Cet état est caractérisé par des agencements moléculaires particuliers : ils sont plus ordonnés que dans un liquide mais moins structurés que dans un cristal. En présence d'eau, ces lipides vont spontanément former des phases de cristal liquide sous forme de structures auto-assemblées. Ces mésophases possèdent un polymorphisme important en fonction de la teneur en eau et de la température menant à différentes organisations structurales des lipides (Seddon 1990).

Comme exemple, la Figure 16 représente un diagramme des phases cristal liquide d'un amphiphile dispersé dans un solvant. Ce composé présente plusieurs transitions de phase comme la phase micellaire (L1), la phase hexagonale normale (H1), la phase cubique normale (Q1), la phase lamellaire ($L\alpha$), la phase cubique inverse (Q2), la phase hexagonale inverse (H2) et la phase micellaire inverse (L2).

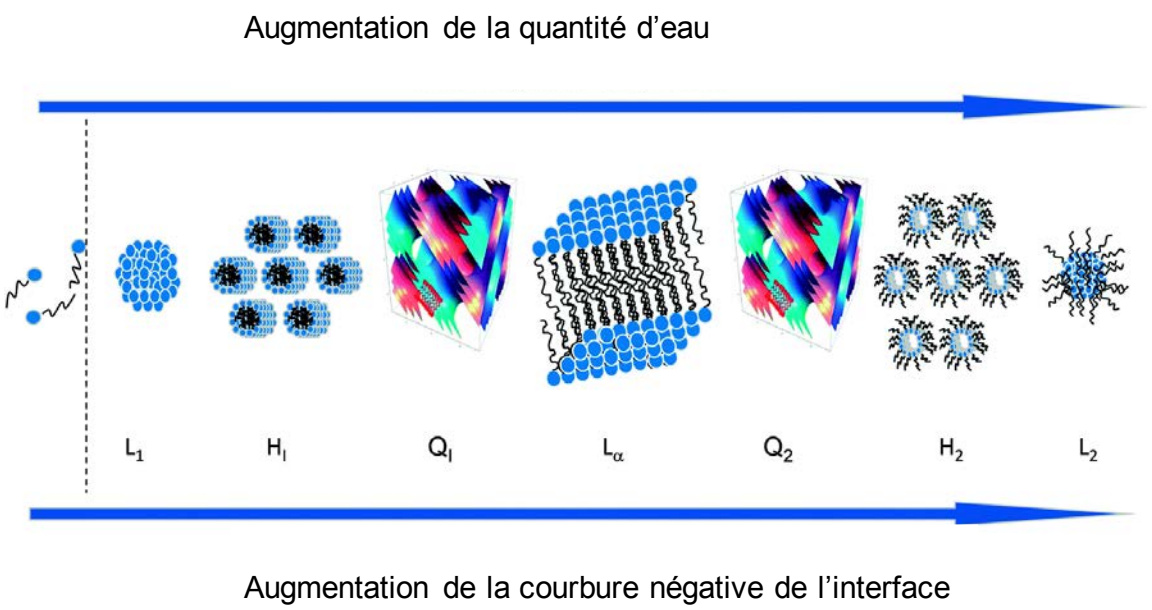

Figure 16 : *Diagramme des phases cristal liquide d'un amphiphile dispersé dans un solvant (Fong et al. 2015).*

2. La famille des ISAsomes

Les phases liquides cristal cubique et hexagonale peuvent être obtenues par simple mélange d'un lipide et d'une phase aqueuse par vortex. Après dispersion des cristaux en nanoparticules par excès d'eau en présence d'un stabilisant, ils forment des dispersions colloïdales stables (Spicer 2005).

Les dispersions stables de mésophases ont été dénommées ISAsomes pour *Internally Self-Assembled-somes* soit des particules ayant une structure interne auto-assemblée. Ainsi, la phase H2 devient une phase hexagonale inverse émulsifiée ou Hexosome et la phase Q2 devient une phase cubique inverse émulsifiée ou Cubosome (Azmi *et al.* 2015). Ces dispersions ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine du médicament (Blunk *et al.* 2006).

Les hexosomes sont composés de canaux d'eau circulaires, fermés sur eux-mêmes et organisés selon une matrice hexagonale. Ces domaines d'eau, isolés les uns des autres, ainsi que la phase continue constituent d'excellents réservoirs à molécules hydrosolubles. Boyd *et al*. ont montré qu'une série de molécules actives telles que l'irinotecan, le glucose ou encore l'histidine peuvent être incorporées dans les phases hexagonales (Boyd *et al.* 2006).

Les cubosomes sont composés tout comme les hexasomes de deux réseaux continus disjoints : la phase aqueuse et la phase huileuse. Ces objets sont compartimentés avec un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile. Ils sont isotropes (symétriques) et l'imbrication rend les compartiments dépendants l'un de l'autre.

3. Applications des mésophases pour la délivrance de médicaments

Les mésophases possèdent des domaines d'eau et d'huile finement dispersés. Ainsi, ces structures auto-assemblées peuvent accueillir des molécules de toutes solubilités qui peuvent s'intégrer dans l'eau, dans la partie lipophile ou aux interfaces (Figure 17).

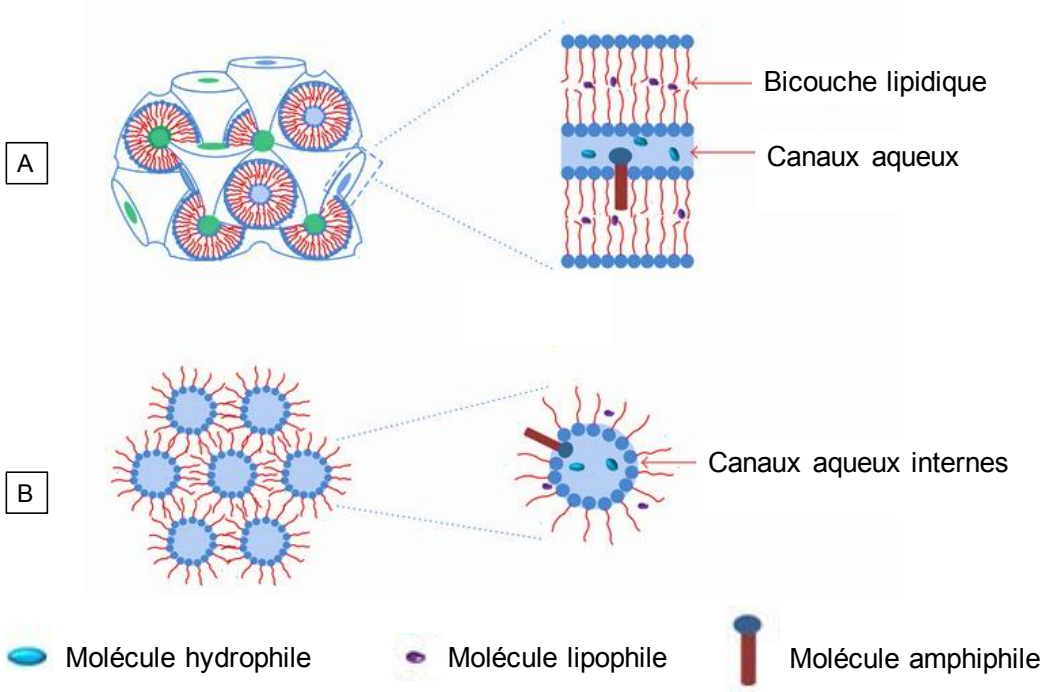

Figure 17 : *Structure schématique de la phase cubique (A) et la phase hexagonale (B) avec la localisation possible des molécules (Chen et al. 2014).*

La plupart des molécules en industrie pharmaceutique possèdent un caractère amphiphile et vont s'adsorber à l'interface eau/huile. Les phases cubiques fournissent une matrice de libération prolongée pour la molécule active. En effet, la structure en phase unique permet un chemin de diffusion tortueux pour les molécules actives permettant des libérations contrôlées. Des molécules actives de masse molaire et de solubilité différente ont démontré une libération retardée comme l'aspirine, la vitamine E, le metronidazole, la mélatonine, le pindolol ou l'insuline. Cette structure originale permet de protéger les peptides, les protéines et les acides nucléiques de dégradations chimiques et physiques. Lors d'une délivrance transdermique, les phases cubiques et les cubosomes amélioreraient la pénétration de composés actifs au travers de la peau.

IV. Systèmes lipidiques multicompartimentés anisotropes

Bien que de nombreux systèmes lipidiques soient disponibles pour encapsuler des molécules actives, tous présentent des inconvénients. Sur ce constat, de nouveaux systèmes lipidiques sont en développement dans le but de répondre davantage aux attentes. Ainsi les nanoparticules multi-compartimentées à architecture originale peuvent incorporer simultanément des principes actifs hydrosolubles et liposolubles : les nanoparticules *Janus.*

A. Les nanoparticules de type *Janus*

1. Introduction

Le terme « *Janus* » désigne dans la mythologie romaine un dieu à une tête mais deux visages opposés (Figure 18). Cette divinité symbolise toute espèce de transition d'un état à un autre, c'est entre autre le gardien des passages et des croisements.

Figure 18 : *Représentation du dieu romain « Janus ».*

Ce double visage est symbolique puisqu'il représente l'association des opposés tels que le passé et le futur, la création et la destruction.

Les particules dites *Janus* sont formées de deux parties distinctes qui sont différentes par la composition chimique et/ou la polarité pour chaque face. De façon générale, la forme la plus rencontrée pour ces particules dissymétriques est une sphère avec une moitié hydrophobe et une autre moitié hydrophile (Walther *et al.* 2007). Les particules peuvent se présenter également sous des formes différentes et variées telles que des disques, cylindres ou bâtonnets représentées par la Figure 19. D'autres formes plus complexes ont également été obtenues comme des particules en forme de gland (Perro *et al.* 2005) ou de bonhomme de neige (Chaturvedi *et al.* 2012).

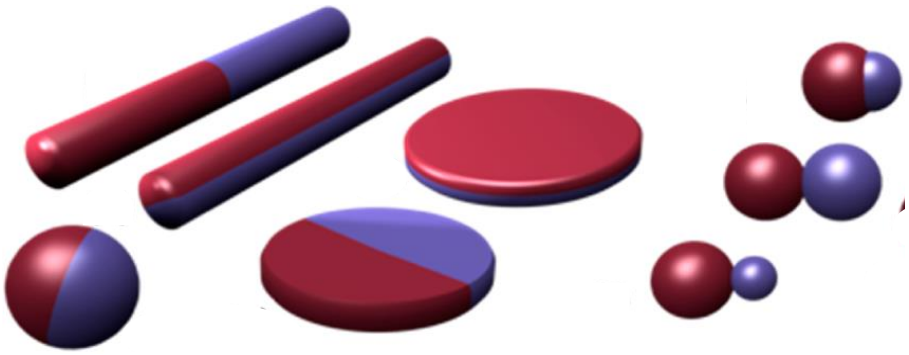

Figure 19 : *Représentation des différents types de géométries rencontrées pour les particules Janus.*

Les premières particules *Janus* ont été décrites par Cho *et al*. (Cho *et al*. 1985). Leurs travaux portaient sur des réseaux asymétriques de polystyrène et poly(méthacrylate de méthyle) obtenus à partir de polymérisation en émulsion. En 1988, Casagrande *et al.* ont décrit des particules sphériques avec une hémisphère hydrophile et une autre hydrophobe et ils étudièrent également leur comportement à l'interface eau/ huile (Casagrande *et al.* 1989).

2. Les différents types de nanoparticules *Janus*

A l'échelle macroscopique, il existe deux types de nanoparticules *Janus* : les « patchy » et les particules compartimentées représentées par la Figure 20. Les particules patchy sont définies comme des particules recouvertent en surface de patchs de natures variées tandis que les particules compartimentées sont définies comme des structures qui sont composées de domaines séparés constituant directement le cœur. Au sens strict du terme, les nanoparticules *Janus* sont composées en ratio 50 / 50 de deux parties distinctes que ce soit en surface, composition, chimique, polarité (Du *et al.* 2011).

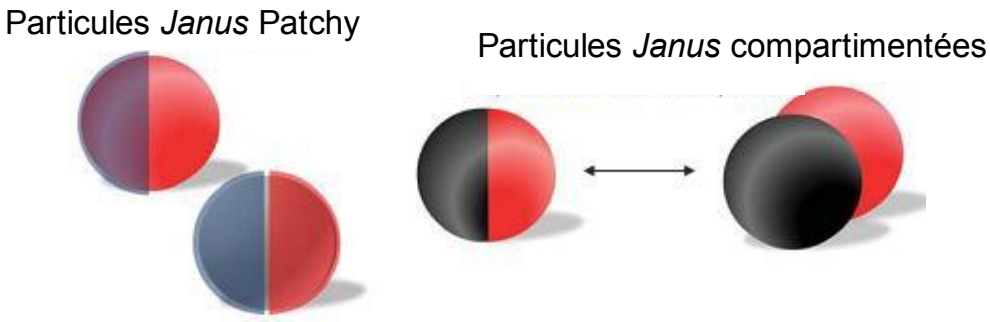

Figure 20 : *Structure des nanoparticules Janus (Tran et al. 2014).*

Ainsi, les particules *Janus* de part leurs asymétries fonctionnelles possèdent des propriétés intéressantes. Ces particules sont anisotropiques par leur chimie de surface et/ou en forme. En effet, la surface de chaque hémisphère est différente ; Si l'une est hydrophile, l'autre sera hydrophobe, de même, si l'une est chargée négativement, l'autre sera chargée positivement.

3. Matériaux

Les nanoparticules *Janus* peuvent être produites à partir de matériaux organiques (polymères, lipides…) ou inorganiques (métaux) selon la stratégie de synthèse. Les nanoparticules *Janus* en polymère peuvent être utilisées pour de larges applications puisque ces matériaux peuvent être préparés à la demande. Les matériaux inorganiques purs peuvent être facilement fonctionnalisés ce qui les rends très attrayants dans le domaine des sciences en bio-imagerie, diagnostique *in vivo*, thérapeutique et ciblage.

4. Stratégie de synthèse

Au début, les nanoparticules *Janus* étaient synthétisées en fractionnant des particules en plus petits fragments. Des particules hétérogènes étaient obtenues avec très peu de contrôle sur la forme, la taille et la pureté. Récemment, plusieurs méthodes de fabrication des nanoparticules *Janus* ont été développées selon trois modes de synthèse différents : le masquage, l'assemblage « bottom-up » et la séparation de phase contrôlée comme l'indique la Figure 21.

a) Le masquage

Cette technique consiste à réaliser une fonctionnalisation asymétrique d'une particule qui est à l'origine homogène en surface. Une partie de la surface de la particule est exposée, et va être modifiée par réaction chimique. L'autre partie reste intacte grâce à l'application d'un agent masquant durant la réaction chimique. Les nanoparticules sont piégées à l'interface entre deux fluides (émulsions de Pickering par exemple) (Liu *et al.* 2008), ou adsorbées sur une surface solide (Casagrande *et al.* 1989) (Lattuada *et al*. 2011). Il est facile de préparer des nanoparticules *Janus* par masquage puisqu'une large gamme de groupes fonctionnels est disponible pour modifier la surface des nanoparticules et les rendements sont généralement bons (Gu *et al.* 2005).

b) L'assemblage « bottom-up »

Cette méthode de fabrication des nanoparticules *Janus* permet par un auto assemblage de bloc de copolymère ou par assemblage de particules préformées d'obtenir spontanément des particules *Janus* de composition et forme variées (Gu *et al.* 2005). En premier, la synthèse des copolymères est réalisée dans un solvant. Lors du changement de solvant, l'auto-assemblage de di-blocs de copolymère s'organise autour d'un cœur de polymère. Ce cœur est obtenu en mélangeant deux copolymères AB et CD dont l'affinité de deux segments (A et C) permet l'auto-assemblage. La co-micellisation et la séparation de phase des blocs à la surface sont des paramètres importants pour l'obtention des nanoparticules *Janus* (Tran *et al.* 2014).

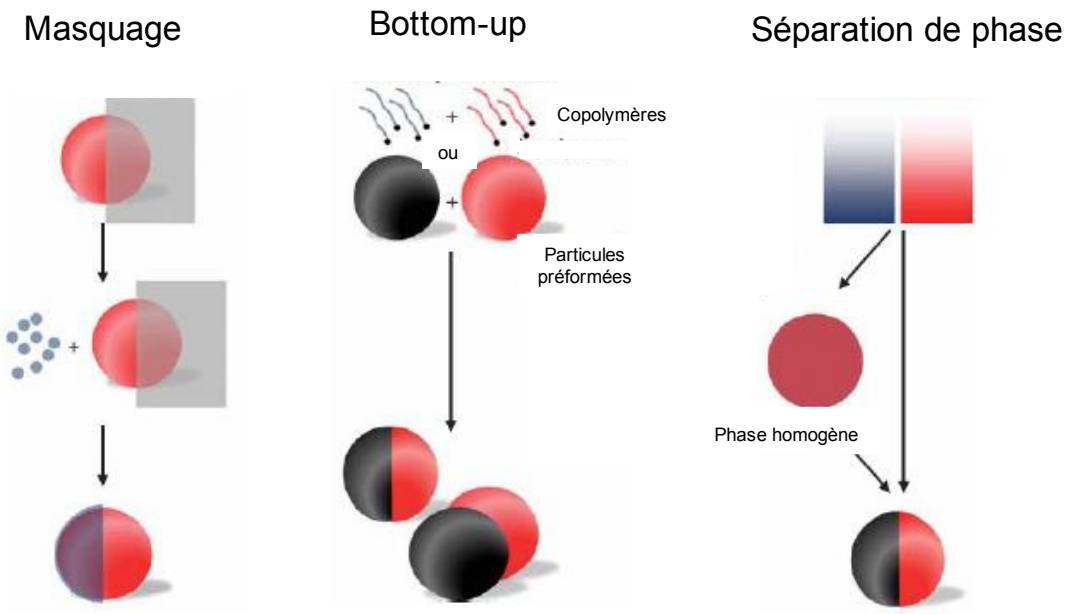

Figure 21 : *Méthodes d'obtention des nanoparticules Janus (Tran et al. 2014).*

c) La séparation de phase

Pour cette méthode de préparation, des matériaux incompatibles sont mélangés afin d'obtenir un mélange homogène. L'élimination du solvant, par exemple par évaporation, va déclencher la séparation de phase qui mène à l'obtention de deux compartiments liés entre eux, formant ainsi les nanoparticules *Janus* (Romanski *et al*. 2012). Les matériaux utilisés peuvent être tous deux inorganiques, ou organiques ou encore il peut s'agir d'un mélange organique / inorganique. Cette technique semble être la plus simple mais il est nécessaire de bien connaître la thermodynamique et les cinétiques lors de la séparation de phase, mais aussi les propriétés physico-chimiques des composants seuls et en mélange. Tel que résumé par Walther et Muller dans le cas des polymères, un haut poids moléculaire, une haute incompatibilité des deux constituants et une faible tension interfaciale à l'interface solvant/eau sont les paramètres les plus critiques pour obtenir des nanoparticules *Janus* avec des compartiments symétriques (Walther *et al.* 2013).

5. Applications à la délivrance de médicaments

Les objets *Janus* ne proviennent pas en premier lieu du domaine des nanotechnologies. Les comprimés bicouches sont des formes pharmaceutiques de type *Janus* déjà présentent sur le marché pharmaceutique. De tels comprimés asymétriques sont utilisés pour contrôler la cinétique de libération d'une ou des deux substances actives différentes. Cette forme permet également de séparer les substances actives incompatibles ou bien encore de donner des propriétés spécifiques à seulement un coté du comprimé (propriété adhésive, gonflement osmotique …).

Les nanoparticules *Janus* sont des particules colloïdales très intéressantes avec des nombreuses perspectives possibles en recherche. La bi-fonctionnalité des particules permet d'augmenter la capacité d'encapsulation des différents matériaux qui les composent. De plus, les nanoparticules *Janus* sont dotées de propriétés pouvant aboutir à de vastes possibilités d'utilisation dans le domaine des nanotechnologies. Principalement quatre applications ont été envisagées pour les nanoparticules *Janus* dans le cadre de la délivrance de médicaments.

En première intention, elles peuvent être utilisées pour encapsuler des molécules actives de propriétés physico-chimiques opposées. Xie *et al* ont formulé des nanoparticules *Janus* biocompatibles formées de polymère poly(acide lactique-co-glycolique) ou PLGA. Ces particules ont la capacité de contenir deux molécules différentes d'anticancéreux, une hydrophobe (le paclitaxel) et l'autre hydrophile (la doxorubicine) (Xie *et al.* 2012). Cette co-administration de substances actives permet également d'utiliser l'effet synergique que peuvent avoir deux molécules actives. Ainsi, Sun *et al.* ont développés un système micellaire biodégradable se rapprochant des nanoparticules *Janus* afin de libérer dans une même cellule tumorale la molécule active et un ARNsi. Ce système innovant « deux en un » est capable de libérer simultanément l'ARNsi et le paclitaxel à la même cellule tumorale *in vitro* et *in vivo* (Sun *et al.* 2011).

En jouant sur la nature physico-chimique des deux compartiments, il est également envisageable de moduler les cinétiques de libération. Ainsi Hwang *et al.* ont ciblé différentes zones de libération d'une substance active en fonction du pH optimal de dégradation (Hwang *et al.* 2012).

De nombreux ligands sont utilisés dans la littérature pour cibler plus spécifiquement tel organe ou cellule par les particules colloïdales. Selon Djohari et Dormidontova, les nanoparticules de type *Janus* pourraient être une alternative intéressante pour produire des nanovecteurs avec une efficacité de ciblage supérieure aux particules classiques *(*Djohari *et al.* 2009).

Enfin, les nanoparticules *Janus* peuvent être utilisées dans le domaine du théranostique. Il est possible de charger un agent diagnostique dans un hémisphère et un agent thérapeutique dans l'autre pour obtenir la double action.

V. Le système *Janus* développé au laboratoire

A. Généralités de l'invention

La morphologie des nanoparticules *Janus* développées par l'équipe de physico-chimie des systèmes polyphasés de l'UMR CNRS 8612 est représentée sur les Figures 22 et 23. Les images obtenues par microscopie électronique à transmission cryoscopique (cryo-TEM) dévoilent la juxtaposition d'un compartiment lipidique hydrophobe (sombre) et d'un compartiment aqueux hydrophile (claire) délimité par une bicouche à base de phospholipides et de tensioactifs polyoxyéthylénés. En d'autres termes, ces particules à l'architecture originale résultent de l'association d'une gouttelette huileuse et d'une structure vésiculaire.

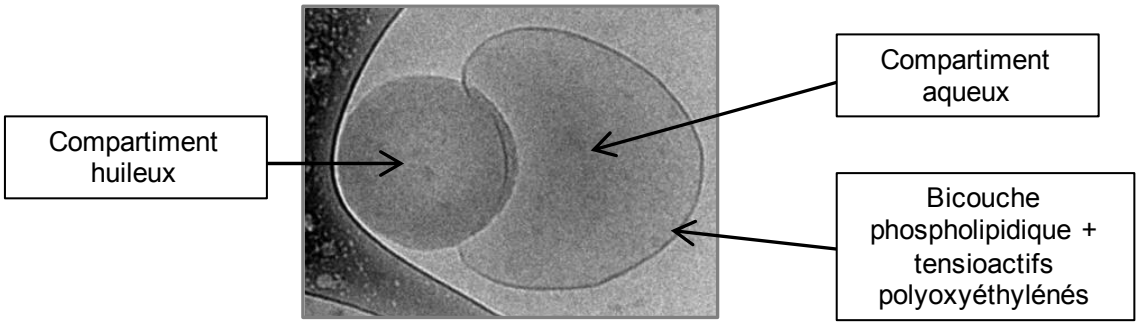

Figure 22 : *Morphologie des nanoparticules Janus compartimentées observées par microscopie électronique à transmission cryoscopique.*

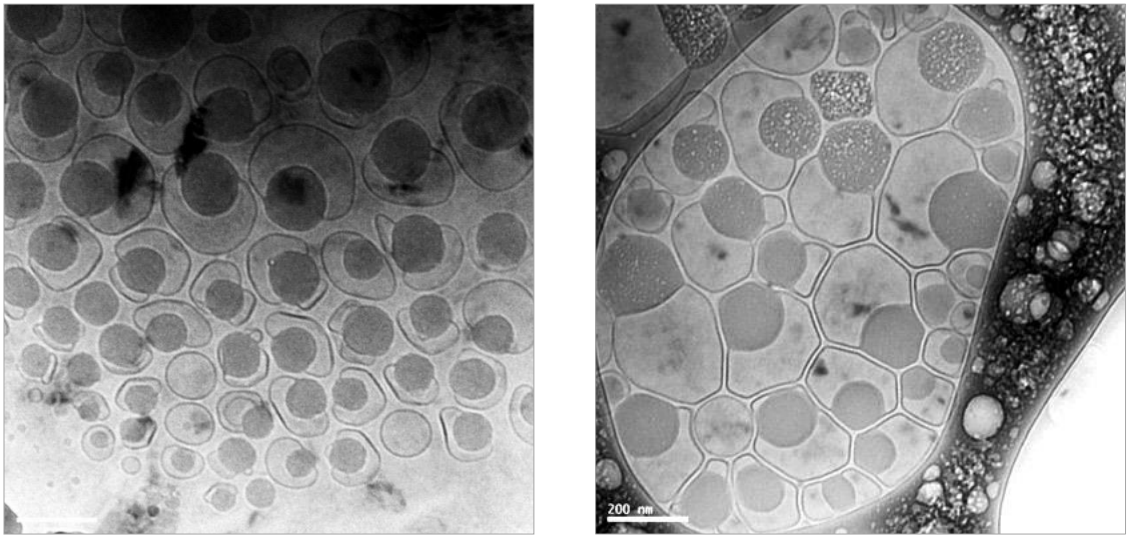

Figure 23 : *Morphologie des nanoparticules Janus compartimentées observées par microscopie électronique à transmission cryoscopique.*

La stabilité physique de ce système en suspension dans l'eau est de plus de 20 mois à température ambiante et la composition est détaillée dans le Tableau III. La fabrication des

nanoparticules *Janus* nécessite la présence de phospholipides et de diesters de polyéthylène glycol (Gélucire 50/13®) dans la phase aqueuse. Après l'ajout de la phase lipidique facilement dispersible, la nanosuspension subit plusieurs passages dans un homogénéisateur haute pression à chaud.

Tableau III : *Formule de base des nanoparticules multi-compartimentées Janus développées au laboratoire avec la description des composants, leur proportion et leur rôle.*

Phase	Composant	Proportion (%)	Rôle
Aqueuse	Eau	77	Phase dispersante
	Gélucire 50/13®	2	Surfactant hydrophile
	Phospholipon 90G®	1	Co-surfactant
Huileuse	Labrafil 1944® ou 2125®	20	Phase lipidique

Ces nanoparticules *Janus* sont un outil potentiellement très intéressant du point de vue pharmaceutique et biomédical. En effet, ce vecteur a le potentiel de co-véhiculer des substances actives aux solubilités opposées (Tran *et al.* 2014). Par exemple, il peut s'agir aussi bien de deux principes actifs thérapeutiques complémentaires ou encore d'un agent d'imagerie ou de diagnostic et un médicament. Pour des applications cosmétiques, des travaux antérieurs ont démontré la possibilité d'incorporer ces nanoparticules *Janus* dans un gel de Carbopol® sans en modifier ni leur taille, ni leur morphologie pendant plus de 5 mois. De plus, les nanoparticules *Janus* sont non irritantes (histologie, MTT) pour la peau et permettent une amélioration de la pénétration et de la diffusion de la molécule active encapsulée (chloroxylénol). Un agent antioxydant puissant, la quercétine, a également été encapsulé avec succès dans le compartiment lipidique des nanoparticules *Janus*. Ensuite, par application sur un explant de peau, l'action antioxydante et protectrice contre les UVA des nanoparticules *Janus* chargées en quercétine a été confirmée (Saindou *et al.* 2014).

B. Les contraintes industrielles pour la fabrication de particules *Janus*

Les nanoparticules lipidiques sont largement répandues dans l'industrie cosmétique. Incorporée dans une crème, cette technologie est déjà utilisée pour encapsuler des vitamines comme la vitamine E (tocophérol) et la vitamine A (rétinol), des agents antioxydants comme la coenzyme Q10, ou des agents protecteurs UV (Hua 2015). Cependant, le développement à l'échelle industrielle de nouveaux systèmes innovants tels que les nanoparticules *Janus* reste difficile et se confronte à quelques contraintes.

1. Procédés transposables à l'échelle industrielle

L'un des pré-requis lors du développement d'un nouveau vecteur est l'existence d'un procédé de fabrication permettant une production à grande échelle en vue à terme de sa mise sur le marché. Ce procédé doit être qualifié et validé puis accepté par les autorités pour envisager un passage de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. Pour la fabrication des nanoparticules *Janus*, le procédé d'homogénéisation haute pression (HHP) à chaud est utilisé (Figure 24). Cette technique de fabrication est utilisée depuis longtemps dans le domaine agroalimentaire et cosmétique mais aussi en pharmaceutique pour la production de nanoémulsions lipidiques injectables pour la nutrition parentérale (Intralipid®, Lipofundin®).

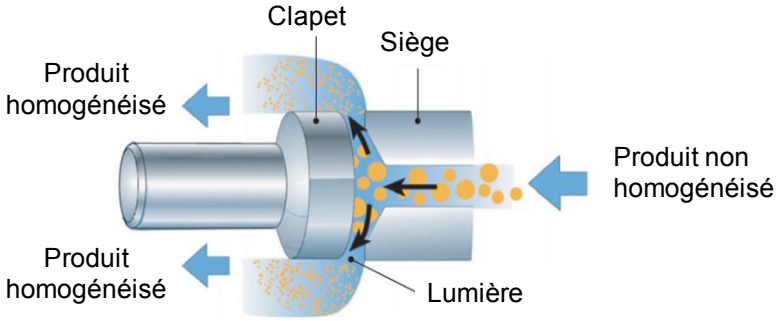

Figure 24 : *Schéma de la partie centrale d'un homogénéisateur à haute pression avec la valve où la fragmentation en gouttelettes très fines a lieu.*

Cependant, bien que ce procédé présente de nombreux avantages, la préparation de nanoparticules *Janus* reste très difficile en raison de leur architecture complexe. En effet, lors de la transposition d'échelle, certains paramètres deviennent primordiaux à contrôler pour leur formation et d'autres peuvent apparaitre. Le couple pression / contre-pression ou la température du module de l'homogénéisateur sont par exemple des paramètres qui pourraient impacter la formation des nanoparticules *Janus*. De plus, bien que ce procédé permette une production en cycle continu, le nombre de passage de la suspension au sein de l'homogénéisateur sera à étudier pour ne pas avoir une production trop longue.

2. Stabilité physique des nanoparticules *Janus*

La stabilité est exprimée comme la capacité d'une substance active ou d'un produit fini à rester dans les spécifications bien établies d'identité, de qualité, de pureté dans une période définie (FDA 1998). Le suivi de la stabilité chimique et physique des vecteurs lipidiques sur le long terme est un paramètre clé pour leur mise sur le marché. En général, le vecteur et la substance active doivent rester stables pendant la fabrication, le transport, le stockage et la distribution. Les instabilités se manifestent entre autres par une altération de la taille des particules en raison de fusions et d'agrégations. De ce fait, les caractéristiques optiques, la viscosité et les changements physiques tels que le crémage ou la sédimentation de la formulation sont

importants à étudier pendant son stockage. Le produit peut être soumis à différentes conditions de température, luminosité, humidité. En ce qui concerne la température, l'objectif sera d'évaluer la stabilité physique des nanoparticules *Janus* à trois valeurs de température de conservation différentes : + 4°C, température ambiante et + 40°C.

3. Stabilité microbiologique des nanoparticules *Janus*

Un produit cosmétique se compose en général d'une phase aqueuse, d'émulsionnants, de composés actifs et d'additifs. Les additifs sont ajoutés au produit pour permettre sa conservation et contrer les nombreuses instabilités auxquels il peut être soumis durant son cycle de vie. Les produits à forte teneur en eau (phase aqueuse continue) constituent un milieu riche en nutriments et propice au développement des micro-organismes (Brannan *et al.* 1995). L'incorporation d'un conservateur dans la formulation est alors primordiale pour protéger le produit des contaminations microbiennes.

Ces contaminations peuvent être apportées lors de la production par :

- Les matières premières (principes actifs, eau…)
- Les articles de conditionnement
- L'atmosphère des locaux
- Le personnel

Le conservateur peut être utilisé seul ou en mélange avec d'autres conservateurs pour élargir le spectre d'activité antimicrobien (Orth 2006). Les conservateurs sont fréquemment introduits sous la forme de sel plutôt que sous leur forme acide pour faciliter leur solubilisation.

Le rapport de sécurité du produit cosmétique doit comporter les spécifications microbiologiques du produit, ainsi que les résultats du *challenge test* pour la conservation. Le *challenge test* permet d'évaluer l'efficacité du conservateur face à une contamination volontaire et artificielle par des micro-organismes de référence. Ce test a pour but d'analyser si les produits mis à disposition du consommateur ne présentent pas de risques particuliers. Cet essai d'efficacité doit être effectué :

- A la conception du produit pour sélectionner le système le plus efficace.
- Lors de l'étude de stabilité afin de s'assurer de son efficacité à la date de péremption du produit.
- A chaque changement d'un élément de la formulation ou du conditionnement.

Au vue de cette réglementation, l'incorporation de différents conservateurs au sein de la formule initiale des nanoparticules *Janus* sera réalisée parmi lesquels le benzoate de sodium,

le sorbate de potassium et le sodium salicylate. L'ajout de ces conservateurs, seuls ou en mélange, à des concentrations différentes peut avoir un impact sur la formation et la stabilité physique des nanoparticules *Janus*.

4. Le *sourcing* fournisseur pour les matières premières

Lors du développement d'un produit il est prudent d'identifier plusieurs solutions matières premières, et plusieurs fournisseurs pour les solutions choisies. Cela permet de répondre rapidement à toute urgence telle qu'un problème d'approvisionnement de matières premières ou une évolution de leur prix. Les excipients contenus dans les nanoparticules *Janus* (glycérides, polyoxylglycérides et phospholipides) sont actuellement largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire et acceptés par les autorités. La proportion et la nature de chacun participe à la création du système et sa stabilité. Des travaux antérieurs ont montré qu'il était possible de remplacer le Gélucire 50/13® et le Phospholipon 90G® par des produits analogues provenant de fournisseurs différents. Dans le cadre de ce projet, cette substitution sera explorée pour les Labrafils constituants la phase lipidique. En effet, pour des problématiques de concurrence sur le marché, il est nécessaire d'identifier un fournisseur alternatif capable de fournir une matière première équivalente au Labrafil 1944® utilisé dans la formule initiale. Ce changement d'excipient peut avoir un impact sur la formation et la stabilité physique des nanoparticules *Janus* et sera étudié.

Partie II

Approche Expérimentale

I. Introduction

Le but de cette partie expérimentale est de produire des nanoparticules compartimentées *Janus* (JNP) stables dans le temps pour des applications cosmétiques.

La première étape du travail expérimental consiste à formuler les nanoparticules *Janus* par le procédé d'homogénéisation haute pression à chaud puis à les caractériser. L'analyse de taille et le suivi de la stabilité physique des nanoparticules ont été réalisés par la technique de diffusion quasi-élastique de la lumière et l'analyse morphologique a été effectuée par microscopie électronique par cryo-transmission.

La seconde étape s'intéresse à étudier l'impact sur la stabilité physique des nanoparticules de l'intégration de nouveaux excipients tels qu'un système tampon, un conservateur. Des analyses par diffraction des rayons X ont permis d'étudier à plus petite échelle l'influence de ces composés sur la stabilité des bicouches phospholipidiques. Des mesures de tensions interfaciales ont été menées pour améliorer la stabilité du système conservé à 40°C. Enfin, la dernière étape consistait à incorporer un tripeptide hydrophile biotinylé ayant la capacité d'activer le renouvellement cellulaire dans les nanoparticules compartimentées *Janus.*

II. Matériels

Le Labrafil 1944® (oleoyl polyoxyl-6 glycérides) et le Gélucire 50/13® (stéaroyl polyoxyl-32 glycérides) proviennent de chez Gattefossé (Saint-Priest, France). Le Phospholipon 90G® (phosphatidylcholine de soja) est commercialisé par Lipoid (Köln, Allemagne). Le Dubcare GPE AB® (oleoyl polyoxyl-6 glycérides), le Dubcare Olga SF® (oleoyl polyoxyl-6 glycérides) et le Dub O Peg 8V® (PEG-8 oléate) sont fournis par Stéarinerie Dubois (Boulogne-Billancourt, France). L'huile de noyau d'abricot est fournie par la société Croda. L'acide citrique, le citrate trisodique, le sorbate de potassium, le benzoate de sodium ainsi que le Microcare SBS® (salicylate de sodium et benzoate de sodium) sont fournis par Sederma (Le Perray-en-Yvelines, France). L'eau est purifiée par un système Milli-Q (Millipore, France).

III. Méthodes

A. Fabrication des nanodispersions par le procédé d'homogénéisation haute pression à chaud

1. Principe de l'homogénéisation Haute Pression (HHP)

L'émulsion primaire est préparée par fragmentation des gouttes d'huile dans l'eau par agitation à l'ultra turrax (Figure 25). L'axe de cet appareil comporte deux pièces, un stator et un rotor, qui sont deux cylindres concentriques séparés par un entrefer. L'extrémité de ces deux pièces comporte des indentations de forme carrée permettant la circulation du fluide. L'appareil est équipé d'un moteur permettant le mouvement du rotor à différents régimes aboutissant à un écoulement turbulent qui fragmente les gouttes.

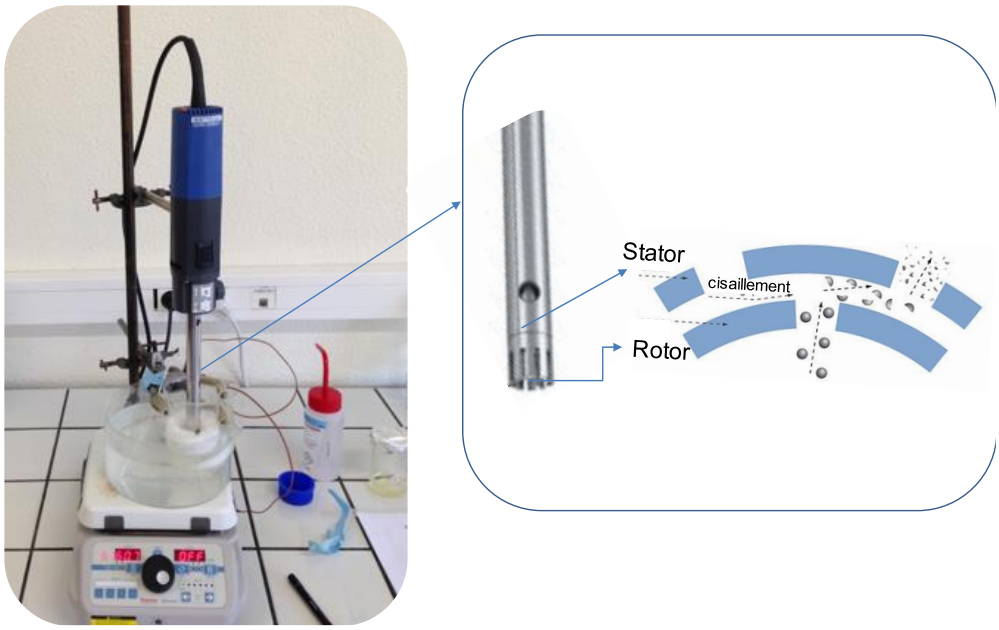

Figure 25 : *Fragmentation des gouttes d'huile dans l'eau par agitation à l'ultra turrax T25.*

La pré-émulsion subit ensuite l'action d'un homogénéisateur haute pression à chaud. L'appareil utilisé est un homogénéisateur à deux étages, c'est-à-dire doté de deux têtes d'homogénéisation montées en cascade illustré par la Figure 26 (APV 2000, Invensys, Albertslund, Danemark). Le liquide introduit dans l'appareil est projeté à haute pression à travers l'orifice étroit de la tête d'homogénéisation. Ainsi, le fluide s'accélère à une grande vitesse sur une très courte distance menant à la formation de gouttelettes micronisées. Le mécanisme de réduction de taille des éléments dispersés est dû à plusieurs phénomènes dont la contrainte de cisaillement et les forces de cavitation. Ce procédé est déjà transposé dans l'industrie.

Le second étage d'homogénéisation permet d'éviter la formation de regroupements de gouttelettes micronisées et permet de mettre en œuvre une contre-pression qui accroît l'effet des ondes de chocs générées dans le premier étage. Le système est également équipé d'un système de chauffage.

Figure 26 : *Homogénéisateur haute pression à chaud utilisé au laboratoire.*

2. Protocole de fabrication

La majorité des lots sont préparés suivant le protocole standard en trois étapes décrit ci-dessous (Figure 27).

1. Emulsification

La phase aqueuse composée de Gélucire 50/13® à 2% (m/m), de Phospholipon 90G® à 1% (m/m) et d'eau milli-Q est mise à chauffer à environ 55°C pendant 10 min au bain-marie. Pour les préparations contenant le principe actif, le tripeptide a été dissout préalablement dans 3 mL d'eau purifiée de la phase aqueuse. A la même température, cette suspension de tensioactifs est dispersée sous agitation mécanique à l'ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel GMBH & Co.KG, IKA®-Labotechnik, Allemagne) à la vitesse de 11000 rpm pendant 5 min. Parallèlement, la phase lipidique à 20% (m/m) est mise à chauffer à environ 55°C au bain marie. Ensuite, le mélange lipidique est ajouté en filet à la phase aqueuse et agité par ultra-turrax à la vitesse de 15000 rpm pendant 5 min, pour obtenir une pré-émulsion (H/E).

2. Diminution et homogénéisation de la taille des particules par HHP

La pré-émulsion obtenue est rapidement introduite dans l'homogénéisateur à deux étages chauffé au préalable à 55°C (APV 2000, Invensys, Albertslund, Danemark). Elle y subit plusieurs cycles d'homogénéisation continue pendant 5 minutes, sous un double effet de pression (la pression du 1er étage est de 600 bars et celle du 2nd est de 60 bars), pour former une nanoémulsion (H/E) à chaud.

3. Refroidissement des particules

La formulation est stockée dans un flacon de verre et mise à refroidir à température ambiante. Les nanodispersions ont été ensuite maintenues à température ambiante, 4°C et 40°C pour l'étude de leur stabilité.

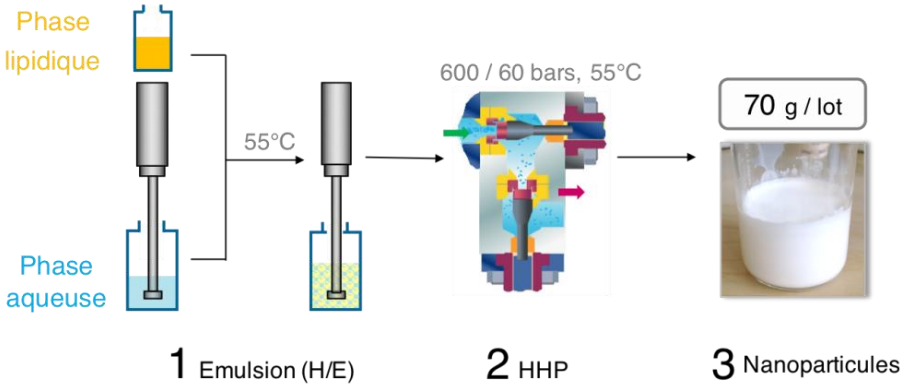

Figure 27 : *Protocole de préparation des nanoparticules multi-compartimentées Janus selon les trois étapes suivantes: (1) Emulsification par ultra-turrax à 55°C, (2) Réduction de taille par homogénéisation haute pression à la même température, (3) Refroidissement à température ambiante.*

3. Paramètres explorés

Au cours de ce stage, des changements de paramètres procédés sont effectués en raison du changement d'échelle sur la quantité de lot produit (70 g, 320 g ou 1 kg) mais aussi pour étudier leur impact sur la stabilité des nanoparticules obtenues (Tableau IV).

Tableau IV : *Description des paramètres modifiés lors de la fabrication des nanoparticules et leur plage de variation*

Paramètres modifiés	Gamme
Quantité de lot produit	70 g – 1 kg
Durée de chauffe de la phase aqueuse	10 – 20 min
Durée de l'agitation mécanique	5 – 20 min
Température du bain marie de l'émulsion	55°C – 60°C
Module d'agitation mécanique	Modules T18 – S50N
Température de l'homogénéisateur	Ambiante – 60°C
Contre Pression de l'homogénéisateur	60 – 200 bars
Nombre de cycles d'homogénéisation	3 – 15 cycles

Certains de ces paramètres ne seront pas commentés dans ce manuscrit.

B. Evaluation des propriétés physico-chimiques des nanodispersions

1. Mesure de la distribution de taille des nanoparticules *Janus*

La taille des nanoparticules *janus* a été étudiée grâce à la technique de diffusion dynamique de la lumière.

a) Principe

Le principe de la diffusion dynamique de la lumière repose sur l'interprétation des variations d'intensité de la lumière diffusée lors de son interaction avec les particules, elles-mêmes soumise au mouvement Brownien. L'interprétation de ces variations se fait par le biais d'une fonction de corrélation, et sachant que le coefficient de diffusion des particules (D) peut être relié à leur taille grâce à l'équation de Stockes-Einstein (Équation 1).

$$\boldsymbol{R_h = \frac{k_B\, T}{6\pi\eta D}}$$

avec R_h, le rayon hydrodynamique, k_B la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité.

Les grosses particules bougeant lentement, l'intensité du faisceau diffusé fluctuera lentement, et inversement. Il est alors possible d'obtenir une distribution de taille en intensité. Le diamètre obtenu est le diamètre hydrodynamique.

b) Dispositif expérimental

La distribution de taille des particules des nanodispersions issues des différentes expériences est mesurée avec un appareil Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Orsay, France) collectant l'intensité de la lumière diffusée à un angle de 90° par rapport au faisceau incident. Les analyses ont été réalisées à 25°C après un temps de mise à l'équilibre thermique des échantillons de deux minutes et les échantillons sont dilués au 1/300e dans de l'eau Milli-Q pour assurer des conditions de mouvement brownien des particules. Ainsi, le diamètre moyen hydrodynamique des particules et l'indice de polydispersité (PdI) sont déterminés en utilisant la diffusion quasi-élastique de la lumière. Chaque analyse est le résultat de trois mesures consécutives, effectuées en plaçant l'échantillon dans une cuvette de 1 cm de chemin optique. Faute de temps et pour limiter la consommation de matières premières, un seul lot a été fabriqué pour la majorité des conditions expérimentales. Toutefois, différents travaux antérieurs ont montré la bonne reproductibilité du procédé. Ainsi la variation de diamètre est inférieure à 1,5 % pour trois lots préparés successivement dans les mêmes conditions.

2. Structure des nanoparticules

Suite à la préparation, la présence de nanoparticules *Janus* est confirmée par microscopie électronique à transmission cryoscopique (JEM2100, JEOL, Japon). Cette technique de microscopie électronique à froid est utilisée pour analyser directement les ultrastructures et l'organisation interne des nanoparticules.

a) Principe

La microscopie électronique en transmission (MET) est proche dans son principe de la microscopie optique. Il existe une certaine analogie entre la MET et le microscope optique à lumière directe.

C'est le rayonnement utilisé qui diffère principalement dans les deux cas :

- Le microscope optique utilise comme rayonnement des photons (lumière extérieure). Un système de lentilles optiques permet de dévier ou focaliser le rayon lumineux qui traverse un échantillon "relativement fin". L'image obtenue se forme directement sur la rétine de l'observateur.
- Le MET utilise, lui, comme rayonnement des électrons. Un système de lentilles magnétiques permet de dévier ou focaliser le faisceau d'électrons sur un échantillon "extrêmement fin". L'image (ou cliché de diffraction) obtenue peut être vue sur un écran fluorescent, enregistrée sur un film photographique ou bien détectée par un capteur CCD (*Charge-Coupled Device*).

La différence majeure entre la cryo-MET et la MET tient dans la préparation des échantillons. En effet, ils peuvent être détériorés par la déshydratation et la fixation des sels de métaux dans la MET. Ces étapes sont évitées dans la cryo-MET qui utilise des méthodes de préparation qui ne détériorent pas l'échantillon. En effet les objets d'intérêts se retrouvent figés dans leur état initial au sein de la matrice solide vitrifiée. En cryo-MET, l'échantillon est visualisé directement à l'état hydrate congelé (Kuntsche *et al*. 2011).

b) Dispositif expérimental

Les nanodispersions lipidiques sont diluées dans l'eau Milli-Q au 1/40e (v/v). Ensuite, 5 µl d'échantillon sont placés sur une grille de cuivre et l'excès de solution est retiré avec un papier absorbant. La vitrification du film d'échantillon est réalisée en plongeant brutalement la grille dans de l'éthane liquide. Cet état vitreux correspond à un état amorphe métastable de l'eau et évite la formation de glace cristalline, opaque aux électrons. Le support technique utilisé est appelé une guillotine ou un plongeur. Ce dispositif se compose d'une cuve comprenant un récipient rempli d'éthane liquide et un support de réceptacle à grilles, la cuve étant remplie

d'azote de façon à recouvrir le support et affleurer le récipient d'éthane (Figure 28).

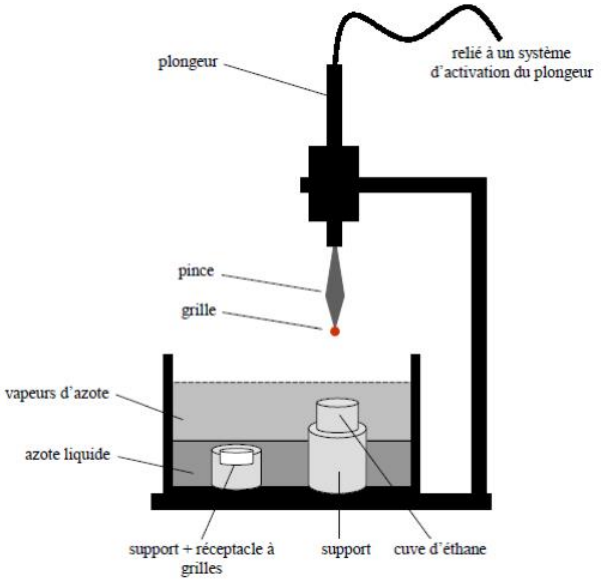

Figure 28 : *Schéma illustrant le principe d'une guillotine à déclenchement manuel (Kuntsche et al. 2011).*

Pendant le transfert sous le microscope et l'observation, la température de l'échantillon est gardée à -80°C pour empêcher le réchauffement de l'échantillon et la formation de cristaux de glace. L'ensemble des manipulations a donc lieu sous azote liquide ou sous vapeurs d'azote.

3. Diffraction des Rayons X

La diffraction des rayons X est une technique de choix pour l'identification des différentes structures et formes polymorphiques présentes dans des composés purs, des mélanges ou dans des produits finis.

a) Principe

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde λ est de l'ordre de l'Angström. Ils permettent l'étude de motifs de répétition dont les dimensions sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde (λ). Lorsque les photons X rencontrent les électrons des atomes constituant le matériau qu'ils traversent, ils sont déviés de leur trajectoire incidente dans toutes les directions de l'espace produisant un rayonnement diffusé de faible intensité. Toutefois, lorsque les atomes ou molécules possèdent une organisation dans l'espace, si la condition de Bragg est satisfaite, la diffusion à un angle égal à l'angle d'incidence s'effectue sous forme d'interférences constructives, donc avec une intensité beaucoup plus importante. Pour que la condition de Bragg soit remplie, il faut que la différence entre les chemins optiques parcourus par deux ondes réfléchies par des atomes ou molécules situés sur des plans

parallèles et équidistants (distance entre plan réticulaire d), soit égale à un nombre entier (n) de fois la longueur d'onde du rayonnement :

$$2d \sin \theta = n \lambda \text{ (Loi de Bragg)}$$

La relation de Bragg permet de relier, la distance réticulaire d (en Å) d'une famille de plans et la longueur d'onde λ des rayons X, à l'angle de réflexion θ (en degré) du faisceau sur ces plans ; n est un nombre entier représentant l'ordre de la réflexion. L'ordre 1 (n = 1) détermine la distance réticulaire entre deux plans consécutifs et renseigne sur l'épaisseur de la strate considérée. En général, plusieurs réflexions correspondant à des ordres différents sont observées et permettent de préciser l'épaisseur de la strate.

La détermination des angles de Bragg permet ainsi de mesurer des distances interatomiques ou intermoléculaires du même ordre de grandeur que la longueur d'onde du rayonnement X, classiquement entre 1 et 100 Å.

b) Dispositif expérimental

L'influence de l'ajout des nouveaux excipients ajoutés à la formule initiale du brevet sur l'organisation lamellaire du Phospholipon90G® a été étudiée à 25°C par diffraction des rayons X (DRX). Ces analyses ont été réalisées sur le montage du laboratoire (Equipe PCSP, UMR CNRS 8612) permettant l'acquisition simultanée du signal de diffraction aux petits (*small angle X-ray scattering*, SAXS) et grands angles (*wide angle X-ray scattering,* WAXS).

Une solution de 400 mg de Phospholipon 90G® dans 10 ml de chloroforme est préparée puis répartie en aliquot de 1 ml dans des vials de 3 ml. Ensuite, le solvant organique est évaporé sous flux d'azote puis chaque échantillon est mis sous vide durant une nuit pour retirer les dernières traces de solvant. Le film lipidique obtenu est réhydraté à 80% par les milieux d'intérêts. Les échantillons réhydratés sont vortexés pour obtenir une dispersion homogène. Ensuite, ils sont introduits dans des capillaires en verre possédant un diamètre externe de 1,5 mm et une épaisseur de 0,01 mm (Hilgenberg GmbH, Allemagne). Les capillaires sont scellés par une goutte de cire pour éviter l'évaporation de l'eau.

4. Mesure de la tension interfaciale par la méthode de la goutte montante

Des études de tension interfaciale sont menées afin d'évaluer l'influence des nouveaux excipients ajoutés dans la formule des nanoparticules *Janus* sur l'interface entre la phase aqueuse et huileuse (Drelich *et al.* 2002).

a) Principe

La tension interfaciale est l'énergie libre par unité de surface entre deux liquides. La mesure de cette tension interfaciale s'effectue à l'aide d'un tensiomètre. Dans le cas de la méthode de la goutte pendante, les tensions interfaciales sont déterminées à partir de la géométrie d'une goutte partiellement expulsée de l'extrémité d'une aiguille. La forme de la goutte dépend des forces interfaciales et gravitationnelles. Les premières tendent à donner à la goutte une forme sphérique tandis que les secondes tendent à l'allonger. La forme d'équilibre de la goutte ressemble à celle d'une ampoule. Il est alors possible de déterminer la tension interfaciale en fonction de la forme de la goutte et en tenant compte de la différence de densité entre les deux milieux. Le profil géométrique de la goutte est mesuré par analyse d'images. Le nombre de pixel/mm peut être évalué à partir du diamètre de l'aiguille. Cette méthode est également valable dans le cas d'une goutte montante si la différence de densité l'impose. L'aiguille est alors recourbée à 180°.

b) Dispositif expérimental

Les mesures de tension interfaciale sont effectuées à l'aide d'un tensiomètre dynamique à goutte (Teclis Instrument, Tracker) représenté par la Figure 29.

La solution huileuse est introduite dans une seringue de 500 µL avec une aiguille recourbée à 180° et hydrophobisée (jauge n°18). Par pression automatisée sur le piston, la goutte montante est formée dans la phase aqueuse contenue dans une cuve en quartz. Les mesures ont été réalisées à différentes températures, de 60°C à 25°C, par échelons de 5°C sur une durée de 15 minutes par température. Pour déterminer la variation de la tension interfaciale de l'interface huile/eau, chaque mesure a été effectuée 3 fois pour chaque température.

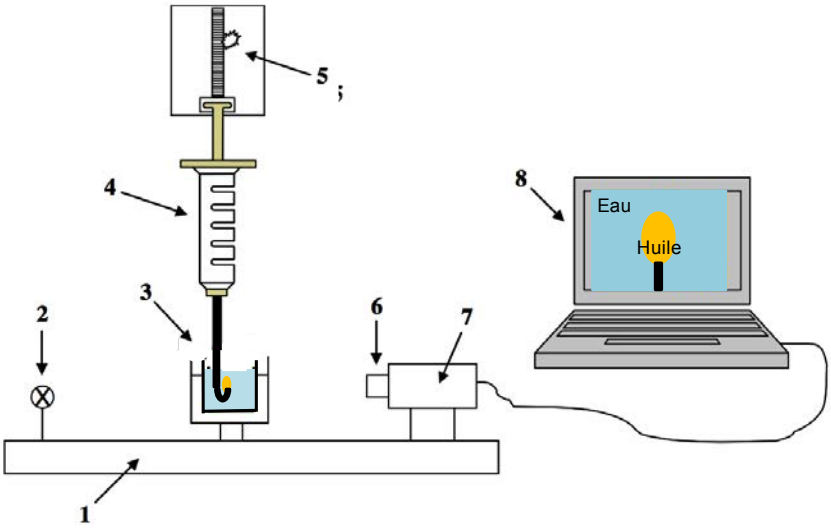

Figure 29 : *Schéma du montage d'un tensiomètre à goutte (cas de la goutte montante). 1-banc optique, 2-source lumineuse, 3-cuve thermostatée remplie d'eau et aiguille avec goutte montante, 4-seringue remplie de la phase huileuse, 5-moteur contrôlant le piston de la seringue, 6-lentille télécentrique calibrée, 7-caméra CCD, 8-moniteur vidéo et ordinateur (Adapté de Benjamins et al. 1996).*

5. Etude de la densité

Les mesures de tensions interfaciales nécessitent de connaitre la densité des liquides en fonction de la température. Un densimètre à tube vibrant (Anton-Paar, France) est utilisé comme méthode indirecte pour la mesure de la densité des différents excipients utilisés dans la phase aqueuse et phase huileuse des nanoparticules *Janus*. La caractérisation du comportement mécanique du tube en réponse à la vibration permet de relier directement la densité du fluide à la période d'oscillation. Les mesures sont réalisées à des températures croissantes allant de 20°C à 55°C par échelons de 5°C. Pour chaque produit, l'évolution de la densité en fonction de la température est modélisée par un polynôme de degré 3 de type : $D = a + b.(T-25) + c.(T-25)^2 + d.(T-25)^3$ où a est la densité du produit à 25°C et b, c et d sont des constantes caractéristiques de chaque fluide. Sur l'ensemble des liquides étudiés, les coefficients de corrélation, r^2, de ce modèle sont supérieurs à 0,9996. Ces constantes sont ensuite intégrées dans le logiciel d'analyse du tensiomètre à goutte. Le logiciel calcule alors automatiquement la masse volumique des deux fluides en fonction de la température mesurée par la sonde placée dans la cuve de mesure. Sur l'eau pure, l'écart entre nos mesures en fonction de la température et les valeurs de références données par le logiciel du tensiomètre ne dépasse pas 0,6%. Pour les excipients lipidiques, les valeurs obtenues à 20°C sont conformes aux spécifications données par les fournisseurs.

IV. Résultats et Discussion

A. Modification du procédé de fabrication des nanoparticules *Janus*

1. Temps de circulation au sein de l'homogénéisateur

Afin d'envisager un transfert du procédé de fabrication des nanoparticules *Janus*, de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle, le nombre de cycles d'homogénéisation haute pression est fixé à trois maximum pour assurer une durée de procédé compatible avec les temps de production. Habituellement, la nanosuspension est mise en circulation continue pendant cinq minutes ce qui équivaut à une quinzaine de cycle. De ce fait, l'impact du temps d'homogénéisation sur la formation et la stabilité physique des nanoparticules *Janus* sont étudiés en comparant deux lots de 70 g, l'un homogénéisé pendant cinq minutes et l'autre en trois passages. La distribution de taille des nanoparticules en sortie de procédé reste très similaire quelques soit le nombre de passage réalisé (Tableau V).

Tableau V : *Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées en 5 minutes ou 3 passages au sein de l'homogénéisateur.*

Lots	Taille ± σ (nm)	PdI ± σ
3 passages	229 ± 1	0,13 ± 0,03
5 minutes	234 ± 1	0,09 ± 0,02

Pour le lot formulé en trois cycles d'homogénéisation discontinu, la distribution de taille des particules conservées à 4°C et à température ambiante ne varie que très peu au cours des trois premiers mois avec un PdI inférieur à 0,15 (Figure 30). Cependant, lorsque la nanosuspension est conservée à 40°C, la taille des particules augmente progressivement au cours du temps de 229 nm initialement jusqu'à déphaser au bout du troisième mois. Le même profil d'évolution de la distribution de taille est obtenu avec le lot homogénéisé pendant cinq minutes en continu.

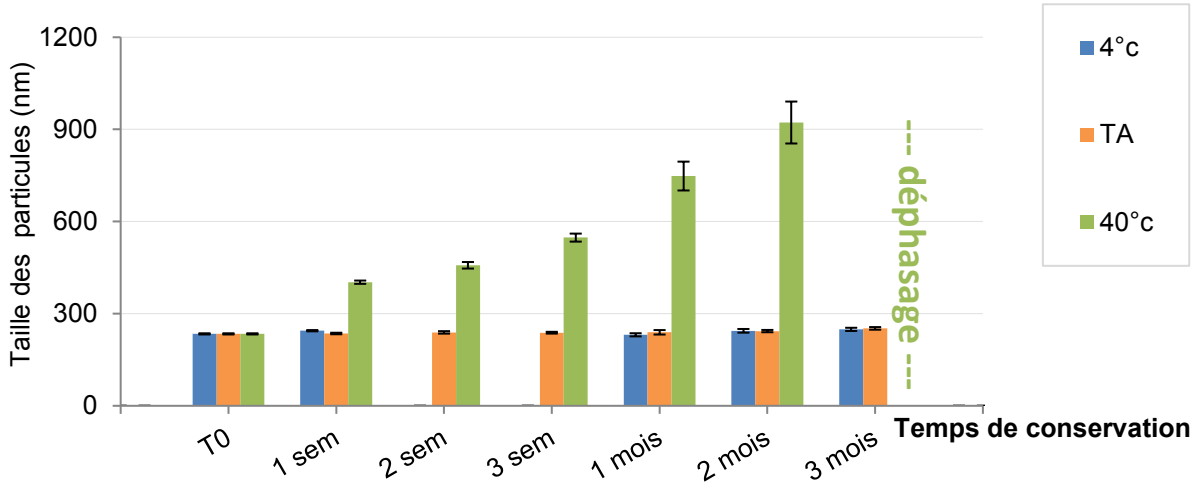

Figure 30 : *Evolution de la distribution de taille des nanoparticules Janus formulées en trois cycles d'homogénéisation conservées à 4°C, température ambiante et 40°C au cours du temps.*

La morphologie des nanoparticules formulées en trois cycles d'homogénéisation est observée en cryo-TEM. La présence de nanoparticules multi-compartimentées de type *Janus* dans l'échantillon après fabrication est confirmée (Figure 31A) mais également après deux mois de conservation à température ambiante (Figure 31B).

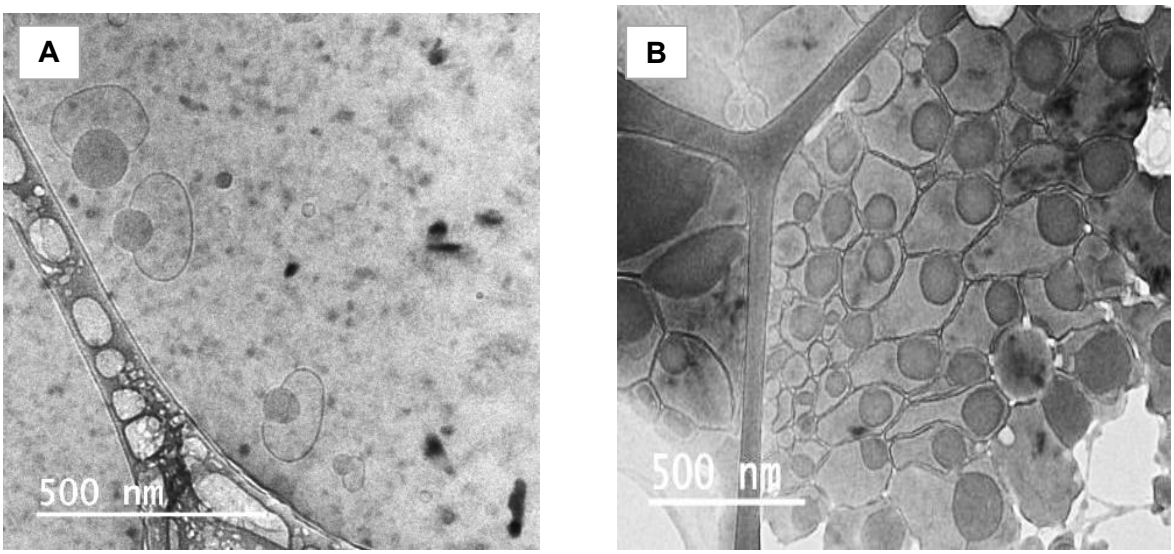

Figure 31 : *Morphologie des nanoparticules observées par cryo-TEM pour le lot de formulé en trois passages à l'homogénéisateur (A) après fabrication et (B) après conservation pendant deux mois à température ambiante.*

2. Quantité du lot produit

Tout en conservant trois cycles d'homogénéisation, un lot de 320 g et de 1 kg sont fabriqués afin de vérifier si la production de nanosuspension en quantité plus importante mène toujours

à la formation de nanoparticules *Janus*. La taille des particules du lot de 320 g (297 nm ± 1) est légèrement supérieure comparée à celles du lot de 1 kg (246 nm ± 1) et celui de 70 g (229 nm ± 1). En termes de stabilité physique, la distribution de taille des nanoparticules conservées à 4°C et température ambiante reste constante avec un PdI inférieur à 0,15. Après passage en cryo-TEM, des nanoparticules *Janus* de morphologie similaire au lot de 70 g sont retrouvées dans le lot de 320 g (Figure 32A). Cependant, bien que la morphologie des nanoparticules contenues dans le lot de 1 kg soit de type multi-compartimentées *Janus*, l'apparence de la nanoparticule est différente en raison d'un compartiment aqueux bilobé (Figure 32B).

Lors du changement d'échelle, la durée d'un cycle d'homogénéisation augmente en raison d'une quantité de produit plus importante à faire circuler au sein de l'homogénéisateur. Par conséquent, la nanosuspension contenue dans la trémie d'alimentation peut être sujette à un refroidissement avant homogénéisation. Il a été noté en effet une baisse de température du produit jusqu'à 41°C pendant la production. La température est un paramètre important pour la fabrication des nanoparticules *Janus*. Or, l'absence de module de chauffage de l'homogénéisateur lors de la fabrication des lots chez l'industriel peut être à l'origine d'une différence de morphologie des nanoparticules *Janus.*

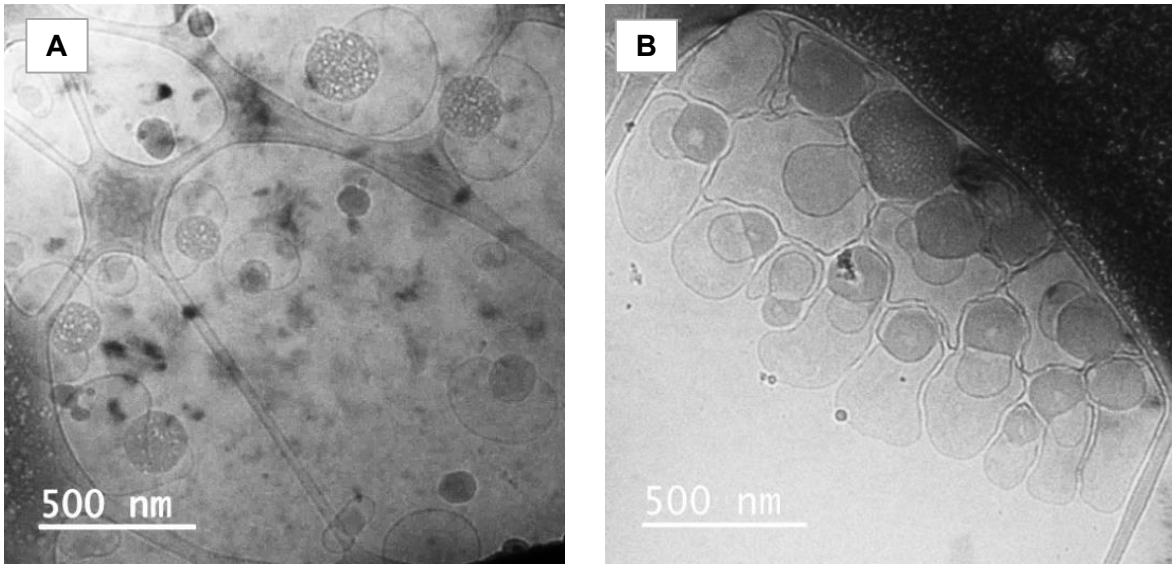

Figure 32 : *Morphologie des nanoparticules obtenues en cryo-TEM pour le lot formulé en trois passages à l'homogénéisateur en quantité (A) 320 g et (B) 1 kg.*

B. Modification de la formule initiale du brevet des nanoparticules *Janus*

1. Origine des matières premières

Pour des raisons de concurrence sur le marché et de diversifications des sources, il est nécessaire de changer de fournisseur pour le Labrafil 1944® et de substituer cet excipient par un équivalent de même nature chimique. Ainsi, des études de pré-formulation ont été réalisées avec le Dubcare Olga SF® de grade pharmaceutique et Dubcare GPE® de grade cosmétique provenant de chez Stéarinerie-Dubois. La proportion de la phase lipidique (20% de la masse totale de la formule) reste inchangée. Suivant le lipide utilisé, la distribution de taille des nanoparticules varie de 190 à 239 nm environ avec un indice de polydispersité inférieur à 0,11 (Tableau VI). Les particules composées de Labrafil 1944® ou de Dubcare GPE® sont de même calibre tandis que les particules formées avec le Dubcare Olga SF® sont plus petites.

Tableau VI : *Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées à partir du Labrafil 1944®, du Dubcare GPE® ou du Dubcare Olga SF®.*

Lots	Taille ± σ (nm)	PdI ± σ
Labrafil M1944 CS®	234 ± 2	0,09 ± 0,02
Dubcare GPE®	239 ± 2	0,09 ± 0,02
Dubcare Olga SF®	190 ± 3	0,11 ± 0,11

A température ambiante et à 4°C, la distribution de taille des nanoparticules à base de Labrafil 1944® et de Dubcare GPE® est stable au cours des trois premiers mois de conservation (autour de 250 nm et 300 nm respectivement). Au contraire, la taille des nanoparticules à base de Dubcare Olga SF® augmente au cours du temps jusqu'à déphasage. Cependant, lors de la conservation des lots à 40°C tous les lots déphasent rapidement. Les morphologies observées par cryo-TEM sont de type *Janus* quel que soit le lipide utilisé (Figure 33A et B). Le compartiment aqueux qui apparait clair sur l'image semble s'organiser différemment lors de l'utilisation du Dubcare GPE® ou du Dubcare Olga SF®.

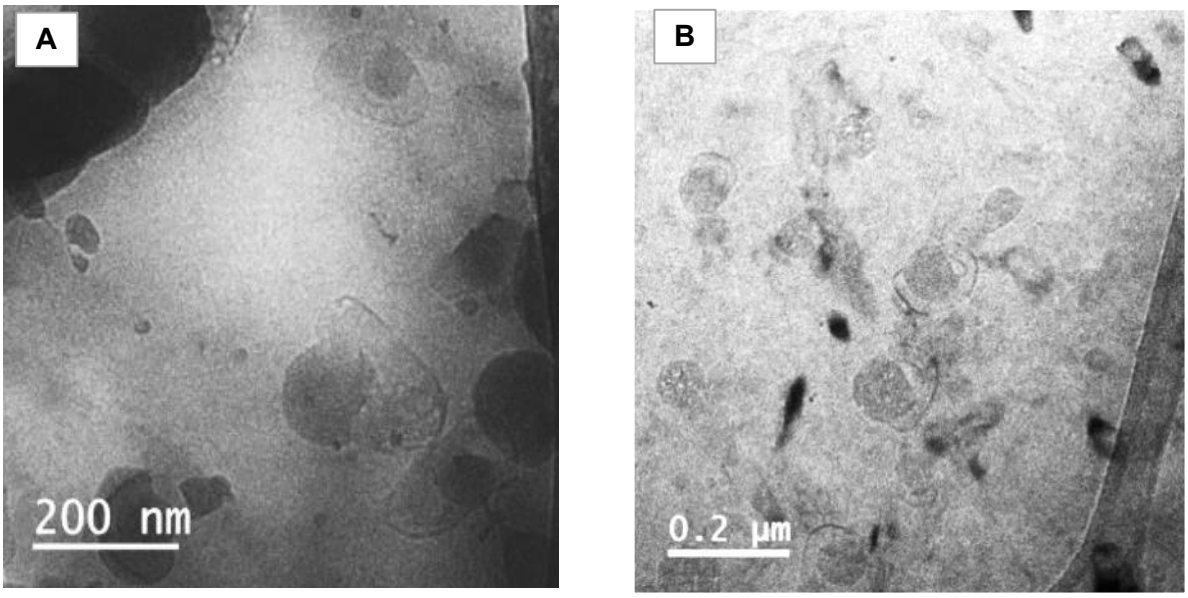

Figure 33 : *Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du Dubcare GPE® (A) ou Dubcare Olga SF® (B) comme substituant de la phase lipidique.*

Ces différences de comportement pourraient s'expliquer par des différences de compositions. En effet, les spécifications de compositions de ces produits mentionnées dans la pharmacopée européenne précise la distribution de chaînes grasses (proportion de C18 mono ou poly insaturés par exemple) mais pas l'association des acides gras ni leur répartition. Ainsi, une proportion différente en mono-, di- ou triglycérides et esters d'acide gras peut exister entre ces trois produits. Ces composants jouent un rôle important dans la formation des nanoparticules *Janus* et des ratios différents peuvent engendrer une différence de morphologie et de comportement des nanoparticules *Janus.*

2. Stabilité microbiologique des nanoparticules *Janus*

a) Contrôle du pH de la nanosuspension : Ajout d'un système tampon

Chaque conservateur possède un spectre d'activité particulier vis-à-vis des bactéries et leur action est possible dans une gamme de pH précise. Avec la formule initiale, la valeur du pH de la nanosuspension finale est de 6,4 en moyenne tandis que l'ensemble des conservateurs sélectionnés sont plus efficaces à pH inférieur à 4,8. Par conséquent, l'ajout d'un système tampon dans la formule est nécessaire pour ajuster le pH de la nanosuspension finale. Le système tampon acide citrique/citrate trisodique (0,10 / 0,17% m/m) est ajouté dans la phase aqueuse avant agitation à l'ultra turrax. La taille des nanoparticules obtenue pour le lot de 70 g est de 450 nm ± 3 ce qui est environ 200 nm plus elevé que pour les nanopartiules formulées sans tampon. La distribution de taille de l'essai est stable lorsqu'il est conservé à 4°C et température ambiante avec un index de polydispersité inférieur à 0,2 au bout de deux mois. Cependant, une forte augmentation en taille et un déphasage sont observés lorsque

l'échantillon est conservé à 40°C au bout de trois semaines. Malgré ce diamètre important, la présence de nanoparticules *Janus* est confirmée en cryo-TEM (Figure 34).

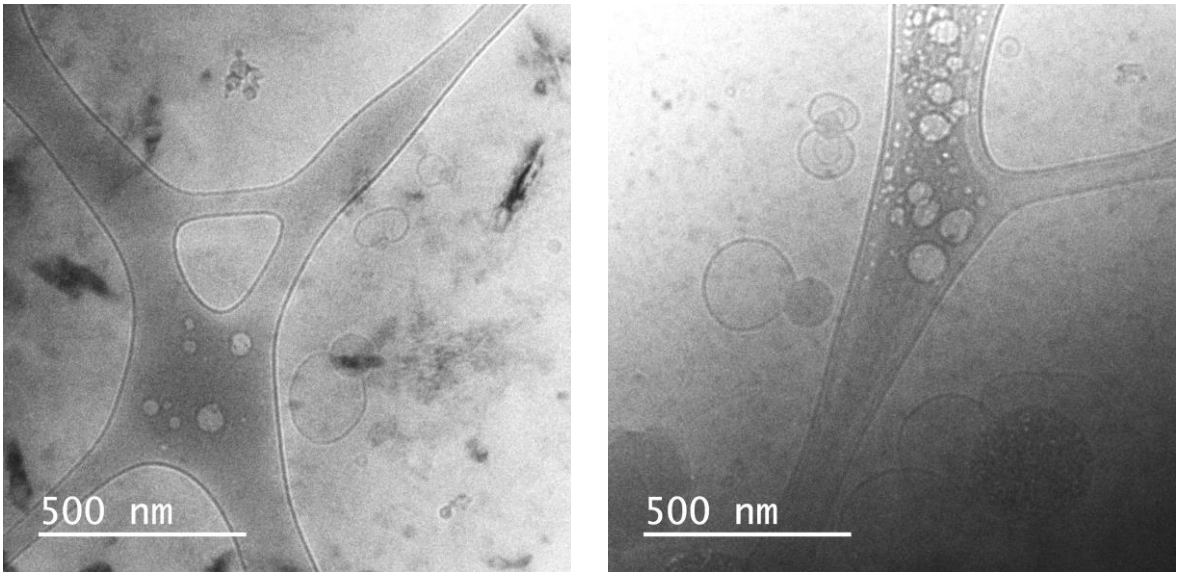

Figure 34 : *Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation d'un système tampon acide citrique / citrate trisodique.*

b) Contrôle de la contamination bactérienne : Ajout d'un conservateur

L'impact des différents conservateurs sur la stabilité des nanoparticules *Janus* est étudié. Dans un premier temps, les modalités d'incorporation du conservateur au sein de la formulation sont testées. L'ajout se fait soit dans la phase aqueuse avant émulsification, soit en fin de procédé dans la nanosuspension refroidie. Des essais préliminaires avec Sederma ont montré que l'ajout sur la nanosuspension finale est préférable puisque l'incorporation dès le départ dans la phase aqueuse pouvait mener au déphasage pendant la préparation.

Dans un second temps, le Microcare SBS® a été envisagé comme conservateur. Il s'agit d'un mélange de salicylate de sodium et benzoate de sodium dont les concentrations étaient de 0,25 et 0,15 % respectivement dans la préparation finale. Comme le montre la Figure 35, une dissociation des deux compartiments et la présence de nombreux types d'objets sont observées en présence de ce conservateur.

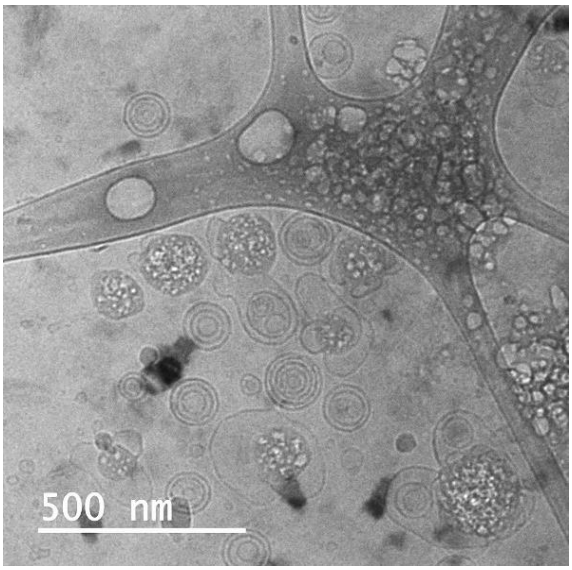

Figure 35 : *Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du mélange salicylate de sodium et benzoate de sodium.*

Les conservateurs, notamment le salicylate de sodium et benzoate de sodium, ayant une activité tensioactive à la base de leur activité antimicrobienne, l'interaction entre les stabilisants de la formulation et ces conservateurs pourrait expliquer cette dissociation (Ali *et al.* 1995). Ainsi, l'impact de différents conservateurs sur l'organisation structurale des phospholipides (Phospholipon 90G®) est étudié en diffraction des rayons X (Figure 36). Aux petits angles (SAXS), lorsque le Phospholipon 90G® est hydraté avec de l'eau, deux pics sont observés ce qui correspond aux 1er et 2ème ordres de diffraction d'une structure lamellaire ordonnée d'épaisseur 61,6 Å.

En présence du système tampon, les pics de 1er et 2ème ordre sont parfaitement superposables (position et intensité) avec une épaisseur de bicouche non modifiée. Il n'y a pas d'influence significative du tampon sur la formation de la bicouche (Résultat non présenté).

Au contraire, si le Phospholipon 90G® est réhydraté avec une solution contenant des conservateurs, les deux pics de diffraction caractéristiques sont toujours présents mais apparaissent différemment sur le diffractogramme. La Figure 36 montre l'action du benzoate de sodium (BZ) et du sorbate de potassium (SP) à différentes concentrations, de leur mélange, ainsi que du mélange salicylate de sodium - benzoate de sodium (SA/BZ) évoqué précédemment. Ce dernier est celui qui altère le plus le diffractogramme du Phospholipon 90G® avec un déplacement du pic vers de plus petites distances (59,1 Å) mais surtout une diminution de l'intensité maximum du pic du 1er ordre, une augmentation de sa largeur, et la disparition du second ordre. Sans disparition complète de la structuration en bicouche, ces éléments attestent d'une désorganisation partielle du Phospholipon 90G® en présence du

mélange (SA/BZ). Les mêmes tendances sont observées pour les autres conservateurs, seuls ou en mélange, mais avec des intensités variables. En comparaison avec le sorbate de potassium et à concentrations égales, le benzoate de sodium modifie plus nettement l'épaisseur de la bicouche de phospholipides. Les autres paramètres restent assez proches.

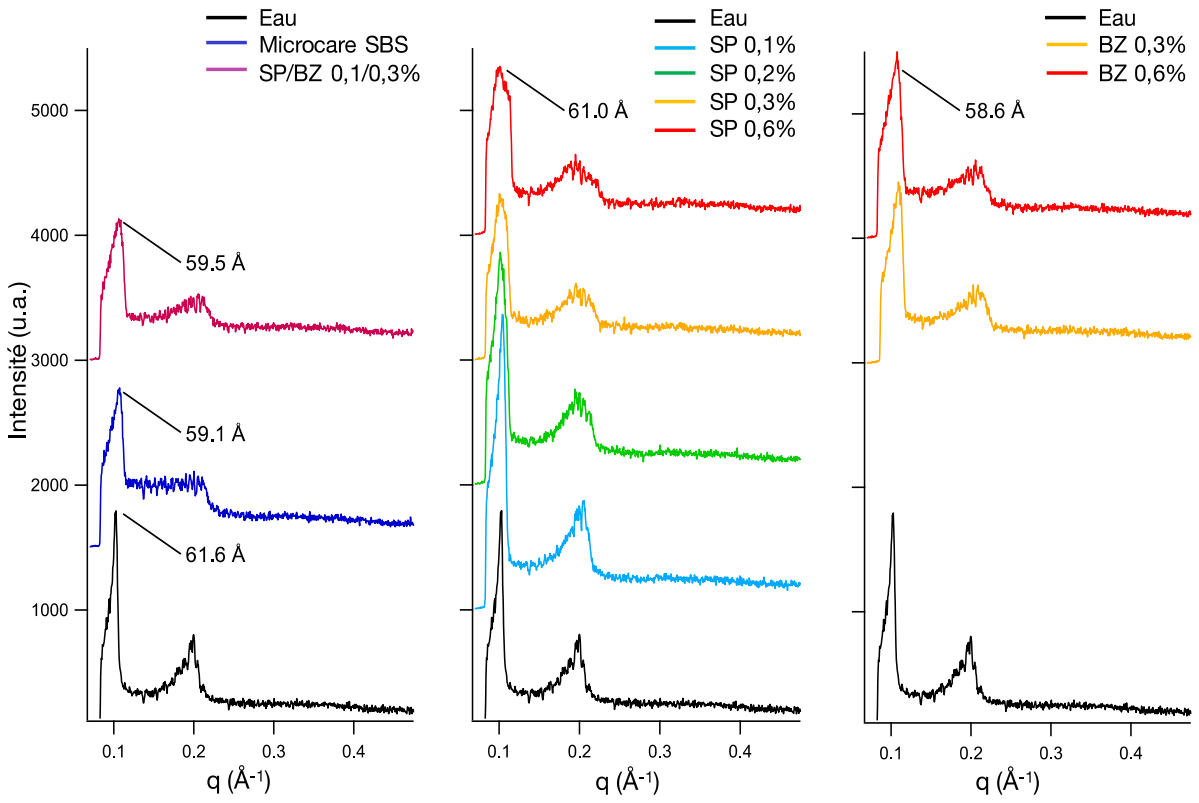

Figure 36 : *Influence des conservateurs sur l'organisation structurale du Phospholipon 90G®. Diagramme de diffraction des rayons X aux petits angles enregistré à partir de Phospholipon 90G® en excès d'eau (80% en masse H_2O) (noir), mélange SP/BZ à 0,1/0,3% (rose) à 25°C, BZ et SP à 0,3% (jaune), BZ et SP à 0,6% (rouge).*

Ces résultats démontrent l'altération de l'organisation de la bicouche de Phospholipon 90G® dès lors qu'un conservateur est ajouté. L'interaction des conservateurs avec les autres constituants des nanoparticules *Janus* tels que le Gélucire 50/13® serait également intéressant à étudier. Cependant, l'équipement disponible ne permet pas d'étudier la diffraction des rayons X sur les autres excipients. En effet, les bicouches lipidiques formées à partir des phospholipides contenus dans le Phospholipon 90G® sont de petite épaisseur tandis que celles formées avec les tensioactifs PEGylés contenus dans le Gélucire 50/13® ou le Labrafil 1944® génèrent des bicouches dont l'épaisseur, plus importante (≥ 90 Å), nécessiterai d'accéder à de plus petites valeurs de q (≤ 0,07 $Å^{-1}$). La position du *beam-stop* empêche l'accès à ces valeurs.

Au regard de ces résultats, il a été décidé de continuer les travaux autour du mélange SP/BZ 0,1% / 0,3% qui décrit un effet un peu moins désorganisant que le mélange SA/BZ. Les associations de conservateurs sont proposées par les fournisseurs afin de couvrir un spectre d'activité antimicrobien élargi. Les associations permettent aussi d'utiliser une teneur inférieure à celle préconisée lorsqu'ils sont seuls afin de limiter les risques d'irritation et/ou de sensibilisation liés à l'utilisation de certains conservateurs.

La production d'un lot de 70 g de nanosuspension en présence du système tampon et du mélange SP/BZ est effectuée en 3 passages à l'homogénéisateur. La même opération est menée avec les conservateurs seuls de manière à identifier un effet qui leur serait propre. La nature des conservateurs, leur concentration et les résultats obtenus en distribution de tailles pour les particules sont exposés dans le Tableau VII. La distribution de taille des nanoparticules reste stable à 4°C et à température ambiante.

Tableau VII : *Distribution de taille et PdI des nanoparticules multi-compartimentées formulées en fonction de la nature du conservateur et leurs concentrations finales dans la suspension.*

Lots	Concentration (m/m)	Taille ± σ (nm)	PdI ± σ
Sorbate de Potassium (SP)	0,1 %	222 ± 2	0,11 ± 0,01
Benzoate de Sodium (BZ)	0,3 %	298 ± 4	0,20 ± 0,01
	0,6 %	314 ± 4	0,16 ± 0,05
SP/BZ	0,1 et 0,3 %	338 ± 1	0,13 ± 0,02

En cryo-TEM, en présence du mélange benzoate de sodium et sorbate de potassium, la présence de nanoparticules *Janus* est confirmée (Figure 37A) et en présence de benzoate de sodium seul à 0,6% également (Figure 37B). Les autres conditions n'ont pas été observées en cryo-TEM.

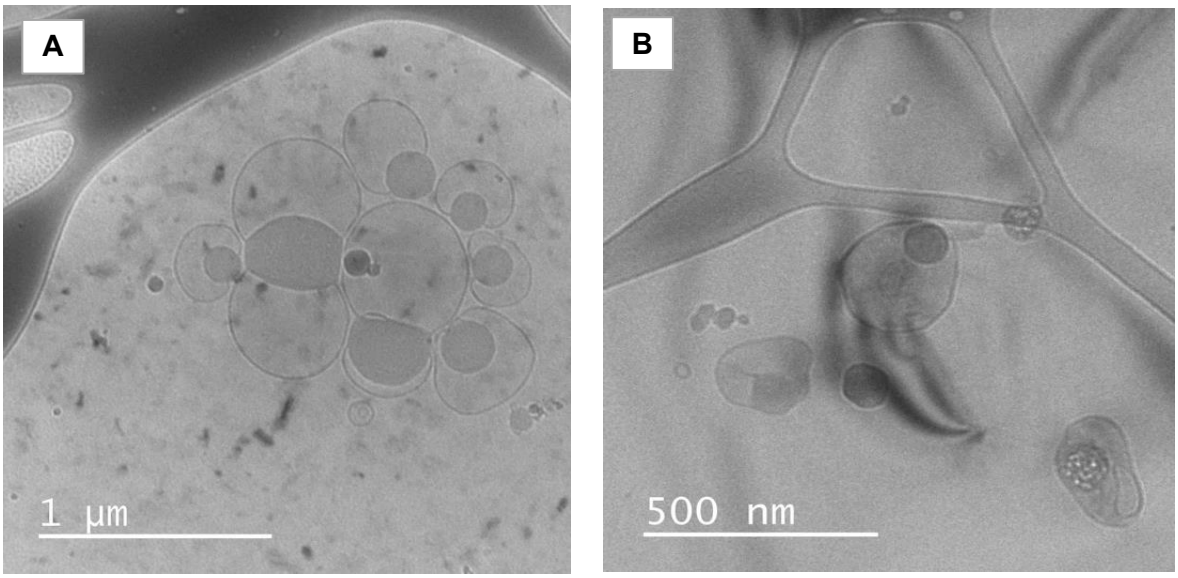

Figure 37 : *Morphologie des nanoparticules observées en cryo-TEM lors de l'utilisation du mélange SP/BZ (A) ou du BZ seul en concentration 0,6% (B).*

3. Stabilité physique des nanoparticules *Janus*

Les nanoparticules *Janus* sont physiquement stables pendant leur conservation à 4°C et à température ambiante. Dans le cadre de ce projet, la stabilité du produit à une température de 40°C est recherchée en raison de la zone géographique de commercialisation prévue. Comme il a été montré précédemment dans la Figure 30, dont les évolutions présentées sont parfaitement représentatives des études de stabilités, les dispersions de particules *Janus* se déstabilisent avec le temps à cette température plus élevée.

Le Labrafil 1944® est une huile végétale composée principalement d'une fraction glycéridique (mono-, di- et triglycérides de l'acide oléique) et d'esters entre ce même acide gras et des PEG-6. Ces esters sont des tensioactifs non ioniques de type polyéthoxylé à chaîne courtes connus pour avoir une affinité différente pour le compartiment aqueux et huileux suivant la température du système. Ceci est lié à la déshydratation progressive des chaînes PEG lorsque la température augmente, aboutissant à une augmentation de la lipophilie de ces tensioactifs. La température d'inversion de phase (*Phase inversion Temperature* ou PIT) introduit par Shinoda *et al*. en 1964 est la température caractérisant ce passage d'un tensioactif plus hydrophile à un tensioactif plus lipophile (Shinoda *et al.* 1964).

Compte tenu de la composition du Labrafil 1944®, il a été émis l'hypothèse que des phénomènes d'inversion de phase pourraient être à l'origine des différences de stabilité des nanoparticules Janus lors de leur stockage à différentes températures. Par l'étude de la tension interfaciale en fonction de la température, il est possible de déterminer la température

d'inversion de phase du système et de pouvoir éventuellement l'adapter pour obtenir plus de stabilité.

a) Détermination de la température d'inversion des différentes phases huileuses

Dans un premier temps, la température d'inversion de phase du Labrafil 1944®, du Dubcare GPE® et du Dubcare Olga SF® a été étudiée. La Figure 38 représente l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la température pour une goutte de Labrafil 1944® formée dans l'eau. De 60°C à environ 40°C, la tension interfaciale chute jusqu'à des valeurs faibles. Puis de 40°C jusqu'à 20°C, elle augmente légèrement pour atteindre une valeur d'environ 0,30 mN/m à 20°C. Ce type de profil est largement décrit dans la littérature et il est admis que le minimum correspond à la température d'inversion de phase (Tadros *et al.* 2013). Chaque portion de courbe de tension interfaciale, à basse et à haute température, est modélisée par un polynôme du 2ème degré (Figure 38). La température d'inversion de phase a pour valeur le point d'intersection entre ces deux polynômes : dans le cas du Labrafil 1944® la valeur est de 43°C.

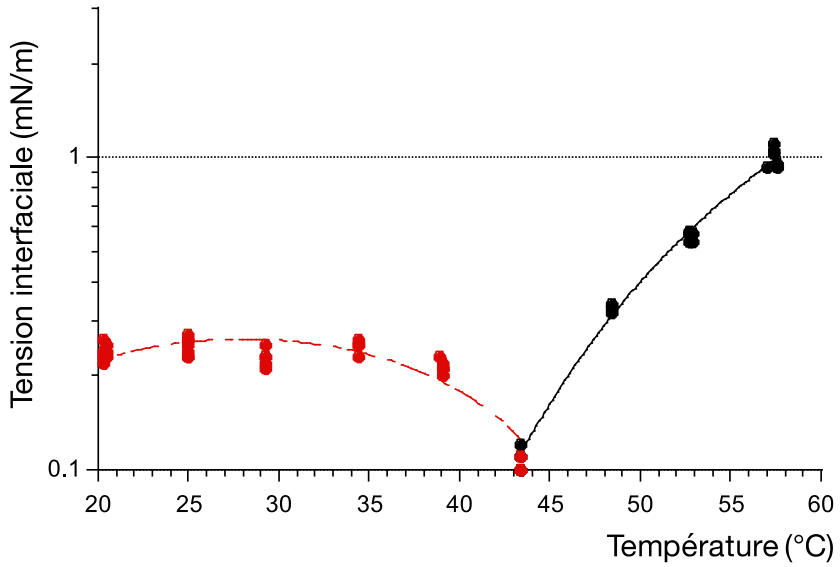

Figure 38 : *Modélisation de la courbe représentant l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la température pour une goutte de Labrafil 1944® formée dans l'eau selon les deux polynômes du 2ème degré.*

Un profil de courbe similaire est obtenu pour le Dubcare GPE® et le Dubcare Olga SF®, les résultats de température d'inversion de phase sont exposés dans le Tableau VIII. Bien que les huiles testées proviennent de fournisseurs différents, leur température d'inversion de phase est similaire et avoisine les 43°C.

Tableau VIII : *Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte de Labrafil 1944®, de Dubcare GPE® ou de Dubcare Olga SF® formée dans l'eau.*

Goutte	Phase dispersante	Température d'inversion de phase
Labrafil 1944®	Eau	43°C
Dubcare Olga SF®	Eau	44°C
Dubcare GPE®	Eau	43°C

Lorsque le système est conservé à une température inférieure à la PIT (température ambiante et 4°C), l'affinité du tensioactif pour la phase aqueuse est plus importante qu'au-dessus de la PIT. Autrement dit, la balance hydrophile – lipophile (HLB) des tensioactifs PEG du Labrafil 1944® augmente quand la température diminue. La grande stabilité du système à température ambiante, suivie sur quelques mois pendant ce stage mais jusqu'à 20 mois dans des travaux antérieurs, montre qu'à cette température, le HLB moyen des tensioactifs en présence dans le mélange doit être proche du HLB critique (permettant la stabilité optimale) de la dispersion. L'instabilité à 40°C pourrait alors s'expliquer par le fait qu'à cette température, le HLB moyen du mélange diminue et n'est pas suffisamment élevé pour stabiliser une dispersion lipophile dans hydrophile telle que les nanoparticules *Janus*. Selon cette hypothèse, afin d'obtenir une stabilité physique des nanoparticules conservées à 40°C, l'objectif est d'augmenter la température d'inversion de phase du système bien au-delà de la température de conservation pour avoir des tensioactifs PEG suffisamment hydrophiles à cette température de stockage. Plusieurs stratégies ont été proposées pour cela.

b) Modification de la température d'inversion de phase

La première stratégie consiste à modifier le ratio huile / tensioactifs polyoxyéthylénés à chaînes courtes du Dubcare GPE® en y ajoutant une proportion d'huile de noyaux d'abricot (HA) en ratio 75/25 et 50/50 respectivement. Le choix s'est porté sur l'huile de noyaux d'abricot car il s'agit de la matière grasse végétale à la base du Labrafil 1944® et des Dubcare® utilisés. En effet, les glycérides constituant cette huile sont partiellement hydrolysés pour libérer des acides gras qui sont estérifiés avec des groupements PEG pour obtenir le mélange final des Labrafils et Dubcares (Jannin *et al.* 2014). Le suivi de la tension interfaciale de ces systèmes dans l'eau en fonction de la température est réalisé. Après modélisation des courbes et résolution des équations, la température d'inversion de phase trouvée quel que soit le ratio utilisé est proche de 48°C (Tableau IX), soit une évolution dans le sens attendu.

Tableau IX : *Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte du mélange Dubcare GPE® / huile de noyaux d'abricot ratio 50/50 et 75/25) formée dans l'eau.*

Goutte	Phase dispersante	T°C
Dubcare GPE® / HA (50 / 50)	Eau	49
Dubcare GPE® / HA (75 / 25)	Eau	48
Dubcare GPE®	Eau	43

Après observation en cryo-TEM des échantillons, les nanoparticules présentes ne sont pas de nature *Janus*. L'ajout d'huile de noyaux d'abricot dans la phase huileuse perturbe le procédé et engendre la séparation du compartiment aqueux et huileux quel que soit le ratio utilisé. La présence de goutte d'huile et de liposomes dissociés est illustrée par la Figure 39.

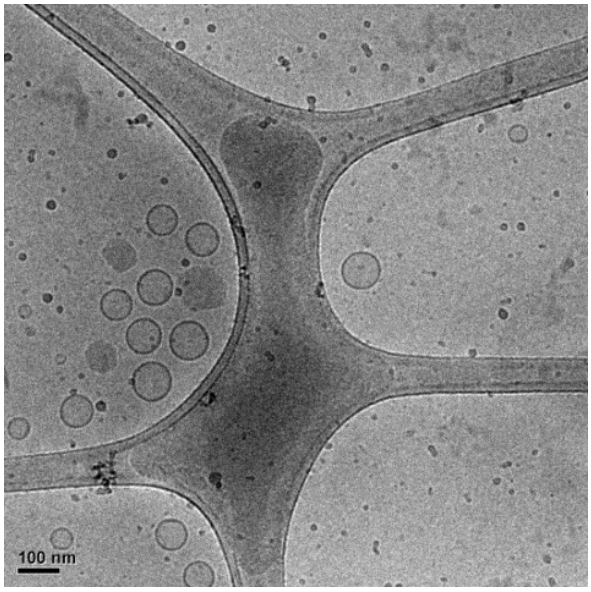

Figure 39 : *Morphologie des nanoparticules formulées avec le mélange Dubcare GPE® et l'huile de noyaux d'abricot en ratio 50/50.*

La seconde stratégie pour augmenter la température d'inversion de phase consiste à incorporer une proportion de tensioactifs à chaîne polyéthoxylées à chaîne légèrement plus longues (oléate de PEG8) dans la phase huileuse Labrafil 1944® tout en conservant une proportion d'huile de noyaux d'abricot. D'après le diagramme de phase binaire de la chaîne polyéthoxylée $C_{12}E_5$, la PIT augmente lorsque la chaîne polyéthoxylée du tensioactif s'allonge (Drelich *et al.* 2002).

Pour la goutte formée dans l'eau avec le mélange des trois composants, quel que soit le ratio, la tension interfaciale à 60°C est trop basse et dans les limites de mesure de l'appareil pour être enregistrée, de ce fait la PIT n'a pas pu être déterminée. Lors de l'analyse de ces lots en

cryo-TEM, aucune particule *Janus* n'est observée en raison de la dissociation des compartiments aqueux et huileux. Cependant, lors de l'ajout de l'oléate de PEG 8 avec le Labrafil 1944® seul (ratio 98,5/1,5 respectivement), la tension interfaciale a pu être enregistrée. La température d'inversion de phase obtenue est de 47°C (Tableau X). Ainsi, comme attendu, l'incrément du nombre de groupes d'oxyde éthylène produit une augmentation de la PIT (Mitsui *et al.* 1970).

Tableau X : *Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte composée de Labrafil 1944®, d'huile de noyaux d'abricot et de PEG-8 formée dans l'eau.*

Goutte	Phase dispersante	T°C
Labrafil 1944® / NA / PEG-8 (87,5 / 7,5 / 5)	Eau	Limite détection
Labrafil 1944® / NA / PEG-8 (75 / 15 / 10)	Eau	Limite détection
Labrafil 1944® / PEG-8 (98,5 / 1,5)	Eau	47

Le lot de 70 g de nanosuspension fabriqué avec cette composition de phase huileuse a une distribution de taille de 385 nm ± 9 avec un PdI de 0,09. En cryo-TEM, la présence de particules *Janus* est confirmée (Figure 40). Cependant, la conservation à 40°C mène à un déphasage au bout d'un mois.

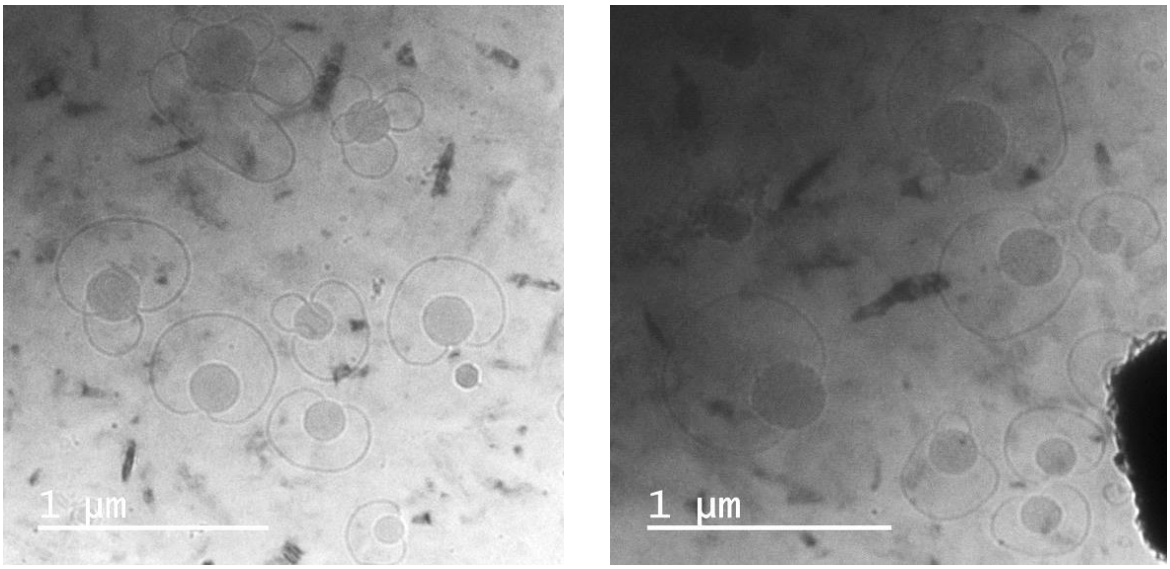

Figure 40 : *Morphologie des nanoparticules formulées avec le mélange Labrafil 1944® et l'oléate de PEG-8 en ratio 98,5 / 1,5.*

Des travaux antérieurs dans l'équipe ont montré l'importance du Phospholipon 90G® et du Gélucire 50/13® dans la genèse des particules *Janus*. Leur présence est nécessaire pour la formation du compartiment aqueux. Plus récemment, il a été décrit que les tensioactifs à

chaîne PEG-6 des Labrafils et équivalents pouvaient également participer à la création de la bicouche délimitant ce compartiment. Plus précisément, après hydratation du Labrafil, ces tensioactifs sont capables de générer des structures lamellaires à température ambiante alors qu'à plus hautes températures, des dispersions eau dans huile sont obtenues. Ceci s'explique par le paramètre d'empilement qui va être, pour ces tensioactifs à PEG court, proche de 1 à 20°C et supérieur à 1 aux températures plus élevées (Israelachvili *et al.* 1976).

Cette notion de paramètre d'empilement, qui va permettre de comprendre les courbures générées par les associations supra-moléculaires de lipides et tensioactifs, pourrait expliquer les dissociations observées entre les deux compartiments pour certaines des formulations. En effet, comme évoqué précédemment, le Phospholipon 90G® et les tensioactifs PEG-6 vont générer des structures lamellaires après hydratation. A l'inverse, le Gélucire 50/13® qui possède une tête polaire volumineuse (PEG 1500), formera des micelles après hydratation totale à température ambiante, preuve d'un paramètre d'empilement très inférieur à 1 (Hadri *et al.* 2016). Ce paramètre sera probablement légèrement inférieur à 1 pour l'oléate de PEG-8. Il est intéressant de noter que dans toutes les formulations où les compartiments ce sont dissociés, la proportion de Gélucire 50/13® a été indirectement augmentée par rapport à l'ensemble des autres tensioactifs. La contrainte de courbure imposée par ce tensioactif pourrait alors être à l'origine de la séparation entre les deux compartiments.

c) Influence de la phase aqueuse sur la PIT

Pour aider à la poursuite de ces travaux, des essais préliminaires ont été menés autour de l'influence de la composition de la phase aqueuse sur la PIT. Ainsi, l'évolution de la température d'inversion de phase lors des modifications de formule sur la phase dispersante aqueuse est étudiée et notamment lors de l'ajout du système tampon et d'un conservateur (Microcare SBS®). La température d'inversion de phase obtenue en présence du système tampon et du conservateur est de 39°C contre 43°C pour le Labrafil 1944® seul (Tableau XI).

Tableau XI : *Température d'inversion de phase obtenue par mesure de la tension interfaciale d'une goutte de Labrafil 1944® formée dans une solution aqueuse contenant le système tampon et le conservateur.*

Goutte	Phase dispersante	T°C
Labrafil 1944®	Eau	43
Labrafil 1944®	Eau + Tampon + Conservateur	39

Cette évolution est conforme à la littérature car il a été démontré, pour de nombreux sels, que la PIT décroît quand la concentration en sel dans la phase aqueuse augmente. L'augmentation

de la salinité diminue l'affinité du tensioactif pour la phase aqueuse et en conséquence la température nécessaire pour inverser la polarité du tensioactif diminue également. Cette diminution en présence de sels sera à prendre en compte pour la formulation d'un produit fini ayant une PIT suffisamment élevée.

C. Incorporation d'un principe actif hydrophile

Dans un premier temps, l'encapsulation d'un peptide hydrophile (Masse molaire = 566,67 g/mol) dans les nanoparticules multi-compartimentées est réalisé en incorporant le peptide dans la phase aqueuse avant émulsification (150 ppm/m). Les résultats de test de solubilité menés à Sederma indiquent que ce peptide est très soluble dans l'eau. La taille des NPs en présence du peptide est de 292 nm contre une taille de 234 nm sans peptide. Lors de l'incorporation de la substance active au sein des NPs, leur taille varie légèrement mais elles sont stables pendant au moins les deux premiers mois à température ambiante et à 4°C. Des observations en cryo-TEM sont effectuées pour valider la présence des nanoparticules *Janus*. Le cliché de la Figure 41 révèle très clairement que l'incorporation du peptide ne perturbe pas le procédé de formation des nanoparticules attendues, celles-ci étant présentent en grande majorité dans les champs observés. Des nanoparticules *Janus* multilobées sont également présentes dans l'échantillon et peu de vésicules ou de gouttelettes d'huiles libres sont observées.

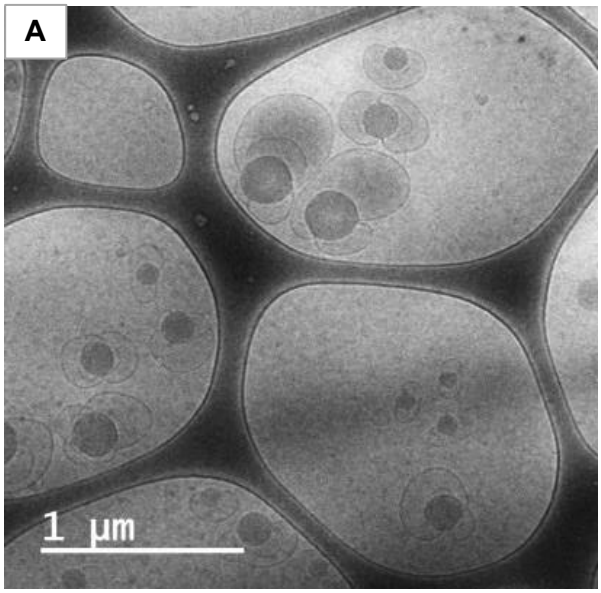

Figure 41 : *Morphologie des nanoparticules formulées en présence du principe actif.*

Dans un second temps, des essais portant sur l'ajout du système tampon tout en chargeant les nanoparticules avec le principe actif est réalisé. Les nanoparticules obtenues ont une taille de 228 nm ± 1 et les nanoparticules *Janus* sont toujours observées en cryo-TEM ce qui

confirme que le tampon ne déstabilise par le système même en présence de l'actif (Figure 42).

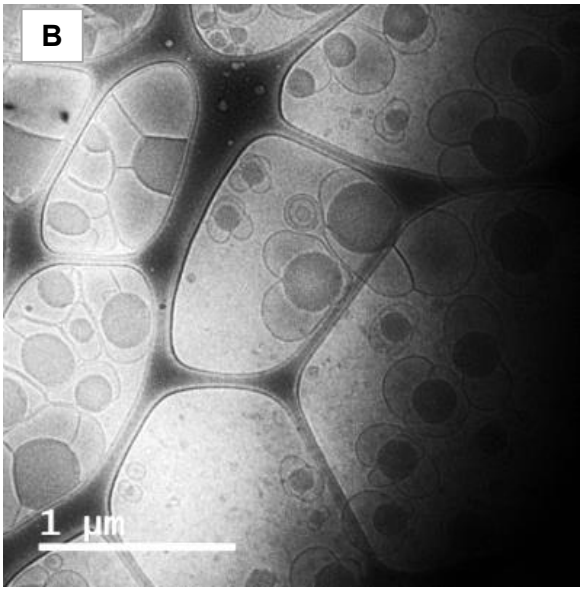

Figure 41 : *Morphologie des nanoparticules formulées en présence du principe actif et du système tampon.*

L'incorporation de principe actif dans la formulation sans déstabiliser les nanoparticules *Janus* n'est pas toujours simple. En effet, des travaux antérieurs dans le laboratoire se sont intéressés à l'incorporation de principes actifs tels que la quercétine (masse molaire = 302g/mol ; LogP = 2,16), le chloroxylénol (masse molaire = 157 g/mol ; LogP = 3,30) ou l'érythromycine (Masse molaire = 734 g/mol ; Log P = 2,60). Des résultats satisfaisant ont été obtenus avec la quercétine ou le chloroxylénol tandis que l'incorporation d'érythromycine dans la formulation menait à la perturbation du procédé.

V. Conclusions et Perspectives

L'étude portait sur l'impact des changements de formule et de procédé sur la stabilité physique des nanoparticules *Janus*. Ainsi, la substitution de la phase lipidique est possible, tout comme l'ajout d'un tampon citrate pour ajuster le pH de la nanosuspension finale. Cependant, l'incorporation d'un conservateur dans la formule mène à la déstabilisation des objets *Janus*. Il est tout de même possible d'obtenir des nanoparticules *Janus* avec le mélange sorbate de potassium et benzoate de sodium. Les mesures de tension interfaciale en fonction de la température entre différents constituants contenus dans la phase huileuse ou aqueuse ont permis de mettre en évidence l'existence d'une température d'inversion de phase qui est probablement à l'origine de l'instabilité des formulations à 40°C. La couche délimitant le compartiment aqueux est très certainement constituée de 3 types de composés : les tensioactifs à PEG courts (PEG-6 dans le Labrafil 1944®), à PEG longs (PEG-32 dans le Gélucire 50/13®) et des phospholipides. Les premiers vont être sensibles à la température alors que les seconds vont induire des courbures importantes dans cette couche. Une perspective intéressante à explorer pour améliorer la stabilité à 40°C tout en conservant l'aspect *Janus* pourrait être de jouer sur la composante phospholipidique de cette membrane, le Phospholipon 90G® ayant un paramètre d'empilement proche de 1 et n'étant pas sensible à la température.

Des essais sur les paramètres du procédé ont été réalisés pour explorer la possibilité du transfert de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. Ainsi, la formation de nanoparticules *Janus* est toujours possible si la nanosuspension ne subit que trois cycles d'homogénéisation menant à des particules stables à 4°C et à température ambiante. De même, tout en conservant ce nombre de cycle il est possible de fabriquer des lots de nanoparticules Janus de petite à moyenne échelle (de 70 g à 1 kg).

L'incorporation d'un actif hydrophile peptidique a été réalisée aboutissant à la formation de nanoparticules *Janus*. Il serait intéressant d'étudier cette encapsulation plus en détail, notamment en réalisant une séparation puis un dosage de l'actif pour déterminer le taux d'encapsulation et également sa stabilité au cours du temps. Pour la suite du projet, un autre actif, hydrophobe, doit être encapsulé de sorte à exploiter la propriété des nanoparticules *Janus* en délivrant deux principes actifs aux propriétés physico-chimiques différentes dans la peau.

VI. BIBLIOGRAPHIE

AGACHE P., *Précis de cosmétologie dermatologique*.214p. 2e éd. Masson, 1990.

ALI B.A., ZUGHUL M.B, BADWAN A.A. 1995. Surface Activity and Energetic of Aggregate Formation in Aqueous Sodium Benzoate and Salicylate Solutions. *Journal of Dispersion Science and Technology* 16 (6): 451-68.

ALMEIDA A., SOUTO E. 2007. Solid Lipid Nanoparticles as a Drug Delivery System for Peptides and Proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (6): 478-90.

AZMI D.M., MOGHIMI S, YAGHMUR A. 2015. Cubosomes and Hexosomes as Versatile Platforms for Drug Delivery. *Therapeutic Delivery* 6 (12): 1347-64.

BENJAMINS J., CAGNA A, LUCASSEN-REYNDERS E.H. 1996. Viscoelastic Properties of Triacylglycerol/Water Interfaces Covered by Proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 114 (8): 245-54.

BERMANN P.E., 2007. Aging Skin : Causes, Treatments, and Prevention. *Nursing Clinics of North America* 42 (3): 485-500.

BLUNK D., BIERGANNS, P, BONGARTZ N, TESSENDORF R, STUBENRAUCH C. 2006. New Speciality Surfactants with Natural Structural Motifs. *New Journal of Chemistry* 30 (12): 1705.

BOULAY N. 2007. Les cellules de Merkel, *Kératin*, 12: 4-8.

BOYD B., WHITTAKER D.V, KHOO S, DAVEY G. 2006. Lyotropic Liquid Crystalline Phases Formed from Glycerate Surfactants as Sustained Release Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutics* 309 (1-2): 218-26.

BOZZUTO G., MOLINARI A. 2015. Liposomes as Nanomedical Devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10 (2), 975-999.

BRANNAN D. 1995. Cosmetic preservation. *Journal of the society of cosmetic chemists*, 46 (8), 199-220.

CASAGRANDE C., FABRE P, RAPHAEL E, VEYSSIE M. 1989. “Janus Beads” : realization and behaviour at water/oil interfaces. *Europhysics Letters* 9 (3): 251.

CEVC G., SCHÄTZLEIN A, RICHARDSEN H. 2002. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1564 (1): 21–30.

CHATURVEDI N., JULURI B.K, HAO Q, HUANG T.J, VELEGOL D. 2012. Simple Fabrication of Snowman-like Colloids. *Journal of Colloid and Interface Science* 371 (1): 28-33.

CHEN Y., MA P, GUI S. 2014. Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. *BioMed Research International* 2014: 1-12.

CHO I., LEE K. 1985. Morphology of latex particles formed by poly (methyl methacrylate)-seeded emulsion polymerization of styrene. *Journal of applied polymer science* 30 (5): 1903–1926.

DAVIS G.E., BAYLESS K.J, DAVIS M.J, MEININGER G.A. 2000. Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules. *The American Journal of Pathology* 156 (5): 1489-98.

DELMIGLIO. 2016. Structure briques mortier du *stratum corneum*.[en ligne] Consulté le 21 septembre 2016. *Bodylanguage.fr*

DJOHARI H., DORMIDONTOVA E.E. 2009. Kinetics of Nanoparticle Targeting by Dissipative Particle Dynamics Simulations. *Biomacromolecules* 10 (11): 3089-97.

DRELICH J., FANG C, WHITE C. L. 2002. Measurement of interfacial tension in fluid-fluid systems. *Encyclopedia of surface and colloid science* 3: 3158–3163.

DU J., O'REILLY R.K. 2011. Anisotropic particles with patchy, multicompartment and Janus architectures: preparation and application. *Chemical Society Reviews* 40 (5): 2402.

FAIVRE V., LESIEUR S, OLLIVON M, OUATTARA M, TRUONG T. 2014. Nanoparticules lipidiques multicompartimentées. WO2015011419A1.

FANG J.Y., LEU Y. 2006. Prodrug strategy for enhancing drug delivery via skin. *Current drug discovery technologies* 3 (3): 211–224.

FDA. 1998. Guidance for Industry. Manufacturing, Processing, or Holding Active Pharmaeuticals Ingredients.

FEINGOLD K.R. 2008. The Outer Frontier : The Importance of Lipid Metabolism in the Skin. *The Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S417-22.

FONG C., DONG A.W, HILL A.J, BOYD J, DRUMMOND J. 2015. Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy (PALS): A Probe for Molecular Organisation in Self-Assembled Biomimetic Systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (27): 17527-40.

GOROUHI F., MAIBACH H. I. 2009. Role of Topical Peptides in Preventing or Treating Aged Skin. *International Journal of Cosmetic Science* 31 (5): 327-45.

GU H., YANG Z, GAO J, CHANG C. K, XU B. 2005. Heterodimers of Nanoparticles: Formation at a Liquid−Liquid Interface and Particle-Specific Surface Modification by Functional Molecules. *Journal of the American Chemical Society* 127 (1): 34-35.

HADGRAFT J. 2001. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224 (1): 1–18.

HADRI M., ACHAHBAR A, KHAMKHAMI J.EL, KHELIFA B, FAIVRE V, ABBAS O, BRESSON S. 2016. Lyotropic Behavior of Gelucire 50/13 by XRD, Raman and IR Spectroscopies according to Hydration. *Chemistry and Physics of Lipids*. 200 (6): 11-23.

HONEYWELL-NGUYEN L., DE GRAAFF A.M, WOUTER H.W, GROENINK, BOUWSTRA J.A. 2002. The in Vivo and in Vitro Interactions of Elastic and Rigid Vesicles with Human Skin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1573 (2): 130-40.

HUA S., 2015. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*

HWANG S., LAHANN J. 2012. Differentially Degradable Janus Particles for Controlled Release Applications. *Macromolecular Rapid Communications* 33 (14): 1178-83.

ISRAELACHVILI J.N., MITCHELL D.J, NINHAM B.W. 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72: 1525–1568.

JANNIN V., RODIER J, MUSAKHANIAN J. 2014. Polyoxylglycerides and Glycerides: Effects of Manufacturing Parameters on API Stability, Excipient Functionality and Processing. *International Journal of Pharmaceutics* 466 (1-2): 109-21.

JONES R., CASTELLETTO V, CONNON C.J, HAMLEY I. W. 2013. Collagen Stimulating Effect of Peptide Amphiphile C_{16} –KTTKS on Human Fibroblasts. *Molecular Pharmaceutics* 10 (3): 1063-69.

KUNTSCHE J., HORST J.C, BUNJES H. 2011. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics* 417 (1-2): 120-37.

LATTUADA M., HATTON T.A. 2011. Synthesis, Properties and Applications of Janus Nanoparticles. *Nano Today* 6 (3): 286-308.

LINTNER K., PESCHARD O. 2000. Biologically active peptides : from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. *International journal of cosmetic science* 22 (3): 207–218.

LIU B., WEI W, QU X, YANG Z. 2008. Janus Colloids Formed by Biphasic Grafting at a

Pickering Emulsion Interface. *Angewandte Chemie* 120 (21): 4037-39.

MAQUART F.X., PASCO S, RAMONT L, HORNEBECK W, MONBOISSE J. 2004. An Introduction to Matrikines: Extracellular Matrix-Derived Peptides Which Regulate Cell Activity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49 (3): 199-202.

MARTINI M.C. 2003a et b. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. *Editions médicales internationales.* Paris.

MENON G.K., CLEARY G.W, LANE M.E. 2012. The Structure and Function of the Stratum Corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 435 (1): 3-9.

MITSUI T., MACHIDA Y, HARUSAWA F. 1970. An Application of the Phase-Inversion-Temperature Method to the Emulsification of Cosmetics. I. Factors Affecting the Phase-Inversion Temperature . *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 43 (10): 3044-48.

MOFTAH N., EL-HAKEEM M, EL-SHAAL A, HASSAN N. 2012. Morphometry and Epidermal Fas Expression of Unexposed Aged versus Young Skin. *Indian Journal of Dermatology* 57 (3): 181.

ORTH D.S. 2006. *Cosmetic and drug microbiology*. Cosmetic science and technology 31. New York: Informa Healthcare.

PANDEY H., RANI R, AGARWAL V. 2016. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59.

PARDEIKE J., HOMMOSS A, MÜLLER R.H. 2009. Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) in Cosmetic and Pharmaceutical Dermal Products. *International Journal of Pharmaceutics* 366 (1-2): 170-84.

PERRO A., RECULUSA S, RAVAINE S, BOURGEAT-LAMI E, DUGUET E. 2005. Design and Synthesis of Janus Micro- and Nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 15 (35-36): 3745.

PICKART L., VASQUEZ-SOLTERO J.M, MARGOLINA A. 2015. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *BioMed Research International* 2015 : 1-7.

ROMANSKI F.S., WINKLER J.S, RICCOBENE R.C, TOMASSONE M.S. 2012. Production and Characterization of Anisotropic Particles from Biodegradable Materials. *Langmuir* 28 (8): 3756-65.

SAINDOU C., TUYET L, TRUONG-CONG T, GUEUTIN C, LAUGEL C, LESIEUR S, FAIVRE V. 2014. Innovative lipid-based Janus nanoparticules : Formulation, preparation and cosmetic applications. *28th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*

(IFSCC) Congress.

SCHAEFER U.F., HANSEN S, SCHNEIDER M, LUENGO CONTRERAS J, LEHR C.M. 2008. Models for skin absorption and skin toxicity testing. *Drug absorption studies*, 3–33. Springer.

SEDDON J.M. 1990. Structure of the Inverted Hexagonal (HII) Phase, and Non-Lamellar Phase Transitions of Lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1031 (1): 1-69.

SHINODA K., ARAI H. 1964. The Correlation between Phase Inversion Temperature In Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier. *The Journal of Physical Chemistry* 68 (12): 3485-90.

SIMEON A., WEGROWSKI Y, BONTEMPS Y, MAQUART F.X. 2000. Expression of Glycosaminoglycans and Small Proteoglycans in Wounds : Modulation by the Tripeptide–Copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu 2+. *Journal of Investigative Dermatology* 115 (6): 962–968.

SMEDEN J., JANSSENS M, GOORIS G.S, BOUWSTRA J.A. 2014. The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (3): 295-313.

SOUTO E.B., MÜLLER R. H. 2008. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *International Journal of Cosmetic Science* 30 (3): 157–165.

SPICER P.T. 2005. Progress in Liquid Crystalline Dispersions : Cubosomes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10 (5-6): 274-79.

SUN T.M., DU J, YAO Y, MAO C, DOU S, HUANG S.Y, ZHANG P, LEONG K.W, SONG E, WANG J. 2011. Simultaneous Delivery of siRNA and Paclitaxel *via* a “Two-in-One” Micelleplex Promotes Synergistic Tumor Suppression. *ACS Nano* 5 (2): 1483-94.

TADROS T. 2013. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. First Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

TOUITOU E., DAYAN N, BERGELSON L, GODIN B, ELIAZ M. 2000. Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release* 65 (3): 403–418.

TRAN K.T., LAMB P, DENG J. 2005. Matrikines and Matricryptins: Implications for Cutaneous Cancers and Skin Repair. *Journal of Dermatological Science* 40 (1): 11-20.

TRAN C., LESIEUR S, FAIVRE V. 2014. *Janus* Nanoparticles: Materials, Preparation and Recent Advances in Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, mai, 1-14.

UCHECHI O., OGBONNA J.D.N, ATTAMA A.A. 2014. Nanoparticles for Dermal and

Transdermal Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. PhD. Ali Demir Sezer (Ed.), InTech.

VALENZUELA P, SIMON J.A. 2012. Nanoparticle Delivery for Transdermal HRT. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*: S83-89.

WALLER J. M., MAIBACH H.I. 2006. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II) : protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin research and technology* 12 (3): 145–154.

WALTHER A., ANDRE X, DRECHSLER M, ABETZ V, MÜLLER A. H. E. 2007. Janus Discs. *Journal of the American Chemical Society* 129 (19): 6187-98.

WALTHER A., MÜLLER A.H. E. 2013. Janus Particles: Synthesis, Self-Assembly, Physical Properties, and Applications. *Chemical Reviews* 113 (7): 5194-5261.

WILLIAMS A.C., BARRY B.W. 2012. Penetration Enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (12): 128-37.

XIE H., SHE Z.G, WANG S, SHARMA G, SMITH J.W. 2012. One-Step Fabrication of Polymeric Janus Nanoparticles for Drug Delivery. *Langmuir* 28 (9): 4459-63.

ZHANG L., FALLA T. J. 2009. Cosmeceuticals and Peptides. *Clinics in Dermatology* 27 (5): 485-94.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE DE LORRAINE

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27 Janvier 2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Caroline TWAROG

Sujet :

Particules Janus pour des applications industrielles : Stabilités et incorporation de principes actifs

Jury :

Président : M. MAINCENT, Professeur
Directeur : M. FAIVRE, Maitre de conférences
Juges : Mme SAPIN-MINET, Maitre de conférences
Mme SOCHA-BORY, Maitre de conférences PH

Vu,

Nancy, le 7 Novembre 2016

Le Président du Jury — Directeur de Thèse

M. — M. FAIVRE

Vu et approuvé,

Nancy, le 3.01.2017

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

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 12.01.2017

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 9413

N° d'identification :

TITRE

Particules *Janus* pour des applications industrielles : Stabilités et incorporation de principes actifs

Thèse soutenue le 27 Janvier 2017

Par Caroline TWAROG

RESUME :

En cosmétique, l'utilisation de systèmes colloïdaux permet de pénétrer la barrière cutanée pour une action plus efficace des substances actives. Les vecteurs de type lipidiques sont les plus utilisés du fait de leur biodégradabilité et leur biocompatibilité avec les composants de la peau. Ce projet consiste en la préparation et la caractérisation de nanoparticules compartimentées lipidiques *Janus* (JNP) selon un cahier des charges définit par la collaboration avec un industriel cosmétique. De ce fait, des modifications de la formule initiale et du procédé de fabrication ont été réalisées.

L'objectif du travail est d'étudier l'impact de ces changements sur la stabilité physique des nanoparticules *Janus* par des techniques de cryo-microscopie, diffraction des rayons X, diffusion quasi-élastique de la lumière et tension interfaciale notamment. Les particules Janus multi compartimentées sont produites à petite et large échelle (de 70 g à 1 kg) par la méthode d'homogénéisation à haute pression en trois passages à l'homogénéisateur. Les nanoparticules *Janus* sont obtenues lors de l'ajout d'un système tampon citrate et d'un principe actif peptidique hydrophile. Des études ont été menées sur le choix du conservateur. Les nanodispersions sont très stables sur plusieurs mois à température ambiante et à 4°C mais sont déstabilisées lors d'une conservation à 40°C. Des études de tensions interfaciales ont permis de mettre en évidence l'importance de la température d'inversion de phase sur la stabilité physique du système.

MOTS CLES :

NANOPARTICULES JANUS - STABILITE PHYSIQUE - TEMPERATURE D'INVERSION DE PHASE

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Mr. Vincent FAIVRE	**Institut Galien Paris Sud UMR CNRS 8612 Equipe Physico-chimie des Systèmes Polyphasés**	**Expérimentale** **Bibliographique** **Thème**	☒ ☐ **3**

Thèmes : **3 – Médicament**