



HAL
open science

Mise au point de vecteurs colloïdaux pour améliorer l'absorption d'anticancéreux utilisés par voie orale

Emilie Roger

► **To cite this version:**

Emilie Roger. Mise au point de vecteurs colloïdaux pour améliorer l'absorption d'anticancéreux utilisés par voie orale. Médicaments. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00476809

HAL Id: tel-00476809

<https://theses.hal.science/tel-00476809>

Submitted on 27 Apr 2010

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.

**MISE AU POINT DE NOUVEAUX VECTEURS COLLOÏDAUX
POUR AMELIORER L'ABSORPTION DIGESTIVE DE MEDICAMENTS
ANTICANCEREUX**

**THESE DE DOCTORAT
En pharmacologie expérimentale**

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 novembre 2009

à Angers

par **Emilie ROGER**

Devant le jury ci-dessous :

Professeur Jean-Pierre BENOIT, Université d'Angers	Directeur de thèse
Professeur Véronique PREAT, Université catholique de Louvain	Rapporteur
Professeur Jean-Marie DEVOISSELLE, Université de Montpellier	Rapporteur
Professeur Alf LAMPRECHT, Université de Franche-Comté	Examineur
Docteur Pascal OURY, Ethypharm	Examineur
Docteur Frédéric LAGARCE, Université d'angers	Examineur

INSERM U646, Ingénierie de la vectorisation particulière
IBT, 10 Rue André Boquel, 49 100 Angers, France

Je voudrais tout d'abord présenter mes plus sincères remerciements,

*A Monsieur le **professeur Jean-Pierre Benoît**, directeur de l'Unité INSERM 646, pour m'avoir fait l'honneur de m'accorder sa confiance pour travailler sur ce sujet de thèse, pour ses précieux conseils et ses encouragements.*

En témoignage de mon respect.

*A Monsieur le **docteur Frédéric Lagarce**, co-encadrant de ce travail de thèse, pour m'avoir encouragée et rassurée, pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et la confiance que tu m'as accordée. Ces 3 années de travail passées à tes côtés furent très enrichissantes.*

*A Madame le **professeur Véronique Prémat** et Monsieur le **professeur Jean-Marie Devoisselle**, pour me faire l'honneur de participer à ce jury et pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse en qualité de rapporteur.*

*A Monsieur le **docteur Pascal Oury**, pour m'avoir accordé sa confiance pour ce travail de thèse et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.*

*A Monsieur le **professeur Alf Lamprecht**, pour avoir accepté d'être membre de ce jury.*

*J'adresse également mes remerciements à **Ethypharm** pour m'avoir donné les moyens de mener ce travail de recherche.*

Je souhaite remercier également en particulier,

Valérie Péron, pour avoir suivi l'avancée de ce travail, pour sa gentillesse et sa disponibilité et pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans un cadre rationnel.

Emmanuel Garcion, merci pour ton aide et tes réflexions qui ont fait avancer les choses (des fois même un peu trop !) et pour les nombreuses discussions que nous avons eu ensemble.

Pierre Legras, merci de m'avoir rassurée et aidée avec les souris car tout le monde sait que c'était un grand défi pour moi, grâce à toi je peux tenir une souris sans crier. Je te remercie pour ta disponibilité, ton écoute, ta grande gentillesse, tes conseils et tes « nounours » !

Merci aussi à Jérôme, Dominique et Laurent pour leur gentillesse, et pour avoir rendu l'animalerie plus accueillante.

Jacqueline Colleau et Nolwenn Lautram, mes deux acolytes de la masse. Chacune à votre tour vous m'avez aidée et soutenue pour l'utilisation de la LC-MS/MS mais aussi écoutée et remonté le moral tout au long de ma thèse. Grâce à vous je me suis aperçue qu'en sortant d'une thèse on est capable de travailler sur autre chose que son sujet.

Jacqueline, je pensais te revoir plus souvent après ton départ, je suis contente que ta nouvelle vie se passe bien.

Nolwenn, sais-tu que l'on peut marcher et non courir au labo ? Ta bonne humeur et nos longues discussions vont me manquer.

Le Docteur Sylvie Demignot de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes de Paris pour m'avoir permis de tester les ultracentrifugations.

Monsieur Robert FILMON du service commun d'imagerie et de microscopie de l'Université d'Angers qui a réalisé les images de microscopie confocale.

Merci aux stagiaires qui m'ont aidé dans ce travail : Adeline, Marina, Miriam, Paul et Annabelle, François et Messan.

Un grand merci aussi aux membres du laboratoire pour les bons moments partagés.

Marie. Tu es à mes côtés depuis mon arrivée au laboratoire, tu m'as soutenue et j'ai toujours pu compter sur toi. Tu es un vrai capitaine, bon match pour la suite.

Merci à mes collègues de bureau passés et présents.

Emilie. Tu es devenue une réelle amie, tes « blonderies » me feront toujours rire. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite et pour tes nombreuses vacances.

Olivier, tu as supporté mes râleries, ton engagement pour les LNCs est remarquable. Bon courage pour ta thèse.

Samuli, ton calme et ta curiosité m'ont fait beaucoup de bien. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille.

Edith, tu es presque du bureau, les longues discussions avec toi le long du radiateur et nous à nos bureaux étaient très sympathiques.

Merci aussi à tous mes collègues du laboratoire, je vous exprime ma profonde sympathie et vous souhaite beaucoup de bonheur :

Alexandra (continuons à rêver, on va y arriver), Archibald (dit Mr bisounours), Arnaud (désolé pour ma mythique erreur), Ahmed, Claire, Elisa (eres una amiga sincera), Emilien (continue à suivre ta route), Erika, Frank, Florian (vive la Flag), Guillaume, Jean-Pierre (promis je vais écouter tes conseils Dr corazon), Jérôme B. (mais non tu n'es pas si vieux), Jérôme C., José, Kaïes, Livia, Marie W., Maud, Nicolas, Sandy, Stéphanie, Than, Thomas.

Sans oublier les dames de ce laboratoire: Anne, Catherine C., Catherine P., Claudia, Gisèle, Laurence, Marie-Claire, Mimi, Nathalie.

Enfin je tiens à remercier :

Très chaleureusement mes amis pour leur soutien,

Pauline, tu as toujours été là pour mes interrogations professionnelles et personnelles. Merci d'avoir écouté mes monologues tour à tour enthousiastes et plaintifs. A mon tour de t'encourager pour ta thèse et autre ! Tu pourras compter sur moi, nos longues soirées téléphoniques ne sont pas finies !

Et très affectueusement,

Mes parents et ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix, pour leurs encouragements quotidiens tout au long de cette longue route et pour leur affection.

Mathilde. Cela n'a pas toujours été facile de travailler avec sa sœur mais tu as été présente même dans les moments les plus difficiles. Merci d'avoir été autant à mon écoute, bon courage pour la dernière année mais je ne me fais pas de soucis, tu es une battante.

Simon, merci pour ta patience, mais c'est ça d'être avec « soeur Roger ». Bon courage pour ta thèse.

*« A mes parents
A mes grands-parents
A ma famille»*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1-18
<u>PARTIE I : PROPRIETES DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES POUR UNE ADMINISTRATION ORALE</u>	19-127
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
“Oral delivery of nanocarriers: why and how should particle integrity be sought?”	
TRAVAIL EXPERIMENTAL	
Chapitre 1	62
Stabilité <i>in vitro</i> des nanocapsules lipidiques dans les milieux gastro-intestinaux	
“ <i>The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules</i> ”	
Chapitre 2	79
Mécanisme de transport des nanocapsules lipidiques de paclitaxel à travers l'épithélium intestinal	
“ <i>Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis.</i> ”	
Chapitre 3	107
Effet de la P-gp sur le transport des nanocapsules lipidiques	
“ <i>Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells.</i> ”	
<u>PARTIE II : MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE FORMULATION DE NANOCAPSULES LIPIDIQUES ENCAPSULANT LE Sn38</u>	128-190
TRAVAIL EXPERIMENTAL	
Chapitre 1	132
Mise en place des méthodes analytiques du Sn38	
Chapitre 2	146
Conception et caractérisation de LNCs de Sn38	
“ <i>Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration</i> ”	
Chapitre 3	169
Evaluation <i>in vivo</i> des LNCs de Sn38	
DISCUSSION GENERALE	191-217
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	218-222
ANNEXES	223

ABBREVIATIONS

A

ABC = ATP-Binding cassette

B

BSA = bovine serum albumin

C

Caps = capsule

Cpr = comprimé

CPT-11 = irinotécan

CYP = cytochrome P450

D

DLS = dynamic light scattering

D-MEM = Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO = dimethyl sulfoxide

F

FaSSIF= fasted state simulated intestinal fluid

FDA = food and drug administration

FeSSIF= fed state simulated intestinal fluid

G

GI= gastro-intestinal

H

HBSS = Hank's Buffered Salt Solution

HPLC = High performance liquid chromatography

I

IV = intraveineuse

L

LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LNC = lipid nanocapsule

LOD = limite de détection

LOQ = limite de quantification

M

MRM = multiple reaction monitoring

N

NR = nile red

NP = nanoparticle

O

O/W = oil-in- water

P

P_{app} = apparent permeability coefficient

PBS = phosphate buffer saline

PC = phosphatidycholine

PEG = polyéthylène glycol

P-gp = P-glycoprotéine

PIZ = phase inversion zone

PLGA = poly(lactic-co-glycolic acid)

Ptx = paclitaxel

S

SEDDS = self-emulsifying drug delivery system

SGF= simulated gastric fluid

SIF= simulated intestinal fluid

SLN = solid lipid nanoparticle

SMEDDS = self-microemulsifying drug delivery system

SNEDDS = self-nanoemulsifying drug delivery system

T

TEER = transepithelial resistance

TEM = transmission electron microscope

THF = tetrahydrofurane

TJ= tight junction

U

UV = ultraviolet

V

VO = voie orale

W

W/O = water-in-oil

W/O/W = water-in-oil-in-water

INTRODUCTION GENERALE

1. Voie orale : intérêts et limites dans l'administration d'anticancéreux

En 2008, le nombre de nouveau cas de cancer en France est estimé à 353 000 et il est devenu la première cause de mortalité chez l'homme en étant responsable de plus de 145 000 décès (et 2^{ème} cause de mortalité chez la femme) [1]. Même si aujourd'hui, tous les cancers sont susceptibles de bénéficier d'un traitement, le taux de guérison reste encore limité. Environ 900 000 personnes effectuent chaque année un séjour à l'hôpital en raison de leur cancer et ce, grâce à une équité d'accès aux soins et une prise en charge des coûts par la collectivité. Le coût du cancer a été estimé à environ 15 milliards d'euros en France, en 2002 [2], et continue d'augmenter (15% en 2007) [3]. Depuis 2000, le gouvernement français a montré son engagement en faisant du cancer une priorité nationale avec la réalisation de deux plans cancer. Le plan de lutte contre le cancer 2003-2007 a ainsi permis des avancées significatives en matière de prévention et de qualité des soins pour le patient. De plus, la qualité de vie des malades, pendant le traitement du cancer, fait aujourd'hui partie à part entière de la prise en charge. La « vie pendant le cancer » sera donc l'un des objectifs du plan 2009-2013.

Actuellement la majorité des chimiothérapies sont administrées par voie intraveineuse, alors qu'une administration par voie orale permettrait de réduire les coûts du traitement et d'améliorer la qualité de vie des patients. En effet, une administration *per os* permet aux patients de bénéficier d'un traitement à domicile, et par conséquent de réduire le coût global d'une hospitalisation [8, 9]. Liu *et al.* [10] ont ainsi montré que 89% des patients préfèrent un traitement par voie orale. Plus récemment, une enquête [11] a montré qu'avec un traitement par voie orale les patients se sentaient plus libres et moins malades car ce traitement s'accorde mieux avec la vie quotidienne, et ils pouvaient faire face plus facilement à la maladie améliorant ainsi leur qualité de vie. Cette voie d'administration permet également de palier aux risques d'infection du cathéter, de thrombose et d'extravasation possibles par voie intraveineuse [12]. L'administration des traitements de chimiothérapie par voie orale présente donc un intérêt majeur.

A l'heure actuelle, environ 25% de l'ensemble des médicaments de chimiothérapie se prennent par voie orale [13] et concernent le traitement de certaines formes du cancer

du sein, du colon, du rectum, du poumon, du cerveau, de l'ovaire, des testicules et certaines formes de myélome, de lymphome et de leucémie (Table 1). De ce fait, des avancées dans ce domaine sont encore possibles.

Toutefois une administration par voie orale présente deux principaux inconvénients : l'observance du traitement par le patient et la biodisponibilité du médicament.

En effet, les molécules anticancéreuses sont caractérisées par une marge thérapeutique étroite, une complexité du protocole de traitement, de nombreux effets indésirables et des interactions médicamenteuses. Les principaux effets indésirables sont :

- une toxicité hématologique pouvant entraîner une neutropénie, une anémie, une pancytopenie ou une thrombopénie ;
- une toxicité digestive le plus souvent caractérisée par des nausées-vomissements, des diarrhées ou des mucites ;
- une toxicité des phanères (alopécie, érythrodermie, onychopathie).

Lors d'une administration par voie intraveineuse, la prise en charge des événements toxiques est mieux réalisée car plus facile et plus rapide puisqu'elle se fait en milieu hospitalier, en général. De ce fait, il est important de cibler la population susceptible de recevoir un traitement par voie orale car dans ce cas, le patient devient un réel acteur de son traitement [14]. Dès l'apparition d'effets indésirables il doit être pris en charge. Toute erreur médicamenteuse représente un risque et doit être signalée. Des études ont montré que l'observance, variable d'un individu à l'autre (entre 20 et 100% [15]), peut évoluer au cours du temps pour un même individu et est différente selon le traitement prescrit [16]. Une réelle éducation et information du patient (ou entourage dans le cas des enfants ou des personnes âgées) doit donc être réalisée lors d'un traitement par chimiothérapie orale [17, 18].

La biodisponibilité des anticancéreux est également un facteur limitant l'administration orale car celle-ci est faible et variable selon les individus pour de nombreuses molécules anticancéreuses [4, 12]. La biodisponibilité dépend principalement de l'absorption et du métabolisme de ces molécules. Deux principaux facteurs expliquent ces faibles et variables biodisponibilités : l'affinité de ces molécules pour les protéines d'efflux comme la P-glycoprotéine et leur métabolisme par les cytochromes P450 [19].

Principe actif	Spécialité	Forme	Classe	Indication
Altrétamine	Hexastat [®]	Gélule	agent alkylant	cancer de l'ovaire et bronchique à petites cellules
Bexarotène	Targretin [®]	caps molle	agent différenciateur	lymphome cutané T epidermotrope
Busulfan	Myleran [®]	cpr pelliculé	agent alkylant	LMC
Capécitabine	Xeloda [®]	cpr pelliculé	antimétabolite	cancer colorectal métastatique, cancer du sein métastatique
Chlorambucil	Chloraminophene [®]	Gélule	agent alkylant	LLC, LH et LNH
Cyclophosphamide	Endoxan [®]	cpr enrobé	agent alkylant	cancer du sein métastatique, cancer de l'ovaire, bronchique, vessie, sarcome, neuroblastome, LH et LNH, myélomes multiples, LAL
Dasatinib monohydrate	Sprycel [®]	cpr pelliculé	inhibiteur des tyrosines kinases	LMC, LAL
Erlotinib chlorhydrate	Tarceva [®]	cpr pelliculé	inhibiteur des tyrosines kinases	cancer bronchique non à petites cellules, cancer du pancréas métastatique
Estramustine	Estracyt [®]	Gélule	agent alkylant	cancer de la prostate hormono-résistant
Etoposide	Celltop [®] , vepeside [®]	Caps	intercalant	cancer bronchique à petites cellules, cancer du sein, LH, LNH, LA
Fludarabine	fludara [®]	cpr pelliculé	antimétabolite	LLC
Gefitinib	Iressa [®]	Cpr	inhibiteur des tyrosines kinases (ATU en France)	cancer du poumon non à petites cellules
Hydroxycarbamide	Hydrea [®]	Gélule	Antimétabolite	LMC, thrombocythémie essentielle, splénomégalie myéloïde, polyglobulie
Idarubicine	Zavedos [®]	Gélule	inhibiteur des topoisomères II	LAM
Imatinib	Glivec [®]	cpr pelliculé	inhibiteur des tyrosines kinases	LMC, GIST
Lapatinib	Tyverb [®]	cpr pelliculé	inhibiteur des tyrosines kinases	cancer du sein avancé ou métastatique
Lenalidomide	Revlimid [®]	Gélule	antinéoplasique	myélome multiple
Lomustine	Belustine [®]	Gélule	agent alkylant	tumeur cérébrale, mélanome, cancer bronchique à petites cellules, cancer du sein
Melphalan	Alkerant [®]	cpr pelliculé	agent alkylant	
Mercaptopurine	Purinethol [®]	cpr sécable	antimétabolite	LAL, LAM, LMC
Methotrexate	Methotrexate bellon [®]	Cpr	antimétabolite	LAL
Mitotane	Lysodren	Cpr	antinéoplasique	carcinome surrénalien
Nilotinib	Tasigna [®]	Gélule	inhibiteur des tyrosines kinases	LMC
Pipobroman	Vercyte [®]	Cpr	agent alkylant	polycythémie vraie
Procarbazine	Natulan [®]	Gélule	agent alkylant	LNH, maladie de Hodgkin, tumeur cérébrale, cancer du poumon à petites cellules
Sorafénib tosilate	Nexavar [®]	cpr pelliculé	inhibiteur des tyrosines kinases	cancer du rein
Sunitinib malate	Sutent [®]	Gélule	inhibiteur des tyrosines kinases	GIST, cancer du rein avancé et/ou métastatique,
Tégafur-uracile	UFT [®]	Gélule	antimétabolite	cancer colorectal métastatique
Thalidomide	Thalidomide Pharmion [®]	Gélule	antinéoplasique	myélome multiple
Témozolomide	Temodal [®]	Gélule	agent alkylant	gliome malin
Thioguanine	Ianvis [®]	cpr sécable	antimétabolites	LA, LMC
Topotecan	Hycamtin [®]	Gélule	antitopoisomérase I	carcinome métastatique de l'ovaire, cancer du poumon à petites cellules
Trétinoïne	Vesanoïd [®]	Caps	agent différenciateur	leucémie aiguë promyélocitaire
Vinorelbine	Navelbine [®]	caps molle	poison du fuseau	cancer du poumon non à petites cellules

Table 1 : Chimiothérapie orale actuellement disponible [4-7]. cpr = comprimé, caps= capsule, LH= lymphome hodgkinien, LNH= lymphome non hodgkinien, LLC= leucémie lymphoïde chronique, LA= leucémie aiguë, LAL= leucémie aiguë lymphoblastique, LAM= leucémie aiguë myéloblastique, LMC= leucémie myéloïde chronique, GIST= tumeur stromale gastro-intestinale.

1.1 *Dissolution et perméabilité*

Lors d'une administration par voie orale, les molécules anticancéreuses, comme tout autre principe actif, doivent être dissoutes pour ensuite être absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal et atteindre la circulation générale. Les facteurs physiologiques du tractus gastro-intestinal : pH, mobilité et durée du transit, l'état physiologique du patient (âge, sexe, maladie...) et la présence de nourriture sont des facteurs importants à prendre en compte [20]. La molécule doit donc présenter des propriétés physico-chimiques particulières : stable au pH acide de l'estomac, stable dans le milieu intestinal, présenter un profil de dissolution reproductible et une balance hydrophile/lipophile adéquate pour passer l'épithélium intestinal. Les deux principaux facteurs biopharmaceutiques étant la solubilité et la perméabilité intestinale, une classification a été proposée à la fin des années 1990 afin de prédire l'absorption d'une molécule [21](table 2). De nombreux anticancéreux appartiennent aux classes IV limitant ainsi leur possibilité d'administration par voie orale.

Classe biopharmaceutique	Solubilité	Perméabilité intestinale	
Classe I	Forte	Forte	⇒ Molécules généralement très bien absorbée
Classe II	Faible	Forte	
Classe III	Forte	Faible	
Classe IV	Faible	Faible	⇒ Molécules présentant une très faible biodisponibilité orale

Table 2 : Classification biopharmaceutique (BCS) [21] : une forte solubilité signifie que la molécule peut se dissoudre à dose thérapeutique dans un volume inférieur à 250mL d'eau de pH1-8, une forte perméabilité correspond à une perméabilité supérieure à 80%.

1.2 *P-glycoprotéine*

La P-glycoprotéine (P-gp) est une protéine d'efflux appartenant à la super famille des ATP binding cassette (ABC), elle est composée de deux portions homologues formées chacune de six domaines transmembranaires et de deux sites de fixation d'ATP

intracellulaires. Elle est associée au phénomène de multirésistance (multidrug résistance : mdr) des cellules tumorales aux médicaments anticancéreux (Figure 1). On la retrouve également au niveau de tissus sains comme au niveau du pôle apical de la membrane épithéliale de l'intestin, sur les tubules rénaux, la membrane des hépatocytes, la barrière hémato-encéphalique. Cette glycoprotéine est codée chez l'homme par les gènes MDR1 et MDR3 [19, 22, 23]. De plus, cette protéine possède une spécificité de substrat avec une préférence pour les molécules lipophiles et/ou cationiques. Des études ont montré que les *Vinca* alcaloïdes, anthracyclines, epidophyllotoxines et taxanes sont substrats de la P-gp [24, 25].

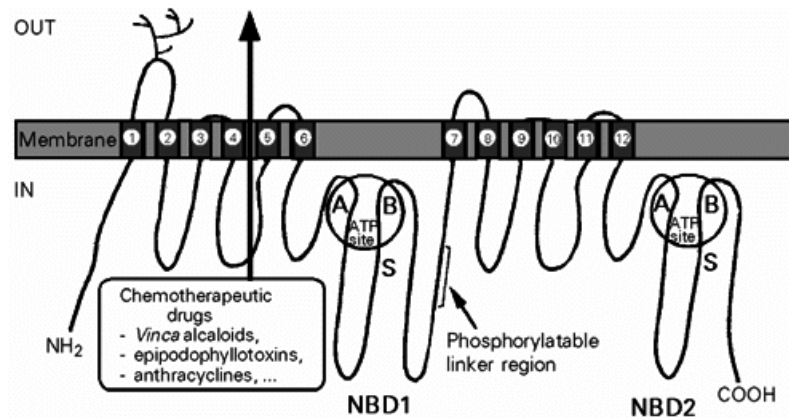


Figure 1 : Structure schématique de l'organisation de la P-gp [26].

1.3 Cytochrome P450 (CYP)

Le CYP est la principale enzyme impliquée dans le métabolisme oxydatif de nombreux anticancéreux (Table 3). Il est fortement exprimé au niveau du foie et de la paroi intestinale (effet de premier passage). Il existe différents isoformes de CYP dont le CYP3A4 et le CYP3A5 qui sont les plus abondants et qui sont impliqués dans le métabolisme de nombreux anticancéreux. Par exemple, le CYP3A4 représente 70% des cytochromes intestinaux [19, 27] et le CYP3A5 14 à 32% des cytochromes au niveau du foie [23].

De plus, il existe une concordance dans la spécificité des substrats et la localisation au niveau des mêmes entérocytes de la P-gp et du CYP3A4 ce qui suggère que ces deux protéines coopèrent et constituent une barrière pour l'absorption de certaines molécules.

Cytochrome P450	Molécules anticancéreuses
CYP3A4	Bexarotene, busulfan, cisplatine, cyclophosphamide, cytarabine, doxorubicine, erlotinib, exemestane, fulvestant, gefitinib, imatinib mesylate, letrozole, topotecan, toremidene, tretinoïne, vinblastine, vincristine, vinorelbine
CYP3A4 et CYP3A5	Docetaxel, etoposide, ifosfamide, irinotécan, paclitaxel, tamoxifen, teniposide

Table 3 : Exemple de molécules anticancéreuses substrats des cytochromes P450 3A4 et 3A5 [28].

Face à ces différents inconvénients (figure 2), de nombreuses stratégies sont développées afin d'améliorer la biodisponibilité de certains anticancéreux et de réduire la toxicité d'une chimiothérapie orale.

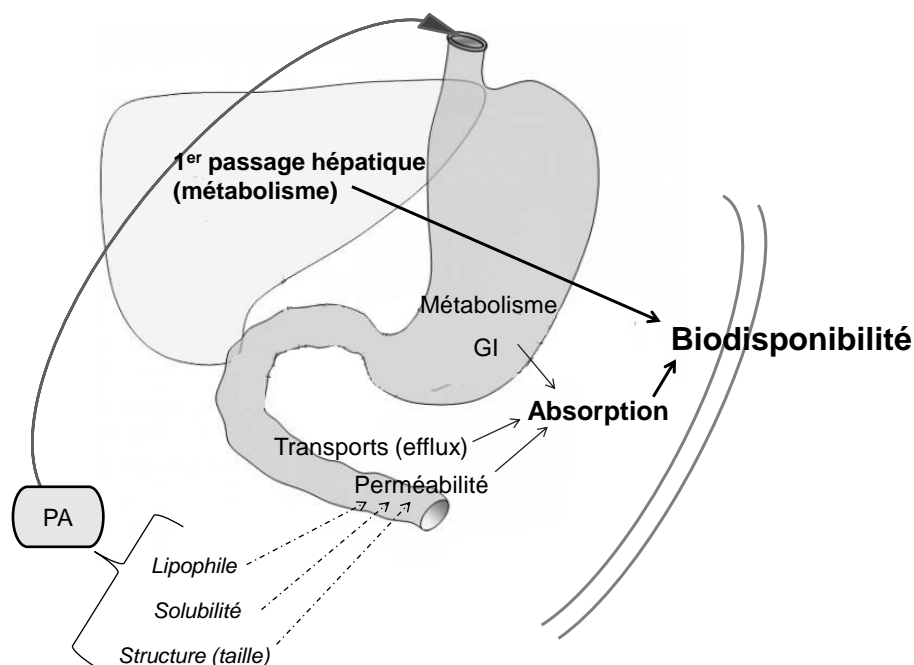


Figure 2: Différents obstacles et paramètres nécessaires pour une administration par voie orale [29].

La première stratégie consiste en l'association d'inhibiteur de la P-gp et/ou du cytochrome P450, comme par exemple la cyclosporine A qui a permis d'augmenter la biodisponibilité du paclitaxel d'un facteur huit [8]. Dans le cas du 5-fluorouracile (5-FU), une co-administration avec de l'eniluracil (inactivateur de la dihydropyrimidine déshydrogénase) a permis de diminuer les variations interindividuelle d'une administration orale de 5-FU et d'obtenir une biodisponibilité de 100% [30]. Cependant,

la co-administration de telles molécules n'est pas anodine et peut entraîner d'autres effets secondaires.

Une autre stratégie consiste à modifier les molécules afin d'augmenter leur solubilité, perméabilité et stabilité. Ainsi, les spécialités Xeloda[®] (capecitabine)[31] et UFT[®] (tegafur-uracile)(table 1) actuellement commercialisées, sont des prodrogues qui après administration par voie orale sont métabolisées dans l'organisme en 5-FU.

Ces stratégies nécessitent un métabolisme qui est variable d'un individu à un autre. Pour certaines molécules ces stratégies n'ont pour le moment pas permis une administration orale comme par exemple pour les taxanes (paclitaxel, docetaxel) qui sont les molécules cytostatiques les plus consommées en France en 2007 [32]. Par conséquent, l'application des nouvelles formulations, notamment les systèmes colloïdaux, pour permettre une chimiothérapie orale est une autre stratégie de plus en plus étudiée [33]. Ces systèmes particuliers protègent la molécule encapsulée des milieux traversés et peuvent limiter les phénomènes de dégradation, d'efflux et de métabolisme rencontrés lors d'une administration orale. De plus, ces systèmes permettent d'améliorer l'absorption intestinale de la molécule encapsulée.

2. Vecteurs d'anticancéreux pour la voie orale

Différents systèmes colloïdaux ont été décrits pour l'administration orale d'anticancéreux.

Tout d'abord, les formulations lipidiques de type émulsion tels que les SEDDS (self-emulsifying drug delivery system) ou SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) ont permis d'améliorer la solubilisation de certains cytostatiques (tamoxifène [34], paclitaxel [35]). Ces systèmes sont des mélanges isotropes du principe actif, de lipides, de tensioactifs et de co-tensioactifs ou co-solvants [36]. Lorsque ces systèmes, initialement sous forme de solution, sont en contact avec des milieux aqueux comme le liquide gastro-intestinal, ils s'auto émulsifient spontanément et forment des microémulsions dispersées dont la taille des gouttelettes est inférieure à 5 μm ce qui permet d'améliorer l'absorption du principe actif [37]. Ces systèmes ont permis d'améliorer la biodisponibilité d'un facteur deux du 5-FU [38] et du paclitaxel [35].

Ensuite, il existe les systèmes particuliers (figure 3) dont les nanovecteurs qui présentent une taille de plusieurs dizaines de nanomètres (< 1 μm) [39]:

- Les liposomes : vésicules dont la paroi est composée d'une ou plusieurs bicouches, de nature phospholipidique, renfermant un espace interne aqueux [40].
- Les micelles polymères : structure cœur-noyau formée par un arrangement spontané de polymères amphiphiles [41].
- Les dendrimères : complexes composés d'une répétition de molécules polymères.
- Les nanoparticules polymères : nanocapsules ou nanosphères [42].
- Les nanoparticules à cœur lipidique solide (SLN, NLC, LDC)[43].

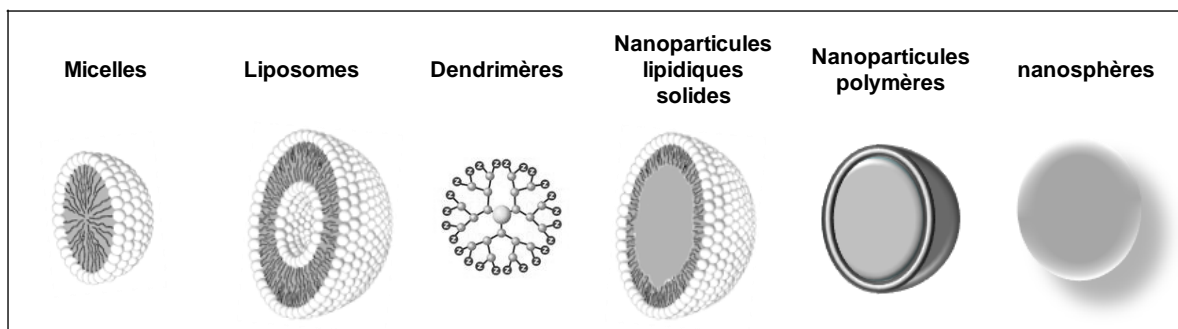


Figure 3: Représentation schématique des différents systèmes colloïdaux.

De nombreux travaux utilisant ces vecteurs colloïdaux ont ainsi démontré une augmentation de la biodisponibilité orale de certains cytostatiques qui s'explique par :

- une protection du principe actif contre les dégradations gastro-intestinales grâce à la présence de polyéthylène glycol en surface des particules [44-46].
- une augmentation du temps de transit dans le tractus GI par muco-adhésion grâce à la présence de lectine, chitosan, ou de polymère thiolé à la surface des particules [47-51].
- une amélioration de la perméabilité.

Si les deux premières explications sont largement décrites dans la littérature et les systèmes nanoparticulaires optimisés en fonction, l'amélioration de la perméabilité reste peu expliquée et la possibilité d'un passage intact des particules encore incertain. La première partie (partie I) de ce manuscrit consiste ainsi en une revue sur les mécanismes d'absorption des nanovecteurs à travers la barrière intestinale, et une description du vecteur idéal pour cette voie d'administration a été recherchée. Une

attention particulière est portée sur les paramètres qui permettent la conservation de la structure des vecteurs colloïdaux, car il est important, dans la plupart des applications, que la structure du vecteur soit maintenue au cours du phénomène d'absorption. Cela permet d'autre part une meilleure prévisibilité et une optimisation plus efficace du vecteur pour l'absorption.

3. Présentation du vecteur étudié

Au sein de l'unité Inserm U646 une nouvelle génération de nanocapsules lipidiques (LNCs) a été développée [52, 53]. Ces nanocapsules lipidiques sont formulées à partir d'une phase lipophile, cœur des nanocapsules, constituée de triglycérides à chaînes moyennes et entourée par deux tensioactifs: le Lipoid[®] S75-3 (lécithine de soja contenant en moyenne 69% de phosphatidylcholine) et le Solutol[®] HS15 (12 hydroxystéarate de Polyéthylène glycol 660) (Figure 4). Ces nanocapsules ont déjà permis d'encapsuler différents anticancéreux [54]: paclitaxel[55], étoposide [56], dérivé du tamoxifène [57]. De plus, une récente étude a montré l'intérêt de ces particules pour la voie orale. En effet, l'encapsulation du paclitaxel dans ces nanocapsules lipidiques (LNCs-Ptx) a permis d'améliorer la biodisponibilité du paclitaxel d'un facteur trois [55]. Ces LNCs possèdent également la propriété d'inhiber la P-gp grâce à la présence du Solutol[®]HS15 [56, 58]. Enfin, différentes tailles de LNCs peuvent être formulées [52, 59]. Les nanocapsules lipidiques sont, par conséquent, un vecteur intéressant pour une administration orale des cytostatiques.

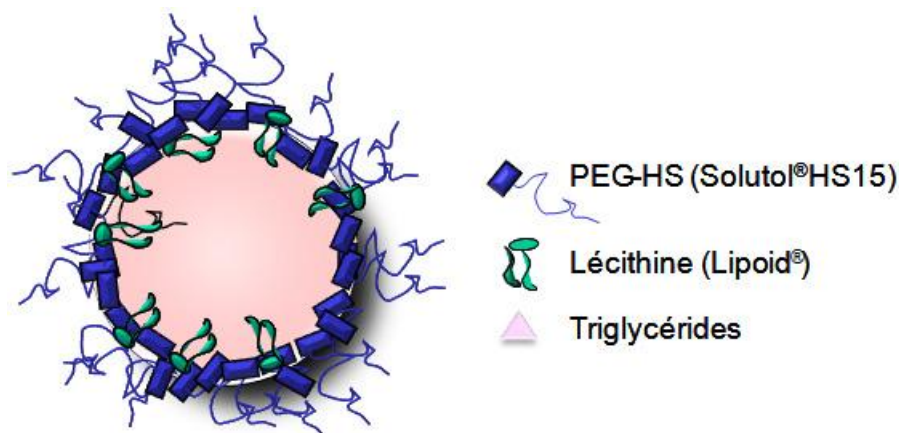


Figure 4: Représentation schématique des nanocapsules lipidiques.

4. Travail expérimental

Le présent travail s'inscrit dans cette stratégie d'administration orale d'anticancéreux. Deux anticancéreux ont été plus particulièrement étudiés : le paclitaxel et le Sn38.

4.1 Etude mécanistique

L'étude *in vivo* ayant montré, chez le rat, une amélioration de la biodisponibilité du paclitaxel encapsulé dans les LNCs, nous avons voulu étudier les raisons de cette augmentation. Dans ce but, un modèle de barrière intestinale *in vitro* (modèle cellulaire Caco-2) a été mis au point au sein du laboratoire afin d'étudier le mécanisme d'absorption des LNCs-Ptx à travers l'épithélium intestinal, et des milieux intestinaux simulés ont été recherchés.

Trois chapitres seront consacrés à cette partie. Tout d'abord, l'évaluation de la stabilité gastro-intestinale des LNCs fera l'objet du premier chapitre. Le deuxième s'intéressera au mécanisme de transport des LNCs-Ptx à travers l'entérocyte. Enfin, le troisième chapitre concernera l'interaction des LNCs avec la P-gp située au niveau des entérocytes.

4.2 Mise au point d'une nouvelle formulation

Dans le cadre de la thèse CIFRE, un travail d'encapsulation d'un principe actif à forte valeur ajoutée, le Sn38, a été réalisé.

Le Sn38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothécine) est le métabolite actif de l'irinotécan (CPT11), dérivé de la camptothécine. La cytotoxicité du Sn38 est due à la formation d'un complexe stable entre la topoisomérase I, l'ADN et le SN38 entraînant des dommages au niveau du double brin de l'ADN pendant sa réplication. Il est classé comme cytostatique inhibiteur de la topoisomérase I. Actuellement, l'irinotécan est commercialisé sous le nom commercial Campto[®] et est utilisé dans le traitement de certaines proliférations cellulaires du côlon ou du rectum. Le CPT11 est métabolisé au niveau du foie ou de la tumeur par la carboxylestérase en Sn38 [60, 61] (Figure 5), inhibiteur 100 à 1000 fois plus actif *in vitro* que le CPT11 et principal responsable de son activité anti-tumorale [62]. Néanmoins, seulement 2 à 8% du CPT11 est converti en Sn38 [63], et cette métabolisation dépend des variations interindividuelles génétiques de l'activité de la

carboxylestérase [64]. De plus, l'irinotécan présente des effets secondaires qui sont principalement des diarrhées, des neutropénies et des anémies [61, 65]. Il a été démontré que ces diarrhées étaient principalement dues à une accumulation de Sn38 dans l'intestin [66]. En effet, le Sn38 est métabolisé par l'UDP-glucuronosyl transférase en Sn38 glucuronide qui est ensuite éliminé par les urines, la bile ou les fèces [14]. Or cette glucuronidation hépatique du Sn38 est également variable d'un individu à l'autre entraînant des toxicités et des complications cliniques différentes selon les individus [67]. Face à ces différences interindividuelles ainsi qu'à la faible quantité de Sn38 actif retrouvée dans la circulation sanguine après administration de CPT11, une administration du Sn38 présente un réel intérêt.

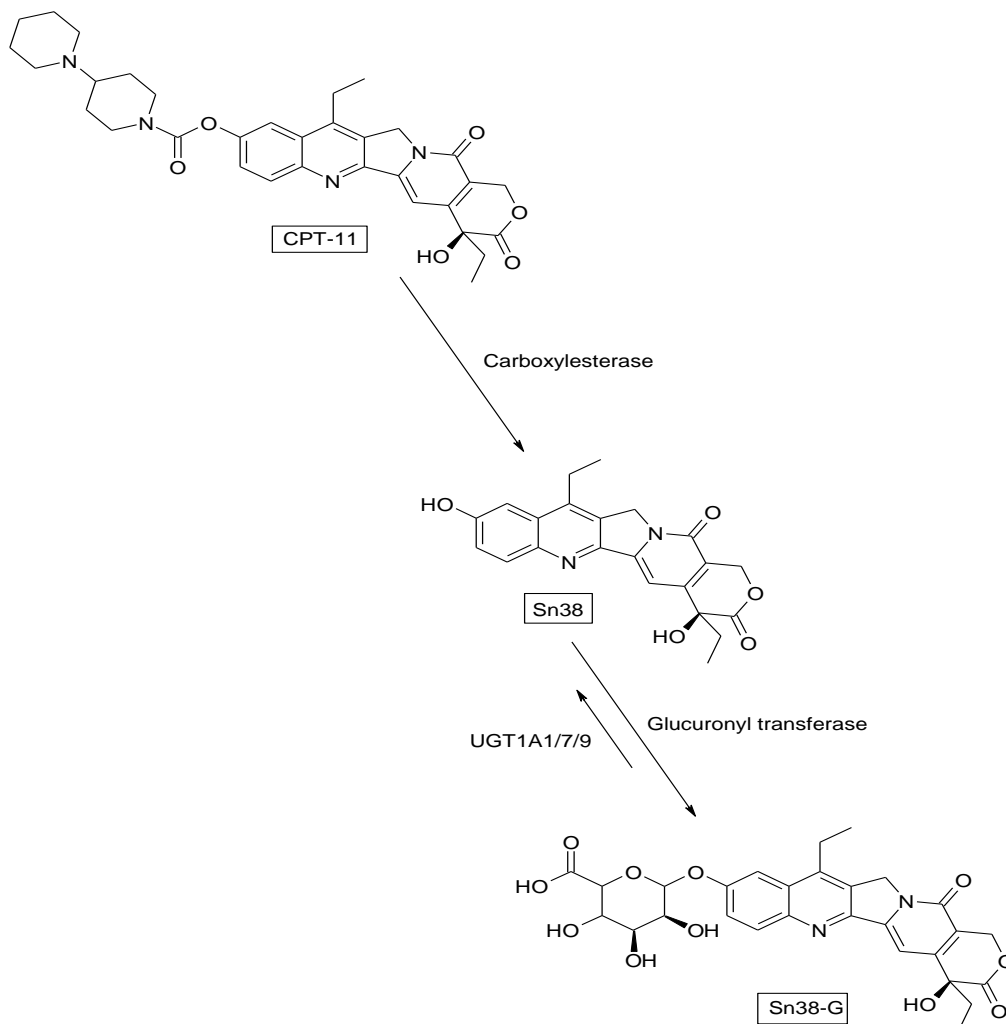


Figure 5: Voie métabolique de dégradation du CPT-11 en Sn38 puis Sn38-G [60].

Le Sn38 est insoluble en milieu aqueux (10-38 μ g/ml)[68] empêchant son administration par voie intraveineuse. Il est également responsable des toxicités gastro-intestinales limitant son administration par voie orale et présente une faible biodisponibilité orale (<8%) [69]. Par conséquent, l'encapsulation du Sn38 est nécessaire pour une administration orale mais également intraveineuse.

Des systèmes nanoparticulaires ont récemment été développés pour la voie intraveineuse (Table 4), et au début de ce travail de thèse il n'existait pas de formulation mise au point pour une administration par la voie orale. L'année dernière, des dendrimères complexant le Sn38 en vue d'une administration par voie orale ont été décrits [69].

Formulation	Taux d'encapsulation	Taille (nm)	Références
Micelles polymères (NK012)	20% p/p	~20nm	[70-72]
Micelles polymères	1,56-6,05% p/p	100-300nm	[73]
SLNs	0,5-1mg/ml	100-300nm	[27]
Liposomes	0,028-0,26mg/ml	~95nm	[74]
Liposomes	0,16-1,9mg/ml	150-200nm	[27, 75, 76]
Nano-liposomes	1.40-9.51 % p/p	150-200nm	[77]
Dendrimères	12,14-28,48mg/g	/	[78]

Table 4: Formulations de Sn38 décrites dans la littérature.

La troisième partie de cette thèse sera donc consacrée à la mise au point d'une formulation de nanocapsules lipidiques de Sn38, à sa caractérisation physico-chimique, et à son évaluation *in vitro* et *in vivo* pour une administration orale.

Références

1. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France: InVS, Framcim, Inserm, INCa, et hôpitaux civils de Lyon; 2008.
2. Perrier L, Borella L, Philip T. The cost of cancer in France: Macroeconomic and microeconomic approaches, evolution towards a prospective payment system. *Bulletin du cancer* 2003;90(11):1005-1009.
3. Grünfeld J-P. Recommandations pour le plan 2009-2013: Rapport au président de la république; 2009 14 février.
4. Terwogt JM, Schellens JH, Huinink WW, Beijnen JH. Clinical pharmacology of anticancer agents in relation to formulations and administration routes. *Cancer Treat Rev* 1999 Apr;25(2):83-101.
5. Apretna E, Thiessard F, Miremont-Salamé G, Harambu F. Pharmacovigilance, cancer et médicaments anticancéreux. *Oncologie* 2004 février;6(1):66-71.
6. Batle JF, Arranz EE, Carpano J, Saez EC, Aunon PZ, Sanchez AR, et al. Oral chemotherapy: potential benefits and limitations. *Journal of oncology* 2004 may;6(6):335-340.
7. Taïeb J, Desramé J, Artru P. Chimiothérapie orale, 2006.
8. Meerum Terwogt JM, Malingré MM, Beijnen JH, Ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Koopman FJ, et al. Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clinical Cancer Research* 1999;5(11):3379-3384.
9. Navarro RP, Morrow T, Baran R. Pharmacoeconomic and clinical outcomes in oncology using oral chemotherapy. *Manag Care Interface* 2002 Jul;15(7):55-62.
10. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997 Jan;15(1):110-115.
11. Catania C, Didier F, Leon ME, Sbanotto A, Mariani L, Nole F, et al. Perception that oral anticancer treatments are less efficacious: development of a questionnaire to assess the possible prejudices of patients with cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005 Aug;92(3):265-272.
12. Sparreboom A, de Jonge MJ, Verweij J. The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment. *Eur J Cancer* 2002 Jan;38(1):18-22.
13. Ranchon F, Bouret C, Charpiat B, Leboucher G. Sécurisation de l'emploi des chimiothérapies anticancéreuses administrables par voie orale. *Le Pharmacien Hospitalier* 2009;44(1):36-44.
14. Lokiec F. Toxicité des chimiothérapies orales. *Oncologie* 2007;9:HS37-HS40.
15. Viele CS. Managing oral chemotherapy: the healthcare practitioner's role. *Am J Health Syst Pharm* 2007 May 1;64(9 Suppl 5):S25-32.
16. Ruddy K, Mayer E, Partridge A. Patient adherence and persistence with oral anticancer treatment. *CA Cancer J Clin* 2009 Jan-Feb;59(1):56-66.
17. Partridge AH, Avorn J, Wang PS, Winer EP. Adherence to therapy with oral antineoplastic agents. *J Natl Cancer Inst* 2002 May 1;94(9):652-661.

18. Szetela AB, Gibson DE. How the new oral antineoplastics affect nursing practice: capecitabine serves to illustrate. *Am J Nurs* 2007 Dec;107(12):40-48.
19. Schellens JH, Malingre MM, Kruijtzter CM, Bardelmeijer HA, van Tellingen O, Schinkel AH, et al. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *Eur J Pharm Sci* 2000 Dec;12(2):103-110.
20. Singh AK, Chaurasiya A, Singh M, Upadhyay SC, Mukherjee R, Khar RK. Exemestane loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS): development and optimization. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(2):628-634.
21. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998 Jan;15(1):11-22.
22. Malingre MM, Beijnen JH, Schellens JH. Oral delivery of taxanes. *Invest New Drugs* 2001 May;19(2):155-162.
23. Kruijtzter CM, Beijnen JH, Schellens JH. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *Oncologist* 2002;7(6):516-530.
24. Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, Steinfels E, Krell T, Tromprier D, et al. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res* 1999 Aug;32(8):925-939.
25. Barrand MA, Bagrij T, Neo SY. Multidrug resistance-associated protein: a protein distinct from P-glycoprotein involved in cytotoxic drug expulsion. *Gen Pharmacol* 1997 May;28(5):639-645.
26. Gao Z-G, Choi H-G, Shin H-J, Park K-M, Lim S-J, Hwang K-J, et al. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* 1998;161(1):75-86.
27. Francis MF, Cristea M, Winnik FM. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure and Applied Chemistry* 2004;76(7-8):1321-1335.
28. Scripture CD, Sparreboom A, Figg WD. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2005 Oct;6(10):780-789.
29. van de Waterbeemd H, Testa B. Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability: Wiley-VCH verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
30. Baccanari DP, Davis ST, Knick VC, Spector T. 5-Ethynyluracil (776C85): a potent modulator of the pharmacokinetics and antitumor efficacy of 5-fluorouracil. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 1;90(23):11064-11068.
31. Koukourakis GV, Kouloulis V, Koukourakis MJ, Zacharias GA, Zabatis H, Kouvaris J. Efficacy of the oral fluorouracil pro-drug capecitabine in cancer treatment: a review. *Molecules* 2008;13(8):1897-1922.
32. cancer Ind. Situation de la chimiothérapie des cancers en 2007; 2008 decembre 2008.

33. Feng S-S, Chien S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 2003;58(18):4087-4114.
34. Yang SC, Benita S. Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions. *Drug Development Research* 2000;50(3-4):476-486.
35. Yang S, Gursoy RN, Lambert G, Benita S. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm Res* 2004 Feb;21(2):261-270.
36. Pouton CW, Porter CJ. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 Mar 17;60(6):625-637.
37. Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* 1995 Nov;12(11):1561-1572.
38. Takahashi T, Kono K, Yamaguchi T. Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect by anticancer agents in the form of fat emulsion. *Tohoku J Exp Med* 1977 Nov;123(3):235-246.
39. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine* 2005 Sep;1(3):193-212.
40. Rogers JA, Anderson KE. The potential of liposomes in oral drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(5):421-480.
41. Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *J Control Release* 2008 Jun 4;128(2):99-112.
42. Feng SS, Mu L, Win KY, Huang G. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Curr Med Chem* 2004 Feb;11(4):413-424.
43. Muchow M, Maincent P, Muller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2008 Dec;34(12):1394-1405.
44. Kokkona M, Kallinteri P, Fatouros D, Antimisiaris SG. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. *Eur J Pharm Sci* 2000 Jan;9(3):245-252.
45. Olbrich C, Müller RH. Enzymatic degradation of SLN--effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;180(1):31-39.
46. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *Int J Pharm* 2000 Jan 20;194(1):39-49.
47. Yamanaka YJ, Leong KW. Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008;19(12):1549-1570.
48. Ponchel G, Irache J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):191-219.
49. Sakuma S, Hayashi M, Akashi M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):21-37.

50. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):39-54.
51. Yoncheva K, Gomez S, Campanero MA, Gamazo C, Irache JM. Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv* 2005 Mar;2(2):205-218.
52. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003 Jan;18(1):55-61.
53. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002 Jun;19(6):875-880.
54. Lacoeyille F, Garcion E, Benoit JP, Lamprecht A. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J Nanosci Nanotechnol* 2007 Dec;7(12):4612-4617.
55. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
56. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* 2006 May 15;112(2):208-213.
57. Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessieres A, Jaouen G, et al. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 2008 Sep 10;130(2):146-153.
58. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1710-1722.
59. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The Gastrointestinal stability of Lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*;In Press, Accepted Manuscript.
60. Ohtsuka K, Inoue S, Kameyama M, Kanetoshi A, Fujimoto T, Takaoka K, et al. Intracellular conversion of irinotecan to its active form, SN-38, by native carboxylesterase in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003 Aug;41(2):187-198.
61. Takimoto CH, Wright J, Arbuck SG. Clinical applications of the camptothecins. *Biochim Biophys Acta* 1998 Oct 1;1400(1-3):107-119.
62. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991 Aug 15;51(16):4187-4191.
63. Rothenberg ML, Kuhn JG, Burris HA, 3rd, Nelson J, Eckardt JR, Tristan-Morales M, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. *J Clin Oncol* 1993 Nov;11(11):2194-2204.

64. Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreau P, Fretigny E, et al. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 1999 May;80(3-4):364-370.
65. Herben VM, Ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors. *Pharm World Sci* 1998 Aug;20(4):161-172.
66. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res* 1994 Jul 15;54(14):3723-3725.
67. Puisset F, Chatelut E. UDP-glucuronosyl-transférase 1A1 et pharmacogénétique de l'irinotécan. *Oncologie* 2005;7:49-54.
68. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. *Int J Pharm* 2004 Feb 11;270(1-2):93-107.
69. Kolhatkar RB, Swaan P, Ghandehari H. Potential oral delivery of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly(amidoamine) dendrimers. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1723-1729.
70. Koizumi F, Kitagawa M, Negishi T, Onda T, Matsumoto S, Hamaguchi T, et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* 2006 Oct 15;66(20):10048-10056.
71. Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, Horiguchi A, Ito K, Asano T, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008 Mar 15;68(6):1631-1635.
72. Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 May 22;60(8):899-914.
73. Peng CL, Lai PS, Lin FH, Yueh-Hsiu Wu S, Shieh MJ. Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an HT-29 human colon cancer xenograft model using SN-38-loaded chlorin-core star block copolymer micelles. *Biomaterials* 2009 Jul;30(21):3614-3625.
74. Sadzuka Y, Takabe H, Sonobe T. Liposomalization of SN-38 as active metabolite of CPT-11. *J Control Release* 2005 Nov 28;108(2-3):453-459.
75. Peikov V, Ugwu S, Parmar M, Zhang A, Ahmad I. pH-dependent association of SN-38 with lipid bilayers of a novel liposomal formulation. *Int J Pharm* 2005 Aug 11;299(1-2):92-99.
76. Lei S, Chien PY, Sheikh S, Zhang A, Ali S, Ahmad I. Enhanced therapeutic efficacy of a novel liposome-based formulation of SN-38 against human tumor models in SCID mice. *Anticancer Drugs* 2004 Sep;15(8):773-778.
77. Atyabi F, Farkhondehfar A, Esmaeili F, Dinarvand R. Preparation of pegylated nano-liposomal formulation containing SN-38: In vitro characterization and in vivo biodistribution in mice. *Acta Pharm* 2009 Jun;59(2):133-144.
78. Kitchens KM, Kolhatkar RB, Swaan PW, Ghandehari H. Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across Caco-2 cells. *Mol Pharm* 2008 Mar-Apr;5(2):364-369.

PREMIERE PARTIE

PROPRIETES DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES

POUR UNE ADMINISTRATION ORALE

Revue bibliographique

Oral delivery of nanocarriers: why and how should particle integrity be sought?

E. Roger^{a,b}, F. Lagarce^{b,c*}, J-P Benoit^{b,c}

^aEthypharm, 92213-Saint-Cloud Cedex, France.

^bINSERM U646, Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, 49100-Angers, France.

^cCentre Hospitalier Universitaire Angers, Pôle Pharmaceutique, 49033-Angers, cedex 9, France.

*Corresponding author.

Tel.: +33 241 735885; fax: +33 241 735853;

E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Abstract: Oral route is the most common route for the delivery of drugs because it is simple to implement and improves patient's compliance and quality of life. However, the oral absorption is limited by various physiological barriers and remains a scientific challenge. Nanometric sized drug delivery systems are being extensively studied and provide promising potential for oral drug delivery. It is essential to determine if particle integrity is maintained through the gastro-intestinal tract and after intestinal absorption in order to obtain intact nanocarriers in the blood stream. In the present review, we will first discuss the different gastro-intestinal barriers and physiological stress factors with regard to nanocarriers integrity issues. Secondly, we will describe the different characteristics offered by the nanocarrier (size, surface composition and properties mediated by external factors such as ligands) helping it to keep its integrity for optimal transport into the blood stream.

Keywords: Oral administration, Nanocarrier, Degradation, Gastro-intestinal tract, Oral absorption, Intestinal endocytosis.

Abbreviations

AP-2= polypeptide 2 (AP-2)	NP=nanoparticle
BSA = bovine serum albumin	PA= palmitic acid
CCP= clathrin-coated pit	PACA= Polyalkylcyanoacrylate
CCV= clathrin-coated vesicle	PAMAM = polyamidoamine
CS= chitosan	PDGF= platelet-derived growth factor
DOTMA=N[1-(2,3-dioleloxy) propyl]- N,N,N-trimethylammonium chloride or	PEG= poly(ethyleneglycol)
1,2-DOTAP= dioleyl-3- trimethylammonium-propane	PEI = poly(ethylenimines)
EGF-R= epidermal growth factor receptor	PGA= poly(γ -glutamic acid)
FaSSGF= fasted state simulated gastric fluid	PIP2= phosphoinositol bisphosphate
FaSSIF= fasted state simulated intestinal fluid	PLA = poly(lactide)
FeSSIF= fed state simulated intestinal fluid	PLGA=Poly(D,L-Lactide-co-glycolide acid)
GI= gastro-intestinal	PS=polystyrene
GPI= glycoposphatidylinositol	SGF= simulated gastric fluid
HAS=human serum albumin	SIF= simulated intestinal fluid
LNC= Lipid nanocaspule	SLN= solid lipid nanoparticle
LUV= large unilammellar	SMP= submicroparticle
MLV= multilammellar vesicle	SUV= small unilammellar
mTPP = meso-tetraphenyl porphine	SV40= simian virus
	TEER= transepithelial resistance
	TJ= tight junction
	TMC=N-trimethyl chitosan
	WGA= wheat germ agglutin

1. Introduction

Oral administration has been the most common route for the delivery of drugs for decades. Nevertheless, oral absorption of drugs is limited by various physiological barriers (Figure 1) which need to be pharmacologically modulated to alter the resulting low and variable oral bioavailability. Nanometric sized drug delivery systems (ranging between 1 to 100nm) may provide an alternative solution for oral administration. These nanocarriers include polymeric or lipid-based carriers such as liposomes (vesicles in which an aqueous volume is entirely surrounded by a bilayer phospholipid' membrane), micelles (self-assembly of amphiphiles that form supramolecular core-shell structures in the aqueous environment), dendrimers (polymeric complexes that comprise a series of well-defined branches around an inner core) and nanoparticles including nanospheres and nanocapsules [1]. In the literature, many studies have demonstrated the enhancement of bioavailability of drugs encapsulated in nanocarriers (Table 1) and in some cases, an increase of permeability across the intestinal barrier has been established. Indeed, due to their small size, nanocarriers offer several advantages for oral administration. They can protect the drug against gastro-intestinal degradation, as well as diffuse within the mucus, enhancing the ability for the nanocarrier-associated drug to be absorbed. These carriers can transport drug across the epithelial membrane serving as a vehicle for the drug. However, recent studies have demonstrated that only a few orally-administered particles are taken up across the intestinal epithelium [2, 3] thus having a chance to reach the blood stream and being able to attain their pharmacological target while keeping their native structure. The current challenge is to develop particles which remain intact from the mouth to the blood stream, consequently being real oral nanovectors with similar properties as those injected via intravenous route. In this paper, the interaction between nanocarriers and biological barriers (Figure 1) following oral administration will be described. Specifically, this review focuses on the role of enterocytes, which constitute the major component of the intestinal epithelium, on nanocarriers uptake. Finally, strategies that could be used to optimise intact nanocarrier transport are proposed.

Formulation	Drug	Oral bioavailability of the drug alone	Increased oral bioavailability with formulation	Ref.
SLN®	Clozapine	<27%	4.5-fold	[4]
SLN®	Quercetin	<1%	More than 5-fold	[5]
SLN®	Nitrendipine	Ranging from 10 to 20%	3 to 4 fold	[6]
SLN®	Vinpocetine	<50%	4.16 to 4.17-fold	[7]
Poly(alkyl cyanoacrylate) NPs	Vincamine	22 ±1%	Nearly 2-fold	[8]
CS-NPs	Cyclosporin A	10-60% with high variability	2.6-fold	[9]
LNCs	Paclitaxel		3-fold	[10]
Polymeric NPs	Insulin	Degradation	7.7% AUC	[11]
CS-NPs	Insulin	Degradation	15.1 ± 0.9% bioavailability	[12]
PLGA-NPs	Doxorubicin	Low	363% bioavailability	[13]
NPs	Cefuroxime axetil	<50% and variable	2-fold	[14]
PEG-coated liposomes	Human epidermal growth factor	1-5%	2.5-fold	[15]
Liposomes	N ₃ -O-toluy-Fluorouacil	39%	4 to 6.6-fold	[16]
Liposomes	Cefotaxime	Low	2.7 to 2.3-fold	[17]
Uncoated and acid folic coated-Liposomes	Vancomycin	<2%	3.9 to 12.5-fold	[18]
Double Liposomes	Salmon calcitonin	Low	6 to 8-fold	[19]
Polymeric micelles	Genistein	Low	3-fold	[20]
Polymeric micelles	Fenofibrate	Approximately 30%	1.5 to 6-fold	[21]
PAMAM dendrimers	Doxorubicin	Low	More than 300-fold	[22]

Table 1: examples of nanocarrier' formulations that increase the oral bioavailability of drugs.

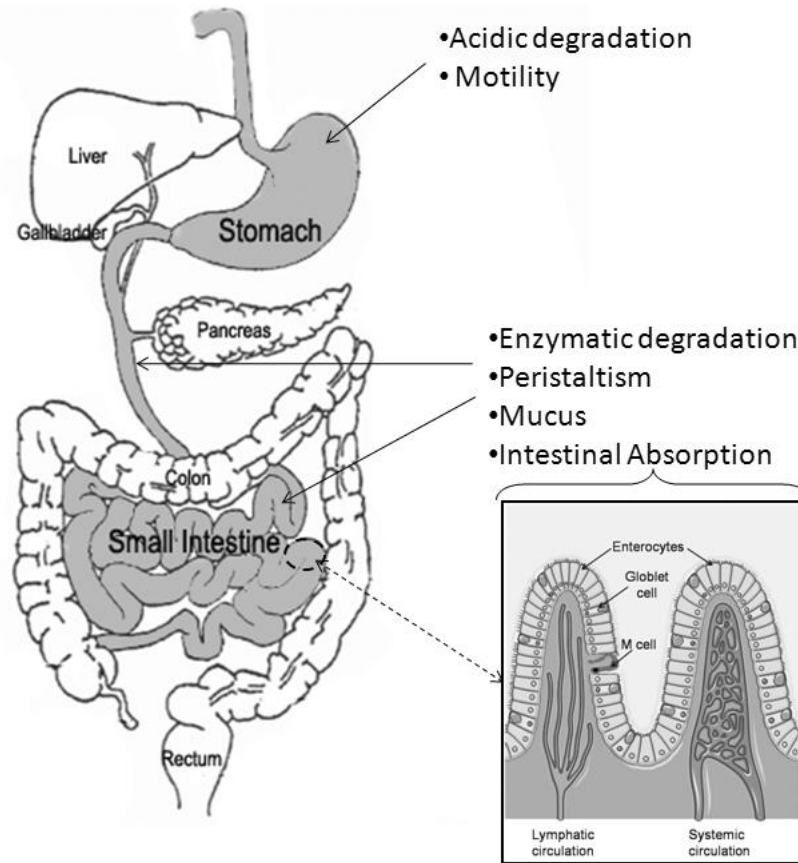


Figure 1: Different barriers after the oral administration of nanocarriers.

2. Gastrointestinal tract and barriers

The gastrointestinal tract is considered to be the tube starting from the mouth and the oesophagus, where it has only a transport role. Digestion then begins in the stomach and continues in the small intestine to the colon. Absorption essentially takes place in the small intestine.

2.1 *Stability in the gastro-intestinal medium*

After oral administration, the first barrier met by nanocarriers is the gastrointestinal (GI) lumen. The interaction between nanocarriers and the content of the stomach or the intestine can lead to the degradation of particles. Consequently, nanocarriers need to be resistant and stable in the GI tract [23]. The stomach is characterised by an acidic pH (ranging between 1.5 to 5 for the fasted and fed state respectively) and the presence of pepsin. In the small intestine, the pH is in the range of 5.5 to 7 and several digestive enzymes such as trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase, amylase, lactase and lipase,

as well as bile salts are present [24]. Furthermore, the stability of nanocarriers can be affected by the residence time, the volume of fluid available in the GI tract and its motility. The *in vitro* models used in order to study the stability of nanocarriers were in fact designed to evaluate the solubility of drugs in the gastrointestinal tract [25-28] (Table 2). Thus, these models are not totally suitable to study the stability of nanocarriers and the interpretation of the results has to be cautious.

Gastric fluid	Composition	Ref.
SGF USP	pH of 1.2; pepsin	[29]
SGF modified	pH of 1.2; pepsin and sodium lauryl sulphate or Triton®	[30]
FaSSGF	pH of 1,6; pepsin, bile salt and lecithin	[31]
Ensure® Plus and full fat Milk	pH of 6,5; stimulate fed stomach: fat	[32]
Intestinal fluid		
SIF USP	pH of 6,8; pancreatin	[29]
FaSSIF	pH of 6,5; 3mM of bile salt and 0,75mM of lecithin	[26, 30]
FeSSIF	pH of 5, bile salt; 15mM of bile salt and 3,75mM of lecithin	
FaSSIF-V2	pH of 6,5; 3mM of bile salt and 0,2mM of lecithin	[32-36]
FeSSIF-V2	pH 5,8; 10mM of bile salt; 2mM of lecithin and lipid digestion product and optionally pancreatin	
Dynamic lipolysis model	pH of 6,5; various concentrations of bile salt, Ca ²⁺ and lipase activity	[37, 38]
Lipase/colipase solution	pH of 7,4, lipase and colipase	[39, 40]

Table 2: *In vitro* model of gastro-intestinal fluid described in the literature.

The stability of different nanocarriers was studied and in some cases modifications of the formulations were made in order to improve stability. Firstly, the integrity of liposomes is controversial due to the possible degradation of these nanocarriers by the acidity of the stomach, bile salt and lipase [41]. Liposomes are structured in concentric bilayers of phospholipids. In the gastric medium, H⁺ cations can diffuse in the inner aqueous phase of liposomes and destabilise them. Moreover, the bile salt monomers are able to penetrate into liposomal lipid bilayers, disintegrate and solubilise them and disrupt their vesicular structure [42, 43]. Nevertheless, the increase of cholesterol

quantities or the addition of saturated phospholipids improves the rigidity of liposomes and as a consequence decrease the possibility of enzymatic degradation [44-47]. Rowland *et al.* [48] showed that liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine/cholesterol were stable in presence of bile salt, pancreatic lipase and at low pH, on the contrary liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylethanolamine/cholesterol/dicetylphosphate were unstable at low pH. It was found, coating the surface of liposomes with a polymer such as polyethyleneglycol (PEG) or the sugar portion of mucin protected them against bile salts destabilisation and increased the stability of these colloidal carriers in the GI tract [15, 49-51]. For example, Iwanaga *et al.* [51] observed that uncoated liposomes released 20-50% of insulin in the presence of bile salts, whereas DSPE-PEG-coated liposomes and mucin-coated liposomes released about 2 and 10% of insulin, respectively, within 6h in the same medium. It is interesting that liposomes coated with chitosan are more unstable than uncoated liposomes (retention of FITC was $\sim 20\%$ vs. 36% after 2h exposure in simulated gastric fluid) [52]. All the same, chitosan nanoparticles, poly(alkylcyanoacrylate) and calcium phosphate nanoparticles were rapidly degraded [53-56]. In the case of polylactide (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and palmitic acid (PA) nanoparticles [57, 58] or solid lipid nanoparticles [39, 40], the presence of poloxamer or PEG at the surface improved stability of these nanoparticles. In fact, PLA, PLGA, PA polymers contain ester bonds which can be cleaved in an acidic environment or by enzymes [59-61]. In the same way, SLNs are particles made from lipids that are solid at room temperature and are degraded by the pancreatic lipase found in the intestinal fluid [39, 40]. PEG and poloxamer form a sterically stabilising crown on the surface of nanoparticles and consequently acidity, or enzymes can affect their integrity. Likewise, the gastrointestinal stability of polymer micelles [62] and lipid nanocapsules (LNCs) [18] were demonstrated *in vitro* in simulated fluid. LNCs were covered with PEG₆₆₀ hydroxystearate (Solutol®)[63, 64] which stabilised the particle structure.

2.2 Diffusion across mucus

Prior to intestinal absorption, nanocarriers must diffuse across the unstirred water layer (UWL) (also called the aqueous boundary layer) in spite of rapid transit. The UWL is a more or less stagnant layer of water, mucus and glycocalyx adjacent to the intestinal wall, and its thickness is about 30-100 μ m [65, 66]. Mucus is released by goblet cells (a type of specialised cells that makes up the intestinal epithelium) and protects epithelial surface by lubricant properties conferred by mucin. Due to the hydrophilic surface of mucin and the presence of water, a hydrophilic surface exhibited by particles increases their transport across the mucus gel layer [67, 68].

Nanocarriers with a positive surface charge can be transported more easily across mucus: the high number of sulphate sialic acid and sugar moieties in the carbohydrate part chains of the mucin molecule imparts a highly negative charge to mucin. Consequently, if the particles are positively charged, an electrostatic interaction with the negative charges of mucin favour the penetration of particles in the mucus layer and an increased internalisation by epithelial cells [67]. *In situ* studies of positively charged-PLGA nanoparticles prepared with didodecyl dimethyl ammonium bromide have shown an increase of nanoparticle uptake in comparison with neutral or negatively charged PLGA nanoparticles prepared with polyvinyl alcohol [69]. For example, chitosan conferred a positive charge to nanoparticles which then adhered to the mucosal surface [54, 68, 70]. The bioadhesion of colloidal drug delivery systems has been reviewed [71] and some polymers have mucoadhesive properties [72]. More particularly, Takeuchi *et al.* [73] demonstrated that chitosan and Carbopol® exhibited superior adhesion ability (1.6 to 4.6-fold) than other polymers like poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid). Yin *et al.* [74] have also shown that wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles increased the bioadhesion of nanoparticles (about 1.5–4.8 times) via lectin binding sites over the rat M-cells and enterocytes. WGA is a specific ligand, showing an affinity for N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid, which is present in both M-cells and enterocytes. So, coating nanocarriers with mucoadhesive polymers or polysaccharides allows increased contact with the apical membrane of enterocytes and thus these vectors can be absorbed favourably by the paracellular or transcellular route.

2.3 Transport across the intestinal epithelium

Different mechanisms are used to transport nanocarriers across the intestinal barrier (Figure 2). Table 3 describes studies performed with different nanocarriers.

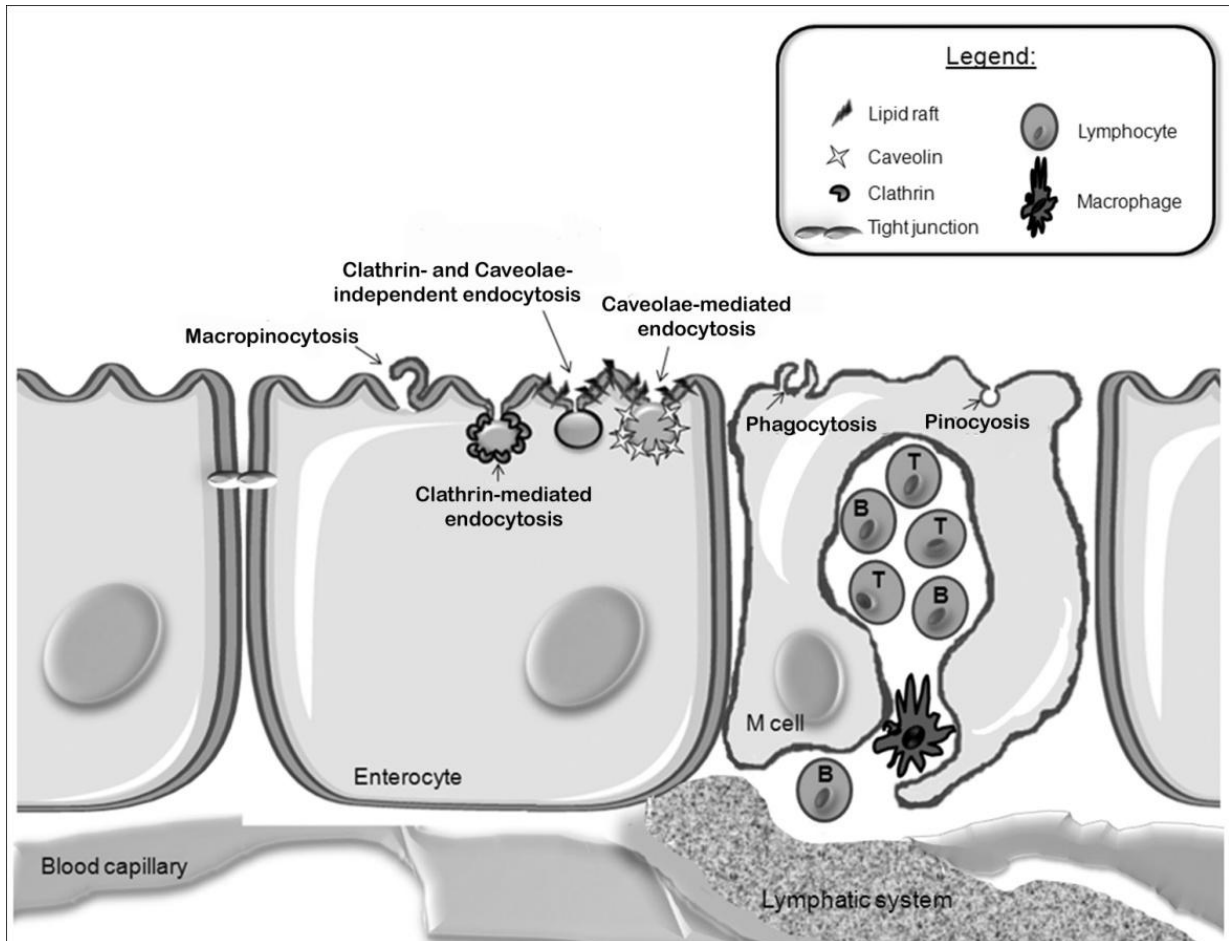


Figure 2: Schematic representation of a possible transcellular mechanism of nanocarrier uptake by the intestinal barrier.

Table 3: The transport of nanocarriers across the intestinal barrier (NS: not studied, TEER: transepithelial resistance, TJ: Tight junction, PLGA: Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid), PS: polystyrene, NPs: nanoparticles, CS: chitosan, TMC: N-trimethyl chitosan, SMP: submicroparticles, WGA: wheat germ agglutinin, HAS: human serum albumin, SLN: solid lipid nanoparticles, PGA: poly(γ -glutamic acid), PEI: poly-(ethylenimines), PAMAM: polyamidoamine, mmePEG₇₅₀P(CL-co-TMC): monomethylether poly(ethyleneglycol)₇₅₀-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylene carbonate), PLA: poly(lactide), TPGS = vitamin E TPGS, BSA: albumin).

Formulation	Size and zeta potential if available	Model	Paracellular transport	Transcellular/uptake by enterocytes	Transcellular/uptake by M-cells	Ref.
PLGA-NPs	95±20nm	Caco-2 cells	No TEER decrease	NP uptake but low	NS	[75]
PLGA-NPs	300-600nm	Caco-2 cells	NS	Uptake caused by a collision-induced process: diffusion of marker	NS	[76]
PLGA-NPs ++	168±20nm; -10.4±2.8mV	Caco-2 cells	NS	uptake and localization in cytoplasm and in nuclei	NS	[77]
PS-NPs	108±2nm; -48.8±1.6mV			uptake and localization in cytoplasm		
NPs	NS	Caco-2 cells	No TEER decrease	Passive transepithelial transport and energy dependent uptake	NS	[78]
CS NPs	433±28nm; +27.2±0.8mV	Caco-2 cells	TEER decrease	Internalization by adsorptive endocytosis, an energy-dependent, saturable process: include clathrin-mediated endocytosis and not include caveolae-mediated endocytosis	NS	[79]

CS-coated PLGA-NPs	104.1±1.2nm; 36.2±2.5mV	Caco-2 cells	Both open TJ, NPs adhere and release by paracellular drug transport	NS	NS	[80]
TMC-coated PLGA-NPs	106±2.3nm; 32.3±2.1mV					
CS-PGA NPs	140.2±4.8nm; 12.2±0.6mV 145.1±3.7nm; 13.2±0.4mV	Caco-2 cells	Ability to open the TJ	NS	NS	[81]
CS nanocapsules	266.6±7.6nm; -34.8±0.6mV	Caco-2 cells	TEER decrease	Uptake by an energy-dependent process	NS	[82]
CS-coated lipid NPs	537±16nm; +29.2±6.2mV					
multi-ion-crosslinked NPs	264.3 ± 4.5nm, 28.5 ± 1.5 mV 254.2 ± 2.3nm 9.2 ± 0.3mV 270.7 ± 4.8nm 4.9 ± 0.5mV	Caco-2 cells	TEER decrease: NPs disintegrate: paracellular drug transport	NS	NS	[83]
CS-PLGA NPs	290±7nm; +17.5±3.6mV	Caco-2 and HT29-MTX clone E12 cells	No TEER decrease	Transcytosis mechanism (active transport): adsorptive endocytosis and exocytosis release	NS	[68, 84]
PLGA-SMP	120±1.0nm; -39.2±0.23mV	Caco-2 cells	NS	No cytoadhesion	NS	[85]
HAS-coated PLGA-SMP	124±1.2nm; -30.7±0.75mV			No cytoadhesion		

WGA-coated PLGA-SMP	159±1.2nm; -33.9±1.03mV			Cytoadhesion (specific binding to membrane-associated glycoprotein by lectin-carbohydrate interactions) + internalisation by energy dependent transport		
WGA-grafted PLGA nanospheres	570 to 1020nm diameter	Caco-2 cells	NS	Cytoadhesion and cytoinvasion of particles. Energy-dependent uptake by the EGF receptor-mediated endocytosis pathway.	NS	[86, 87]
WGA-conjugated PEG-PLA NPs	95.3±41nm; -22.67±1.21mV	Caco-2 cells	NS	Rapid uptake Endocytosis via both clathrin- and caveolae-dependent pathways. After endosome creation transport occurs to both trans-golgi and lysosomes.	NS	[88]
PLA-TPGS NPS	343±19nm	Caco-2 cells	NS	Uptake	NS	[89]
amino-CLIO NPs	21±6nm; 20±5nm; 18±7nm;	Caco-2 cells	No TEER decrease	energy dependent endocytic mechanism	NS	[90]
TMC-NPs	304±6nm; +14.9±0.5mV	Caco-2 cells	TEER decrease: open TJ, no difference between formulation	Alginate modified TMC NPs increased drug transport through transcellular pathway in comparison with TMC NPs	NS	[91]
Alginate modified TMS NPs	181±14nm; +6.0±0.3mV					

PEI-NPs	200±300nm	Caco-2 cells	TEER decrease: erosion of particles and drug absorption	NS	NS	[92]
SLNs	NS	<i>In situ</i> perfusion method in rats	Passive transfer across the lipid membrane	NS	Transport	[5]
LNCs	26.3±2.7 to 132.7±5.5	Caco-2 cells	No TEER decrease	Clathrin- and caveolae- dependent endocytosis	NS	[93]
Cyclodextrines	NS	Caco-2 cells	No TEER decrease	Cyclodextrin bound to cells surface and encapsulated durg transport by transcellular diffusion via lipophilic domains	NS	[94]
Liposomes	70-100nm			No uptake and no transport		
mmePEG ₇₅₀ P(CL-co- TMC) polymeric micelles	24.15nm; -2.7mV	Caco-2 cells and in FAE models	No paracellular transport	Passive diffusion of free drug fraction and free polymer Fluid phase endocytosis of polymeric micelles for translocation (no clathrine or caveolae endocytosis pathways)	No transport	[95]

(PEG ₂₀₀₀ -DSPE) micelles	6nm	Caco-2 cells, everted rat intestine	Decrease of TEER = Open TJ, improved paracellular transport	Good bioadhesion	NS	[96]
Pluronic [®] F127 micelles	30nm		No decrease of TEER			
Pluronic [®] P85 micelles	NS	BBMEC and Caco-2 cells	No paracellular permeability	Transcellular uptake via fluid-phase endocytosis	NS	[97]
G3, G2 PAMAM dendrimers	NS	Caco-2 cells	Decrease of TEER: paracellular transport	Transcellular transport: energy-dependent process such as adsorptive endocytosis : clathrin-dependent endocytosis mechanism and rapid trafficking to endosomal and lysosomal compartments	NS	[98-101]

2.3.1 Paracellular transport

Paracellular transport is the passive diffusion through intercellular spaces. Tight junctions (TJ) are the closely-associated areas of two cells that permit the formation of an almost impermeable barrier. Tight junctions are composed by a group of transmembrane and cytosolic proteins, principally including mainly occludins, claudins, actin and ZO-1 proteins. Between these protein complexes, paracellular spaces are defined. Consequently, the paracellular transport between the epithelial cells is limited by the intercellular space whose pore diameter has been estimated to be between 3Å and 10Å [102, 103]. In order to allow drug-loaded nanocarrier passage, tight junctions need to be opened.

Different nanocarrier components have already demonstrated their capacity to open tight junctions [104]. Recently, reviews [102, 105] have described different polymers or surfactants such as anionic polyacrylate derivatives, poly(methacrylic) derivatives, cationic chitosan, chitosan derivatives (for example N-trimethyl chitosan), thiolated polymers, or thiomers, poly(amidoamine) [99] and their mechanisms to enhance the paracellular transport of drugs by the structural reorganisation of tight junction-associated proteins or by reducing the extracellular Ca^{2+} concentration. Thus, even if nanocarrier components can open tight junctions, the intercellular space remains limited to transport intact particles. However, Volkeimer [106] introduced the concept of “persorption” of particles, and suggested a passage of particles by the mechanical lesion of tight junctions, but this hypothesis is still under debate and needs to be confirmed [107]. Consequently, the most probable explanation of the paracellular transport of drugs encapsulated in nanocarriers is the anticipated release of drugs from the carriers.

In a recent publication, Sadeghi *et al.* [108] compared the effect of free-soluble quaternised derivatives of chitosan and their incorporation in nanoparticles to open tight junctions. They demonstrated that free polymer had much more effect on TJ opening than chitosan entrapped in nanocarriers. Studies were performed on a Caco-2 cells model, a well established model to study the intestinal permeability of drugs that express tight junctions [109]. The quality of tight junctions was controlled by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER): a decrease of TEER reflects an increase of paracellular permeability [110]. In the presence of nanoparticles, the decrease of the

transepithelial resistance was about 20% of the initial values whereas in the presence of free chitosan derivative it went up to 55%. This result was correlated with the positive surface-charge density of polymers that was greater than that of nanoparticles, and consequently, free polymers could be fixed more abundantly on negative charges present in the interior of TJ.

Sezgin *et al.* [96] who investigated the transport of PEG-PE micelles, demonstrated the bioadhesion of micelles and their capacity to open tight junctions. Nevertheless, the transport experiment showed a lack of drug passage through the intestinal barrier (around 14% and 1% after 4h for rhodamine-PE-labeled and meso-tetraphenyl-loaded micelles, respectively) which was due to the absence of the drug being released from the micellar core.

Consequently, two hypotheses could explain paracellular drug transport. Firstly, nanocarriers infiltrate the mucus layer, then break and released their components which opened up tight junctions thus allowing the release drug to permeate through the paracellular route [83]. Alternatively, intact nanocarriers such as micelles adhere to tight junctions, open them up and then encapsulated drugs are released to be transported between paracellular cells. According to the second hypothesis, the drug remains encapsulated during the mucus layer transport to reach tight junctions which is an advantage. However, in the first hypothesis, drug is released in the mucus layer and needs to be stable and able to diffuse through the mucus. To date, no paracellular transport of intact nanocarriers has been demonstrated. It is worth noting that the opening of tight junctions has consequences on their physiological functions. When tight junctions are opened, toxins and biological pathogens can also be transported into the systemic circulation system.

The paracellular transport of an intact nanocarrier to the bloodstream seems difficult and needs further investigations.

2.3.2 Transcellular transport

To cross the intestinal barrier, nanocarriers can be transported according to a number of different passive and active transcellular pathways. The latter divided in three main steps: 1- uptake process at the apical side of cell, 2- transport through the cell and 3- release at the basolateral side of cell. These different transport stages across epithelial cells can be performed across enterocytes or M-cells. The intestinal epithelium is made

up of different types of cells: absorptive cells or enterocytes, goblet cells (secreting mucus into the intestinal lumen), enteroendocrine cells (secreting hormones such as cholecystokinin and gastrin into the blood), paneth cells (secreting a number of antimicrobial molecules into the lumen), and M-cells.

Firstly, passive transcellular transport includes diffusion across cells. This transport by diffusion is only feasible for small molecules, because of the limited size of pores in the cell membrane that can be opened or closed by the conformational change of a membrane protein [75, 111]. The rate of absorption is governed by Fick's Law which depends, among other parameters, on the physicochemical properties of the molecule and on the concentration gradient across cells. Passive transport has been used to transport small, lipophilic molecules across the phospholipidic bilayer and the membrane-bound protein regions of the cell membrane [23]. Theoretically, supramolecular structures such as nanocarriers could not diffuse through cells only by passive diffusion due to their size. However, different studies performed at 4°C have demonstrated the transport of encapsulated drugs. El-Sayed *et al.* [99] demonstrated a 38-fold decrease in the transport of FITC-labelled dendrimers at 4°C after 150 min. With nanoparticles, Win and Feng [112] showed a reduction of uptake at 4°C down to 25–46% in comparison to 37 °C. In this case, a release of encapsulated drug was suggested [95, 113] which allowed its transport by passive diffusion.

Secondly, one has to consider transport by active transcellular process. Indeed, large objects such as macromolecules and particles are internalised by an active mechanism in which a portion of the membrane extends and envelops the object, drawing it into the cell to form a vacuole (this process is called *-cytosis*). Active transport, which is illustrated by different energy-dependent mechanisms, is mostly used to transport drugs encapsulated in nanocarriers. This active transport has been described for M-cells and enterocytes.

i) M-cells

M-cells have been identified in the intestinal epithelium. They are specialized cells of the mucosa-associated lymphoid tissues (O-MALT) that consists of lymphoid follicles arranged to form distinct structures such as Peyer's patches. M-cells are characterised by their ability to transport antigens from the lumen of small intestine to cells of the

immune system. Indeed, the invagination of cells at the basolateral side contains lymphocytes and some macrophages [114] which are then distributed throughout the whole body. M-cells can endocytose particles by different mechanisms (fluid phase endocytosis, adsorptive endocytosis and phagocytosis) and then exocytose particles across the basolateral membrane into the lymphoid tissue [115]. Due to the absorption property of M-cells, particle uptake by these cells has been described extensively [107, 116-129]. Jung *et al.* [107] suggested that nanoparticles with a negative charge combine with the hydrophobic surface and promote M-cell uptake. Indeed, M-cells have sparse microvilli, glycocalyx and an absence of mucus, which relate to the hydrophilic property of the intestinal barrier [122]. In a review, des Rieux *et al.* [117] summarise the properties of particle uptake by M-cells, specifically those exhibiting molecule on their surface to target M-cells. *Ulex europaeus agglutinin 1* ligand (UEA-1), *Aleuria aurantica lectin* (AAL), *salmonella extract* (SE), *invasin*, RGD peptide, IgA, ganglioside (GM1) are some specific ligands attached on particles which could specifically target M-cells. Particles with sizes superior to 1 μ m can also be taken up by M-cells. Table 4 lists nanocarriers which undergo M-cell uptake.

M-cell transcytosis appears to be a target for the delivery of oral particulate-based vaccines but, it is limited since M-cells constitute less than 1% of the intestinal epithelial cell population [120]. The access of nanocarriers to systemic circulation is limited after M-cells transport it is often trapped in the local lymph nodes [130]. Moreover, lymph flow is very limited in comparison to blood flow, and is highly variable depending on the physiological conditions. Consequently for drugs that need to reach the blood circulation, their transport across absorptive epithelial cells (i.e enterocytes) could be the most appropriate mechanism to deliver drug encapsulated in intact nanocarriers. Consequently, this review focuses mostly on enterocyte transcytosis.

Nanocarrier	Ref.
PLGA nanoparticles anchored with UEA-1	[131]
PEGylated PLGA- nanoparticles grafted with RGD peptides	[132]
PEGylated PLA:PLGA nanoparticles	[59]
RGD-coated polystyrene nanoparticles	[133, 134]
UEA-1-labelled liposomes	[135]
poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules	[136]
Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules	[137]

Table 4: Examples of nanocarriers transported by M-cells

ii) Enterocytes

The transport of nanocarriers by enterocytes has been extensively studied [102]. However, the investigation of the underlying mechanisms responsible for transcellular transport is still unknown. As previously seen, the transcellular transport of particles is an active process, i.e. energy is required for particle internalisation. Uptake by enterocytes is described by pinocytosis which includes macropinocytosis, or endocytosis which includes clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis and clathrin- and caveolae- independent endocytosis [138, 139]. Characterization of the intracellular transport profiles of nanocarriers is in research stage.

Firstly, macropinocytosis is an actin-dependent process which is not receptor-mediated, and hence is not a specific transport system. It corresponds to the formation of large and heterogeneous, dynamic vesicular structures at the cell surface, called macropinosomes, with sizes of 0.5-2 μ m [140]. Consequently, a suspension of particles can be internalised this way if they are smaller than 2 μ m. *In vitro* experiments by Ragnarsson *et al.* [141] have studied the macropinocytosis transport of fluorescent carboxylated polystyrene nanoparticles.

Secondly, clathrin-coated pit (CCP) is the best studied receptor-mediated endocytosis mechanism. The assembly of clathrin molecules on the coated pit induces the invagination of the membrane and forms a clathrin-coated vesicle (120nm) (CCV) that requires the GTPase activity of dynamin and actin polymerisation to form. This endocytosis pathway is initiated when the endocytosed material interacts with the assembly polypeptide 2 (AP-2) and phosphoinositol biphosphate (PIP2) [142]. It was demonstrated that nanocarriers could stabilised the CCP [143]. The molecular basis of cargo captured by CCP was established with the characterisation of endocytotic signalling within the cytoplasmic domain of the internalised cargo, as for example, a low-density lipoprotein receptor or a transferrin receptor which interacts directly with AP-2. Moreover, internalisation of CCVs was induced by triggering a receptor such as the epidermal growth factor receptor (EGF-R) [142]. Kitchens and colleagues [100, 101, 144] demonstrated that poly(amidoamine) PAMAM dendrimers are internalised by a clathrin-dependent receptor mediated endocytosis process. These macromolecular

structures maintained a high degree of colocalisation between clathrin and transferrin and induced rapid internalisation by a clathrin-dependent endocytosis mechanism. Uptake experiments were also performed with chitosan nanoparticles, in the presence of chlorpromazine in Caco-2 cells. Chlorpromazine at a concentration of 6 to 10 µg/ml can induce the redistribution of clathrin and AP-2 from the whole surface and can reduce the number of CCPs at the cell surface. The resulting inhibition of clathrin-mediated endocytosis reduced the internalisation of nanoparticles by up to 67.9% [79].

Thirdly, caveolae-mediated endocytosis was observed 50 years ago and was associated with cholesterol and sphingolipid-rich microdomains of the membrane [138]. The term 'lipid raft' refers to these putative membrane microdomains that are defined as "small heterogeneous membrane domains" (10-200nm) enriched in cholesterol, glycosphingolipids, sphingomyelin, phospholipids, glycosphosphatidylinositol (GPI)-linked proteins and some membrane -spanning proteins [145, 146]. The shape and structural organisation of caveolae-mediated endocytosis vesicles are characterised by the presence of a family of proteins called caveolins, that bind proteins present in intestinal cells [147]. Caveolins coat the cytoplasmic surface to form buds on the membrane, contrary to clathrin that coats membrane invaginations of clathrin-coated pits [148]. Moreover, caveolae appear to be remarkably uniform invaginations with dynamin localised at the neck and with a pit diameter estimated between 50 and 80nm [145, 146, 149]. This diameter is smaller than clathrin-coated vesicles, consequently, the size of nanocarriers is a parameter determining the endocytosis pathway.

Uptake by caveolae-mediated endocytosis can lead to caveolin-1-containing endosomes, called caveosomes [150]. Interestingly, simian virus SV40 trafficking via caveolae has been demonstrated. By binding to two lipid raft receptors, a virus can induce receptor clustering and a cascade of signalling events, including tyrosine kinase phosphorylation and protein kinase C activation which contribute to caveolae formation and endocytosis [151]. In that sense, nanocarriers can be compared to viruses in terms of size and structure and this caveolae pathway could provide a possibility for their transport. Filipin is known to disrupt the caveolae structure by binding to sterols such as cholesterol and by disorganising caveolin [152]. By using filipin and chlorpromazine, our group [93] demonstrated on an *in vitro* Caco-2 cell model that lipid nanocapsules were

transported via both clathrin- and caveolae-dependent endocytosis. Indeed, a decrease of about 20% and 65% of paclitaxel-encapsulated transport was measured in the presence of chlorpromazine and filipin, respectively. Similarly, Gao *et al.* [88] demonstrated that wheat germ agglutinin-conjugated nanoparticles (WGA-NP) were also absorbed via both of these mechanisms which can be explained by the binding of WGA to N-acetyl-glucosamine or sialic acid on the cell surface.

Finally, other endocytosis pathways, different from the three ones previously described and found to be associated with lipid rafts, were identified as clathrin- and caveolae-independent endocytosis. These poorly described pathways cannot be excluded for the transport of nanocarriers.

After being endocytosed, nanocarriers have to be transcytosed i.e. transported across cells to become available for blood transport to their therapeutic targets. In the case of transport across the enterocytes, nanocarriers can potentially enter by lymphatic or blood capillaries.

The main intracellular trafficking of macropinosome, caveosome or clathrin-coated vesicles is interesting. Clathrin-coated vesicles or macropinosomes, are transported and fused with cytoplasmic or early endosomes (membrane-enclosed vesicles). From there, endosomal vesicles, are acidified via a proton pump to become late endosomes then lysosomes. Two mechanisms are possible to explain lysosome formation; either a part of the late endosomes compartment is transported to the Golgi area and matured to become lysosomes (membrane-enclosed vesicles containing acid hydrolases), or late endosomes fuse already existing lysosomes. The content of lysosomes, could then be exocytosed into the intestinal lymphatic system [153]. Currently, the evolution of nanocarriers in lysosomal vesicles is not known. In the lysosomal vesicles, the enzymatic destruction of molecules including lipids, carbohydrates and proteins can occur. Moreover, exocytosis by the apical side of late endosomes, is also possible and could limit the transport of carriers into the blood stream. In the literature, the description of the intracellular trafficking of nanocarriers in intestinal cells has not yet been described. But, in other cell lines, it has been demonstrated that following their uptake into primary endosomes, a fraction of nanoparticles is released by exocytosis, the other fraction of

nanoparticles remains in primary endosomes and is then transported to secondary endosomes which fuse with lysosomes [154]. Some nanocarriers described in the literature showed their ability to escape endo-lysosomes. For example, Panyam *et al.* [155] have shown the rapid capacity of PLGA-nanoparticles to escape endo-lysosomal vesicles due to the reversal of nanoparticle's surface charge in the acidic medium of the endo-lysosomes [156, 157]. The same authors suggested, in the case of nanoparticles localised in the cytoplasmic compartment, a possible exocytosis across the cell membrane.

Moreover, cationic liposomes can destabilise the endosomal membrane by electrostatic interactions which induces the displacement of anionic lipids [158]. Consequently, there are three possibilities after the uptake of nanocarriers by clathrin-coated vesicles or macropinosomes. Firstly, nanocarriers can be degraded and can release their drug-content in the endo-lysosomal vesicles. Secondly, nanocarriers can escape from the endo-lysosomal vesicles and can undergo exocytosis to blood capillaries. In this case, key questions are: do the nanocarriers remain intact in the cytosol and how are they exocytosed? Finally, nanocarriers can remain intact in lysosomes and can be transported under the form of chylomicrons to the lymphatic system.

In the case of caveolae-coated vesicles, many studies [145, 159, 160] have described a different transcytosis pathway through the cytoplasm that is distinct from endo-lysosomes. Caveolae could deliver their content either to endosomes or to caveosomes and this could lead to direct exocytosis on the basolateral side of the enterocytes by an independent pathway [152]. This mechanism represents a refined permutation describing transcytosis and provides direct, specific transport across the cell. Consequently, caveolae-dependent endocytosis could be another hypothesis to explain the release of intact nanocarriers outside enterocytes in blood capillaries via the basolateral cell side. Sang Yoo *et al.* [84] have demonstrated that salmon calcitonin-loaded PLGA nanoparticles could be transported across the intestinal barrier by a transcytosis mechanism based on caveolae-coated vesicles.

However, it is important to notice that in the case of direct transport in the systemic circulation via the portal vein, travelling through the liver will take place and accordingly, a first pass metabolism is very probable. This is not the case if nanocarriers are transported via the lymphatic system.

3. Properties of nanocarriers

The biodistribution of a nanocarrier depends on its physical and chemical properties. To perform pharmacological targeting after oral administration, the nanocarrier has to conserve its structure.

Hussain *et al.* [2] have shown that over 10% of orally administered latex nanoparticles were found in the systemic circulation of rats. Improving this percentage may be interesting but, in order to do that, nanocarriers have to avoid several stress factors and consequently, should possess several properties [67, 118]. Factors increasing particle uptake have been extensively described [124] including size and surface charge. In the last part of this review, the discussion will be focused on the possible optimisation that could enhance intact particle transport across the gastrointestinal epithelium.

3.1 Size

Particle size and size distribution are the most important characteristics of nanoparticles related to their biodistribution properties. Size is an important parameter governing the entry of the nanocarriers in the cell and its fate in subcellular domains [161]. Generally nanoparticles have relatively high cell uptake when compared to microparticles [162]. Particles with a diameter below 50nm showed a higher uptake degree of by mammalian cells than large particles [163, 164]. Nanoparticles have been shown to greatly improve cellular uptake over microspheres which were only taken up by phagocytotic M-cells in the Peyer's patches: 100 nm nanoparticles experienced a 2.5-fold greater uptake rate by Caco-2 cells than 1 μm microparticles [124, 164]. However, Win and Feng [112] established that the uptake of 100-200nm polystyrene nanoparticles was optimal whereas nanoparticles with a size of 50nm showed a lower uptake by enterocytes: 100 nm particles experienced a 2.3-fold greater uptake compared to that of 50nm particles.

Delivery of the drug polymer complex was achieved by producing nanospheres having a size compatible with caveolae-coated vesicles or clathrine-coated pits. Rejman *et al.* [165] demonstrated that particles with diameter of less than 200nm are internalised via clathrin-coated pits and larger particles (200nm-1 μm) are internalised by a clathrin-independent pathway, more especially by a caveolae-mediated endocytosis. Therefore, receptor-mediated endocytosis is a size-dependent mechanism. Thus, whereas smaller

particles (<200nm) are internalised through a relatively rapid process by clathrin-mediated endocytosis, larger particles, can be taken up via a caveolae-mediated receptor pathway and thereby escape degradation in the lysosomal compartment.

As previously explained, size is a parameter governing the fate of a nanocarrier after oral administration and can be more or less easily modulated. In the case of polymer nanoparticles, the preparation process, the assembly of monomer and the molecular weight of the polymer (higher than 10,000 Daltons in general) are key parameters used to obtain the sought size [166]. For example, polyalkylcyanoacrylate (PACA) nanoparticles produced by anionic polymerisation had sizes ranging from 20 to 770nm with dextran as a stabilizing agent (the size was 193nm and 585nm with dextran 70 and dextran 10, respectively) [167]. If produced by interfacial polymerisation, PACA nanoparticles had a size of less than 500nm [118, 168, 169].

The size of lipid nanoparticles can also be modulated. These particles are classified into two main groups: solid lipid nanoparticles (SLNs) and lipid nanocapsules (LNCs). SLNs are generally larger than 150nm [170]. The particle size depends on the lipid, the surfactant type and percentage, and the production method. Internalisation via clathrin-coated pits is not likely. On the other hand, LNC are larger than 20nm, but this can be modified by varying the excipient proportions [171]. Recent work demonstrated that LNCs were internalized via clathrin- and caveolae-dependent pit endocytosis [93].

The size of liposomes depends on their structure which is related to their preparation process: multilamellar (MLV>100nm), small unilamellar (SUV,10-50nm) and large unilamellar (LUV, 50-1000nm) liposome can be obtained [172]. Maintani *et al.*[46] have shown that 100nm liposomes were absorbed more effectively than those of 200nm in diameter.

3.2 Surface properties

In order to increase the percentage of nanocarrier absorption by the intestinal cells, nanocarriers need to remain intact following GI transit. Hydrophilic polymers such as PEG, form a sterically-stabilizing crown on the surface of the nanocarriers that protects the particles against gastrointestinal degradation. In the case of LNCs developed in our laboratory, PEG₆₆₀ (Solutol®HS15) is located on the external surface what makes the LNCs relatively stable in gastro-intestinal fluids [173]. To stabilise liposomes or some

polymer nanoparticle formulations which are unstable, PEG can be covalently linked to the surface during preparation of formulation or by a post-insertion method [174].

Nanocarriers also have to overcome intestinal transit and to cross mucus to be taken up by enterocytes. Bioadhesion could be a solution to increase the uptake levels of particles by enterocytes rather than M-cells which are less protected by mucus. With this in mind, different coating materials for manufacturing nanocarriers have been employed such as poly(alkylcyanoacrylate) and poly(lactide acid) as well as chitosan or Carbopol® which is the most active [73]. Takeuchi *et al.* [73] reviewed strategies for coating particles. The coating can be obtained by using a fluidized bed; the nanocarriers can be mixed with the polymer solution, and sometimes the coating is added during the preparation of the particles. Surface coating can be confirmed by measuring the zeta-potential. For example, polystyrene nanoparticles with a zeta potential equal to $+1.1 \pm 1 \text{ mV}$, have a zeta potential of $+17.5 \pm 3.6 \text{ mV}$ when coated with chitosan and $-23.9 \pm 1.2 \text{ mV}$ when coated with PEG-PLA. The cell association of nanoparticles with Caco-2 cells depends on this coating (the rank order of association was found to be: polystyrene > chitosan >> PEG-PLA) [68]. Thus the surface charge and more especially the surface properties of nanocarriers seem to influence their transport by intestinal cells. More hydrophobic particles prepared with poly(lactide-co-glycolides) or polyanhydrides polymers increase mucus transport in comparison to more hydrophilic particles, for example alginate [175]. The addition of positive charges to nanocarriers may improve their potential to be internalised by endocytosis and more especially, by the clathrin-mediated endocytosis pathway [176]. Moreover, positive charges avoid endo-lysosomal degradation. These positive charge can be acquired by the incorporation of chitosan into nanocarriers [79] or cationic lipids such as *N*[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA) or 1,2-dioleyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP). Stearylamine or oleylamine can be added to nanoparticle formulation to confer a net positive surface charge [4, 177].

3.3 Targeting- nanocarrier

Specific ligands can be added to the nanocarrier's surface in order to target specific surface receptors on enterocytes. It is well-documented that several proteins are expressed in caveolae, such as the folic acid receptor, the GPI anchor, gp60, the autocrine motility factor (AMF) receptor, the IL-2 receptor, GM1 gangliosides, sialic acid, $\alpha 2\beta 1$ -

integrin, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), bradykinin, and the CCK receptor [178]. Consequently, in order to promote this endocytosis pathway, nanocarriers conjugated to specific ligands could be formulated (for example with folic acid, albumin or IRQ, a new peptide [178]).

Clathrin-mediated endocytosis is receptor-mediated endocytosis, and includes transferrin, asialoglycoprotein, EGF, and CCR2 chemokine [179]. Thus transferrin-coated nanoparticles [180] or ICAM-1-coated nanocarriers [181] can target clathrin-mediated endocytosis. Nevertheless, peptides that interact with receptors are generally unstable in the gastrointestinal environment, resulting in the degradation of the compound prior to absorption. Consequently, it may be important to confirm that the conjugated ligand keeps its properties after gastrointestinal transit [182]. Interestingly, tomato lectin was shown to resist the digestion process [183] and provided specific binding to biological surfaces bearing sugar residues located at the surface of epithelial cells. Consequently, tomato lectin-conjugated nanoparticles enhanced the bioadhesive and endocytic potential of latex particles [184, 185]. .

Another possibility is to coat nanocarriers with polymers that enhance endocytosis pathways. For example, the presence of polyethylenimine (PEI) or wheat germ agglutinin [88] allow endocytosis by both clathrin and caveolae-mediated endocytoses [186]. Indeed, wheat germ agglutinin is also a specific binder for *N*-acetylglucosamine and sialic acid [86]. However, polymers (e.g. PEG-PLA) show better lysosome escape ability than WGA, and may thus protect certain loaded drugs from lysosomal degradation [88]. A mixture of WGA and PEG-PLA may increase endocytosis and escape lysosomal vesicles activity. Russel-Jones *et al.* [187] also demonstrated an increase in internalisation and transport of vitamin B12-coated nanoparticles. Moreover, the modification of PLGA nanoparticles with vitamin E TPGS (bioadhesive material) improved cellular uptake [120]. Nevertheless, coating nanoparticles can increase particle size and in this case modified the endocytosis pathway.

Finally, due to the presence of enzymes and acidity, most nanocarriers aim at avoiding lysosomal trafficking [179], but currently no specific targeting for caveolae-endocytosis can be administered orally due the gastrointestinal tract environment

3.4 Co-administration

In order to increase the oral bioavailability of drugs encapsulated in nanocarriers, it may be interesting to administer nanocarriers with a simultaneous physiological system that can favour the gastrointestinal absorption. Samstein *et al.* [188] demonstrated the potential of bile salts for improving the oral delivery of PLGA nanoparticles. The co-administration of nanoparticles and deoxycholic acid emulsion improved the bioavailability of encapsulated model agent (rhodamine B). In fact, the presence of bile salts delayed transit time thus increasing absorption, and bile salts can also disrupt tight junctions hence improving paracellular transport. In the same way, exposure to *Yersinia pseudotuberculosis* affects the paracellular route in model epithelial cells, and improves the transcytosis of nanoparticles. To be more precise, bacteria induced active energy-dependent transport, possibly macropinocytosis, across the intestinal epithelium [141].

4. Conclusion

Different stress factors and barriers can have a significant impact on nanocarriers' integrity. The nanocarrier can be altered before or during the absorption process depending on its physical or chemical features. Moreover, the mechanisms of absorption are related to the characteristics of the nanocarrier (size, surface properties). Even if, in some extent, nanocarriers can enhance drug absorption while being altered, it is preferable to encapsulate the drug in nanocarriers remaining intact after oral administration. In this way, the distribution of the drug can be modulated in the blood stream until it reaches its target. Several formulation strategies (pegylation, other ligand such as tomato-lectins, positive charge) can be implemented to help the carriers keeping its key physical and chemical parameters.

References

1. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine* 2005 Sep;1(3):193-212.
2. Hussain N, Florence AT. Utilizing bacterial mechanisms of epithelial cell entry: invasion-induced oral uptake of latex nanoparticles. *Pharm Res* 1998 Jan;15(1):153-156.
3. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 1990 Dec;42(12):821-826.
4. Manjunath K, Venkateswarlu V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J Control Release* 2005 Oct 3;107(2):215-228.
5. Li H, Zhao X, Ma Y, Zhai G, Li L, Lou H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control Release* 2009 Feb 10;133(3):238-244.
6. Kumar VV, Chandrasekar D, Ramakrishna S, Kishan V, Rao YM, Diwan PV. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *Int J Pharm* 2007 Apr 20;335(1-2):167-175.
7. Luo Y, Chen D, Ren L, Zhao X, Qin J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Control Release* 2006 Aug 10;114(1):53-59.
8. Maincent P, Le Verge R, Sado P, Couvreur P, Devissaguet JP. Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles. *J Pharm Sci* 1986 Oct;75(10):955-958.
9. El-Shabouri MH. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm* 2002 Dec 5;249(1-2):101-108.
10. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
11. Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J Control Release* 2006 Aug 28;114(2):242-250.
12. Sonaje K, Lin YH, Juang JH, Wey SP, Chen CT, Sung HW. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* 2009 Apr;30(12):2329-2339.
13. Kalaria DR, Sharma G, Beniwal V, Ravi Kumar MN. Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharm Res* 2009 Mar;26(3):492-501.
14. Dhumal RS, Biradar SV, Yamamura S, Paradkar AR, York P. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by sonoprecipitation for enhancement of bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Sep;70(1):109-115.

15. Li H, Song JH, Park JS, Han K. Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. *Int J Pharm* 2003 Jun 4;258(1-2):11-19.
16. Sun W, Zou W, Huang G, Li A, Zhang N. Pharmacokinetics and targeting property of TFu-loaded liposomes with different sizes after intravenous and oral administration. *J Drug Target* 2008 Jun;16(5):357-365.
17. Ling SS, Magosso E, Khan NA, Yuen KH, Barker SA. Enhanced oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of a hydrophilic drug using liposomes. *Drug Dev Ind Pharm* 2006 Mar;32(3):335-345.
18. Anderson KE, Eliot LA, Stevenson BR, Rogers JA. Formulation and evaluation of a folic acid receptor-targeted oral vancomycin liposomal dosage form. *Pharm Res* 2001 Mar;18(3):316-322.
19. Yamabe K, Kato Y, Onishi H, Machida Y. Potentiality of double liposomes containing salmon calcitonin as an oral dosage form. *J Control Release* 2003 May 20;89(3):429-436.
20. Kwon SH, Kim SY, Ha KW, Kang MJ, Huh JS, Im TJ, et al. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. *Arch Pharm Res* 2007 Sep;30(9):1138-1143.
21. Sant VP, Smith D, Leroux JC. Enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkyl acrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. *J Control Release* 2005 May 18;104(2):289-300.
22. Ke W, Zhao Y, Huang R, Jiang C, Pei Y. Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system. *J Pharm Sci* 2008 Jun;97(6):2208-2216.
23. Francis MF, Cristea M, Winnik FM. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure and Applied Chemistry* 2004;76(7-8):1321-1335.
24. Anya M, Hillery AWLaJS. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacist and Pharmaceutical Scientists*. New York: Taylor & Francis, 2001.
25. Dressman J. LH. *Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment*. New-York: marcel decker, Inc., 2000.
26. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998 Jan;15(1):11-22.
27. Horter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 1;46(1-3):75-87.
28. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release* 1999 Nov 1;62(1-2):41-49.
29. US.Pharmacopeia.XXIV. Rockville, MD, 2006.
30. Galia E, Nicolaidis E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 1998 May;15(5):698-705.

31. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm* 2005 Aug;60(3):413-417.
32. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res* 2006 Jan;23(1):165-176.
33. Jantratid E, Janssen N, Chokshi H, Tang K, Dressman JB. Designing biorelevant dissolution tests for lipid formulations: case example--lipid suspension of RZ-50. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Jun;69(2):776-785.
34. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1663-1676.
35. Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaidis E, et al. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects. *J Pharm Pharmacol* 2004 Apr;56(4):453-462.
36. Kalantzi L, Persson E, Polentarutti B, Abrahamsson B, Goumas K, Dressman JB, et al. Canine intestinal contents vs. simulated media for the assessment of solubility of two weak bases in the human small intestinal contents. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1373-1381.
37. Zangenberg NH, Mullertz A, Kristensen HG, Hovgaard L. A dynamic in vitro lipolysis model. II: Evaluation of the model. *Eur J Pharm Sci* 2001 Oct;14(3):237-244.
38. Zangenberg NH, Mullertz A, Kristensen HG, Hovgaard L. A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *Eur J Pharm Sci* 2001 Sep;14(2):115-122.
39. Müller RH, Rühl D, Runge SA. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutics* 1996;144(1):115-121.
40. Olbrich C, Müller RH. Enzymatic degradation of SLN--effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;180(1):31-39.
41. Woodley JF. Liposomes for oral administration of drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1985;2(1):1-18.
42. Arien A, Goigoux C, Baquey C, Dupuy B. Study of in vitro and in vivo stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1993;53(16):1279-1290.
43. Andrieux K, Forte L, Lesieur S, Paternostre M, Ollivon M, Grabielle-Madellmont C. Solubilisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers by sodium taurocholate: a model to study the stability of liposomes in the gastrointestinal tract and their mechanism of interaction with a model bile salt. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 Feb;71(2):346-355.
44. Rogers JA, Anderson KE. The potential of liposomes in oral drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(5):421-480.

45. Kokkona M, Kallinteri P, Fatouros D, Antimisiaris SG. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. *Eur J Pharm Sci* 2000 Jan;9(3):245-252.
46. Maitani Y, Hazama M, Tojo Y, Shimoda N, Nagai T. Oral administration of recombinant human erythropoietin in liposomes in rats: influence of lipid composition and size of liposomes on bioavailability. *J Pharm Sci* 1996 Apr;85(4):440-445.
47. Rowland RN, Woodley JF. Uptake of free and liposome-entrapped horseradish peroxidase by rat intestinal sacs in vitro. *FEBS Lett* 1981 Jan 12;123(1):41-44.
48. Rowland RN, Woodley JF. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1980 Dec 5;620(3):400-409.
49. Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Kakemi M, Morimoto K, Yamashita S, et al. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 1999 Feb;88(2):248-252.
50. Minato S, Iwanaga K, Kakemi M, Yamashita S, Oku N. Application of polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes for oral vaccine: effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity. *J Control Release* 2003 Apr 29;89(2):189-197.
51. Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Morimoto K, Kakemi M, Yamashita S, et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: Improvement of stability of insulin in GI tract. *International Journal of Pharmaceutics* 1997;157(1):73-80.
52. Filipovic-Grcic J, Skalko-Basnet N, Jalsenjak I. Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability. *J Microencapsul* 2001 Jan-Feb;18(1):3-12.
53. Trapani A, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology* 2008;19(18).
54. Pan Y, Li YJ, Zhao HY, Zheng JM, Xu H, Wei G, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 2002 Dec 5;249(1-2):139-147.
55. Vauthier C, Labarre D, Ponchel G. Design aspects of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *J Drug Target* 2007 Dec;15(10):641-663.
56. Ramachandran R, Paul W, Sharma CP. Synthesis and characterization of PEGylated calcium phosphate nanoparticles for oral insulin delivery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Jan;88(1):41-48.
57. Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, Veillard M, Kreuter J. Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials* 1996 Apr;17(7):715-723.
58. Tobío M, Sánchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato JL, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2000;18(3-4):315-323.
59. des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, Detrembleur C, Alonso-Sande M, Van Gelder J, et al. Helodermin-loaded nanoparticles: characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. *J Control Release* 2007 Apr 23;118(3):294-302.

60. García-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003;27(2-3):159-168.
61. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008 Nov;4(6):1752-1761.
62. Kim S, Kim JY, Huh KM, Acharya G, Park K. Hydrotropic polymer micelles containing acrylic acid moieties for oral delivery of paclitaxel. *J Control Release*. 2008 Jul 10.
63. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002 Jun;19(6):875-880.
64. Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P. Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: Part 2. Properties of the formed surface film. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005 Sep;44(4):197-203.
65. Fagerholm U, Lennernäs H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995;3(5):247-253.
66. Lennernas H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci* 1998 Apr;87(4):403-410.
67. Norris DA, Puri N, Sinko PJ. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):135-154.
68. Behrens I, Pena AI, Alonso MJ, Kissel T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm Res* 2002 Aug;19(8):1185-1193.
69. Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar M. Design of Estradiol Loaded PLGA Nanoparticulate Formulations: A Potential Oral Delivery System for Hormone Therapy. *Pharmaceutical Research* 2006;23(1):184-195.
70. Bravo-Osuna I, Vauthier C, Farabollini A, Palmieri GF, Ponchel G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 2007 Apr;28(13):2233-2243.
71. Sakuma S, Hayashi M, Akashi M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):21-37.
72. Dodou D, Breedveld P, Wieringa PA. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2005 May;60(1):1-16.
73. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):39-54.
74. Yin Y, Chen D, Qiao M, Wei X, Hu H. Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J Control Release* 2007 Oct 18;123(1):27-38.

75. Cartiera MS, Johnson KM, Rajendran V, Caplan MJ, Saltzman WM. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials* 2009 May;30(14):2790-2798.
76. Pietzonka P, Rothen-Rutishauser B, Langguth P, Wunderli-Allenspach H, Walter E, Merkle HP. Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake. *Pharm Res* 2002 May;19(5):595-601.
77. Gaumet M, Gurny R, Delie F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur J Pharm Sci* 2009 Mar 2;36(4-5):465-473.
78. Zha LY, Xu ZR, Wang MQ, Gu LY. Chromium nanoparticle exhibits higher absorption efficiency than chromium picolinate and chromium chloride in Caco-2 cell monolayers. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008 Apr;92(2):131-140.
79. Ma Z, Lim LY. Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 2003 Nov;20(11):1812-1819.
80. Mi FL, Wu YY, Lin YH, Sonaje K, Ho YC, Chen CT, et al. Oral delivery of peptide drugs using nanoparticles self-assembled by poly(γ -glutamic acid) and a chitosan derivative functionalized by trimethylation. *Bioconjug Chem* 2008 Jun;19(6):1248-1255.
81. Lin YH, Mi FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF, et al. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules* 2007 Jan;8(1):146-152.
82. Prego C, Garcia M, Torres D, Alonso MJ. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Release* 2005 Jan 3;101(1-3):151-162.
83. Lin YH, Sonaje K, Lin KM, Juang JH, Mi FL, Yang HW, et al. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J Control Release* 2008 Dec 8;132(2):141-149.
84. Sang Yoo H, Gwan Park T. Biodegradable nanoparticles containing protein-fatty acid complexes for oral delivery of salmon calcitonin. *J Pharm Sci* 2004 Feb;93(2):488-495.
85. Fillafer C, Friedl DS, Wirth M, Gabor F. Fluorescent bionanoprobes to characterize cytoadhesion and cytoinvasion. *Small* 2008 May;4(5):627-633.
86. Weissenboeck A, Bogner E, Wirth M, Gabor F. Binding and uptake of wheat germ agglutinin-grafted PLGA-nanospheres by caco-2 monolayers. *Pharm Res* 2004 Oct;21(10):1917-1923.
87. Lochner N, Pittner F, Wirth M, Gabor F. Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Pharm Res* 2003 May;20(5):833-839.
88. Gao X, Wang T, Wu B, Chen J, Chen J, Yue Y, et al. Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Dec 5;377(1):35-40.
89. Zhang Z, Feng SS. Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-Vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy. *Int J Pharm* 2006 Nov 6;324(2):191-198.

90. Koch AM, Reynolds F, Merkle HP, Weissleder R, Josephson L. Transport of surface-modified nanoparticles through cell monolayers. *Chembiochem* 2005 Feb;6(2):337-345.
91. Chen F, Zhang ZR, Yuan F, Qin X, Wang M, Huang Y. In vitro and in vivo study of N-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery. *Int J Pharm* 2008 Feb 12;349(1-2):226-233.
92. Cheng WP, Gray AI, Tetley L, Hang Tle B, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Polyelectrolyte nanoparticles with high drug loading enhance the oral uptake of hydrophobic compounds. *Biomacromolecules* 2006 May;7(5):1509-1520.
93. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 2009 Aug 20.
94. Sattler S, Schaefer U, Schneider W, Hoelzl J, Lehr CM. Binding, uptake, and transport of hypericin by Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* 1997 Oct;86(10):1120-1126.
95. Mathot F, des Rieux A, Arien A, Schneider YJ, Brewster M, Preat V. Transport mechanisms of mmePEG750P(CL-co-TMC) polymeric micelles across the intestinal barrier. *J Control Release* 2007 Dec 20;124(3):134-143.
96. Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine for oral administration. *Int J Pharm* 2007 Mar 6;332(1-2):161-167.
97. Batrakova EV, Han HY, Miller DW, Kabanov AV. Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm Res* 1998 Oct;15(10):1525-1532.
98. Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. *Pharm Res* 2003 Oct;20(10):1543-1550.
99. El-Sayed M, Rhodes CA, Ginski M, Ghandehari H. Transport mechanism(s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm* 2003 Oct 20;265(1-2):151-157.
100. Kitchens KM, Foraker AB, Kolhatkar RB, Swaan PW, Ghandehari H. Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells. *Pharm Res* 2007 Nov;24(11):2138-2145.
101. Kitchens KM, Kolhatkar RB, Swaan PW, Ghandehari H. Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across Caco-2 cells. *Mol Pharm* 2008 Mar-Apr;5(2):364-369.
102. des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, Preat V, Schneider YJ, Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci* 2005 Jul-Aug;25(4-5):455-465.
103. Nellans HN. (B) Mechanisms of peptide and protein absorption: (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1991;7(3):339-364.

104. Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technolo Today* 2000 Oct 1;3(10):346-358.
105. Salamat-Miller N, Johnston TP. Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *Int J Pharm* 2005 Apr 27;294(1-2):201-216.
106. Volkheimer G. Persorption of particles: physiology and pharmacology. *Adv Pharmacol Chemother* 1977;14:163-187.
107. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Jul;50(1):147-160.
108. Sadeghi AM, Dorkoosh FA, Avadi MR, Weinhold M, Bayat A, Delie F, et al. Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Sep;70(1):270-278.
109. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997 Dec;14(12):1655-1658.
110. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2000 May;10(3):195-204.
111. Washington N, Washington C, Wilson CG. *Physiological pharmaceuticals: Barriers to drug absorption*. second ed, 2001.
112. Win KY, Feng SS. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005 May;26(15):2713-2722.
113. Mathot F, Schanck A, Van Bambeke F, Arien A, Noppe M, Brewster M, et al. Passive diffusion of polymeric surfactants across lipid bilayers. *J Control Release* 2007 Jul 16;120(1-2):79-87.
114. Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 1996;167:91-159.
115. Yeh P, Ellens H, Smith PL. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):123-133.
116. Florence AT. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug Discovery Today: Technologies* 2005;2(1):75-81.
117. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 2006 Nov;116(1):1-27.
118. Damge C, Reis CP, Maincent P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opin Drug Deliv* 2008 Jan;5(1):45-68.
119. Delie F, Blanco-Prieto MJ. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 2005;10(1):65-80.

120. Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 2005 Sep 1;10(17):1145-1157.
121. Brayden DJ. Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Eur J Pharm Sci* 2001 Oct;14(3):183-189.
122. Foster N, Hirst BH. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 Jan 10;57(3):431-450.
123. Clark MA, Jepson MA, Hirst BH. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Aug 23;50(1-2):81-106.
124. Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res* 1997 Mar;14(3):259-266.
125. Kuolee R, Chen W. M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 2008 Jun;5(6):693-702.
126. Vyas SP, Gupta PN. Implication of nanoparticles/microparticles in mucosal vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines* 2007 Jun;6(3):401-418.
127. Jepson MA, Clark MA, Hirst BH. M cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 Mar 3;56(4):511-525.
128. Lambkin I, Pinilla C. Targeting approaches to oral drug delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2002 Jan;2(1):67-73.
129. Lavelle EC, Sharif S, Thomas NW, Holland J, Davis SS. The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;18(1):5-22.
130. O'Hagan DT. Intestinal translocation of particulates -- implications for drug and antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1990;5(3):265-285.
131. Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Mishra N, Vyas SP. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J Drug Target* 2007 Dec;15(10):701-713.
132. Garinot M, Fievez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release* 2007 Jul 31;120(3):195-204.
133. Gullberg E, Keita AV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Soderholm JD, et al. Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Nov;319(2):632-639.
134. Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW, et al. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Dec 29;279(3):808-813.
135. Clark MA, Blair H, Liang L, Brey RN, Brayden D, Hirst BH. Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells. *Vaccine* 2001 Oct 12;20(1-2):208-217.
136. Pinto-Alphandary H, Aboubakar M, Jaillard D, Couvreur P, Vauthier C. Visualization of insulin-loaded nanocapsules: in vitro and in vivo studies after oral administration to rats. *Pharm Res* 2003 Jul;20(7):1071-1084.

137. Damge C, Aprahamian M, Humbert W, Pinget M. Ileal uptake of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules in the rat. *J Pharm Pharmacol* 2000 Sep;52(9):1049-1056.
138. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.
139. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 2005 Jun;7(7-8):997-1004.
140. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 2002 Jul;3(7):443-451.
141. Ragnarsson EG, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazoli F, Lerm M, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest* 2008 Nov;88(11):1215-1226.
142. Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* 2007 Aug;8(8):970-982.
143. Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 2004 Sep 3;118(5):591-605.
144. Kitchens KM, El-Sayed ME, Ghandehari H. Transepithelial and endothelial transport of poly (amidoamine) dendrimers. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 Dec 14;57(15):2163-2176.
145. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 2003 Dec 1;116(Pt 23):4707-4714.
146. Lajoie P, Nabi IR. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 2007 Jul-Aug;11(4):644-653.
147. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J Lipid Res* 1998 Oct;39(10):1938-1950.
148. Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 1982 Apr 15;296(5858):651-653.
149. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997 Jun 5;387(6633):569-572.
150. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 2001 May;3(5):473-483.
151. Medina-Kauwe LK. "Alternative" endocytic mechanisms exploited by pathogens: new avenues for therapeutic delivery? *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Aug 10;59(8):798-809.
152. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 1994 Dec;127(5):1217-1232.

153. Trevaskis NL, Charman WN, Porter CJ. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 Mar 17;60(6):702-716.
154. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003 Feb 24;55(3):329-347.
155. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb J* 2002 Aug;16(10):1217-1226.
156. Panyam J, Labhasetwar V. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 2003 Feb;20(2):212-220.
157. Park JS, Han TH, Lee KY, Han SS, Hwang JJ, Moon DH, et al. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: endocytosis, exocytosis and drug release. *J Control Release* 2006 Sep 28;115(1):37-45.
158. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008 Aug-Sep;29(24-25):3477-3496.
159. Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 1992 Jan 24;255(5043):410-411.
160. Swaan PW. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm Res* 1998 Jun;15(6):826-834.
161. Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jul 5;102(27):9469-9474.
162. Singh R, Lillard JW, Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 2009 Jun;86(3):215-223.
163. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006 Apr;6(4):662-668.
164. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res* 1996 Dec;13(12):1838-1845.
165. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004 Jan 1;377(Pt 1):159-169.
166. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science* 2000;25(8):1171-1210.
167. Douglas SJ, Davis SS, Illum L. Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987;3(3):233-261.
168. Krauel K, Davies NM, Hook S, Rades T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. *J Control Release* 2005 Aug 18;106(1-2):76-87.

169. Damgé C, Aprahamian M, Balboni G, Hoeltzel A, Andrieu V, Devissaguet JP. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules increase the intestinal absorption of a lipophilic drug. *International Journal of Pharmaceutics* 1987;36(2-3):121-125.
170. Wissing SA, Kayser O, Muller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 May 7;56(9):1257-1272.
171. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003 Jan;18(1):55-61.
172. Suggy SC, Murari R, Imran A. Liposomes (a review)--part one: Manufacturing issues. *Biopharm* 2001;14(11):10.
173. Hureauux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Clavreul A, Roger E, et al. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 Jun 25.
174. Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett* 1996 May 20;386(2-3):243-246.
175. Singh M, O'Hagan D. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):285-304.
176. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Feb 2;353(1):26-32.
177. Yuan H, Chen J, Du YZ, Hu FQ, Zeng S, Zhao HL. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007 Aug 1;58(2):157-164.
178. Mudhakir D, Akita H, Tan E, Harashima H. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Control Release* 2008 Jan 22;125(2):164-173.
179. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Aug 10;59(8):748-758.
180. Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett* 2007 Jun;7(6):1542-1550.
181. Muro S, Schuchman EH, Muzykantov VR. Lysosomal enzyme delivery by ICAM-1-targeted nanocarriers bypassing glycosylation- and clathrin-dependent endocytosis. *Mol Ther* 2006 Jan;13(1):135-141.
182. Ponchel G, Irache J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):191-219.
183. Kilpatrick DC, Pusztai A, Grant G, Graham C, Ewen SW. Tomato lectin resists digestion in the mammalian alimentary canal and binds to intestinal villi without deleterious effects. *FEBS Lett* 1985 Jun 17;185(2):299-305.

184. Hussain N, Jani PU, Florence AT. Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat. *Pharm Res* 1997 May;14(5):613-618.
185. Florence AT, Hillery AM, Hussain N, Jani PU. Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: Studies on particle uptake and fate. *Journal of Controlled Release* 1995;36(1-2):39-46.
186. Gabrielson NP, Pack DW. Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J Control Release* 2009 Feb 13.
187. Russell-Jones GJ, Arthur L, Walker H. Vitamin B12-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 cells. *Int J Pharm* 1999 Mar 15;179(2):247-255.
188. Samstein RM, Perica K, Balderrama F, Look M, Fahmy TM. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles. *Biomaterials* 2008 Feb;29(6):703-708.

Travail Expérimental

Chapitre 1 :

Stabilité *in vitro* des nanocapsules lipidiques dans les milieux gastro-intestinaux

Stabilité in vitro des nanocapsules lipidiques dans les milieux gastro-intestinaux

RATIONNEL

Après administration par voie orale, le premier obstacle limitant la stabilité des LNCs et par conséquent ayant un impact potentiel sur la biodisponibilité des molécules encapsulées, est l'environnement gastro-intestinal. En effet, les acides contenus dans l'estomac peuvent déstabiliser les formes galéniques et permettent d'obtenir un pH optimal (pH<4.5) pour le fonctionnement de la pepsine (enzyme gastrique majoritaire qui hydrolyse les protéines en polypeptides) qui elle même peut être délétère. De plus il faut tenir compte de l'action des nombreuses enzymes qui sont sécrétées ou libérées dans l'intestin grêle (sécrétion pancréatique, sécrétion biliaire) et particulièrement de la lipase dans l'application qui nous intéresse. Enfin, le chyme est soumis à la mobilité gastro-intestinale.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail a, dans un premier temps, reposé sur la mise en place, au sein du laboratoire, de différents milieux simulés décrits. Puis, la stabilité des nanocapsules a été étudiée. La taille et le taux d'encapsulation des LNCs de paclitaxel ont été évalués.

RESULTATS

Les milieux décrits par la pharmacopée européenne ont été testés dans un souci de validation pharmaceutique. Néanmoins, ces milieux ainsi que certains récemment décrits ne sont pas représentatifs des conditions humaines, des adaptations à ces milieux ont donc été apportées. Les nanocapsules lipidiques sont stables dans le milieu gastrique et dans tous les milieux intestinaux excepté celui contenant la pancréatine et les sels biliaires. En effet, une faible libération du paclitaxel est observée dans ce dernier milieu après 6h. Ces résultats restent néanmoins en faveur d'une administration orale des nanocapsules lipidiques. Ils permettent une première validation du concept de l'utilisation des LNCs pour la voie orale.

Ce travail est publié dans *International Journal of Pharmaceutics*. (E. Roger, F. Lagarce, J.P Benoit, The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules, *Volume 379, Issue 2, 11 September 2009, Pages 260-265*).

The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules

E. Roger^{a,b}, F. Lagarce^{b,c*}, J-P Benoit^{b,c}

^aEthypharm, 92213-Saint-Cloud Cedex, France.

^bINSERM U646, Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, 49100-Angers, France.

^cCentre Hospitalier Universitaire Angers, Pôle Pharmaceutique, 49033-Angers, cedex 9, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 241 735885; fax: +33 241 735853;

E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Abstract: The *in vitro* gastrointestinal stability of lipid nanocapsules (LNCs) was studied in different media. The size of LNCs was determined in simulated gastric and intestinal media. In updated fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF-V2) and updated fed state simulated intestinal fluid (FeSSIF-V2) media, the encapsulation ratio of paclitaxel-loaded LNCs was also measured. The size of LNCs was not modified after 3 h in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid described by the United States Pharmacopeia, in FaSSIF, FaSSIF-V2, and in FeSSIF. Moreover, in the presence of pancreatin in FeSSIF-V2, a decreased above 30% of the loading of paclitaxel was observed. This was attributed to the presence of lipase in pancreatin that could interact with Lipoid® (a mixture of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine), present on the shell of LNC. As a conclusion, LNCs were stable on gastric medium and fasted state intestinal medium.

Keywords: Lipid nanocapsules, Paclitaxel, Stability, Gastrointestinal tract, Simulated media.

1. Introduction

Lipid nanocapsules (LNCs) form a new generation of nanovectors that can encapsulate some anticancer agents [1-4] and can be administered by different routes. One of the recent applications of these colloidal carriers is the oral administration of drugs that allows an improved quality of life for the patient. For some lipophilic drugs, such as paclitaxel for example, oral administration is problematic because of paclitaxel's low water solubility and its affinity for Cytochrome P-450 3A4, or 2C8 enzymes and the multidrug efflux pump [5, 6]. Thus, its encapsulation in a lipid formulation could provide a solution to improve the oral bioavailability of these compounds. Some publications have already shown the interest of using these novel drug delivery systems orally [7-9]. An *in vivo* study of paclitaxel-loaded LNCs has already shown an increase in oral bioavailability by a factor of 3 [4]. Nevertheless, the reason for this improvement is not yet understood. The first barrier to cross after oral administration is constituted by the physicochemical environment of the gastrointestinal tract. The drug must then be transported across the intestinal epithelium. Some polymeric nanoparticles have already shown degradation in the gastrointestinal tract due to the variation of the pH level, the presence of enzymes or bile salts [10]. On the other hand, lipid-based delivery systems like self-emulsifying or self-microemulsifying drug delivery system (SEDDS or SMEDDS, respectively) form emulsions and thus "dissolve" the drug in the gastrointestinal tract [11, 12]. Moreover, it is well known that lipids are rapidly digested by gastric and intestinal enzymes and absorbed in the form of micellar structures by enterocytes [13, 14]. Consequently, the gastrointestinal tract is a barrier that can limit LNCs absorption by disruption. Over the last few years, some research teams have tried to establish simulated gastrointestinal fluids with *in vitro*-*in vivo* correlations [15-17], but to date, no standard model has been recognized. The aim of this study was to investigate LNCs stability in different gastrointestinal fluids.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Captex® 8000 (tricaprylin) was a gift from Abitec Corp. (Columbus, Ohio, USA) via Unipex (Rueil-Malmaison, France). Lipoid® S75-3 (soya bean lecithin at 70% phosphatidylcholine and 10% phosphatidylethanolamine) and Solutol® HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was purchased from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Paclitaxel powder used for LNCs formulation was from Bioxel Pharma (Quebec, Canada). Purified water was obtained from a MilliQ185 System (Waters, Saint-Quentin-en-Yveline, France). Acetonitrile, acetone, methanol and tetrahydrofuran HPLC grade were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and Carlo Erba Reactifs (Val-de-Reuil, France). Sodium monobasic phosphate anhydrous, maleic acid, and pancreatin (8×USP specification) were purchased from Sigma-Aldrich. Pepsin (European Pharmacopeia), sodium taurocholate, lecithin, sodium hydroxide and 1-oleoyl-*rac*-glycerol were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Calcium chloride and acetic acid were purchased from Prolabo. Sodium oleate (purity >82%) was obtained from Riedel-de Haen (Selze, Germany).

2.2 Methods

2.2.1 Preparation and characterization of blank LNC or paclitaxel-loaded LNC

LNCs were prepared according to the original process described by Heurtault *et al.* [18] including several changes. Briefly, Captex® 8000 (29%, w/w) and Lipoid® S75-3 (1.6%, w/w) were mixed and heated at 85°C. Solutol® HS15 (24.15%, w/w), NaCl (1.77%, w/w) and water (43.48%, w/w) were added and homogenised under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 70 and 90°C were then carried out and followed by an irreversible shock induced by dilution with 2°C purified water (73%, v/v) added to the mixture at 78°C. Slow magnetic stirring was then applied to the suspension of LNCs for 5 min at room temperature.

To prepare paclitaxel-loaded LNCs, 29.3 mg of paclitaxel was dissolved in Captex® 8000 in the presence of ethanol and the solvent was evaporated at 80°C before use. LNCs were then prepared as described previously.

The size of the nanoparticles was measured by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

To determine the paclitaxel encapsulation ratio, LNCs were filtered using a Minisart® 0.2µm filter (Vivascience AG, Hanovre, Germany) after formulation in order to eliminate paclitaxel crystals (paclitaxel not encapsulated). Three samples of filtrate were prepared by dissolution of an exact quantity of LNCs dispersion in a 96/4 (v/v) methanol/tetrahydrofurane solution and then filtrated on a Minisart® 0.2µm filter in order to eliminate the residual components of the LNCs. A 15µL aliquot of each filtrate was injected in triplicate onto the high-performance liquid chromatograph (HPLC) column. Chromatography was performed using a Waters 717 plus autosampler, Waters 600 controller and Waters 2487 Dual Absorbance Spectrometer (Waters S.A., Saint-Quentin-en-Yvelynes, France) with an XTerra® C₁₈-ODB 150mm x 4.6mm column (Waters, Milford, Ireland) and a UV detector set at 227 nm. The flow rate was set to 1 mL/min. The gradient was obtained by mixing proportion of phase A (water) and phase B (acetonitrile). Initially, the mobile-phase composition was 50% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 85% B after 7min, maintained for 2min and then returned to the initial conditions. Quantification was achieved by comparing observed peak area ratios of paclitaxel in the samples to a calibration curve obtained under the same experimental conditions. Linearity was observed in the range from 39.0 to 390.2 mg/L with a correlation coefficient above 0.99. The detection limit was 10.0 mg/L and the quantification limit was 20.0 mg/L. The mean drug payload (mg of paclitaxel/g of LNCs dispersion) of each batch of LNCs dispersion and the standard deviation were calculated from three samples. The encapsulation efficiency (%) was determined by dividing the measured-drug payload by the drug payload calculated with the exact quantity of each component of the formulation.

2.2.2 *Composition of various media*

Simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were prepared according to USP XXIV [19]. The SGF medium contained 0.32% (w/v) of pepsin; the pH was 1.2. The SIF medium was composed of 1% (w/v) pancreatin with a pH of 7.5. The FaSSIF/FeSSIF fluids represent a simplification of the proximal small intestine composition in the fasted state (FaSSIF) or in the fed state (FeSSIF). These media were made up according to the literature [20-22]. The composition is summarised in Tables 1

and 2. The FaSSIF-V2 and FeSSIF-V2 fluids are updated (V2) versions of the standard FaSSIF and FeSSIF media. Revision of FaSSIF and FeSSIF media was performed by Jantravid *et al.* [23] in order to better mimic *in vivo* conditions [12]. FaSSIF-V2 contained one modification: a decrease in the amount of lecithin, whereas in FeSSIF-V2, the pH, the buffer, and the bile component concentration (contains bile salt and lipolysis products) were modified (Tables 1 and 2) [23].

Composition/medium	FaSSIF	FaSSIF-V2
Sodium taurocholate	3mM	3mM
Lecithin	0.75mM	0.2mM
Sodium monobasic phosphate anhydrous	28.65mM	/
Maleic acid	/	19.12mM
Sodium hydroxide	8.71mM	34.8mM
Sodium chloride	105.85mM	68.62mM
pH	6.5	6.5

Table I: Composition of the medium to simulate the fasted state, upper small intestine: FaSSIF, FaSSIF-V2.

Composition/medium	FeSSIF	FeSSIF-V2
Sodium taurocholate	15mM	10mM
Lecithin	3.75mM	2mM
Acetic acid	144.04mM	/
Maleic acid	/	55.02mM
Glyceryl monooleate	/	5mM
Sodium oleate	/	0.8mM
Sodium hydroxide	101.02mM	81.65mM
Sodium chloride	203.18mM	125.5mM
Pancreatin	/	100Unit/mL
Calcium chloride	/	5mM
pH	5	5.8

Table II: Composition of the medium to simulate the fed state, upper small intestine: FeSSIF, FeSSIF-V2.

2.2.3 Stability study

The LNCs were diluted at a final concentration of 10% (v/v) and incubated at 37°C in different media. Samples were collected at times 0, 1, 2 and 3 h. The FeSSIF-V2, samples were centrifuged for 5 min at 13,600×g to eliminate aggregates of pancreatin in medium. The size distribution of the particles in suspension was measured by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). Experiments in FaSSIF-V2 and FeSSIF-V2 were also performed with paclitaxel-loaded LNCs for 6 h and the encapsulation efficiencies were determined by LC-MS/MS after filtration using a Minisart® 0.2µm filter of samples to eliminate free paclitaxel.

Chromatography was performed using a Waters Alliance® 2695 system (Waters S.A.) with an Uptisphere® C₁₈-ODB 150mm×2.0mm, 5µm column (Interchrom, Montluçon, France). The mobile phase consisted of phase A (0.1% formic acid in water) and phase B (0.1% formic acid in methanol). Under initial conditions, the mobile-phase composition was 30% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 98% B after 5 min, maintained for 30 s and then returned to the initial conditions. The flow rate was 0.3 mL/min and the column temperature was set at 40°C. The total HPLC effluent was directed into a Quattro Micro® triple quadrupole mass spectrometer (Waters S.A.). Ionisation was achieved using a turbo ion spray in positive ion mode. The mass spectrometer operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The (M-H)⁺ m/z transitions for each compound were 854.6→286.1. A typical retention time of paclitaxel was 6.46 min. Quantification was achieved with QuantLynx® (Waters S.A.) comparing the observed peak area ratios of paclitaxel samples to a calibration curve made under the same conditions. The range of linear response was 0.015–7.2µg/mL. The lower limit of detection was 0.015µg/mL and the lower limit of quantification was 0.75µg/mL.

3. Results

3.1 Characterisation of lipid nanoparticles

Blank LNCs were obtained with a mean size of 53±1 nm with a polydispersity index of 0.058±0.005. In the case of paclitaxel-loaded LNCs, the mean diameter of the particles was 51±2 nm and the polydispersity index was 0.051±0.008. For both formulations the

polydispersity index was inferior to 0.1 which demonstrates the monodispersity of preparation. The encapsulation of the paclitaxel was very efficient ($93\pm 6\%$) and the drug payload was 1.84 ± 0.15 mg/g of LNCs dispersion.

3.2 Stability study in simulated gastric medium

The size stability of LNCs in SGF was estimated by DLS. As shown in Fig. 1A, the size of the LNCs was not affected by the gastric environment after 2 h of incubation. Nevertheless, the encapsulation ratio of paclitaxel in LNCs was measured during 2 h of incubation in the gastric medium and a release of 12% of the initial amount of encapsulated paclitaxel was measured (Fig. 2A).

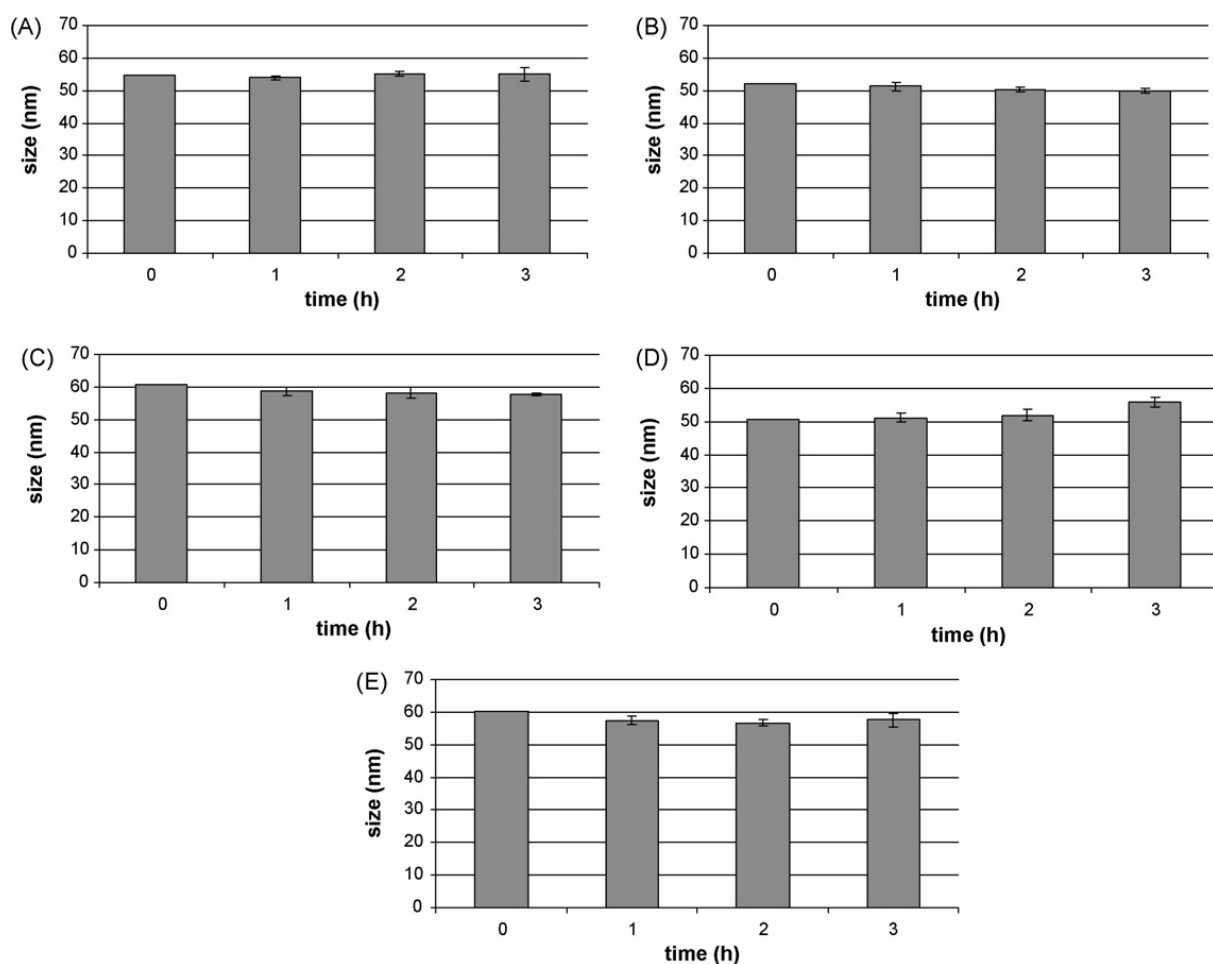


Figure 1: LNCs particle size following incubation in simulated gastric fluid (SGF) (A), in simulated intestinal fluid (SIF) (B), in simulated intestinal fluid in a fasted state (FaSSIF), (C), in simulated intestinal fluid in a fed state (FeSSIF) (D) and in updated simulated intestinal fluid in a fasted state (FaSSIF-V2) (E) ($n=3$; data are shown as mean \pm S.D.).

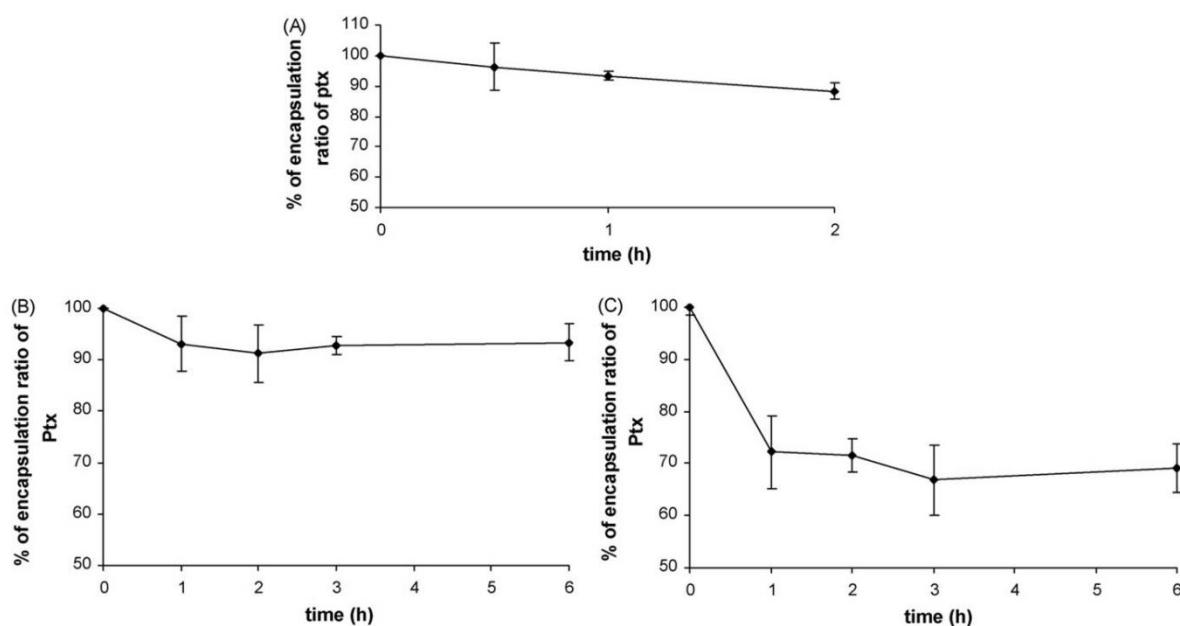


Figure 2: Percentage of encapsulation rate of paclitaxel following incubation in a simulated gastric fluid (SGF) (A), in an updated simulated intestinal fluid in a fasted state (FaSSIF-V2), (B) and in updated simulated intestinal fluid in a fed state (FeSSIF-V2) (C) ($n=3$; data are shown as mean \pm S.D.).

3.3 Stability in simulated intestinal media

In the literature, different media of simulated intestinal fluid have been described and used to evaluate the stability of colloidal carriers. In this paper, different media were used and compared. In the presence of only pancreatin (SIF medium), the size of the LNCs was conserved after 3 h of incubation (Fig. 1B). Using the same experimental procedure, in the presence of bile salts at fed or fasted concentrations, no change of size was observed (Fig. 1C–E). However, in the modified fed state simulated intestinal fluid, which contained bile salts and pancreatin, the size measurement of blank media, i.e. without nanoparticles (Fig. 3B), showed a size above 9 nm, corresponding to micelles. Unfortunately, during the stability experiment on the LNCs, in this media, the same size was measured (Fig. 3A), and no size above 50nm was observed.

Moreover, in order to investigate the stability of paclitaxel-loaded LNCs in simulated intestinal media, the encapsulation ratio of paclitaxel in LNCs was measured during 6 h of incubation in the medium. As shown in Fig. 2B, the release of paclitaxel after incubation in the FaSSIF-V2 medium is less than 6.5%. However, in the FeSSIF-V2 medium, approximately 30% of the initial amount of encapsulated paclitaxel was released (Fig. 2C).

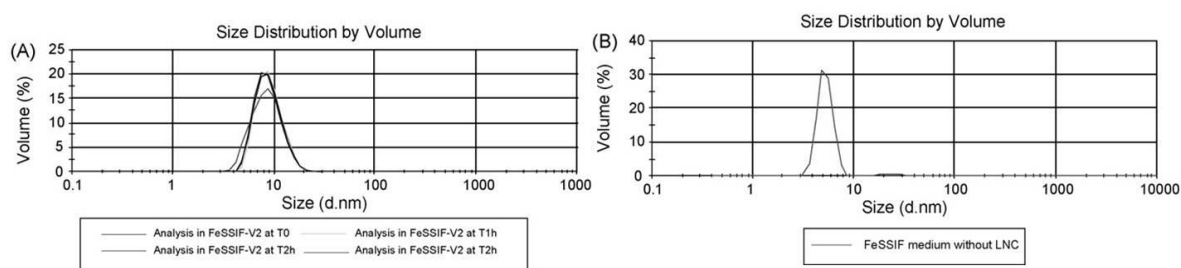


Figure 3: Example of LNCs size distribution (A) following incubation in updated simulated intestinal fluid in a fed state (FeSSIF-V2) and size distribution of the medium (B) ($n=3$; data are shown as mean \pm S.D.).

4. Discussion

In order to evaluate the stability of LNCs in the gastrointestinal tract, the first difficulty was to find the *in vitro* media which have a chance to be predictive of the *in vivo* fate of LNCs. One difficulty is the complexity of gastrointestinal fluid and by consequence the difficulty of creating a representative model. Indeed, the composition, the volume, the dynamics, the motility, and the gastrointestinal transit vary amongst people. Because of these different characteristics of gastrointestinal media, there are many of simulated fluids developed and used to study drug solubility. Nevertheless, no media are used to study the stability of nanovectors. An *in vitro* lipolysis model was described to simulate dynamic digestion of the lipid formulations [24] but in our case lipid was inside nanocapsules. The goal of this study was to investigate the stability of particles. But, in future work, it could be interesting to study the lipolysis of LNCs. Moreover, external influences such as food, disease or drug-taking can modify the transit conditions [25, 26]. Because of these different characteristics of gastrointestinal media, there are many of simulated fluids developed and used to study drug solubility. Accordingly, the stability of LNCs was analysed in different media. Firstly, simulated fluids, as described by the United States Pharmacopeia, were studied. These media are an essential reference in the evaluation of relating data on drug formulations [19]. The simulated gastric fluid has a pH of 1.2 and contains pepsin, a digestive protease that simulates fasting conditions in the stomach. As shown in Fig. 1A, LNCs were stable in gastric media for 3 h and their size was conserved, and approximately 12% of initial amount of encapsulated paclitaxel was released. In the literature, some studies have demonstrated the influence of the particle surface on gastrointestinal stability. PLA nanoparticles presented degradation and an

aggregation in gastric medium [27, 28]. In the presence of a polyoxyethylene (PEG) coating, the stability of the suspension was improved [29-31]. The authors explained this difference by the effect of the acidity of the gastric medium on PLA. Indeed, at low pH levels, PLA was rapidly degraded [32] whereas PEG surfactants remained stable. A similar result was found with PEG stearate lipid nanoparticles [30]. Consequently, PEG managed to consolidate nanoparticles and to protect PLA from degradation. In our case, LNCs contained Solutol® HS15 (a mixture of free PEG 660 and PEG 660 hydroxystearate) on their surface; this could protect Lipoid® and Captex® from acidic degradation but some Paclitaxel could diffuse across the shell of LNCs. Other alternative simulated gastric media are described in the literature [20, 33-35]. Modifications are principally based on the addition of surfactants but while conserving the pH level. As it was demonstrated that it was the pH that affected nanoparticle stability, the lipid nanoparticles were not tested with other media.

After demonstrating the stability of LNCs in the stomach, intestinal stability was studied. Firstly, United States Pharmacopeia media were used, as previously. The size of LNCs particles was conserved (Fig. 1B) after contact with USP SIF. The same stability was observed with PLA or PA nanoparticles coated with PEG [28, 31]. However, PLA nanoparticles uncoated or coated with albumin [27] as well as chitosan nanoparticles [36], have shown rapid degradation that was directly related to the enzymatic activity of pancreatin. This degradation phenomenon was related to the action of the lipase on PLA or was dependent upon an alkaline pH. In the latter case an action with the protons of chitosan was observed. Consequently, the PEG being at the surface of the LNCs protected the particles against pancreatin enzyme activity. Moreover, it was important to notice that the pancreatin concentration given by the USP does not reflect *in vivo* conditions [26]. Stability studies were then performed in the FaSSIF and FeSSIF media in order to study the potential action of the bile salts and lecithin [20, 33]. In these media, the mean size of LNCs particles remained unchanged. Recently some modifications of these media have been proposed. Firstly, phosphate buffer was substituted by maleate buffer [35]. Then, in both, FaSSIF-V2 or FeSSIF-V2, the amount of lecithin was decreased in accordance to *in vivo* data. Moreover, in the fed state simulated intestinal fluid medium two lipid digestion products (glyceryl monooleate and sodium oleate) as well as pancreatin were added [23]. The amount of pancreatin added was based on the lipase activity because it was the main enzyme responsible for lipid digestion. Indeed, lipase

requires bile salts in order to become functional as well as having a pH above 6 [37]. In both media, based on physiological parameters which are required for the prediction of drug dissolution, the size stability of LNCs was measured and the release of paclitaxel was studied. In FaSSIF-V2, the size of LNCs particles was not modified and paclitaxel remained encapsulated. In FeSSIF-V2, the size analysis was not appropriate because micelles of medium were more abundant than the nanocapsules themselves. Indeed, as in the upper small intestine, there was a strong emulsification process which was due to the presence of bile salts, glyceryl monooleate and sodium oleate [38]. On the other hand, paclitaxel-loaded LNCs stability was studied in FeSSIF-V2. After 6 h, a decreased encapsulation ratio was observed (30%). In view of this result, it could be preferable to administrate LNCs in pre-prandial state. These updated media were recently described [23]. For the moment, only the behaviour of one formulation in these media has been published [39]. A difference of drug release rates was observed between the FeSSIF and FeSSIF-V2 (called FeSSIF_a in the original paper); the release was increased in the presence of pancreatin and the author suggested that pancreatin facilitated the 'digestion' of lipid formulations. This explanation could apply in the case of LNCs. Furthermore, the concentration of bile salts was at the upper limit of the *in vivo* secretion, being between 5.2 and 11.2mM in the fed state in humans [40]. It may therefore be interesting to study the effect of bile salts on paclitaxel release via LNCs. It would be also interesting to study the activity of lipase on lipid nanocapsules. In the literature, an enzyme degradation assay was described in the presence of lipase and co-lipase, and, more especially, this experiment was performed on solid lipid nanoparticles (SLNs) that were composed of a lipid matrix and a surfactant [41, 42]. Contrary to LNCs, the SLN contained cholic acid sodium salt in their formulation and more especially on their surface. Bile salts have the capacity to accelerate the adsorption of lipase on particle surfaces and consequently, the complex lipase/co-lipase can degrade the particles. A similar experiment was performed with LNCs (no different sizes were observed (data not shown)) but this result could be explained by the absence of bile salts in the LNCs formulation. Therefore, SLN stability was different to that of LNCs in the gastrointestinal tract.

5. Conclusion

As no standard relevant *in vitro* media are validated to study the stability of lipid colloidal carriers, a stability study of LNCs was performed on various media in order to check how different stress conditions could affect the integrity of lipid nanocarriers. According to our results LNCs present gastrointestinal stability because of their surface coated with PEG. The intestinal stability experiments showed a better stability in fasted state media as LNCs are more stable in absence of pancreatin. The relevance of the *in vitro* media in predicting *in vivo* stability of LNCs has to be assessed with *in vivo* experiments. This is important to progress in validating standard *in vitro* media reliable for stability studies of colloidal carriers such as LNCs. After this milestone passed it will be possible to benchmark different colloidal carriers that exist.

References

1. Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessieres A, Jaouen G, et al. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 2008 Sep 10;130(2):146-153.
2. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1710-1722.
3. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* 2006 May 15;112(2):208-213.
4. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
5. Schellens JH, Malingre MM, Kruijtzter CM, Bardelmeijer HA, van Tellingen O, Schinkel AH, et al. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *Eur J Pharm Sci* 2000 Dec;12(2):103-110.
6. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):2031-2035.
7. Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *J Control Release* 2008 Jun 4;128(2):99-112.
8. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, et al. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* 2003 Dec;92(12):2386-2398.
9. Zhang Z, Feng SS. Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)--Vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy. *Int J Pharm* 2006 Nov 6;324(2):191-198.
10. Kuentz M. Drug absorption modeling as a tool to define the strategy in clinical formulation development. *Aaps J* 2008 Sep;10(3):473-479.
11. Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res* 1995 Nov;12(11):1561-1572.
12. Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2007 Mar;6(3):231-248.
13. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* 2000 Oct;11 Suppl 2:S93-98.
14. Subramanian N, Ghosal SK. Enhancement of gastrointestinal absorption of poorly water soluble drugs via lipid based systems. *Indian J Exp Biol* 2004 Nov;42(11):1056-1065.

15. Dressman J. LH. Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment. New-York: marcel decker, Inc., 2000.
16. Horter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 1;46(1-3):75-87.
17. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release* 1999 Nov 1;62(1-2):41-49.
18. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002 Jun;19(6):875-880.
19. pharmacopeia U. Rockville, MD, 2006.
20. Galia E, Nicolaides E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 1998 May;15(5):698-705.
21. Lobenberg R, Kramer J, Shah VP, Amidon GL, Dressman JB. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide. *Pharm Res* 2000 Apr;17(4):439-444.
22. Nicolaides E, Symillides M, Dressman JB, Reppas C. Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharm Res* 2001 Mar;18(3):380-388.
23. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1663-1676.
24. Porter CJH, Pouton CW, Cuine JF, Charman WN. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60(6):673-691.
25. Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, Lennernas H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res* 1997 Apr;14(4):497-502.
26. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm* 2008 Dec 8;364(2):213-226.
27. Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, Veillard M, Kreuter J. Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials* 1996 Apr;17(7):715-723.
28. Tobío M, Sánchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato JL, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2000;18(3-4):315-323.
29. des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, Detrembleur C, Alonso-Sande M, Van Gelder J, et al. Helodermin-loaded nanoparticles: characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. *J Control Release* 2007 Apr 23;118(3):294-302.
30. García-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003;27(2-3):159-168.

31. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008 Nov;4(6):1752-1761.
32. Makino K, Ohshima H, Kondo T. Transfer of protons from bulk solution to the surface of poly(L-lactide) microcapsules. *J Microencapsul* 1986 Jul-Sep;3(3):195-202.
33. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998 Jan;15(1):11-22.
34. Klein S, Butler J, Hempenstall JM, Reppas C, Dressman JB. Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. *J Pharm Pharmacol* 2004 May;56(5):605-610.
35. Vertzoni M, Fotaki N, Kostewicz E, Stippler E, Leuner C, Nicolaidis E, et al. Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects. *J Pharm Pharmacol* 2004 Apr;56(4):453-462.
36. Trapani A, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology* 2008;19(18).
37. Borgström B. On the mechanism of pancreatic lipolysis of glycerides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1954;13:491-504.
38. Embleton JK, Pouton CW. Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997;25(1):15-32.
39. Jantratid E, Janssen N, Chokshi H, Tang K, Dressman JB. Designing biorelevant dissolution tests for lipid formulations: case example--lipid suspension of RZ-50. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Jun;69(2):776-785.
40. Kalantzi L, Persson E, Polentarutti B, Abrahamsson B, Goumas K, Dressman JB, et al. Canine intestinal contents vs. simulated media for the assessment of solubility of two weak bases in the human small intestinal contents. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1373-1381.
41. Müller RH, Rühl D, Runge SA. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutics* 1996;144(1):115-121.
42. Olbrich C, Müller RH. Enzymatic degradation of SLN--effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;180(1):31-39.

Chapitre 2 :

Mécanisme de transport des nanocapsules lipidiques de paclitaxel à travers l'épithélium intestinal

Mécanisme de transport des nanocapsules lipidiques de paclitaxel à travers l'épithélium intestinal

RATIONNEL

Au cours du chapitre 1, nous avons étudié la stabilité des LNCs dans les milieux gastro-intestinaux. Pour être actives, les molécules ingérées doivent ensuite être absorbées et transportées vers la circulation générale ou lymphatique. Le principal lieu d'absorption des nutriments, et des macromolécules se situe au niveau de l'épithélium intestinal qui est principalement composé par les entérocytes. Ces cellules sont séparées par des jonctions serrées et possèdent des microvillosités au niveau apical, ainsi que des nombreuses protéines et enzymes. Différents mécanismes de transport à travers l'entérocyte sont possibles : diffusion passive, diffusion facilitée et transport actif. Néanmoins, actuellement il existe peu de données dans la littérature sur le transport des nanovecteurs.

Afin d'étudier la perméabilité des molécules mais également leurs mécanismes de transport, plusieurs techniques sont actuellement disponibles : méthode *in vivo*, méthodes *ex vivo* (méthode de Ussing, intestin éversé), méthode *in vitro* (culture cellulaire). La méthode de screening la plus appropriée est la culture cellulaire telle que le modèle cellulaire Caco-2. Ce modèle est largement utilisé pour prédire l'absorption des principes actifs.

OBJECTIF

Dans un premier temps, l'intérêt des nanocapsules lipides pour améliorer la perméabilité du paclitaxel à travers la barrière intestinale a été évalué. Ensuite, différentes études de transport et d'internalisation ont été effectuées en présence d'inhibiteurs spécifiques dans le but de comprendre le mécanisme de transcytose des LNCs. Enfin, la présence de nanocapsules dans le milieu basolatéral a été recherchée afin de savoir si un transport intact des LNCs est plausible.

RESULTATS

Au cours de ce travail nous avons démontré *in vitro* que les LNCs permettent d'améliorer la perméabilité du paclitaxel à travers l'épithélium intestinal. L'encapsulation du paclitaxel dans les LNCs est donc une solution pour améliorer son absorption.

Les différentes études ont ensuite montré que les LNCs sont transportées majoritairement par voie active. La quantité de paclitaxel transportée par voie passive est dépendante de la taille des nanoparticules. De plus, les LNCs sont internalisées par endocytose via un récepteur clathrine ou cavéole dépendant.

Enfin, la présence de nano-objets au niveau basolatéral en présence des LNCs, est en faveur d'un mécanisme de transcytose des nanoparticules.

Ce travail est publié dans *Journal of Controlled Release* (E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J.-P. Benoit, Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis, *In Press*)

Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis.

E. Roger^{a,b}, F. Lagarce^{b,c*}, E. Garcion^b, J-P Benoit^{b,c}

^aEthypharm, 92213-Saint-Cloud Cedex, France.

^bINSERM U646, Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, 49100-Angers, France.

^cCentre Hospitalier Universitaire Angers, Pôle Pharmaceutique, 49033-Angers, cedex 9, France.

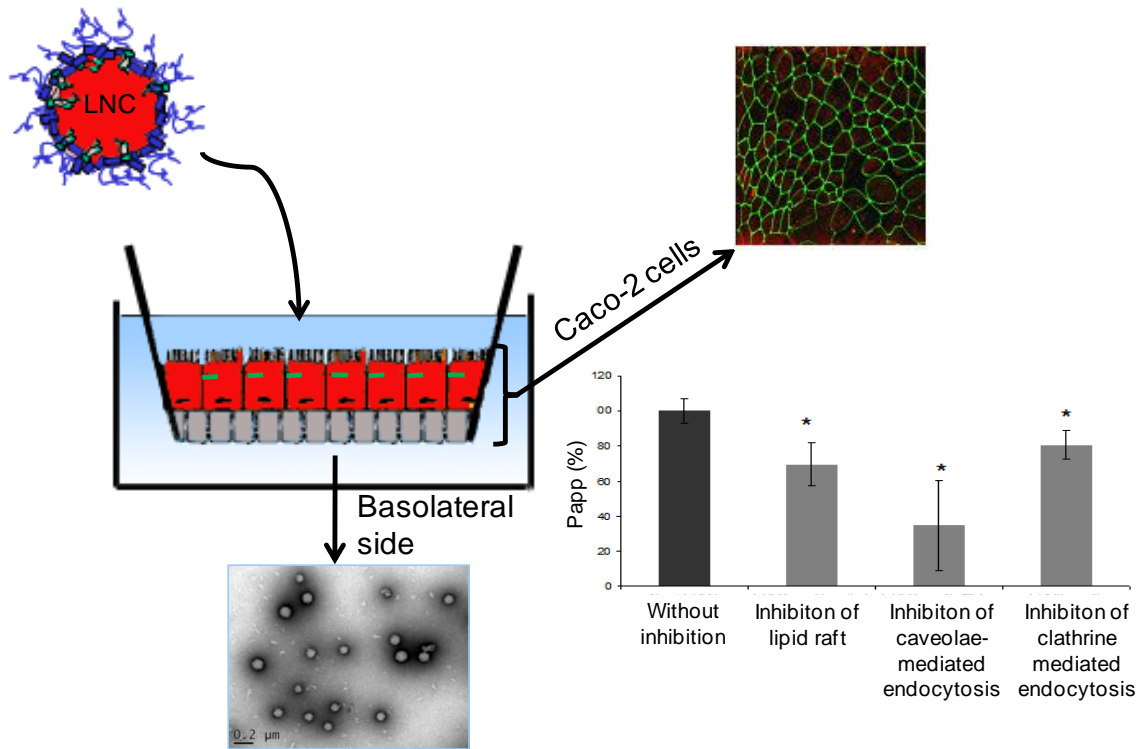
*Corresponding author. Tel.: +33 241 735885; fax: +33 241 735853;

E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Abstract: The use of lipid nanocapsules (LNCs) has enabled an improvement of the oral bioavailability of paclitaxel (Ptx). However, mechanisms that support this recent observation are not yet understood. By focusing on the well defined in vitro Caco-2 model, the purpose of this study was to evaluate the transport of LNCs across a model intestinal barrier. Firstly, four sizes of paclitaxel or dye (Nile Red)-loaded LNCs were formulated and LNCs with sizes between 26.3 ± 2.7 nm and 132.7 ± 5.5 nm were obtained. Different transport and uptake experiments were then performed across a Caco-2 cells culture model using these LNCs. Paclitaxel-loaded LNCs improved permeability of Ptx across intestinal epithelium compared with free Ptx or Taxol® by a factor of 3.5. At 37°C particle size did not influence transport efficiency. However, at 4 °C a decrease in Ptx transport was observed with increasing size of LNCs. Thus, with LNCs of 25 nm size, the apparent permeability coefficient (P_{app}) was 5.3 ± 1.1 cm s⁻¹ at 37°C and 2.2 ± 0.4 cm s⁻¹ at 4°C. In comparison in LNCs of 130 nm size, the P_{app} decreased from 5.8 ± 0.8 cm s⁻¹ at 37 °C to 0.5 ± 0.1 cm s⁻¹ at 4°C. The uptake of LNCs by Caco-2 cells and the incapacity of LNCs to open tight junctions were also demonstrated. Furthermore, experiment transports were performed in the presence of different inhibitors of endocytosis. Findings indicated a reduction of Ptx transport of $30 \pm 6\%$ when cell cholesterol was depleted, $65 \pm 12\%$ when caveolae-mediated endocytosis was inhibited and $20 \pm 8\%$ when clathrin-mediated endocytosis was inhibited. Finally, transmission electronic microscopy showed the presence of nano-objects on the basolateral side of the Caco-2 cell monolayers when LNCs were applied on the apical side.

Graphical Abstract:

LNCs were transported across the intestinal barrier via clathrin- and caveolae-mediated endocytosis that allows vesicle transcytosis.



Keywords: Nanoparticles, Paclitaxel, Endocytosis, Transcytosis, Caco-2 cells.

1. Introduction

The oral administration of drugs can improve patient compliance and quality of life. However, in many instances oral drug delivery remains a scientific challenge and improved technologies are required to optimize oral delivery. Paclitaxel (Ptx) is representative of many drug candidates that have limitations for oral administration. Paclitaxel is a major antitumor agent widely used in the treatment of breast cancer, non-small cell lung cancer and ovarian carcinoma [1] but commonly administered by intravenous infusion (Taxol[®], Paxene[®], Paclitaxel[®], Abraxane[®]). Oral bioavailability of paclitaxel is limited due to a very low aqueous solubility ($\text{Log } P_{o/w}=3.5$) and a restricted permeability across the intestinal barrier. Two main mechanisms could explain this low permeability. Firstly, Ptx affinity for P-glycoprotein (P-gp) [2], a drug efflux pump that is present in the gastrointestinal tract and secondly, metabolism by Cytochrome P-450 3A4 [2–4]. Different strategies have been studied to improve paclitaxel oral bioavailability. For example, Ptx has been administered with the P-gp inhibitor cyclosporine A [5]. Additionally, Ptx has undergone chemical modification [6]. However, one of the most promising strategies is the encapsulation of the drug in nanoscale drug delivery systems facilitating drug permeability across the intestinal barrier. In this instance bioavailability is not dependent on the physicochemical properties of the drug, but on the properties of nanocarrier [7–10].

Paclitaxel-loaded lipid nanocapsules (Ptx-LNCs) have been recently developed [7]. These nanocapsules can be prepared by a low energy process [11] and can be used to encapsulate numerous therapeutic molecules [12]. These nanovectors are prepared with “generally recognized as safe” products, and are compatible with a scale-up process [13]. The cytotoxicity of Ptx-LNCs on NCI-H460 cells was found similar to commercial formulation of paclitaxel Taxol[®] (3.8 nM and 4.4 nM respectively) [13]. In another model, Ptx-LNCs improve Ptx efficiency against dividing glioma cells [14]. Moreover, Ptx-LNC have demonstrated a 3-fold increase in oral bioavailability of Ptx in comparison to Taxol[®] [7]. This enhancement of oral Ptx bioavailability can be explained either by an enhancement of the permeability of Ptx across the intestine, a decrease of intestinal metabolism or a diminution of the hepatic effect. In a recent work [15], the *in vitro* stability of LNCs was demonstrated in artificial gastrointestinal media.

However, the behavior of LNCs with the intestinal barrier and different cellular and molecular interactions with enterocytes remains to be clarified. Thus, two different pathways have been described for nanocarrier transcytosis across enterocytes: paracellular route or transcellular route [16]. In the case of the transcellular pathway, transport begins by an uptake that depends on the type of endocytosis involved: macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolae mediated endocytosis or caveolae- and clathrin-independent endocytoses [17]. In order to better address intestinal barrier integrity and better monitor experimental parameters, experiments were performed *in vitro*. A well-established model to study the intestinal permeability of drugs (Caco-2 cells) [18, 19] was chosen. Indeed, after differentiation, Caco-2 cells formed a monolayer of polarized cells which present tight junctions and active transporters (P-glycoprotein) [19–21]. The objective of the present study was to investigate the permeability of the intestinal barrier regarding Ptx-loaded LNCs and more particularly by focusing on the cellular and molecular mechanisms that LNCs used for Ptx transport across the intestine.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Ptx powder used for LNC formulation was supplied by Indema (Milan, Italy). Captex® 8000 (tricaprylin) was a gift from Abitec Corp. (Columbus, Ohio, USA) via Unipex (Rueil-Malmaison, France). Lipoid® S75-3 (soybean lecithin at 70% of phosphatidylcholine and 10% of phosphatidylethanolamine) and Solutol® HS15 (mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was purchased from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Injectable solution of Ptx at 6 mg/mL (Taxol®) was obtained from Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France). Verapamil, atenolol, propranolol and Nile Red (NR) powder were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified water was obtained from a MilliQ185 System (Millipore, Paris, France). Acetonitrile, acetone, methanol and tetrahydrofurane HPLC grade were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Fisher Bioblock (Illkirch, France), Culture reagents were obtained from Sigma (St.Louis, USA) and Lonza (Verviers, Belgium).

2.2 Formulation and characterization of LNCs

2.2.1 Formulation

LNCs were prepared according to a modified process originally based on the work of Heurtault *et al.* [11]. Briefly, 29.3 mg of Ptx or 10 mg of NR was dissolved in Captex® 8000 in the presence of ethanol or acetone, respectively. Solvent was evaporated at 80°C. Then, Lipoid® S75-3 was added and the mixture was heated at 85°C to solubilize Lipoid®. After cooling, Solutol® HS15, NaCl and water were added and homogenized under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 70 and 90°C were then performed and at 78°C during the last cycle, an irreversible shock was induced by dilution with cold water (11.2 mL at 2°C). Afterward, a slow magnetic stirring was applied to the suspension of LNC for 5 min at room temperature. Four sizes of LNCs were prepared [22].

2.2.2 Characterization

Size measurements: The size distribution of LNCs was determined by dynamic light scattering on a Zetasizer® Nano serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

Encapsulation of drug: For determination of Ptx encapsulation yield, LNCs were filtered using a Minisart® 0.2 µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany). Three samples of filtrate were prepared by dissolution of an exact quantity of LNC dispersion in a 96/4 (v/v) methanol/tetrahydrofurane solution. A filtration was performed using a Minisart® 0.2 µm filter. A 20 µL aliquot of each filtrate was injected onto the high performance liquid chromatography (HPLC) column. Chromatography was performed using a Waters 717 plus autosampler, Waters 600 controller and Waters 2487 Dual Absorbance Spectrometer (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a XTerra® C₁₈-ODB 150×4.60 mm column (Waters, Milford, Ireland). The UV detector was set at 227 nm. The mobile phase consisted of phase A (water) and phase B (acetonitrile). In initial conditions, the mobile-phase composition was 50% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 85% B after 7 min, maintained for 2 min and returned to initial conditions. The flow rate was 1 mL/min. Quantification was achieved by comparison between observed peak area ratios of Ptx of the samples and a calibration curve performed using the same conditions. Samples were performed in triplicate and the

mean±SD Ptx payload was calculated (mg of Ptx/g of LNC dispersion). The encapsulation yield (%) was determined by dividing the experimental drug payload by the theoretical drug payload.

2.3 Caco-2 cell culture: model of gastrointestinal barrier

The human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA) and used between passages 25 and 35. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, high glucose) supplemented with 15% (v/v) foetal bovine serum, 1% (v/v) non-essential amino acids, 1% (v/v) sodium pyruvate, and 1% antibiotic solution (1×10⁴UI/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 µg/mL amphotericin B) in a humidified incubator 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C. Cells were plated on 75 cm² flask at a density of 1×10⁶ cells/flask and were then harvested at 80% confluence with trypsin–EDTA and seeded onto polycarbonate membrane filters (0.4 µm pore size, 1.12 cm² growth area) inside Transwell® cell culture chambers (Corning Costar, Cambridge, MA) at a density of 0.1×10⁶ cells/insert. The culture medium (0.5 mL per insert and 1.5 mL per well) was replaced every two days for the first two weeks and everyday thereafter. After 21–23 days in culture, cell monolayers were used for the following assays.

Before experiments, cell monolayers were washed twice with Hank's buffered salt solution (HBSS) for 15 min at 37°C. The transepithelial electrical resistance (TEER) of monolayers was checked before and after each experiment by using a Millicell®-ER system (Millipore Corporation, Bedford, MA). Only cell monolayers with TEER values over 250 Ω.cm² were used. Then, atenolol and propranolol transports were evaluated for 2h at 37°C to control paracellular and transcellular transport [23]: 20×0.5.10⁶ cm.s⁻¹ and 1.0×0.2.10⁶ cm.s⁻¹ for apparent permeability coefficient of propranolol and atenolol were accepted.

2.4 Ptx transport across Caco-2 cells

The transports of different formulations of Ptx: free Ptx, Taxol®, free Ptx associated with verapamil, and Ptx-loaded LNCs were studied in the apical to basolateral direction on Caco-2 cells. The test solutions were diluted in HBSS at 5 µM Ptx concentrations. The experiment was started by adding 0.5 mL of test solution at the apical side and 1.5 mL of

HBSS at the basolateral side. Then inserts were incubated at 4°C or 37 °C. After 2 h of incubation, samples were taken from apical and basolateral sides and Ptx content was determined by LC-MS/MS.

Apparent permeability coefficient (P_{app}), expressed in centimeters per second, was calculated according to the following equation [18,21]: $P_{app} = dQ/dt \times 1/AC_0$, where dQ/dt is the rate of drug appearance on the basolateral side ($\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$), C_0 is the initial concentration over the apical side ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and A is the surface area of monolayer (cm^2).

Moreover, after collection of media, the bottom of the filter was absorbed onto paper in order to eliminate any basolateral medium, and cell monolayers were washed twice with ice-cold phosphate buffered saline (PBS, 10 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7.5). Then, cell monolayers were transferred into 0.3 mL of lysis buffer (1% Triton X-100, 5 mM EDTA in PBS), and immediately frozen at -20°C until analysis.

In order to identify the transcellular transport used by LNCs, transport experiments were performed in the presence of specific agents for different types of endocytosis. Cell monolayers were first incubated with the medium containing the specific agent, and subsequently transport experiment was performed in the presence of the agent and LNCs of 50 nm size. Control experiment was performed with HBSS for first incubation of cells.

Cholesterol depletion [14, 24]: cells were first incubated with 10 mmol/L methyl- β -cyclodextrin in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lovastatin for 1 h at 37°C . Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNCs suspension at a concentration of 5 μM Ptx in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lovastatin for 2 h at 37°C .

Inhibition of caveola or caveola like domains-mediated endocytosis [25, 26]: cells were first incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ filipin for 1 h at 37°C . Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNCs suspension at 5 μM Ptx concentrations in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of filipin for 2 h at 37°C .

Inhibition of clathrin-mediated endocytosis [25–27]: cells were first incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorpromazine for 1 h at 37°C . Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNCs suspension at 5 μM Ptx concentrations in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of chlorpromazine for 2 h at 37°C .

2.5 *Ptx analysis by LC-MS/MS*

Chromatography was performed using a Waters Alliance® 2695 system (Waters S. A.) with an Uptisphere® C₁₈-ODB 150×2.0 mm, 5 µm column (Interchrom, Montluçon, France). The mobile phase consisted of phase A (0.1% formic acid in water) and phase B (0.1% formic acid in methanol). In initial conditions, the mobile-phase composition was 30% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 98% B after 5 min, maintained for 0.5 min and then set to return to initial conditions. The flow rate was 0.3 mL/min. The total HPLC effluent was directed into a Quattro Micro® triple quadrupole mass spectrometer (Waters S. A.). Ionization was achieved using turbo ion spray in positive ion mode. The mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The (M-H)⁺ m/z transitions for each compound were 854.6→286.1. A typical retention time of Ptx was found to be 6.46 min. Quantification was achieved with QuantLynx® (Waters S.A.) by comparison of the observed peak area ratios of Ptx samples to a calibration curve obtained under the same conditions. The range of linear response was 0.015–7.2 µg/mL. The lower limit of detection was 0.015 µg/mL and the lower limit of quantification was 0.75 µg/mL.

2.6 *Uptake of LNC by Caco-2 cells monolayers*

After 21 days of differentiation, cells were incubated with HBSS (control), or solutions of free NR or NR-loaded LNCs diluted in HBSS (dilution at 1/1000) for 2 h at 37°C. Two methods of analysis were used to assess the intracellular fluorescence.

Flow cytometry analysis: after 2 h of incubation, cells were trypsinized for 2 min. Trypsinization was stopped by addition of cold culture medium. Cells were detached from the Transwell® inserts by pipetting. After centrifugation, cells were resuspended in trypan blue to quench extracellular fluorescence [28, 29]. Treated samples were washed three times with HBSS, transferred to FACS tubes (VWR) and fixed with azide-formaldehyde 0.2 mg/mL–2%. Cells were analyzed by FACS using BD FACSCalibur fluorescent-activated flow cytometry and BD CellQuest software (BD Bioscience, Le Pont-de-Claix, France). This experiment was performed in triplicate for all conditions and a total of 10,000 cells per sample were analyzed.

Confocal microscopy analysis: after 2 h of incubation at 37°C, cell monolayers were washed three times with HBSS for 5 min at 37°C. Then, cell monolayers were fixed with

4% paraformaldehyde solution rinsed with PBS and permeabilized using 0.025% saponin. After further rinsing with PBS, cell monolayers were blocked with PBS containing 4% bovine serum albumin and 10% goat serum. Cell monolayers were incubated overnight at 4 °C with a primary antibody (mouse monoclonal antibody against ZO-1; CliniScience, Montrouge, France), diluted at 100 µg/mL in PBS containing 4% bovine serum albumin. After several washes with PBS, monolayers were incubated for 40 min with FITC-labelled goat anti-mouse immunoglobulin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) diluted at 6 µg/mL in PBS. After several rinses, the polycarbonate membrane with cell monolayers was excised from the Transwell® insert using scalpel and mounted on a glass slide with a cover slip. Images were captured using an Olympus Fluoview FU 300 confocal laser scanning microscopy imaging system with a helium-argon laser (λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 572 nm) (Paris, France).

2.7 Basolateral medium analysis: TEM

Cell monolayers were incubated for 2 h with HBSS (control) or LNCs of 50 nm size at 37°C and the basolateral medium was collected. Then media were treated with uranyl acetate (contrasting agent which fixes preferentially the periphery of the particles) and investigated using a JEOL JEM-1230 transmission electron microscope (TEM).

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as mean values \pm SD. A Student's t-test was used for statistical comparison/analysis. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1 Development and characterization of LNCs

In order to improve oral delivery of Ptx, LNCs have been used as a drug delivery system [11]. Unlike the LNCs initially developed by Heurtault *et al.* [18], Ptx-loaded LNCs had to be prepared using another oily phase (Captex® in the place of Labrafac®) in order to solubilize paclitaxel. Indeed, although unloaded LNCs were synthesized without the use of any organic solvent, Ptx-loaded LNCs were initially formulated by using ethanol (class 3 solvent), dichloromethane (class 3 solvent) and cholesterol in the presence of Labrafac® [14,30] whilst in the presence of Captex®, only ethanol is necessary. Four sizes of LNCs were used to study the impact of the size of the particles on their transport behavior across intestinal barrier. This was done by varying the manufacturing process parameters (Table 1). The resulting physical characteristics of the LNCs are presented in Table 2. Mean diameter ranged between 26.3 ± 2.7 nm and 132.7 ± 5.5 nm for Ptx-LNCs. Zeta potentials were negative. Similar sizes and zeta potential were obtained for fluorescent LNCs loaded with NR and for Ptx-LNC. For all formulations the polydispersity index was < 0.2 which demonstrates the monodispersity of the preparations. Encapsulation efficiency of Ptx in various LNCs (Table 2) was higher than 90% and the drug payload was 1.87 ± 0.10 mg/g of formulation. The drug payload of Ptx was not significantly different for batches of various sizes ($p < 0.05$).

Constituents	Amount (g)			
	A (25nm)	B (55nm)	C (100nm)	D (130nm)
Lipoïd® 75-3	0.067	0.067	0.067	0.067
Captex® 8000	0.68	1.2	1.4	1.6
Solutol® HS15	1.6	1	0.5	0.5
NaCl	0.073	0.073	0.073	0.073
Purified water	1.72	1.8	2.1	1.9
Purified water at 2°C	11.2	11.2	11.2	11.2

Table I: Composition of 4 batches of lipid nanocapsules.

	Mean particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Drug payload (mg/g LNC)	Encapsulation efficiency (%)
25-LNC of Ptx	26.3 ± 2.7	0.136 ± 0.051	- 3.2 ± 1.6	1.87 ± 0.05	95 ± 3
50-LNC of Ptx	51.5 ± 2.5	0.051 ± 0.008	- 2.8 ± 1.9	1.84 ± 0.15	93 ± 6
100-LNC of Ptx	106.3 ± 6.0	0.118 ± 0.083	- 6.4 ± 3.2	1.87 ± 0.12	96 ± 5
130-LNC of Ptx	132.7 ± 5.5	0.108 ± 0.038	- 5.7 ± 1.8	1.89 ± 0.09	98 ± 4
25-LNC of NR	28.3 ± 1.5	0.099 ± 0.082	- 4.8 ± 0.6	/	/
50-LNC of NR	55.6 ± 2.2	0.034 ± 0.003	- 3.9 ± 0.5	/	/
100-LNC of NR	96.4 ± 9.8	0.058 ± 0.014	- 3.8 ± 0.9	/	/
130-LNC of NR	129.7 ± 3.4	0.076 ± 0.021	- 4.7 ± 0.7	/	/

Table II: Particle size, polydispersity, zeta potential and encapsulation drug payload of lipid nanocapsules containing Nile red (NR) or paclitaxel (PTX) (n=3; data are shown as mean ± S.D.).

3.2 Evaluation of Ptx transport across Caco-2 cells

In order to enhance oral bioavailability of paclitaxel, one strategy could be to improve permeability of Ptx across the intestinal barrier. One approach to enhancing the bioavailability of Ptx is to improve its permeability across the intestinal barrier. Peltier *et al.* [7] has shown that encapsulation of paclitaxel in LNCs increased oral bioavailability by a factor 3. Our present study focused on evaluation of Ptx-loaded LNCs transport using different dispersions of Ptx across the Caco-2 cell culture model [18, 19]. LNCs noticeably increased, by a factor 3.5, Ptx transport across Caco-2 cells at 37 °C in comparison with Taxol® dispersion (Fig. 1). Interestingly, this factor is close to the factor obtained with *in vivo* experiments [7]. We could hypothesise that the increase of bioavailability provided by LNCs was mostly due to their capacity to enhance permeability of Ptx across intestinal barrier. El Sayed *et al.* [31] have also performed transport of Paclitaxel in the presence of the smaller dendrimers (G2) but no increase of Ptx transport was observed.

Having demonstrated that LNCs were able to improve Ptx permeability across Caco-2 cell monolayers, we sought to determine the transport mechanism of LNCs in intestinal cell culture model. Three possible uptake mechanisms may be suggested for oral absorption of nanoparticles [16, 32]: (a) transport by a paracellular pathway via

tight junctions, (b) transcellular transport (passive or active) via the intestinal barrier, and (c) lymphatic uptake via M cells of Peyer's patches.

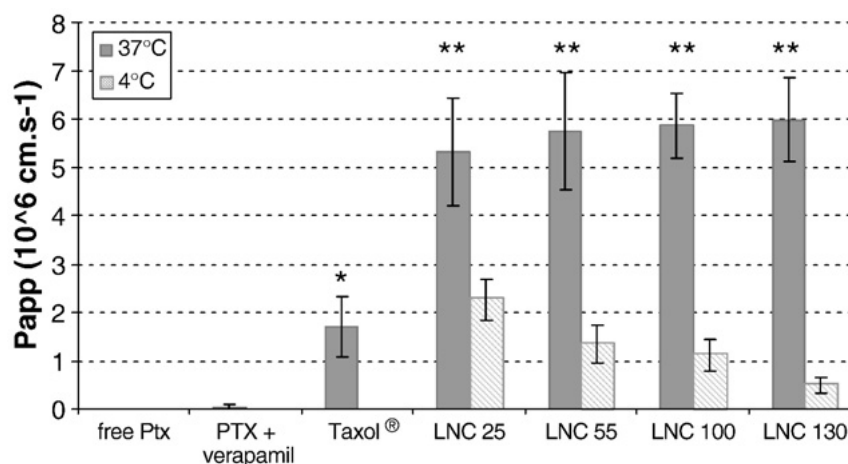


Figure 1: Apparent permeability coefficients of different suspensions of Ptx: free Ptx, Taxol®, Ptx associated with verapamil and 4 sizes of Ptx-loaded LNCs, diluted in buffered HBSS at 5 μ M Ptx to apical from basolateral side of Caco-2 cell monolayers for 2 h at 37°C and 4°C (n=3; data are showed as mean \pm SD, "*" p<0.05 in comparison to free PTX at 37°C ; "**" p<0.05 in comparison to same size at 4 °C. — Student's t-test).

3.3 Passive or active transport

As lowering temperature is a general metabolic inhibitor, mechanisms of active uptake in Caco-2 cells were inhibited by setting up internalization experiments at 4°C with different dispersions of paclitaxel. At this temperature, pinocytic/endocytic uptake of tracer molecules is usually hampered [33, 34]. Thus, 4°C experiments typically account for cytoadhesion of nanoparticles without internalization [35]. Alternatively, several reports demonstrated cell membrane penetration at 4°C that are more related to passive processes, such as modification of membrane fluidity, instead of resulting from active processes [36, 37]. At 4°C, when the size of particles increased, the apparent permeability coefficient of Ptx across Caco-2 cells decreased (Fig. 1). This result indicated that the passive LNC transport mechanism was size dependent: passive transport increased when the size of LNCs decreased. However, for similar size of LNCs, the P_{app} at 4°C was always found to be lower than at 37 °C. For all sizes this significant decrease of permeability suggested a predominant active endocytic mechanism for the transport of LNCs [38–40]. This result was in agreement with previous works that demonstrated that particles up to about 100–200 nm could be internalized by a receptor-mediated endocytosis, while larger particles have to be taken by phagocytosis [41, 42]. Moreover, some publications demonstrated an active uptake or transport of

nanocarrier across Caco-2 cells: nanocapsules and chitosan-coated lipid nanoparticles [43], chitosan-PLGA nanoparticles [44–46], PLGA nanospheres [47, 48], liposome [49].

3.4 Paracellular transport

The paracellular transport corresponds to the passage of molecules between epithelial cells. It is limited by the size of the intercellular space and the tightness of junctions present between the epithelial cells (pore diameter between 3Å and 10Å) [16]. Consequently, tight junctions must be opened up to transport LNCs. This option is possible if the LNCs or the components of LNCs, i.e. Solutol®HS15, were able to open tight junctions. The quality of tight junctions was controlled by measuring the TEER of Caco-2 monolayers. A decrease of TEER would have reflected an increase of the paracellular permeability [50]. In our experiments, no decrease was observed, and typical values between 250 and 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ were obtained at 37°C and $>400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ at 4°C. Furthermore, fluorescent staining of ZO-1 (a tight junction associated protein localized on the cytoplasmic surface) in Caco-2 cell monolayers was observed with or without LNCs (Fig. 2). After 2 h of incubation, a similar fluorescence observed in both conditions indicated that the tight junctions were not altered in the presence of LNCs. As a result, the integrity of Caco-2 cell monolayers was conserved. Therefore, LNCs did not show any ability to open tight junctions at 37°C and at 4°C. Contrary to dendrimers [31], SMEDDS with Labrasol® [51] and nanoparticles of chitosan [25, 42], LNCs could not open tight junctions and consequently paracellular transport was not possible. Lin et al. [52] have shown that negatively charged particles had no effect on the disruption of tight junction whereas positively charged particles with chitosan could open tight junctions.

So, the negative charge of LNCs (Table 2) could explain this absence of effect on the opening of intercellular tight junctions [53].

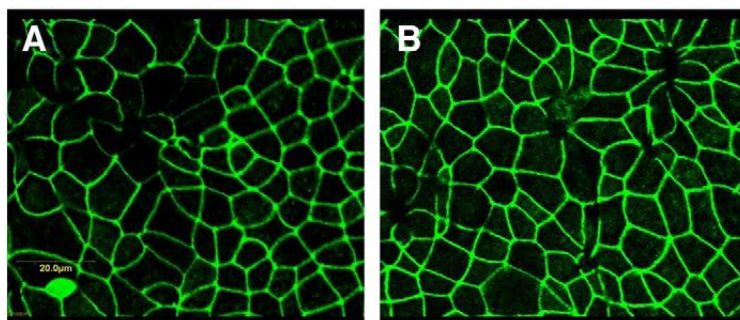


Figure 2: Fluorescent staining of ZO-1 in Caco-2 cells treated with HBSS (control) (A) and treated for 2 h with LNCs (B).

3.5 Transcellular transport

Transcellular transport of LNCs into Caco-2 cells was then assessed. After having demonstrated that LNCs did not route through the paracellular pathway, LNCs uptake by Caco-2 cells was monitored by confocal microscopy and flow cytometry. First, the fluorescent intensity of cells incubated with free NR and NR-loaded LNCs was compared by flow cytometry. The intensity of cells incubated with free NR or NR-loaded LNCs dispersion is displayed on Fig. 3A. The fluorescence intensity of cells incubated with free NR was not significantly different from the intensity of cells incubated with HBSS buffer (own cellular fluorescence) demonstrating that free NR could not be uptaken by Caco-2 cells. However, a significant increase of the intensity of cells incubated with NR-loaded LNCs was observed ($p < 0.05$). This result indicated that the intracellular fluorescence is due to LNC uptake by Caco-2 cells. After 2 h incubation of LNCs with Caco-2 cells at 37°C, cells were fixed and tight junctions were labeled in order to define outline of cells, and the cell monolayer was observed by confocal laser scanning microscopy. In Fig. 3B, the red fluorescence (corresponding to the NR-loaded LNCs) was delimited by the green fluorescence (corresponding to the tight junctions) indicating that the NR-loaded LNCs were localized inside the cells. As sections progressed toward the basolateral membrane, the green intensity decreased because tight junctions were located at the apical membrane of cells. Red fluorescence remained constant along sectioning while avoiding the central cell area corresponding to the nucleus. Thus, the transcellular pathway of LNCs was confirmed. On the other hand, Gaumet *et al.* [54] demonstrated that PLGA- and polystyrene nanoparticles were uptaken by Caco-2 cells and localized in cytoplasm and in nuclei.

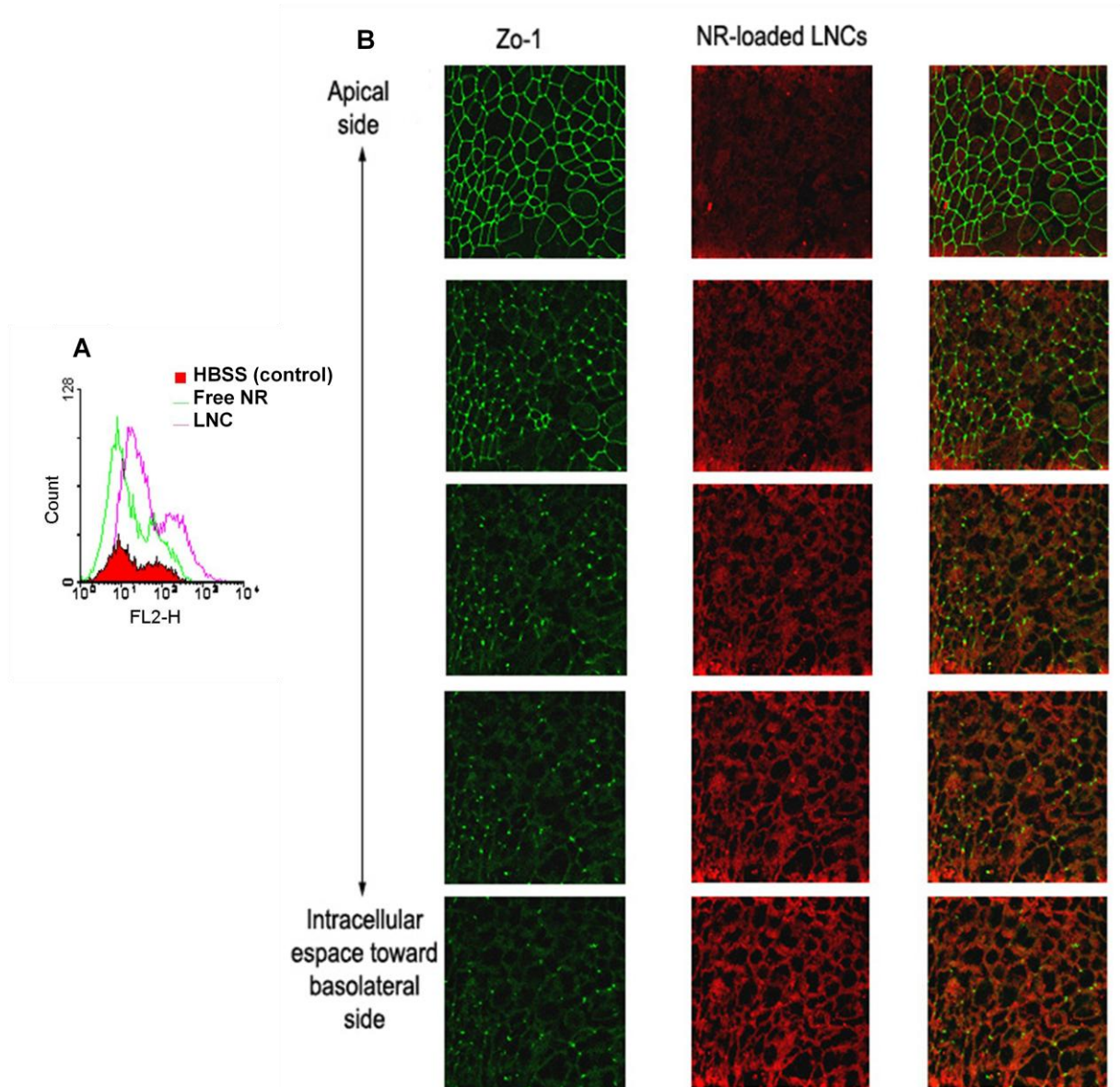


Figure 3: (A), Fluorescent labelling of Caco-2 cells after 2 h incubation at 37 °C with HBSS buffer (control), free Nile Red or NR-loaded LNCs; cell analysis made for granularity: numbers versus fluorescence intensity (counts v/s FL2). (B), Confocal laser scanning microscopy images of Caco-2 cells after 2 h of incubation with NR-loaded LNCs at 37 °C. Cells were delimited with antibody ZO-1. The left series of images was obtained at 488 nm wavelength (FITC-labelled ZO-1) and the middle series of images was obtained at 543 nm wavelength (NR). The right series of images is the overlaying image obtained at 488 nm and at 543 nm wavelength. The sample was optically sectioned in the x - y plane at regularly spaced distances along the z -axis. The top images represent sections closest to the apical membrane of cells, and the bottom images are the intracellular space toward basolateral side.

The effect of nanoparticle size on their uptake was also studied. The intracellular fluorescence of four sizes of NR-loaded LNCs was compared with the own cellular fluorescence (HBSS buffer) by flow cytometry. No significant difference was observed after 2 h of incubation at 37°C (Fig. 4). Some studies [55, 56] have established that nanoparticles had a better uptake by the intestinal tissue than microparticles. More

recently, Win and Feng [41] established that the uptake of 100–200 nm polystyrene nanoparticles was optimal whereas nanoparticles with a size of 50 nm showed a lowest uptake. In the present study, the sizes of LNCs were below 130 nm and this work has demonstrated that there was no significant effect of size on LNC uptake in a range between 25 nm and 130 nm.

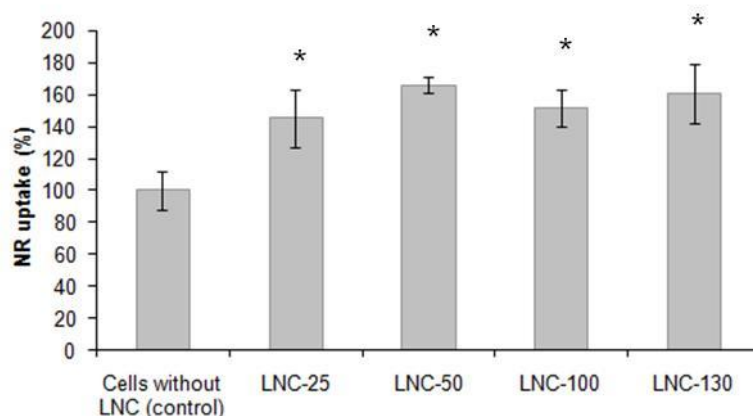


Figure 4: Variation of the mean cells associated fluorescence intensity of Caco-2 cells after 2 h of incubation with 4 sizes of NR-loaded LNCs. Percentage value indicates the fluorescence intensity of NR uptake (%), Caco-2 cells incubated without LNCs were considered as 100% of fluorescence intensity (n=4; data are showed as mean±SD, “*” are displayed for series significant different from control, p<0.05 — Student's t-test).

3.6 Characterization of LNC endocytosis

These results allowed us to conclude that LNCs were predominantly internalized by endocytosis, a carrier-mediated process. Different mechanisms of endocytosis have been described [16, 17]: macropinocytosis or adsorptive endocytosis (a nonspecific uptake), clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis and caveolae- and clathrin-independent endocytosis. The caveolae-dependent or caveolae- and clathrin-independent endocytose are sphingolipid and cholesterol-rich microdomains and are referred to as ‘lipid rafts’ [57]. In order to understand by which endocytosis mechanism LNCs were uptaken, transport experiments were performed in the presence of different inhibitors. Paclitaxel concentration was determined in cells and in apical and basolateral sides in order to calculate the apparent permeability coefficient. Firstly, implication of microdomains in the transport of Ptx-loaded LNCs was studied. Transport experiments were performed in the presence of methyl- β -cyclodextrin, which removes cholesterol from the plasma membrane, and lovastatin, which inhibits cholesterol biosynthesis [14, 24, 58, 59]. Under these particular conditions, a reduction of paclitaxel transport

without modification of intracellular quantities of paclitaxel was observed (Fig. 5). One explanation for this discrepancy, would be that while clathrin and caveolae are involved in nanocapsules transcytosis and thus paclitaxel transport across Caco-2 cells they may not be involved in efflux of this compound at the apical side when released from LNCs. Two species of Ptx may coexist in the intracellular space of enterocyte: encapsulated Ptx and free Ptx. This hypothesis suggests that a fraction of Ptx is released from LNCs in the intracellular space, a phenomenon that might be increased in the presence of caveolae and clathrin inhibitors. Then, caveolae-mediated endocytosis, which is the most widely “raft lipidic” mechanism observed in Caco-2 cells [60], was studied. Incubation of Caco-2 cells with LNCs in the presence of 1 µg/mL filipin was performed. Filipin disrupts the caveolae structure by binding to sterol such as cholesterol and disorganizing caveolin [61]. As shown in Fig. 5A, a significant decrease in the transport of Ptx-loaded LNCs was observed in the presence of filipin. However, as in the cholesterol inhibition experiment, no difference was observed in the quantities of Ptx internalized (Fig. 5B). Finally, experiments were performed in the presence of chlorpromazine at a concentration of 10 µg/mL in order to reduce the number of coated pit associated receptors at the cell surface by disrupting the assembly and disassembly of clathrin. A decrease in transport of paclitaxel-loaded LNCs was also observed but it was less important than with filipin (Fig. 5A). Moreover, intracellular concentration of paclitaxel was also reduced (Fig. 5B). So, contrary to caveolae and lipidic rafts which were involved in the transcytosis of paclitaxel, clathrin was implicated in both endocytosis and transcytosis mechanisms.

Thus, all specific transports were implicated in the transcellular transport of paclitaxel-loaded LNCs across the intestinal barrier. To date, few investigations about transcellular transport of nanovectors were described in the literature. Gao *et al.* [62] have demonstrated that wheat germ agglutinin-conjugated nanoparticles were also absorbed via both clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Moreover, Ma and Lim [25] demonstrated that the uptake of chitosan nanoparticles decreased in the presence of chlorpromazine. Consequently, these nanoparticles were also internalized by clathrin dependent endocytosis. Nevertheless, influence of caveolae-mediated endocytosis was not investigated. Similarly, Kitchens and colleagues [63–66] have demonstrated that dendrimers are internalized only by clathrin-dependent pathways.

This highlights the importance of the nano-cargo nature on its intracellular trafficking.

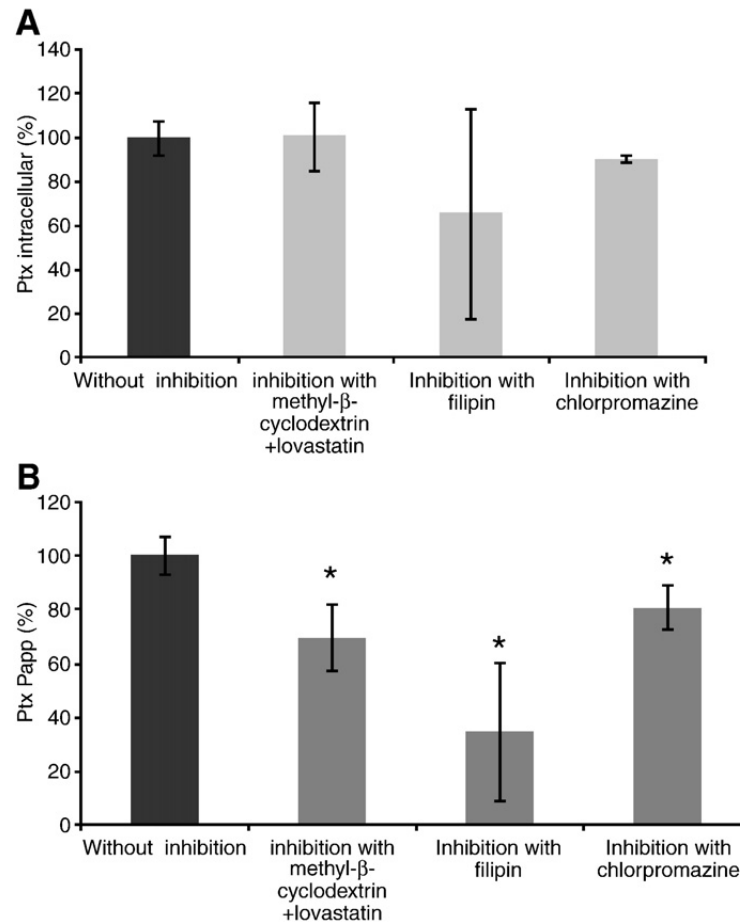


Figure 5: Variation of apparent permeability coefficients and intracellular uptake of paclitaxel after 2 h of incubation with Ptx-loaded LNCs and different endocytosis inhibitors. (A) Percentage value indicates the P_{app} of Ptx (%), P_{app} of Ptx-loaded-LNCs without inhibition was considered as 100% of P_{app} ; (B) Percentage value indicates the intracellular quantities of Ptx (%), Ptx-loaded-LNCs without inhibition were considered as 100% of Ptx intracellular ($n=4$; data are showed as mean \pm SD, “*” are displayed for series significant different from control, $p<0.05$ — Student's t-test).

3.7 Basolateral medium analysis: TEM

Sang Yoo and Gwan Park [44] have suggested a transport of PLGA nanoparticles inside cells by a transcytosis mechanism. At the apical side of Caco-2 cell monolayers, PLGA-nanoparticles entered by endocytosis and left cells by exocytosis at the basolateral side. It was also demonstrated that caveolae (one of the internalization processes used by LNCs) could be delivered their contents either to endosomes or to caveosomes [61]. After endosome uptake, vesicles could be fused with lysosome in which nanoparticles could be degraded by pH acidification or hydrolases. On the contrary, caveosomes are neutral vesicles that could lead to direct exocytosis on the basolateral side of the enterocyte. This last mechanism could be interesting because it would support the integrity of LNCs after cell transport.

Consequently, the basolateral medium was observed by TEM after 2 h of incubation with blank LNCs or HBSS (control). As illustrated in Fig. 6, in apical side, particles with size from 20 to 60 nm and some fragments were observed with LNCs. However, in control, only fragments could be visualized. On the basolateral side, particles with size from 100 to 120 nm were observed. These particles observed at the basolateral side were different in size from those observed at the apical side and it was difficult to show that these nano-objects were modified LNCs. Only fragments were observed on both the apical and basolateral sides for the control, so these nano-objects appeared only when LNCs were placed on the apical side. This result suggests a transcytosis transport of nanovectors. Nevertheless, it is currently not possible to affirm that paclitaxel is still encapsulated in LNCs after cell uptake. We can suggest some hypothesis. The observed nano-objects could be modified LNCs with Ptx, still encapsulated, or could be new objects synthesized in the enterocytes with excipients of LNCs. In this last hypothesis Ptx would be released in the enterocyte cytosol. Therefore, additional investigations must be done regarding the analysis of the nano-objects generated by Caco-2 cells after LNC uptake and more especially on the localization of Ptx with respect to these nano-objects.

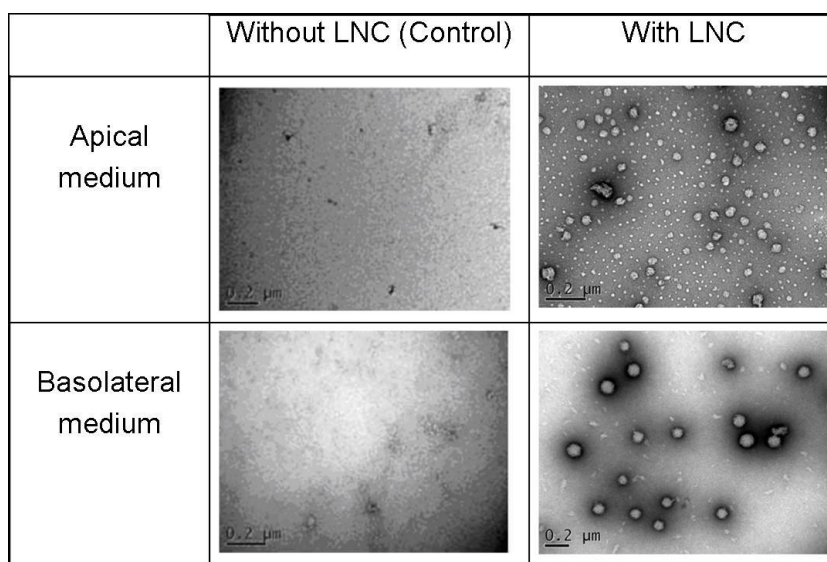


Figure 6: Transmission electronic microscopy images of apical and basolateral media of Caco-2 cells incubated with blank LNCs or HBSS for 2 h at 37 °C. Samples were stained with uranyl acetate.

4. Conclusion

We have demonstrated that LNCs improved Ptx transport across the intestinal barrier. In addition, LNCs were uptaken by Caco-2 cells mainly via active endocytic processes and more particularly via clathrin-dependent and caveolae-dependent transport mechanisms that likely allow transcytosis and thus improved gastrointestinal crossing of the drug.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. R. Filmon (Service commun d'Imagerie et d'Analyse Microscopiques, Angers, France) for assistance with confocal imaging and Dr. C. Gaillard (INRA, U.R. BIA, Microscopy laboratory RIO-BIBS, Nantes, France) for assistance with transmission electronic imaging. The authors are also grateful to Miriam Volpp for her help in cell studies. Emilie Roger is a fellow from Ethypharm supported by "Association National recherche technologie" (ANRT) (41, boulevard des Capucines, 75002 Paris, France). This work was supported by the "Cancéropôle Grand-Ouest" and by "La Ligue Nationale contre le Cancer" (Equipe labellisée 2007, Pr. J.P Benoit).

References

- [1] E.K. Rowinsky, M. Wright, B. Monsarrat, G.J. Lesser, R.C. Donehower, Taxol: pharmacology, metabolism and clinical implications, *Cancer Surv.* 17 (1993) 283–304.
- [2] A. Sparreboom, J. van Asperen, U. Mayer, A.H. Schinkel, J.W. Smit, D.K. Meijer, P. Borst, W.J. Nooijen, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (5) (1997) 2031–2035.
- [3] M.F. Francis, M. Cristea, F.M. Winnik, Polymeric micelles for oral drug delivery: why and how, *Pure Appl. Chem.* 76 (7–8) (2004) 1321–1335.
- [4] M.M. Malingre, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Oral delivery of taxanes, *Invest. New Drugs* 19 (2) (2001) 155–162.
- [5] J.M. Terwogt, B. Nuijen, W.W. Huinink, J.H. Beijnen, Alternative formulations of paclitaxel, *Cancer Treat. Rev.* 23 (2) (1997) 87–95.
- [6] J.S. Choi, B.W. Jo, Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of pegylated paclitaxel prodrug for oral delivery in rats, *Int. J. Pharm.* 280 (1–2) (2004) 221–227.
- [7] S. Peltier, J.M. Oger, F. Lagarce, W. Couet, J.P. Benoit, Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.* 23 (6) (2006) 1243–1250.
- [8] Z. Zhang, S.S. Feng, Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy, *Int. J. Pharm.* 324 (2) (2006) 191–198.
- [9] P. Gao, B.D. Rush, W.P. Pfund, T. Huang, J.M. Bauer, W. Morozowich, M.S. Kuo, M.J. Hageman, Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability, *J. Pharm. Sci.* 92 (12) (2003) 2386–2398.
- [10] L. Bromberg, Polymeric micelles in oral chemotherapy, *J. Control. Release* 128 (2) (2008) 99–112.
- [11] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.* 19 (6) (2002) 875–880.
- [12] N.T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.* 379 (2) (2009) 201–209.
- [13] J. Hureauux, F. Lagarce, F. Gagnadoux, L. Vecellio, A. Clavreul, E. Roger, M. Kempf, J.L. Racineux, P. Diot, J.P. Benoit, T. Urban, Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel *Eur. J. Pharm. Biopharm.* in press.
- [14] E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, J.P. Benoit, A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats, *Mol. Cancer Ther.* 5 (7) (2006) 1710–1722.
- [15] E. Roger, F. Lagarce, J.P. Benoit, The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules, *Int J Pharm.* 379 (2) (2009) 260–265.

- [16] A. des Rieux, E.G. Ragnarsson, E. Gullberg, V. Preat, Y.J. Schneider, P. Artursson, Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (4–5) (2005) 455–465.
- [17] S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (6927) (2003) 37–44.
- [18] P. Artursson, R.T. Borchardt, Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond, *Pharm. Res.* 14 (12) (1997) 1655–1658.
- [19] P.V. Balimane, S. Chong, Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique, *Drug Discov. Today* 10 (5) (2005) 335–343.
- [20] A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton, Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa, *Pharm. Res.* 7 (9) (1990) 902–910.
- [21] P. Artursson, J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (3) (1991) 880–885.
- [22] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (1) (2003) 55–61.
- [23] P. Larger, M. Altamura, R.M. Catalioto, S. Giuliani, C.A. Maggi, C. Valenti, A. Triolo, Simultaneous LC-MS/MS determination of reference pharmaceuticals as a method for the characterization of the Caco-2 cell monolayer absorption properties, *Anal. Chem.* 74 (20) (2002) 5273–5281.
- [24] S.K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, K. Sandvig, Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles, *Mol. Biol. Cell* 10 (4) (1999) 961–974.
- [25] Z. Ma, L.Y. Lim, Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 20 (11) (2003) 1812–1819.
- [26] P.A. Orlandi, P.H. Fishman, Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains, *J. Cell Biol.* 141 (4) (1998) 905–915.
- [27] L.H. Wang, K.G. Rothberg, R.G. Anderson, Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation, *J. Cell Biol.* 123 (5) (1993) 1107–1117.
- [28] J. Hed, G. Hallden, S.G. Johansson, P. Larsson, The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation, *J. Immunol. Methods* 101 (1) (1987) 119–125.
- [29] E.S. Van Amersfoort, J.A. Van Strijp, Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes, *Cytometry* 17 (4) (1994) 294–301.
- [30] F. Lacoëuille, F. Hindre, F. Moal, J. Roux, C. Passirani, O. Couturier, P. Cales, J.J. Le Jeune, A. Lamprecht, J.P. Benoit, In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel, *Int. J. Pharm.* 344 (1–2) (2007) 143–149.

- [31] M. El-Sayed, C.A. Rhodes, M. Ginski, H. Ghandehari, Transport mechanism(s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers, *Int. J. Pharm.* 265 (1–2) (2003) 151–157.
- [32] T. Jung, W. Kamm, A. Breitenbach, E. Kaiserling, J.X. Xiao, T. Kissel, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (1) (2000) 147–160.
- [33] H. Tomoda, Y. Kishimoto, Y.C. Lee, Temperature effect on endocytosis and exocytosis by rabbit alveolar macrophages, *J. Biol. Chem.* 264 (26) (1989) 15445–15450.
- [34] Y. Hu, T. Litwin, A.R. Nagaraja, B. Kwong, J. Katz, N. Watson, D.J. Irvine, Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH responsive core–shell nanoparticles, *Nano Lett.* 7 (10) (2007) 3056–3064.
- [35] H. Suh, B. Jeong, F. Liu, S.W. Kim, Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in vascular smooth muscle cells, *Pharm. Res.* 15 (9) (1998) 1495–1498.
- [36] J. Lovric, H.S. Bazzi, Y. Cuie, G.R. Fortin, F.M. Winnik, D. Maysinger, Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots, *J. Mol. Med.* 83 (5) (2005) 377–385.
- [37] A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, H.S. Han, N. Watson, S. Chen, D.J. Irvine, F. Stellacci, Surface–structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles, *Nat. Mater.* 7 (7) (2008) 588–595.
- [38] R. Jevprasesphant, J. Penny, D. Attwood, N.B. McKeown, A. D'Emanuele, Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity, *Pharm. Res.* 20 (10) (2003) 1543–1550.
- [39] A.M. Koch, F. Reynolds, H.P. Merkle, R. Weissleder, L. Josephson, Transport of surface-modified nanoparticles through cell monolayers, *Chem. Biochem.* 6 (2) (2005) 337–345.
- [40] L.Y. Zha, Z.R. Xu, M.Q. Wang, L.Y. Gu, Chromium nanoparticle exhibits higher absorption efficiency than chromium picolinate and chromium chloride in Caco-2 cell monolayers, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92 (2) (2008) 131–140.
- [41] K.Y. Win, S.S. Feng, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials* 26 (15) (2005) 2713–2722.
- [42] F. Chen, Z.R. Zhang, F. Yuan, X. Qin, M. Wang, Y. Huang, In vitro and in vivo study of trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery, *Int. J. Pharm.* 349 (1–2) (2008) 226–233.
- [43] C. Prego, M. Garcia, D. Torres, M.J. Alonso, Transmucosal macromolecular drug delivery, *J. Control. Release* 101 (1–3) (2005) 151–162.
- [44] H. Sang Yoo, T. Gwan Park, Biodegradable nanoparticles containing protein–fatty acid complexes for oral delivery of salmon calcitonin, *J. Pharm. Sci.* 93 (2) (2004) 488–495.
- [45] I. Behrens, A.I. Pena, M.J. Alonso, T. Kissel, Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport, *Pharm. Res.* 19 (8) (2002) 1185–1193.

- [46] F.L. Mi, Y.Y. Wu, Y.H. Lin, K. Sonaje, Y.C. Ho, C.T. Chen, J.H. Juang, H.W. Sung, Oral delivery of peptide drugs using nanoparticles self-assembled by poly(γ -glutamic acid) and a chitosan derivative functionalized by trimethylation, *Bioconjug. Chem.* 19 (6) (2008) 1248–1255.
- [47] N. Lochner, F. Pittner, M. Wirth, F. Gabor, Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence, *Pharm. Res.* 20 (5) (2003) 833–839.
- [48] A. Weissenboeck, E. Bogner, M. Wirth, F. Gabor, Binding and uptake of wheat germ agglutinin-grafted PLGA-nanospheres by Caco-2 monolayers, *Pharm. Res.* 21 (10) (2004) 1917–1923.
- [49] S.B. Kapitza, B.R. Michel, P. van Hoogevest, M.L. Leigh, G. Imanidis, Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66 (1) (2007) 146–158.
- [50] S. Yamashita, T. Furubayashi, M. Kataoka, T. Sakane, H. Sezaki, H. Tokuda, Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (3) (2000) 195–204.
- [51] X. Sha, G. Yan, Y. Wu, J. Li, X. Fang, Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (5) (2005) 477–486.
- [52] Y.H. Lin, F.L. Mi, C.T. Chen, W.C. Chang, S.F. Peng, H.F. Liang, H.W. Sung, Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery, *Biomacromolecules* 8 (1) (2007) 146–152.
- [53] C. Damge, C.P. Reis, P. Maincent, Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (1) (2008) 45–68.
- [54] M. Gaumet, R. Gurny, F. Delie, Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36 (4–5) (2009) 465–473.
- [55] M.P. Desai, V. Labhasetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharm. Res.* 13 (12) (1996) 1838–1845.
- [56] S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z. Ramtoola, D. Brayden, Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia, *Eur. J. Pharm. Sci.* 6 (2) (1998) 153–163.
- [57] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (6633) (1997) 569–572.
- [58] A.M. Marzesco, M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, P. Janich, K. Langenfeld, C. Thiele, W.B. Huttner, D. Corbeil, Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol, *FEBS Lett.* 583 (5) (2009) 897–902.
- [59] G.H. Hansen, L.L. Niels-Christiansen, E. Thorsen, L. Immerdal, E.M. Danielsen, Cholesterol depletion of enterocytes. Effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking, *J. Biol. Chem.* 275 (7) (2000) 5136–5142.

- [60] F.J. Field, E. Born, S. Murthy, S.N. Mathur, Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J. Lipid Res.* 39 (10) (1998) 1938–1950.
- [61] J.E. Schnitzer, P. Oh, E. Pinney, J. Allard, Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules, *J. Cell Biol.* 127 (5) (1994) 1217–1232.
- [62] X. Gao, T. Wang, B. Wu, J. Chen, J. Chen, Y. Yue, N. Dai, H. Chen, X. Jiang, Quantum dots for tracking cellular transport of lectin-functionalized nanoparticles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (1) (2008) 35–40.
- [63] K.M. Kitchens, M.E. El-Sayed, H. Ghandehari, Transepithelial and endothelial transport of poly (amidoamine) dendrimers, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57 (15) (2005) 2163–2176.
- [64] K.M. Kitchens, A.B. Foraker, R.B. Kolhatkar, P.W. Swaan, H. Ghandehari, Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells, *Pharm. Res.* 24 (11) (2007) 2138–2145.
- [65] K.M. Kitchens, R.B. Kolhatkar, P.W. Swaan, H. Ghandehari, Endocytosis inhibitors prevent poly(amidoamine) dendrimer internalization and permeability across Caco-2 cells, *Mol. Pharm.* 5 (2) (2008) 364–369.
- [66] M. Najlah, A. D'Emanuele, Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (5) (2006) 522–527.

Chapitre 3 :

Effet de la P-gp sur le transport des nanocapsules lipidiques

Effet de la P-gp sur le transport des nanocapsules lipidiques

RATIONNEL

Précédemment, l'intérêt des LNCs pour une utilisation par voie orale a été démontrée in vitro et leurs mécanismes de passage à travers l'entérocyte ont été précisés. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés plus particulièrement, à l'effet de la P-gp sur le transport des LNCs. En effet, la P-gp est une protéine d'efflux fortement exprimée au niveau apical des entérocytes le long du tractus intestinal. Cette protéine est capable d'expulser de nombreuses molécules après absorption par les entérocytes vers le tractus intestinal. Elle permet ainsi de réduire la concentration intracellulaire du principe actif. Le paclitaxel présente ainsi une forte affinité pour la pompe d'efflux P-gp. Parallèlement à notre travail de thèse, des travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis de démontrer la capacité des LNCs à inhiber la P-gp grâce à la présence du Solutol®HS15 présent au niveau de la coque des nanoparticules. De plus, au cours de la validation du modèle cellulaire Caco-2, un défaut d'expression de la P-gp dans notre premier modèle cellulaire a été suspecté. La P-gp est normalement surexprimée dans les cellules Caco-2.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'effet de la P-gp sur le transport et l'internalisation des LNCs. Dans un premier temps, la présence de la P-gp a été étudiée dans deux modèles cellulaires Caco-2. Ensuite, différentes études de transport et d'internalisation ont été effectuées en présence d'inhibiteurs de la P-gp. Enfin, l'effet inhibiteur des LNCs sur la P-gp a été testé sur le transport des LNCs de paclitaxel.

RESULTATS

Un effet négatif de la P-gp sur le transport des LNCs à travers le modèle cellulaire Caco-2 a été démontré. Cet effet a comme conséquence la diminution de la transcytose du paclitaxel encapsulé dans les LNCs. De plus, la capacité des LNCs à réduire l'activité de la P-gp a été confirmée. Une concurrence réciproque entre l'activité de la P-gp et le transport des LNCs a donc été mise en évidence. La P-gp reste un obstacle significatif pour une administration orale efficace d'anticancéreux encapsulés dans les LNCs. Cette étude montre également que les LNCs peuvent être utilisées pour atténuer l'activité de la P-gp.

Ce travail est soumis à *Biomaterials*.

Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells.

Emilie Roger^{a,b}, Frédéric Lagarce^{b,c}, Emmanuel Garcion^{b,*}, Jean-Pierre Benoit^{b,c}

^aEthypharm, 92213-Saint-Cloud Cedex, France.

^bINSERM U646, Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, 49100-Angers, France.

^cCentre Hospitalier Universitaire Angers, Pôle Pharmaceutique, 49033-Angers, cedex 9, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 241 735885; fax: +33 241 735853;

E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Abstract: Lipid nanocapsules (LNCs) have been shown to improve paclitaxel (Ptx) bioavailability and transport across a intestinal barrier model. In the present study, the interaction between P glycoprotein (P-gp) and LNCs transport across Caco-2 cells are investigated. Transport experiments have been performed on Caco-2 cells displaying different P-gp activity (early and later cell passages). The permeability of Ptx encapsulated in LNCs has been studied in the presence of P-gp inhibitors (verapamil and vinblastin) or unloaded LNCs. The uptake of dye labeled LNCs was also observed in the presence of the same inhibitors. It was found that the permeability of Ptx varied depending on the passages with later ones showing higher absolute values (5.74 ± 1.21 vs $133.41 \pm 5.74 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). P-gp inhibition by using either verapamil or vinblastin improved Ptx transport up to 98%. LNCs have also demonstrated their capacity to increase their own transport. Experiments performed with dye-labelled LNCs demonstrated an enhancement of the uptake of dye (nile red), only in the presence of verapamil. These results demonstrate an effect of P-gp on the transport of Ptx when loaded in LNCs and support a direct effect of P-gp on their endocytosis in Caco-2 cells. These finding may assist in the development of new nanomedicine for oral administration.

Keywords: Nanoparticles, P-gp, Paclitaxel, Oral absorption, Caco-2 cells.

1. Introduction

Oral chemotherapy is an attractive option to improve the patient's quality of life. However, many anticancer drugs present a low oral bioavailability due to their poor solubility in aqueous solution. In addition they can be unstable along the gastrointestinal tract or exhibit poor permeability across the intestinal epithelium. Moreover, many anticancer agents are eliminated by first pass metabolization due to cytochrome P450 enzyme and effluxed by the P-glycoprotein (P-gp) pump which is extensively present along the intestinal tract [1, 2]. Paclitaxel (Ptx), a major antitumor agent widely used in the treatment of breast cancer, non-small cell lung cancer and ovarian carcinoma [3], is an example of this phenomena. It exhibits a low bioavailability (< 6%) after oral administration. Sparreboom *et al.* [4] have demonstrated that the P-gp efflux was the main reason for this reduced bioavailability. Consequently, many strategies were developed to inhibit P-gp in order to improve paclitaxel oral bioavailability [5]. Paclitaxel has been co-administered with specific P-gp inhibitors such as cyclosporine A [6-9]. Another strategy was to suppress P-gp activity with lipid or polymer excipients that block P-gp efflux [10-12]. However, alteration of P-gp activity may also impact several physiological properties [2]. Recently, different nanoscale drug delivery systems such as micelles [13], SMEDDS [14], S-SEDDS [15], nanoparticles [16, 17] or lipid nanocapsules [18] have been developed with a certain success to enhance oral bioavailability by encapsulation of paclitaxel. The P-gp inhibitory properties of the nanovector constituents have often been raised to explain the enhancement of bioavailability obtained with these drug delivery systems. P-gp is a member of ATP-Binding cassette (ABC) family of transporters containing 6 transmembrane domains. Different potential mechanisms of P-gp inhibition include: (a) an alteration in membrane lipid composition or fluidity [19], (b) an inhibition on the P-gp-associated ATPase which may induce a direct effect on drug binding or (c) a depletion of cellular ATP accumulation [10, 12, 19].

In 2002, Heurtault *et al.* [20] reported on a new generation of lipid nanocapsules (LNCs) that contained Solutol[®]HS15 [21] and were subsequently shown to be stable in gastrointestinal fluid models [22]. Solutol[®]HS15 is composed of a mixture of free polyethyleneglycol pegylated and hydroxystearate known to inhibit the P-gp activity [23, 24]. It was recently established that LNC could interact on their own with P-gp and

reverse the multidrug resistance phenomenon in cancer cells [25]. The aim of the present work was to investigate possible interactions between the P-gp activity and the LNCs transport across the intestinal barrier. With this in mind, transport and uptake experiment of LNCs were performed using Caco-2 cell monolayers, a well-established *in vitro* model for drug transport study [26, 27].

2. Materials and methods

2.1 Materials

Ptx powder used for LNC formulation was supplied by Indema (Milan, Italy). Captex[®] 8000 (tricaprylin) was a gift from Abitec Corporation (Columbus, Ohio, USA) via Unipex (Rueil-Malmaison, France). Lipoid[®] S75-3 (soybean lecithin at 70% of phosphatidylcholine and 10% of phosphatidylethanolamine) and Solutol[®] HS15 (mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was purchased from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Injectable solution of Ptx at 6 mg/mL (Taxol[®]) was obtained from Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France) and injectable solution of vinblastin at 1mg/mL (Velbe[®]) was obtained from EG labo (Boulogne-Billancourt, France). Verapamil, atenolol, propranolol and Nile red (NR) powder were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified water was obtained from a MilliQ185 System (Millipore, Paris, France). Acetonitrile, acetone, methanol and tetrahydrofuran HPLC grade were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Fisher Bioblock (Illkirch, France), Culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Lonza (Verviers, Belgium).

2.2 Formulation and characterization of LNCs

2.2.1 Formulation

LNCs were prepared according to the process described by Heurtault *et al.* [20] with several modifications. Briefly, 29.3mg of Ptx or 10mg of Nile red were dissolved in 1.2g Captex[®]8000 in the presence of ethanol or acetone, respectively. Solvent was evaporated at 80°C. Then, 67.3mg Lipoid[®] S75-3 was added and the mixture was heated at 85°C to solubilize Lipoid[®]. After cooling, 1g Solutol[®] HS15, 73.3mg NaCl and 1.8g

water were added and homogenized under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling between 70 and 90°C were then performed and at 78°C during the last cycle, an irreversible shock was induced by dilution with 11.2mL cold water. Afterward, a slow magnetic stirring was applied to the suspension of LNC for 5min at room temperature.

2.2.2 Characterization

Size measurements: The size distribution of LNCs was determined by dynamic light scattering on a Zetasizer®Nanoserie DLS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

Encapsulation of drug: For determination of Ptx encapsulation yield, LNCs were filtered using a Minisart® 0.2µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany). Three samples of filtrate were prepared by dissolution of an exact quantity of LNC dispersion in a 96/4 (v/v) methanol/tetrahydrofurane solution. A filtration was performed using a Minisart® 0.2µm filter. A 20µL aliquot of each filtrate was injected onto the high performance liquid chromatography (HPLC) column. Chromatography was performed using a Waters 717 plus autosampler, Waters 600 controller and Waters 2487 Dual Absorbance Spectrometer (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a XTerra® C₁₈-ODB 150×4.60mm column (Waters, Milford, Ireland). The UV detector was set at 227nm. The mobile phase consisted of phase A (water) and phase B (acetonitrile). In initial conditions, the mobile-phase composition was 50% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 85% B after 7min, maintained 2min and returned to initial conditions. The flow rate was 1mL/min. Quantification was achieved by comparison between observed peak area ratios of Ptx of the samples and a calibration curve performed using the same conditions. The mean drug payload (mg of Ptx/g of LNC dispersion) of each batch of LNC dispersion and the standard deviation were calculated from three samples. The encapsulation yield (%) was determined by dividing the experimental drug payload by the theoretical one.

2.3 *Caco-2 cell culture*

The human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) was obtained from the American Type Culture Collection (*Manassas, USA*) and used between passages 25-35 (or at passage 70 for select experiments stated herein). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, high glucose) supplemented with 15% (v/v) foetal bovine serum, 1% (v/v) non-essential amino acids, 1% (v/v) sodium pyruvate, and 1% antibiotic solution (1×10^4 UI/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 μ g/mL amphotericin B) in a humidified incubator 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C. Cells were placed on 75 cm² flask at a density of 1×10^6 cells/flask and were then harvested at 80% confluence with trypsin-EDTA and seeded onto polycarbonate membrane filters (0.4 μ m pore size, 1.12 cm² growth area) inside Transwell[®] cell culture chambers (Corning Costar, Cambridge, MA) at a density of 0.1×10^6 cells/insert. The culture medium (0.5 mL per insert and 1.5 mL per well) was replaced every two days for the first two weeks and every day thereafter. After 21-23 days in culture, cell monolayers were used for further experimentations.

Before experiments, cell monolayers were washed twice with Hanks' buffered salt solution (HBSS) for 15 min at 37°C. The transepithelial electrical resistance (TEER) of monolayers was checked before and after each experiment by using a Millicell[®]-ER system (Millipore Corporation, Bedford, MA). Only cell monolayers with TEER values over 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ were used. Then, atenolol and propranolol transport were evaluated for 2 h at 37°C to control paracellular and transcellular transport [28]: $20 \pm 0.5 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and $1.0 \pm 0.2 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ as apparent permeability coefficient values of propranolol and atenolol were accepted.

2.4 *Expression of P-gp in Caco-2 cells*

2.4.1 *Western blot analysis*

After 21 days of differentiation, cells were rinsed twice with HBSS for 5 min at 37°C and the TEER of monolayers was measured. The polycarbonate membrane with the cell monolayer was excised from the Transwell[®] insert using scalpel and deposited on Petri dish containing 1 mL of cell wash buffer (1.75% NaCl, 0.03% CaCl₂, 0.04% MgCl₂ in Tris HCl 50 mM). Cells were then scrapped and resuspended in cell lysis buffer (1% PMSF 100 mM, 0.5% NP40 and 10% of a protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, USA) in

cell wash buffer before centrifugation at 1000g. Supernatant recognized as the detergent “soluble” fraction” was separated from pellet. Pellet recognized as the detergent “non soluble” fraction was resuspended in Tris-EDTA-SDS 1%, for final solubilization of proteins. Protein concentrations of each fraction were determined with the DC protein assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Cell lysates, each containing 20µg of proteins, were boiled for 4min with a half volume of Laemmli buffer (125mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.0004% bromphenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) and electroblotted on a 7.5% sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins were transferred onto Bio-Rad nitrocellulose membranes and membranes were blocked with PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA). A primary antibody (mouse monoclonal antibody against C219, CliniScience, Montrouge, France), diluted at 1.5µg/ml in TBS with 0.1% Tween®80 and 2% BSA was applied to the membrane and incubated overnight at 4°C. After several washes with TBS with 0.1% Tween®80, membranes were incubated for 1h30 with peroxidase-conjugated goat anti-mouse (Biosciences Division Pierce, Rockford, IL) diluted at 1µg/mL in TBS with 0.1% Tween® and 2% BSA. Then membranes were treated, using ECL Western blotting reagents according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Orsay, France) and revealed with a Chemi-Smart 3000 (Vilbert Lourmat, Marne-La-Vallée, France).

Actin was used as loading control and detected with the monoclonal anti-actin Ab-5 antibody (BD Bioscience, Le Pont-de-Claix, France) diluted at 0.05µg/ml.

2.4.2 *Confocal laser scanning microscopy analysis*

After 21 days of differentiation, cell monolayers were washed three times with HBSS for 5min at 37°C. Then, cell monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde solution rinsed with PBS and permeabilized using 0.025% saponin. After further rinsing with PBS, cell monolayers were blocked with PBS containing 4% bovine serum albumin and 10% goat serum. Cell monolayers were incubated overnight at 4°C with a primary antibody (mouse monoclonal antibody against C219; CliniScience, Montrouge, France), diluted at 100µg/mL in PBS containing 4% bovine serum albumin. After three washes with PBS, monolayers were incubated for 40min with FITC-labelled goat anti-mouse immunoglobulin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) diluted at 6µg/mL in PBS. After three rinses, the polycarbonate membrane with cell monolayers was excised from the Transwell® insert using scalpel and mounted on a glass slide with a cover slip. Images

were captured using an Olympus Fluoview FU 300 confocal laser scanning microscope imaging system with a helium-argon laser (λ_{ex} : 543nm, λ_{em} : 572nm; Paris, France).

2.5 Ptx transport across Caco-2 cells

The transport of different dispersions of Ptx: free Ptx, Taxol[®], free Ptx associated with verapamil, Ptx-loaded LNC was studied from the apical to basolateral direction on Caco-2 cells. The test solutions were diluted in HBSS at 5 μ M Ptx concentrations. The experiment was started by adding 0.5mL of test solution at the apical side and 1.5mL of HBSS at the basolateral side. Then inserts were incubated at 4°C or 37°C. After 2h of incubation, samples were taken from apical and basolateral sides and Ptx content was determined by LC-MS/MS. Apparent permeability coefficient (P_{app}), expressed in centimeters per second, was calculated according to the following equation [26, 29]: $P_{\text{app}} = dQ/dt \times 1/AC_0$, where dQ/dt is the rate of drug appearance on the basolateral side ($\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$), C_0 is the initial concentration over the apical side ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and A is the surface area of monolayer (cm^2). After collection of media, the bottom of the filters was absorbed onto paper in order to eliminate any basolateral medium, and cell monolayers were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7.5). Then, cell monolayers were transferred into 0.3mL of lysis buffer (1% Triton X-100, 5mM EDTA in PBS), and immediately frozen at -20°C until analysis.

In order to determine if P-gp interacted with Ptx-loaded LNCs, different transport experiments were performed.

Inhibition of Pgp: cells were first incubated with 4 different concentrations of verapamil or vinblastin (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M and 100 μ M) for 1h at 37°C. Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNC suspension at the concentration of 5 μ M Ptx in the presence of different inhibitor solutions for 2h at 37°C.

Different expression of P-gp: transport experiment was performed with two different Caco-2 cells passages (p25-35 and p70-75) which differ in P-gp expression [30, 31].

LNC effect: cells were first incubated with a solution of blank LNC (250 μ L of blank LNC diluted in 10mL of HBSS) for 1h at 37°C. Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNC suspension at 5 μ M Ptx concentrations in the presence of the same solution of blank LNC for 2h at 37°C.

Solutol[®] effect: a solution containing the same amount of Solutol[®] in the LNC formulation was prepared (other excipients were replaced by water). Cells were first incubated with this solution diluted (250µL diluted in 10mL of HBSS) for 1h at 37°C. Then, transport experiment was performed with Ptx-loaded LNC suspension at 5µM Ptx concentrations in the presence of the same solution of Solutol[®] for 2h at 37°C.

2.6 Ptx analysis by LC/MS

Chromatography was performed using a Waters Alliance[®] 2695 system (Waters S. A.) with an Uptisphere[®] C18-ODB 150×2.0mm, 5µm column (Interchrom, Montluçon, France). The mobile phase consisted of phase A (0.1% formic acid in water) and phase B (0.1% formic acid in methanol). In initial conditions, the mobile-phase composition was 30% B; a linear gradient was applied to reach a composition of 98% B after 5min, maintained 0.5min and then set to return to initial conditions. The flow rate was 0.3mL/min and the column temperature was set at 40°C. The total HPLC effluent was directed into a Quattro Micro[®] triple quadruple mass spectrometer (Waters S. A.). Ionization was achieved using turbo ion spray in positive ion mode. The mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The (M-H)⁺ m/z transitions for each compound were 854.6→286.1. A typical retention time of Ptx was found to be 6.46min. Quantification was achieved with QuantLynx[®] (Waters S.A.) by comparison of the observed peak area ratios of Ptx samples to a calibration curve obtained under the same conditions. The range of linear response was 0.015–7.2µg/mL. The lower limit of detection was 0.015µg/mL and the lower limit of quantification was 0.75µg/mL.

2.7 Uptake of dye-loaded LNC by Caco-2 cell monolayers

After 21 days of differentiation, cells were incubated with HBSS (control), or solutions of free Nile red or Nile red-loaded LNCs diluted in HBSS (dilution at 1/1000) for 2h at 37°C. After incubation, cells were trypsinized for 2min. Trypsinization was stopped by addition of cold culture medium. Cells were detached from the Transwell[®] inserts by pipetting. After centrifugation, cells were resuspended in trypan blue to quench extracellular fluorescence [32]. Treated samples were washed three times with HBSS, transferred to FACS tubes (VWR) and fixed with azide-formaldehyde 0.2mg/mL-

2%. Cells were analyzed by FACS using BD FACSCalibur fluorescent-activated flow cytometry and BD CellQuest software (BD Bioscience, Le Pont-de-Claix, France). This experiment was performed in triplicate for all conditions and a total of 10.000 cells per sample were analyzed.

As transport experiments, uptake experiments were also performed with different conditions.

Inhibition of P-gp: cells were first incubated with 2 different concentrations of verapamil or vinblastin (10 μ M and 100 μ M) for 1h at 37°C. Then, uptake experiment was performed with NR-loaded LNC solution in the presence of verapamil or vinblastin solutions for 2h at 37°C.

Different expressions of P-gp: uptake experiment was performed with two different Caco-2 cells passages which were different by expression of P-gp [30, 31].

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as mean values \pm S.D. A student t-test was used for statistical comparison. $P>0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

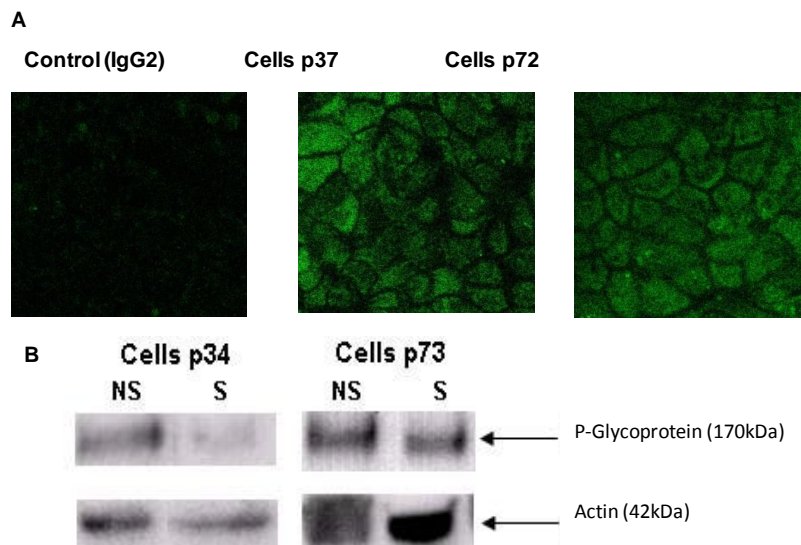
3.1 LNC formulation and characterization

Although LNC can be adjusted to different sizes with a narrow distribution, we focused our work on 50nm size LNC that have already demonstrated their capacity to improve Ptx oral bioavailability [18]. Thus, no significant differences ($p>0.05$) were observed in the LNC size when carrying Ptx or NR, with a mean size for Ptx-loaded LNCs and for NR-loaded LNCs being of 51.5 \pm 2.5nm and of 55.6 \pm 2.2nm, respectively. For each formulation, the polydispersity index was inferior to 0.2 demonstrating the monodispersity of the formulation. The drug loading of Ptx in LNC was 1.84 \pm 0.15mg/g of formulation with an encapsulation yield of 93 \pm 6%.

3.2 Expression of P-gp in Caco-2 cells

As paclitaxel presents a high affinity for binding to P-gp [4], the expression of this protein was evaluated in our system. Whilst the Caco-2 cell model is well established [26] it also presents some versatility with significant differences between laboratories

[31]. Thus, depending on the cell culture conditions [30], passage number [33], or time of culture [34], a strong variability in P-gp expression may be observed. P-gp is a 170kDa protein localized in the brush border membranes of the small intestine. As illustrated in Figure 1A, immunofluorescence using the C219 antibody combined with confocal laser scanning microscopy proved that P-gp was localized in the apical membrane of the Caco-2 cells after 21 days of differentiation, either at early passages (p37) or at later passages (p72). In addition, Western blot analysis using the same C219 antibody evidenced a band with an apparent molecular weight of 170kDa also at each passage (p34 and p73) (Figure 1B). Interestingly, although the presence of P-gp was confirmed in our model at early and later passages, the association of P-gp with non-soluble subcellular fractions (*e.g.* detergent insoluble membrane signaling platforms or proteins from the cytoskeleton) appears to evolve during time. This observation, therefore, indicates a relocation of the protein within the Caco-2 cells between early and later passages (Figure 1B).



Figures 1: (A) Fluorescent staining of C219 in Caco-2 cells after 21 days of differentiation; (B) Western blot on Caco-2 cells at passage p34 and p73. P-gp was labeled with the C219 antibody. Actin was used as loading control. (NS was the non soluble fraction of protein and S was the soluble fraction of protein).

3.3 *Ptx-loaded LNC transport across Caco-2 cells*

In a previous study, we have demonstrated that LNCs increase Ptx transport across intestinal Caco-2 epithelial cells using vesicle-mediated transcytosis [35]. Figure 2 emphasized this result by demonstrating at early and later cell passages an improved

Ptx transport when loaded in LNC as compared to free Ptx. Interestingly, the calculated Ptx permeability was significantly reduced at passage 34 as compared to passage 71 for all Ptx suspensions (Figure 2A). Three possibilities could explain this discrepancy: (a) improvement of paracellular crossing, (b) improvement of LNC and Ptx transcytosis, (c) reduction of Ptx efflux. Transepithelial resistance and atenolol passage that assess for barrier integrity as well as paracellular crossing were found to be similar at passage 34 and passage 71, thus refuting the first hypothesis. Fitting with the second and third hypotheses, it was already demonstrated that while P-gp is expressed at early and later passages, the enzyme is up-regulated and display a reduced activity through passages [30]. Our observation of a redistribution of the P-gp in distinct cell protein fractions among passages in our model matches these data from literature (paragraph 2.2). Consequently, the enhancement of Ptx transport at cell passage p70 could be explained by P-gp diminished activity. As a result, a link between P-gp and transport of Ptx-LNCs was suggested.

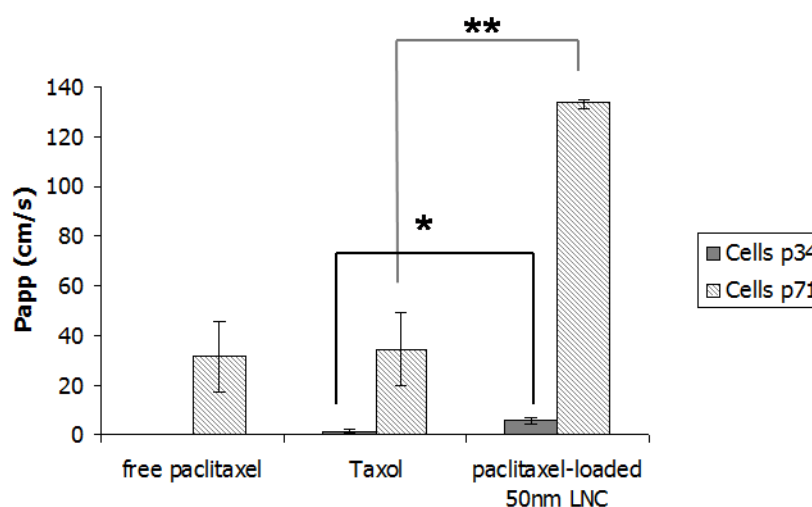
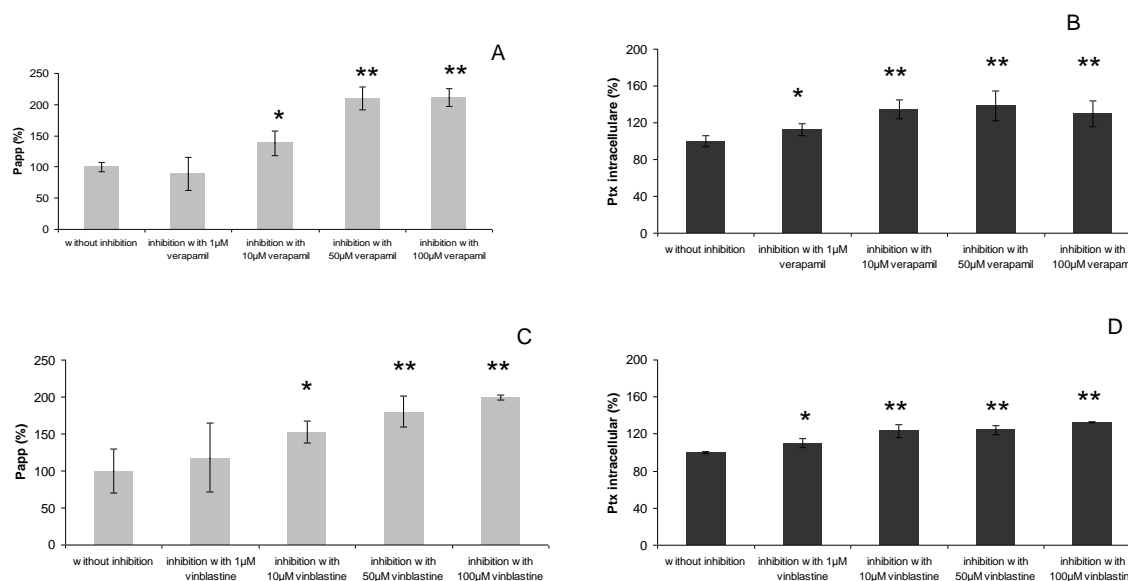


Figure 2: Apparent permeability coefficients of different solutions of Ptx : free Ptx, Taxol®, Ptx associated with verapamil and Ptx-loaded LNCs, diluted in buffered HBSS at 5 μ M Ptx to apical from basolateral side of Caco-2 monolayers for 2h at 37°C at cells passage p71 and p34 (n=3; data are shown as mean \pm SD.).

In order to confirm this assumption, Ptx-loaded LNC transport across Caco-2 cells was evaluated in the presence of verapamil and vinblastin. Verapamil was used as a first generation of P-gp inhibitor [2]. In fact, this calcium channel blocker [36] is also a P-gp substrate that stimulates the ATPase activity of the P-gp [37]. In contrast, vinblastin, which blocks the drug binding site of this enzyme, has a dual effect on ATP consumption

by the efflux pump [37-40]. As shown on Figure 3, each P-gp inhibitor generated an enhancement of the transepithelial transport of Ptx as well as an increase of absolute intracellular amounts of Ptx. Those variations, that were dose/response dependent, were already significant ($p < 0.05$) at 10 μ M verapamil and 10 μ M vinblastin concentrations and reached 100% increase for Ptx transport at 100 μ M for each compound (Figure 3A and 3C). Consequently, P-gp activity will impact Ptx-loaded LNC transport.



Figures 3: Variation of apparent permeability coefficient and intracellular concentration uptake of paclitaxel after 2h of incubation with Ptx-loaded LNCs in presence of verapamil (A,B) or vinblastin (C,D). (A) and (C) Percentage value indicates the Papp of Ptx (%), Papp of Ptx loaded-LNCs without inhibition was considered as 100% of Papp; (B) and (D) Percentage value indicates the intracellular quantities of Ptx (%), Ptx loaded-LNCs without inhibition was considered as 100% of Ptx intracellular (n=4; data are shown as mean \pm SD).

3.4 Nile red-loaded LNC internalization

Two possibilities could explain the effect of P-gp on Ptx-loaded LNC transport. Either (a) P-gp had a negative effect on Ptx-loaded LNC endocytosis or (b) Ptx was released from LNC and then available for P-gp efflux. In order to address these hypotheses and to better understand the link between P-gp and LNC endocytosis, experiments were performed using a LNC tracer that is not known to be a P-gp substrate and therefore may not be effluxed by the enzyme. For this purpose, fluorescent nile red and NR-loaded LNC were evaluated. In contrast to NR-loaded LNC, the use of free nile red in suspension did not change the intrinsic cell fluorescence of the Caco-2 cells when compared to untreated controls (Figure 4). Consequently, Nile red is internalized only when loaded in

LNC and provides a good assessment of actual LNC uptake. As found for Ptx transport (Figure 2), a difference between passages was observed for NR-loaded LNC, with an increase in their uptake at late passages (p71) when compared to early passages (p34) (Figure 4). This observation supports the idea that a time-dependent variation of P-gp activity may affect the uptake of LNC. To further consider this assertion, verapamil and vinblastin were used. Although the presence of vinblastin did not affect the uptake of NR-loaded LNC, the use of verapamil at 100 μ M caused a 34% increase in the cell accumulation of NR-loaded LNC (Figure 5). As Nile red is unlikely to constitute a P-gp substrate our data provides evidence of an inhibition of the LNC uptake in Caco-2 cells by the enzyme. A discrepancy between Ptx and NR uptake when using vinblastin was observed. This may be explained by differences in Ptx and NR transcytosis (Figure 3C and 3D) that may mask actual uptake of NR-LNC measured by flow cytometry and not Ptx uptake measured by LC-MS/MS.

Although very complex, an explanation of the interaction between LNC and P-gp could be a subcellular association of the LNC uptake and the P-gp activity. P-gp is indeed associated with specific cholesterol-rich insoluble membrane microdomains [41-44] that may possibly be involved in vesicular LNC endocytosis by Caco-2 cells as recently observed by our laboratory [35]. Moreover, P-gp presents two ATP hydrolytic sites [45]. Thus, without excluding direct effects on LNC-derived constituents, a competition for cholesterol requirement or for ATP requirement may well be indirectly involved in the inhibitory effect of P-gp on internalization of LNC within Caco-2 cells. This will also explain the differential effect obtained with the two P-gp inhibitors that have distinct relationships on ATP consumption.

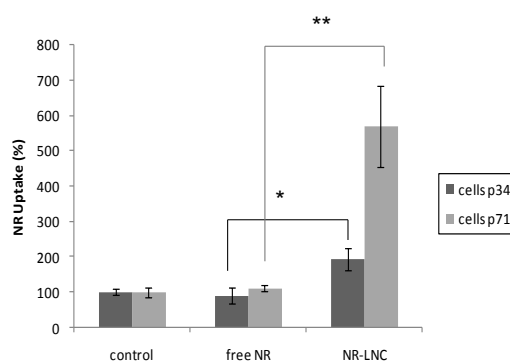
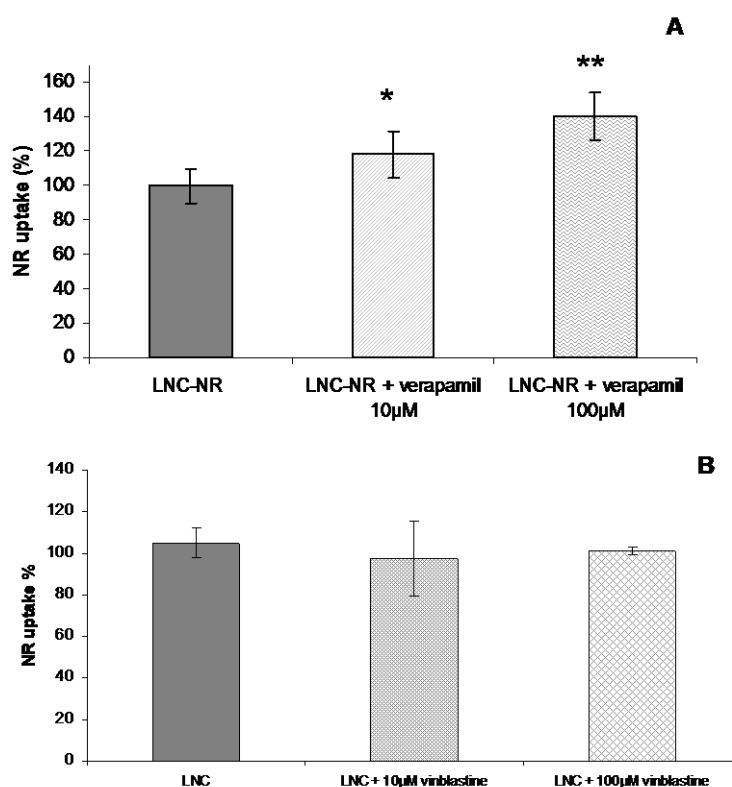


Figure 4: Variation of the mean cells associated fluorescence intensity of Caco-2 cells after 2h of incubation with NR-loaded LNCs at cells passage p34 and p71. Percentage value indicates the fluorescence intensity of NR uptake (%), Caco-2 cells incubated without LNC was considered as 100% of fluorescence intensity.



Figures 5: Variation of the mean cells associated fluorescence intensity of Caco-2 cells after 2h of incubation with NR-loaded LNCs in presence or absence of verapamil (A) or vinblastine (B). Percentage value indicates the fluorescence intensity of NR uptake (%), Caco-2 cells incubated without LNC was considered as 100% of fluorescence intensity (n=3; data are shown as mean±SD).

3.5 LNC inhibition and Ptx-loaded LNC transport

Having studied the P-gp effect on LNC, the effect of LNC on P-gp was then considered. The enhancement of oral bioavailability of paclitaxel-loaded LNC could be explained by the capacity of LNC to inhibit the P-gp activity. LNC are formed by a core of triglyceride (Captex®) covered by phospholipids (Lipoid®S75) and surrounded by a layer formed with Solutol®HS15 [21]. The presence of Solutol® at the LNC surface is interesting because of its ability to reverse multidrug resistance [5, 23, 24]. This property was confirmed by the capacities of LNC to interact directly with the P-gp efflux pump and to revert the multidrug resistance phenomenon in both *in vitro* and *in vivo* experiments [25, 46]. After, pre-incubation of cells with blanks LNCs or a solution containing the same amount of Solutol® in the LNC formulation, the apparent permeability coefficient of Ptx-loaded LNCs was calculated. Figure 6 revealed an enhancement of the Papp of Ptx in presence of blanks LNC and also in the presence of Solutol®. Consequently, LNC may

exert an effect on their own endocytosis that could be explained by the presence of Solutol® and thus by an inhibition of the P-gp activity.

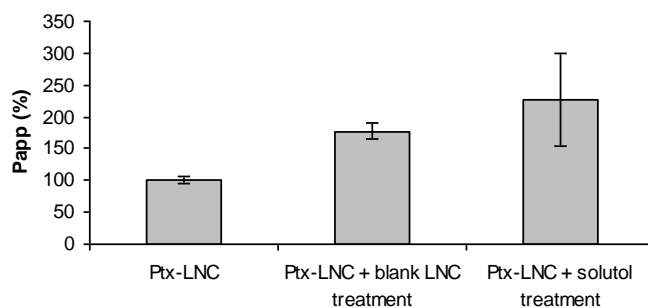


Figure 6: Variation of apparent permeability coefficient of paclitaxel after 2h of incubation with Ptx-loaded LNCs in presence of blanks LNCS or a solution of Solutol®. Percentage value indicates the Papp of Ptx (%), Papp of Ptx loaded-LNCs without pre-treatment was considered as 100% of Papp. (n=3; data are shown as mean±SD).

4. Conclusion

This work has demonstrated an unsuspected negative effect of the P-gp on the uptake of a nanocarrier. In the presence of P-gp inhibitors, the transport of paclitaxel encapsulated in LNCs, and LNC uptake by Caco-2 cells were improved. Although this observation cannot be generalized to other types of nanoparticles, it can here be explained by a subcellular association of LNC endocytosis and P-gp in a specific microenvironment. As such, P-gp was found in caveolae that can also be used for LNCs transcytosis. The capacity of LNC to inhibit the activity of P-gp was also highlighted, thus unveiling reciprocal competition between the two entities. As such, it may be interesting to co-administer blank LNC with Ptx formulations in order to enhance its oral bioavailability. As low permeability of Ptx may as well result from cytochrome P450 metabolism, the effect of this enzyme on LNC outcome in the intestinal epithelium would also be of interest.

References

1. Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* 2003 Oct;48(4):347-359.
2. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000 Oct;11(4):265-283.
3. Rowinsky EK, Wright M, Monsarrat B, Lesser GJ, Donehower RC. Taxol: pharmacology, metabolism and clinical implications. *Cancer Surv* 1993;17:283-304.
4. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):2031-2035.
5. Constantinides PP, Wasan KM. Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *J Pharm Sci* 2007 Feb;96(2):235-248.
6. Meerum Terwogt JM, Malingré MM, Beijnen JH, Ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Koopman FJ, et al. Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clinical Cancer Research* 1999;5(11):3379-3384.
7. Terwogt JM, Nuijen B, Huinink WW, Beijnen JH. Alternative formulations of paclitaxel. *Cancer Treat Rev* 1997 Mar;23(2):87-95.
8. van Asperen J, van Tellingen O, Sparreboom A, Schinkel AH, Borst P, Nooijen WJ, et al. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *Br J Cancer* 1997;76(9):1181-1183.
9. Woo JS, Lee CH, Shim CK, Hwang SJ. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031. *Pharm Res* 2003 Jan;20(1):24-30.
10. Ho PY, Yeh TK, Yao HT, Lin HL, Wu HY, Lo YK, et al. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 400 succinate in mice. *Int J Pharm* 2008 Jul 9;359(1-2):174-181.
11. Mathot F, des Rieux A, Arien A, Schneider YJ, Brewster M, Preat V. Transport mechanisms of mmePEG750P(CL-co-TMC) polymeric micelles across the intestinal barrier. *J Control Release* 2007 Dec 20;124(3):134-143.
12. Zastre JA, Jackson JK, Wong W, Burt HM. P-glycoprotein efflux inhibition by amphiphilic diblock copolymers: relationship between copolymer concentration and substrate hydrophobicity. *Mol Pharm* 2008 Jul-Aug;5(4):643-653.
13. Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *J Control Release* 2008 Jun 4;128(2):99-112.
14. Yang S, Gursoy RN, Lambert G, Benita S. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm Res* 2004 Feb;21(2):261-270.

15. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, et al. Development of a supersaturable SEDDS (S-SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci* 2003 Dec;92(12):2386-2398.
16. Chavanpatil MD, Patil Y, Panyam J. Susceptibility of nanoparticle-encapsulated paclitaxel to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Int J Pharm* 2006 Aug 31;320(1-2):150-156.
17. Zhang Z, Feng SS. Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)--Vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy. *Int J Pharm* 2006 Nov 6;324(2):191-198.
18. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
19. Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS. Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Arch Biochem Biophys* 1995 May 10;319(1):309-315.
20. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002 Jun;19(6):875-880.
21. Minkov I, Ivanova T, Panaiotov I, Proust J, Saulnier P. Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: Part 2. Properties of the formed surface film. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005 Sep;44(4):197-203.
22. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2009 Sep 11;379(2):260-265.
23. Buckingham LE, Balasubramanian M, Safa AR, Shah H, Komarov P, Emanuele RM, et al. Reversal of multi-drug resistance in vitro by fatty acid-PEG-fatty acid diesters. *Int J Cancer* 1996 Jan 3;65(1):74-79.
24. Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res* 1991 Feb 1;51(3):897-902.
25. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1710-1722.
26. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997 Dec;14(12):1655-1658.
27. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today* 2005 Mar 1;10(5):335-343.
28. Larger P, Altamura M, Catalioto RM, Giuliani S, Maggi CA, Valenti C, et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of reference pharmaceuticals as a method for the characterization of the Caco-2 cell monolayer absorption properties. *Anal Chem* 2002 Oct 15;74(20):5273-5281.
29. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Mar 29;175(3):880-885.

30. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, et al. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci* 1998 Jun;87(6):757-762.
31. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005 Jan;21(1):1-26.
32. Hed J, Hallden G, Johansson SG, Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 1987 Jul 16;101(1):119-125.
33. Hosoya KI, Kim KJ, Lee VH. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 1996 Jun;13(6):885-890.
34. Goto M, Masuda S, Saito H, Inui K. Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol* 2003 Jul 1;66(1):163-170.
35. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 2009 Aug 20.
36. Kessel D, Beck WT, Kukuruga D, Schulz V. Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes. *Cancer Res* 1991 Sep 1;51(17):4665-4670.
37. Nagy H, Goda K, Fenyvesi F, Bacso Z, Szilasi M, Kappelmayer J, et al. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Mar 19;315(4):942-949.
38. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 Nov;299(2):620-628.
39. Wang YH, Li Y, Yang SL, Yang L. Classification of substrates and inhibitors of P-glycoprotein using unsupervised machine learning approach. *J Chem Inf Model* 2005 May-Jun;45(3):750-757.
40. Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* 1992 Mar 5;267(7):4854-4858.
41. Orłowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci* 2006 May;63(9):1038-1059.
42. Demeule M, Jodoin J, Gingras D, Beliveau R. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett* 2000 Jan 28;466(2-3):219-224.
43. Dos Santos SM, Weber CC, Franke C, Muller WE, Eckert GP. Cholesterol: Coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Mar 2;354(1):216-221.

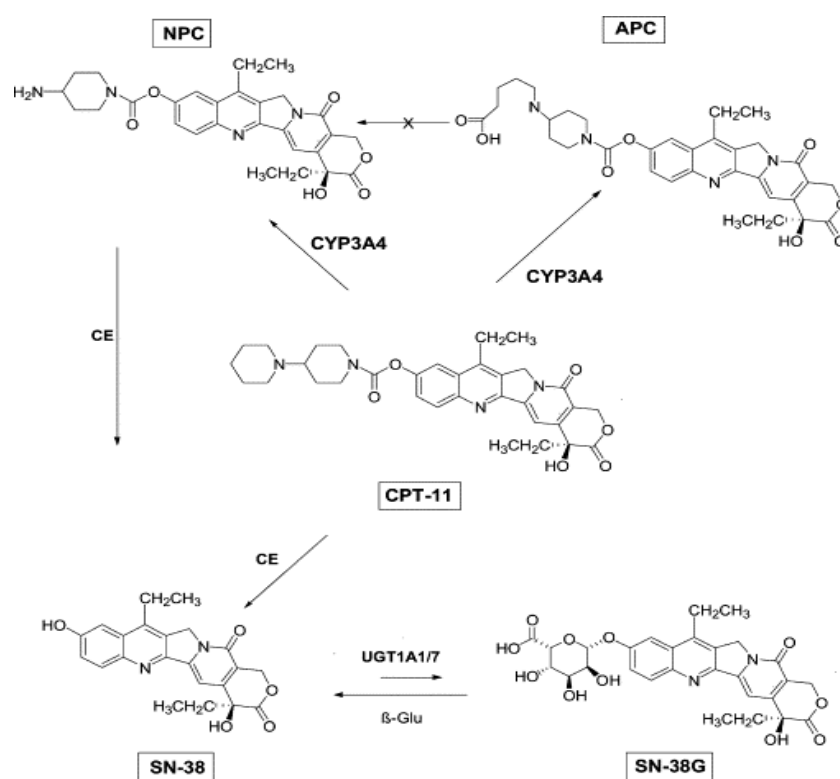
44. Radeva G, Perabo J, Sharom FJ. P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *Febs J* 2005 Oct;272(19):4924-4937.
45. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 1996 Oct;6(5):610-617.
46. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* 2006 May 15;112(2):208-213.

DEUXIEME PARTIE

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE FORMULATION DE SN38

Mise au point d'une nouvelle formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le Sn38

L'irinotécan (CPT-11), commercialisé sous le nom commercial Campto[®], est un inhibiteur de la topoisomérase I utilisé dans le traitement du cancer du colon et du rectum. L'irinotécan est un promédicament, dont l'effet cytotoxique est essentiellement porté par le Sn38 qui est le métabolite actif du CPT-11. Cependant, le CPT-11 possède une activité intrinsèque, car même si *in vitro* le Sn38 est 100 à 1000 fois plus actif que le CPT-11, la molécule mère présente une activité anti-tumorale indépendante de la production du Sn38 [1, 2]. Le CPT-11 est métabolisé en Sn38 par les carboxylestérases (Figure 1) qui sont des enzymes retrouvées dans le plasma, le foie mais également au niveau des cellules tumorales. L'activité de l'irinotécan est donc corrélée avec l'activité des carboxylestérases. Ainsi, seulement 2 à 8% du CPT-11 administré par voie intraveineuse sont métabolisés en Sn38 et cette métabolisation est variable selon les patients [3, 4]. De grandes variations de l'activité des carboxylestérases sont observées selon les lignées de cellules tumorales mais également selon le niveau de prolifération de ces cellules [5]. De plus, le Sn38 est également transformé en Sn38 Glucuronide (molécule inactive) par l'UDP-glucuronosyltransférase 1A1 (UDPG 1A1) (Figure 1). Cette enzyme est concentrée au niveau de nombreuses cellules dont les hépatocytes et les cellules intestinales, elle est notamment responsable de la conjugaison de la bilirubine [6]. La conversion du Sn38 en SN38G est également variable d'un individu à l'autre. Enfin, des études ont montré que la pharmacocinétique du CPT-11 est dose dépendante et qu'une administration prolongée (par exemple 5 jours consécutifs pendant 2 semaines) est plus efficace qu'une administration répétée (par exemple l'administration d'une forte dose toutes les 3 semaines)[7].



NPC : 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-amino]-carbonyloxycamptothecin,

APC : 7-ethyl-10-[4-N-(5aminopentanoic acid)-1-piperidino]-1-amino]-carbonyloxycamptothecin,

CE : carboxylesterase,

CYP3A4 : cytochrome P-450 isoforme 3A,

UGT :UDP glucuronosyltransferase

Figure 1 : Métabolisme de l'irinotécan (CPT-11) et du Sn38 [5].

Les variations et l'imprévisibilité de la conversion du CPT-11 en Sn38, posent donc la limite de ce traitement qui possède des risques de toxicité et qui complique donc l'administration clinique. Une administration directe de la molécule de Sn38 est donc préférable.

La faible solubilité du Sn38 dans l'eau (<40µg/ml [8]), le classe avec les molécules de classe II ou IV de la classification biopharmaceutique [9]. De plus, le CPT-11 présente une faible biodisponibilité orale (~8%) qui est due en partie à son efflux par la P-gp [10]. Le Sn38 est également reconnu comme substrat de la P-gp[11]. Par conséquent, une faible biodisponibilité orale du Sn38 est attendue. Une encapsulation du Sn38 dans les nanocapsules lipidiques pourrait alors être avantageuse pour son administration orale.

Références

1. Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R. Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur J Cancer* 2000 Oct;36(16):2120-2127.
2. Rouits E. Place des outils pharmacogénétique, biochimique et pharmacocinétique dans l'optimisation thérapeutique de l'irinotécan. Angers: Université d'Angers; 2003.
3. Rothenberg ML, Kuhn JG, Burris HA, 3rd, Nelson J, Eckardt JR, Tristan-Morales M, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. *J Clin Oncol* 1993 Nov;11(11):2194-2204.
4. Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreau P, Fretigny E, et al. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 1999 May;80(3-4):364-370.
5. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001 Aug;7(8):2182-2194.
6. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res* 1994 Jul 15;54(14):3723-3725.
7. Rivory LP. Metabolism of CPT-11. Impact on activity. *Ann N Y Acad Sci* 2000;922:205-215.
8. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. *Int J Pharm* 2004 Feb 11;270(1-2):93-107.
9. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release* 1999 Nov 1;62(1-2):41-49.
10. Kolhatkar RB, Swaan P, Ghandehari H. Potential oral delivery of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly(amidoamine) dendrimers. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1723-1729.
11. Saleem A, Edwards TK, Rasheed Z, Rubin EH. Mechanisms of resistance to camptothecins. *Ann N Y Acad Sci* 2000;922:46-55.

Chapitre 1 :

Mise en place des méthodes analytiques du Sn38

Mise en place des méthodes analytiques du Sn38

RATIONNEL

Mettre au point des techniques de dosage du principe actif est une étape nécessaire à tous les niveaux du développement galénique. Le Sn38 est une poudre jaune qui absorbe dans l'ultraviolet (UV). Une méthode de dosage par spectrophotométrie UV est donc envisageable. Néanmoins, cette technique est limitée par l'environnement chimique de l'échantillon (par exemple le solvant de dilution) qui peut absorber à la même longueur d'onde et cette méthode est peu sensible pour des dosages en milieux biologiques. Afin d'éviter l'influence du solvant, il est possible de coupler la détection à une méthode de séparation chromatographique, mais dans ce cas la sensibilité reste faible (0,25µg/ml) [1]. Dans la littérature, de nombreuses publications décrivent des méthodes plus sensibles telles que la technique de chromatographie liquide couplée à un détecteur fluorescent (HPLC/fluorescence) ou couplée à un spectrophotomètre de masse [2]. La technique par HPLC/fluorescence permet d'obtenir, en général, une limite de quantification entre 0,5 et 5ng/ml [3-13]. Rivory *et al.* ont validé une méthode par HPLC/fluorescence permettant de mesurer des traces de Sn38 (10ng/ml)[14] mais cette technique est également limitée par les interférences de la matrice qui nécessite une préparation fastidieuse des échantillons et requiert un appareillage spécifique non disponible au laboratoire. Enfin, avec un système de chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse en tandem (LC/MSMS), une limite de quantification du même ordre (0,05 à 3ng/ml) a été obtenue dans plusieurs laboratoires [15-18].

OBJECTIF

L'objectif de ce chapitre est donc triple. Dans un premier temps, nous avons recherché une méthode de dosage rapide du Sn38 destinée à évaluer sa solubilité et à analyser la quantité de principe actif encapsulée lors des essais de formulation. Ensuite, une méthode de dosage fiable et sensible dans les milieux biologiques *in vitro* a été recherchée. Enfin, nous avons étudié une technique de séparation de la forme carboxylate et de la forme lactone.

RESULTATS

Deux méthodes de dosage ont été validées : une méthode par spectrophotométrie UV et une méthode par LC-MS/MS. En revanche, la séparation des formes carboxylate et lactone par LC-MS/MS n'a pas été concluante.

1. Mise en place et validation d'une méthode de dosage par spectrophotométrie UV

1.1 Introduction

Afin d'évaluer la solubilité du Sn38 dans les différents excipients huileux et solvants, une technique simple et rapide a été recherchée. Le Sn38 absorbant dans l'ultraviolet, une méthode par spectrométrie UV a été mise en place.

1.2 Méthode et résultats

Dans un premier temps un balayage spectral de la molécule solubilisée dans un mélange méthanol/DMSO 50 :50 v/v a été réalisé. Deux pics majoritaires ont été observés à 268nm et 385nm (figure 1).

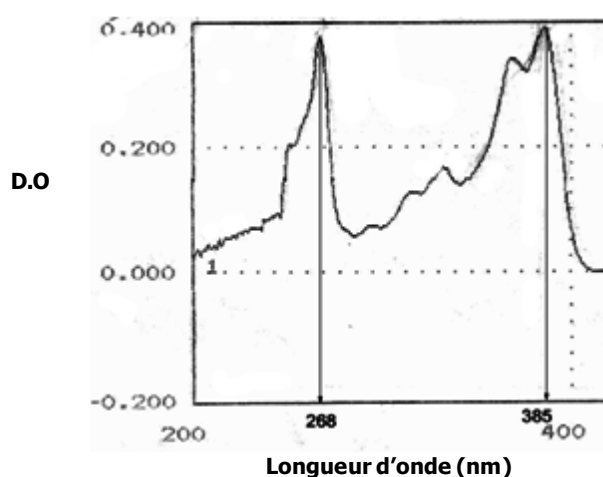


Figure 1 : Balayage spectral entre 200 et 500nm du Sn38 dilué à 25 μ g/ml dans du méthanol/DMSO 50 :50 v/v.

Les différents composants des LNCs et de nombreux solvants peuvent absorber à 268nm. Il a donc été décidé de travailler à la longueur d'onde 385nm. Une gamme de Sn38 a ensuite été testée dans le solvant méthanol/DMSO 50 :50 v/v. Une courbe linéaire entre 0,001 et 0,005mg/ml a ainsi été obtenue avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 (figure 2).

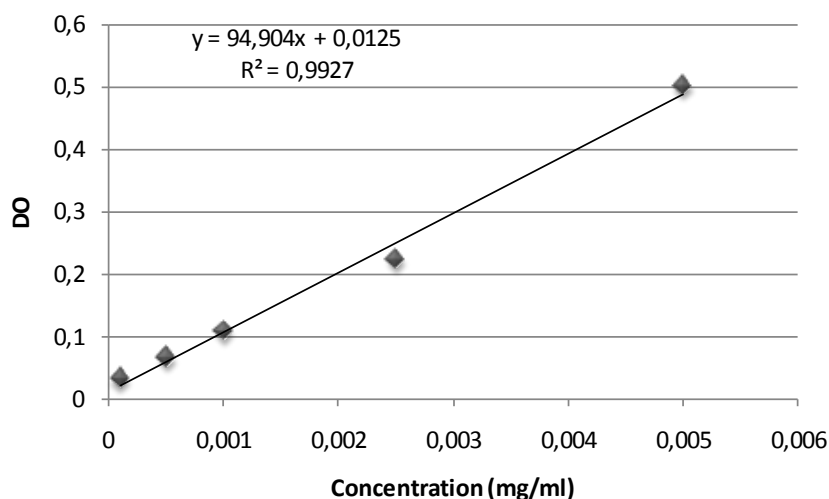


Figure 2 : Gamme de Sn38 dilué dans du méthanol/DMSO 50 :50 v/v entre 0 et 0.005mg/ml.

L'évaluation de la solubilité du Sn38 dans les différents composés huileux ou solvants a donc été réalisée par cette méthode. La densité optique était mesurée contre le composé testé. Lorsque la densité optique était inférieure à 0,05, l'essai de solubilisation n'était pas validé.

Par la suite une méthode de dosage encadrant le 100% théorique du taux d'encapsulation (0,35mg/ml) a été validée en présence de LNCs. La gamme est réalisée de la manière suivante : 100 μ l de LNCs blanches sont mélangées avec 400 μ L de tetrahydrofurane (THF) ce qui permet de solubiliser les excipients des LNCs, puis 400 μ l de méthanol sont ajoutés ainsi que 100 μ l correspondant à chaque point de la gamme préparée dans un mélange méthanol/DMSO. Les échantillons de LNCs de Sn38 sont préparés de la même manière ; exactement 100 μ l de LNC-Sn38, 100 μ l de méthanol/DMSO, 400 μ l de THF et 400 μ l de méthanol. Une gamme linéaire a été obtenue entre 0,07mg/ml et 0,49mg/ml avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99. Cette gamme est stable 1 mois à 4°C.

1.3 Conclusion

Une méthode de dosage par spectrométrie UV a donc été mise en place pour doser le Sn38 encapsulé dans les LNCs.

2. Mise en place et validation d'une méthode de dosage par LC/MSMS.

2.1 Introduction

Pour les études *in vitro*, une sensibilité plus importante est nécessaire. En effet, des concentrations inférieures au $\mu\text{g/ml}$ sont étudiées. Une méthode par LC/MSMS, méthode plus sensible, a donc été mise en place.

2.2 Méthode et résultats

Le Sn38 a été séparé sur une colonne C18, Xbridge[®] (Waters, Milford, Ireland), 2,1mm de diamètre interne et 50mm de longueur, 5 μm de granulométrie couplée avec à une chaîne chromatographique Waters Alliance[®] 2695 system (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). La phase mobile est composée de 65% (v/v) de solution d'acétate d'ammonium à 10mM (pH=3,5, ajusté avec de l'acide formique) et de 35% (v/v) d'acétonitrile. Cette élution isocratique est maintenue pendant 3 min. Le débit de la phase mobile est de 0,2ml/min. Après une injection de 10 μl sur la colonne le temps de rétention du Sn38 est de 1,67 min.

Après séparation chromatographique, la phase mobile est dirigée vers le spectromètre de masse Quattro Micro[®] triple quadrupole (Waters S. A.). La masse de l'ion moléculaire est de 393,2 amu (atomic mass unit). Après infusion dans la cellule de collision, cet ion moléculaire est décomposé en différents ions fils par électrospray positif (figure 3). Le spectromètre de masse est utilisé en mode MRM (multiple reaction monitoring). Le tableau I résume les paramètres de l'appareil.

Paramètres	Valeur
Température de la source (°C)	120
Température de désolvatation	350
Mode d'ionisation	ES+
Energie du cône (V)	60
Energie du capillaire (kV)	3.5
Energie de collision (eV)	26 et 31
Transitions de masse	393,2→343,2 393,2→293,2

Tableau I : Principaux paramètres du spectromètre de masse Quattro Micro[®] pour l'analyse du Sn38.

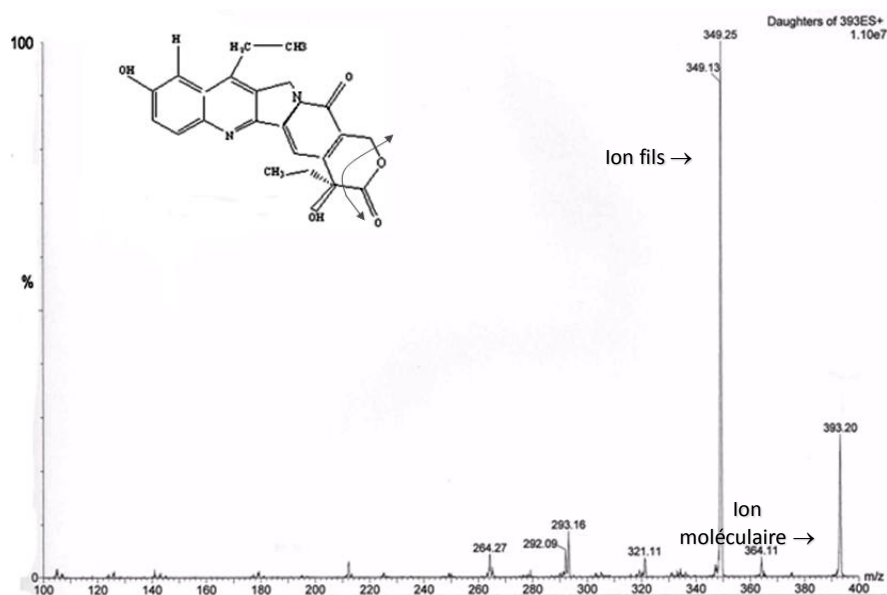


Figure 3 : Spectre de masse et proposition de fragmentation du Sn38 (daughter scan). Spectre réalisé sur un Quattro Micro® Waters après dilution dans la phase mobile (acétate d'ammonium 10mM/Acétrontrile 65 :35 v/v) (concentration 9,16ng/μl).

Nous avons travaillé avec deux transitions de masse pour l'analyse du Sn38. En effet, la transition 393,2→343,2 a été choisie pour quantifier le Sn38 car elle donnait la plus grande sensibilité. En revanche, dans les tampons PBS ou HBSS, celle-ci n'était pas spécifique, un pic apparaissait à 1.15 min. Une deuxième transition 393,2→293,2 a donc été choisie pour qualifier le Sn38 (figure 4).

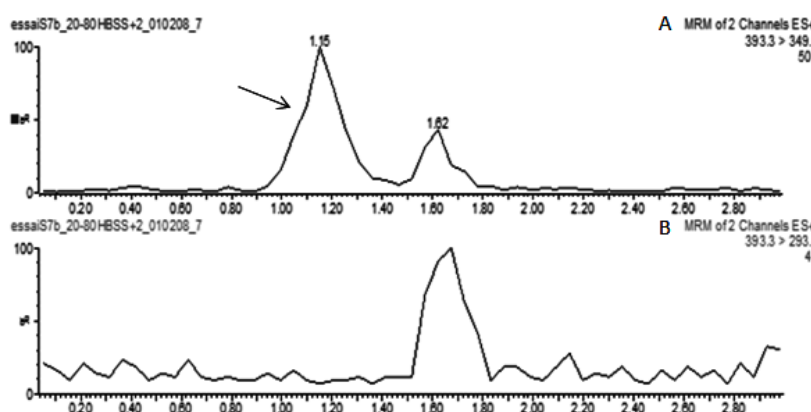


Figure 4 : Chromatogrammes obtenus pour le Sn38 dans l'HBSS aux deux transitions : (A) transition 393,2→343,2 qui permet de quantifier le Sn38, (B) transition 393,2→293,2 qui permet de qualifier le Sn38

Les chromatogrammes obtenus ont été lissés par le logiciel MassLynx avant intégration pour quantification. L'intégration est réalisée par le logiciel après détermination des règles (seuil, hauteur minimum, procédure de lissage, etc.) par l'utilisateur. Tous les chromatogrammes sont contrôlés visuellement (figure 5). La

quantification est réalisée grâce au logiciel QuantLynx® par comparaison de l'aire des pics des échantillons observés avec la courbe de calibration réalisée dans les mêmes conditions. Les résultats montrent une linéarité entre 0.2 et 195ng/ml avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 dans le PBS ou l'HBSS (figure 6). La limite de détection (LOD) (0,05ng/ml) correspond à la concentration minimale pour laquelle le rapport signal sur bruit, pris de pic à pic, est égal à 3. La limite de quantification (LOQ), qui est la concentration la plus petite ayant un rapport signal sur bruit d'au moins 10, est 0,2ng/ml (figure 7). La précision et l'exactitude sont dans les limites acceptables par la FDA [19, 20] pour les 4 concentrations testées (tableau 2).

Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée moyenne (ng/ml)	Précision (% CV)	Exactitude (% de différence)
0,5	0,58	9,8	17,0
2	2,24	8,8	12,0
20	23	2,9	14,3
200	226	1,4	13,3

Tableau II : Précision et exactitude du Sn38 dans l'HBSS en présence de LNCs (n=6).

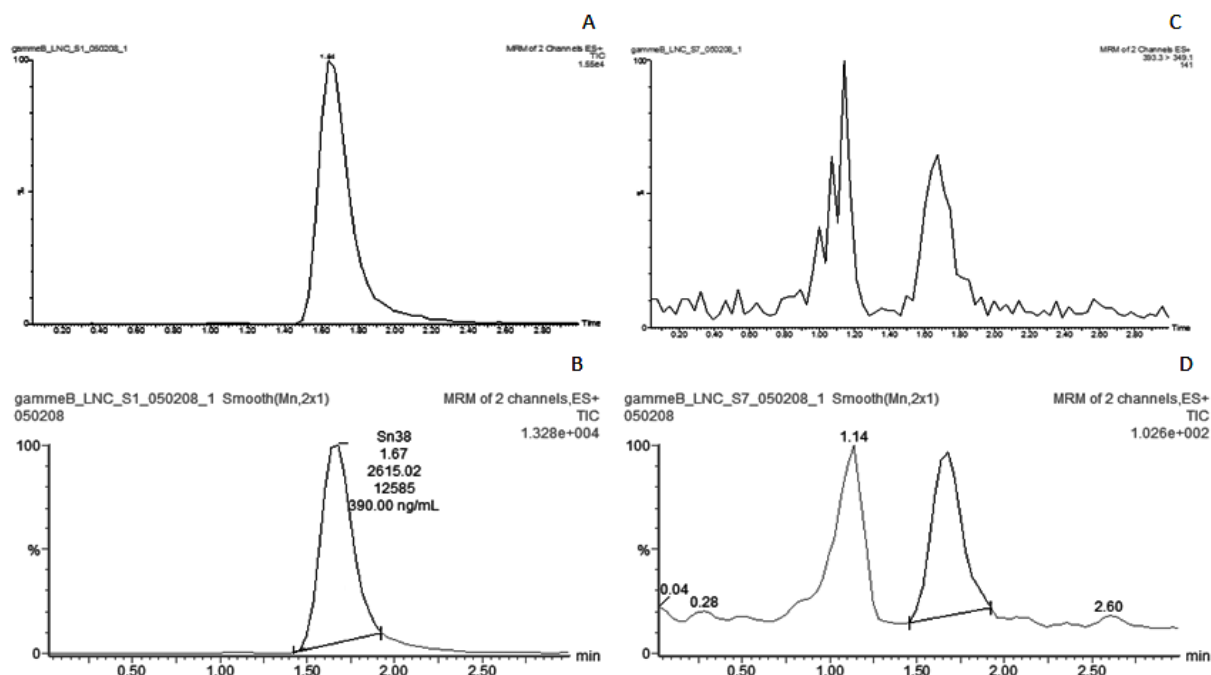
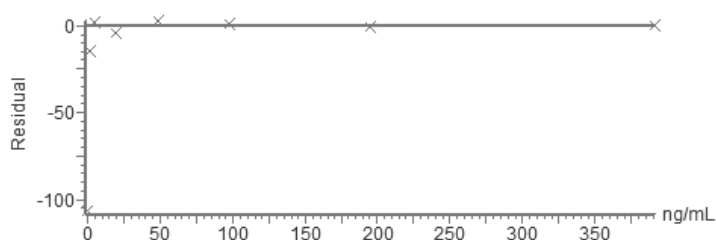


Figure 5 : Chromatogrammes obtenus pour le Sn38 dans l'HBSS après passage du point de gamme 200ng/ml (A) et 2ng/ml (C) et les deux mêmes chromatogrammes après traitement du signal pour quantification (lissage) par le logiciel MassLynx (200ng/ml (B) et 2ng/ml (D)).

Compound name: Sn38
Correlation coefficient: $r = 0.999985$, $r^2 = 0.999971$
Calibration curve: $6.69917 * x + 2.33621$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Sn38
Correlation coefficient: $r = 0.999985$, $r^2 = 0.999971$
Calibration curve: $6.69917 * x + 2.33621$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None

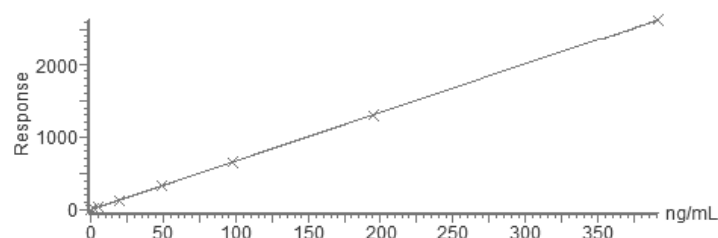


Figure 6 : Exemple de gamme d'étalonnage obtenue dans l'HBSS entre 0.5 et 200ng/ml. Les erreurs résiduelles sont inférieures à 10% et réparties autour de zéro.

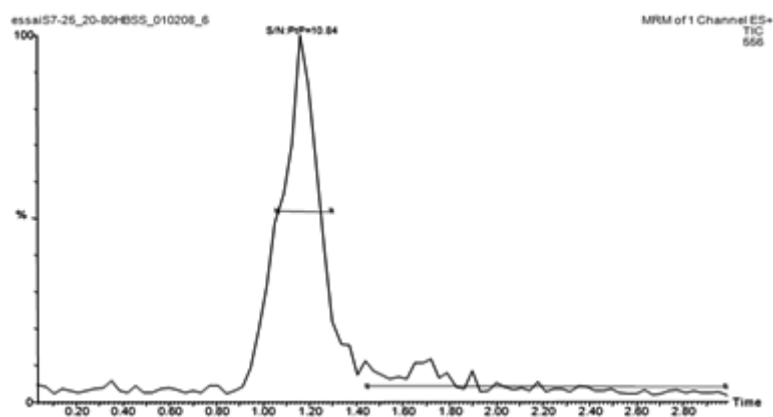


Figure 7 : Chromatogramme réalisé en mode MRM (transition 393,2→343,2) montrant le rapport signal sur bruit (10.84) pour la limite de quantification (0.2ng/ml) dans l'HBSS.

2.3 Conclusion

Une méthode LC/MSMS pour doser le Sn38 a donc été développée et validée selon les critères de la FDA [20]. Nous disposons ainsi d'une technique de dosage fiable et sensible pour les études de perméabilité *in vitro*.

été observé (figure 9A). Pour l'échantillon sous forme carboxylate injecté avec une phase mobile pH 10, un pic à 1,05min a été observé (figure 9B). En revanche, lors de l'injection de ces mêmes échantillons, avec une phase mobile pH 7, deux pics 1,05 min et 1,7 min sont observés (figure 10).

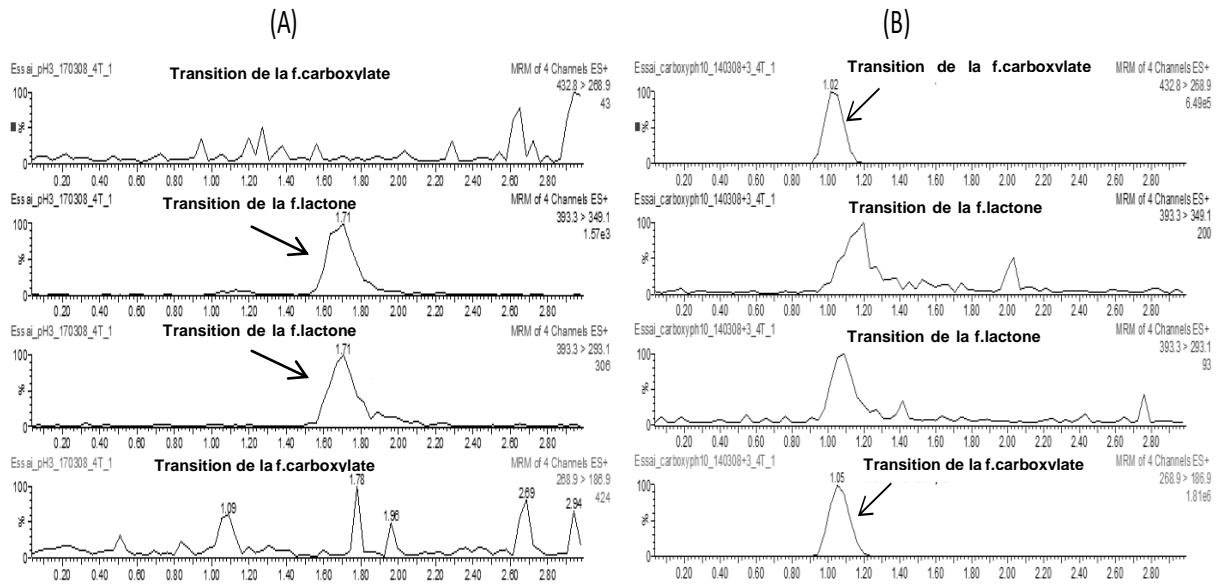


Figure 9 : Chromatogrammes aux 4 transitions correspondantes à la forme lactone et à la forme carboxylate de Sn38 : (A) échantillon préparé dans une solution tampon au pH 3 et efflué par une phase mobile de pH3 (2ng/ml), (B) échantillon préparé dans une solution tampon au pH 10 et efflué par une phase mobile de pH 10 (2ng/ml).

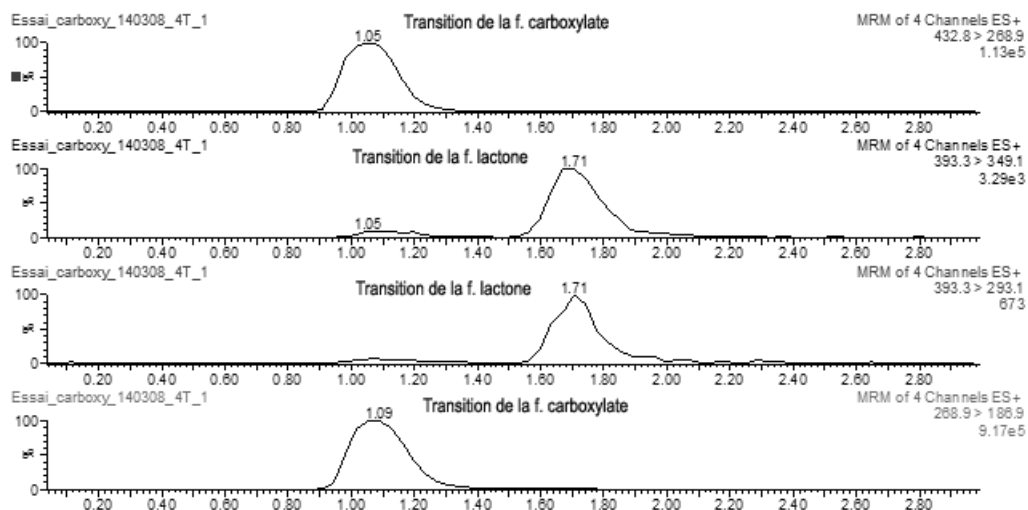


Figure 10 : Exemple de chromatogrammes obtenus aux 4 transitions correspondantes à la forme lactone et à la forme carboxylate de Sn38 d'un échantillon préparé dans une solution tampon au pH 10 et élué par une phase mobile de pH7 (2ng/ml).

3.3 Conclusion

La transformation du Sn38 sous forme lactone ou carboxylate est réversible. Par conséquent, lors de l'élution par HPLC d'un échantillon, la phase mobile peut modifier la forme du Sn38 présent dans l'échantillon. Il n'est donc pas possible d'identifier sous quelle forme le Sn38 est présent dans les échantillons. La réversibilité du changement de forme du Sn38 étant constante, nous avons décidé d'abandonner l'identification de la forme, partant du principe que selon le pH du milieu où la molécule sera retrouvée une modification de la forme sera possible.

Références

1. Xuan T, Zhang JA, Ahmad I. HPLC method for determination of SN-38 content and SN-38 entrapment efficiency in a novel liposome-based formulation, LE-SN38. *J Pharm Biomed Anal* 2006 May 3;41(2):582-588.
2. Zufia L, Aldaz A, Giraldez J. Separation methods for camptothecin and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 Nov 25;764(1-2):141-159.
3. Guo W, Ahmad A, Khan S, Dahhani F, Wang YF, Ahmad I. Determination by liquid chromatography with fluorescence detection of total 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) in beagle dog plasma after intravenous administration of liposome-based SN-38 (LE-SN38). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003 Jul 5;791(1-2):85-92.
4. Chollet DF, Goumaz L, Renard A, Montay G, Vernillet L, Arnera V, et al. Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of the camptothecin derivative CPT-11 and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998 Oct 23;718(1):163-175.
5. Sparreboom A, de Bruijn P, de Jonge MJ, Loos WJ, Stoter G, Verweij J, et al. Liquid chromatographic determination of irinotecan and three major metabolites in human plasma, urine and feces. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998 Aug 7;712(1-2):225-235.
6. Sumiyoshi H, Fujiwara Y, Ohune T, Yamaoka N, Tamura K, Yamakido M. High-performance liquid chromatographic determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite (SN-38) in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995 Aug 18;670(2):309-316.
7. de Bruijn P, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Sep 26;698(1-2):277-285.
8. Barilero I, Gandia D, Armand JP, Mathieu-Boue A, Re M, Gouyette A, et al. Simultaneous determination of the camptothecin analogue CPT-11 and its active metabolite SN-38 by high-performance liquid chromatography: application to plasma pharmacokinetic studies in cancer patients. *J Chromatogr* 1992 Mar 27;575(2):275-280.
9. Kurita A, Kaneda N. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the camptothecin derivative irinotecan hydrochloride, CPT-11, and its metabolites SN-38 and SN-38 glucuronide in rat plasma with a fully automated on-line solid-phase extraction system, PROSPEKT. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999 Mar 19;724(2):335-344.
10. Herben VM, Ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors. *Pharm World Sci* 1998 Aug;20(4):161-172.
11. Boyd G, Smyth JF, Jodrell DI, Cummings J. High-performance liquid chromatographic technique for the simultaneous determination of lactone and hydroxy acid forms of camptothecin and SN-38 in tissue culture media and cancer cells. *Anal Biochem* 2001 Oct 1;297(1):15-24.
12. Escoriaza J, Aldaz A, Castellanos C, Calvo E, Giraldez J. Simple and rapid determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance

liquid-chromatography: application to clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000 Apr 14;740(2):159-168.

13. Chourpa I, Millot JM, Sockalingum GD, Riou JF, Manfait M. Kinetics of lactone hydrolysis in antitumor drugs of camptothecin series as studied by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1998 Mar 2;1379(3):353-366.

14. Rivory LP, Robert J. Identification and kinetics of a beta-glucuronide metabolite of SN-38 in human plasma after administration of the camptothecin derivative irinotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36(2):176-179.

15. Bardin S, Guo W, Johnson JL, Khan S, Ahmad A, Duggan JX, et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for the simultaneous quantification of Camptosar and its metabolite SN-38 in mouse plasma and tissues. *J Chromatogr A* 2005 May 6;1073(1-2):249-255.

16. Ling SS, Magosso E, Khan NA, Yuen KH, Barker SA. Enhanced oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of a hydrophilic drug using liposomes. *Drug Dev Ind Pharm* 2006 Mar;32(3):335-345.

17. D'Esposito F, Tattam BN, Ramzan I, Murray M. A liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for the determination of irinotecan (CPT-11) and its two major metabolites in human liver microsomal incubations and human plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 Nov 15;875(2):522-530.

18. Ragot S, Marquet P, Lachatre F, Rousseau A, Lacassie E, Gaulier JM, et al. Sensitive determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human serum using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999 Dec 24;736(1-2):175-184.

19. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, et al. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000 Dec;17(12):1551-1557.

20. US Department of Health and Human Services FaDA. Guidance of Industry, Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD, 2001.

21. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, et al. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 1989 Mar;32(3):715-720.

Chapitre 2 :
Conception et caractérisation de LNCs de Sn38

Conception et caractérisation de LNCs de Sn38

RATIONNEL

Le Sn38 est peu soluble en milieu aqueux ce qui fait de lui un bon candidat pour une encapsulation dans le cœur lipidique des LNCs. Les résultats obtenus dans la première partie de notre travail montrent l'intérêt de ce vecteur pour une administration du Sn38 par voie orale. La quantité de Sn38 nécessaire pour avoir un effet thérapeutique n'est actuellement pas clairement identifiée. Une évaluation réalisée à partir des résultats de pharmacocinétique obtenus après administration intraveineuse de l'irinotecan (prodrogue du Sn38) permet d'estimer la quantité minimale de Sn38 à administrer à $4\text{mg}/\text{m}^2/\text{semaine}$. En effet, l'irinotecan est administré à la dose maximale de $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{semaine}$ et seulement 2 à 8% sont transformés en Sn38.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail a été de concevoir un nouveau vecteur lipidique encapsulant du Sn38 et de le caractériser.

RESULTATS

Le co-tensioactif Transcutol® a permis de solubiliser le Sn38. Des nanocapsules ont ensuite été mises au point grâce à l'ajout de Labrafil® (huile hydrophile) aux excipients classiques des LNCs. La stabilité de ces nouvelles LNCs encapsulant le Sn38 a été démontrée dans le temps mais également dans les milieux gastro-intestinaux simulés. Ces LNCs permettent également d'augmenter la transcytose du Sn38 à travers la barrière intestinale.

Ce travail fait actuellement l'objet d'une demande de brevet puis sera soumis par la suite pour publication.

Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration

E. Roger^{a,b}, F. Lagarce^{b,c*}, J-P Benoit^{b,c}

^aEthypharm, 92213-Saint-Cloud Cedex, France.

^bINSERM U646, Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, 49100-Angers, France.

^cCentre Hospitalier Universitaire Angers, Pôle Pharmaceutique, 49033-Angers, cedex 9, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 241 735885; fax: +33 241 735853;

E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Abstract:

7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (Sn38), a metabolite of irinotecan hydrochloride (CPT-11), is insoluble in water and in most physiological compatible and pharmaceutically acceptable solvent. Lipid nanocapsules (LNCs), a new generation of nanovector, have shown interest for oral drug administration. The purpose of this study was to formulate lipid nanocapsules encapsulating Sn38. Their characteristics, such as particle size, zeta potential, drug payload, *in vitro* drug release, storage stability and *in vitro* cytotoxicity, were investigated. Moreover, *in vitro* stability in gastrointestinal fluid and permeability across Caco-2 cells were performed in view of an oral administration. LNCs of Sn38 with a mean particles size of 38 ± 2 nm were obtained. The particles displayed a narrow size distribution and a drug payload of 0.40 ± 0.07 mg/g of LNCs dispersion. Sn38-loaded LNCs showed similar antitumor activity against a human colorectal cancer HT-29 xenograft as compared with free Sn38. *In vitro* stability in simulated gastric and intestinal media was also observed. Finally, Sn38-loaded LNCs improved permeability of Sn38 across Caco-2 cells and intracellular concentration compared with free Sn38. Therefore, Sn38 nanocarriers have been developed and could be a promising Sn38-based formulation for oral administration.

Keywords: lipid nanocapsule, Sn38, anticancer drug, colloidal carrier

1. Introduction

7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (Sn38), a biologically active anticancer drug, is metabolized from irinotecan hydrochloride (CPT-11) by carboxylesterases in the liver and in tumors. Sn38 inhibits the release of single-strand DNA breaks mediated by topoisomerase I by stabilizing cleavable complex [1-3]. This metabolite is approximately 1,000-fold more potent than CPT-11 [4]. Only 2-8% of CPT-11 is converted into Sn38 [5] with an important inter patient variability [6]. Thereby, Sn38 might be of a great use for cancer treatment. However, this drug is poorly soluble in aqueous solution and in all pharmaceutically acceptable solvents. Consequently, in order to enhance drug solubility and improve stability of Sn38, nanovectors have been developed such as micelles [7-11], liposomes [12-15] or solid lipid nanocapsules [16]. These formulations have been developed for intravenous administration but oral administration of chemotherapy is preferred by patient at 89% [17]. Indeed, oral administration improves patients' quality of life because of its practical and prevents intravenous drawbacks (catheter infection, thrombosis and extravasations).

Lipid nanocapsules (LNCs), a new generation of nanovector, have been developed in our laboratory [18]. These LNCs were obtained by a low-energy emulsification method and can be formulated in the absence of organic solvent. Moreover, previous studies demonstrated their capacity to increase oral bioavailability of paclitaxel [19] which can be explained by a gastrointestinal stability of particles [20] and an improvement of intestinal permeability [21]. Taking into account these advantages, the aim of the present work was to develop a formulation of Sn38-loaded LNCs. The nanocapsules were also characterized and their ability to cross Caco-2 cell monolayers was evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Sn38 powder was purchased from ScinoPharm Taiwan LDT (Tainan, Taiwan). Oil solubilizers and excipients were a gift from Gattefosse S.A (Saint-Priest, France), Abitec Corp. (Columbus, Ohio, USA) or Stéarinerie Dubois (Boulogne, France). Lipoid[®] S75-3 (soybean lecithin at 70% of phosphatidylcholine and 10% of phosphatidylethanolamine) and Solutol[®] HS15 (mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were gifts from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASF (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was purchased from Prolabo VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Atenolol and propranolol powder were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified water was obtained from a MilliQ185 System (Millipore, Paris, France). Acetonitrile, acetone, dimethylsulfoxide (DMSO), methanol and tetrahydrofurane (THF) HPLC grade were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Carlo Erba Réactifs (Val-de-Reuil, France). Culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Lonza (Verviers, Belgium).

2.2 Solubility studies

Excess amount of Sn-38 was added to tube of 10mL containing 1g of various oil excipients or solvent of class 2 or 3. Preparations were maintained over ultrasound for 2h, and then were filtered using a Minisart[®] 0.2µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany). Solubilization of Sn38 was determined by comparing the absorbency of filtrate to corresponding oil excipient or solvent by spectrophotometry at 385nm.

2.3 LNCs formulation

LNCs were prepared according to the original process described by Heurtault *et al.* [18] including numerous changes. Firstly, Sn38 was solubilized in Transcutol[®]HP (0.5% w/w). At this solution, Labrafil[®]M 1944 CS, Labrafac[®] and Lipoid[®]S75-3 were added and the mixture was heated at 85°C to solubilise Lipoid[®]. After cooling, Solutol[®] HS15, NaCl and basic buffer were added and homogenized under magnetic stirring. Basic buffer was added in order to transform free Sn38 lactone to Sn38 carboxylate. Three cycles of

progressive heating and cooling between 65 and 90°C were then performed and at 70°C during the last cycle, an irreversible shock was induced by dilution with 2°C acidic buffer. Afterward, a slow magnetic stirring was applied to the suspension of LNC for 5min at room temperature.

2.4 Conductivity measurements

The conductivity was measured using a Consort C561 (Consort NV, Turnhout, Belgium) with a two platinum plate attachment electrodes (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France). Conductivity was measured at 2°C intervals, between 50°C and 95°C under magnetic stirring.

2.5 LNCs characterizations

2.5.1 Particle size and zeta potential measurements

The size, polydispersity index (PI) and charge distribution of LNCs were determined by dynamic light scattering on a Zetasizer® Nano serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). The polydispersity index was used as a measurement of the size distribution. A small value of PI (<0.2) indicates a unimodal size distribution. Nanocapsules were diluted 1:20 (v/v) in deionised water in order to assure convenient scattered intensity on the detector.

2.5.2 LNCs drug payload and encapsulation efficiency

For determination of Sn38 encapsulation yield, LNCs were filtered using a Minisart® 0.2µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany) in order to eliminate the residual components of the LNCs. At 500µL of filtrate, 20µL of chlorhydric acid 1M were added in order to change free Sn38 carboxylate to lactone form and a filtration was performed in order to eliminate Sn38 carboxylate which precipitated at acid pH. Three samples of filtrate were prepared by dissolution of an exact quantity of LNC dispersion in a 5/50/45 (v/v/v) DMSO/methanol/THF solution. Quantification was achieved by comparing the absorbency at 385nm of Sn38 in the sample to a calibration curve obtained under the same experimental conditions with blank-LNCs. The range of linear response was 0.07–0.49mg/ml. The lower limit of detection was 0.05mg/ml. Samples were performed in triplicate and the mean±S.D Sn38 payload was calculated (mg of

Sn38/g of LNC dispersion). The encapsulation yield (%) was determined by dividing the experimental drug payload by the theoretical drug payload.

2.6 *In vitro* release study

Sn38-loaded LNCs were diluted 1:200 (v/v) in phosphate-buffered saline (PBS, pH=7.4) to reach sink conditions and placed at 37°C at 150rpm. A sample of 0.5mL was removed and replaced by PBS at various times intervals. Samples were acidified and filtered using a Minisart[®] 0.2µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany) in order to remove free precipitated Sn38. Then, drug payload was determined by LC-MS/MS. Drug release was calculated by difference with the theoretical drug payload and profiles (percent release versus time) were plotted. After the first sampling, the theoretical drug payload was adjusted in order to consider LNCs sampling.

2.7 *LC-MS/MS* analysis

Chromatography was performed using a Waters Alliance[®] 2695 system (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a Xbridge[®] C18 50×2.1mm, 5µm column (Waters, Milford, Ireland). The mobile phase was 10mM ammonium acetate (pH=3.5)/acetonitril, 65:35 (v/v) isocratically, and maintained for 3min. The flow rate was 0.2mL/min. The total HPLC effluent was directed into a Quattro Micro[®] triple quadruple mass spectrometer (Waters S. A.). Ionization was achieved using turbo ion spray in positive ion mode. The mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The (M-H)⁺ m/z transitions for each compound were 393.1–293.1. A typical retention time of Sn38 was found to be 1.67min. Quantification was achieved with QuantLynx[®] (Waters S.A.) by comparison of the observed peak area ratios of Sn38 samples to a calibration curve obtained under the same conditions. The range of linear response was 0.2–195ng/mL. The lower limit of detection was 0.05ng/mL and the lower limit of quantification was 0.2ng/mL.

2.8 *Stability studies*

The stability of Sn38-loaded LNCs was evaluated after storage at 2-8°C during 3 months. The pH, particle size distribution, zeta potential and drug payload of sample were determined after filtration of sample using a Minisart® 0.2µm filter (Sartorius, Goettingen, Germany).

2.9 *In vitro cytotoxicity study*

The human colorectal cancer cell line used, namely HT-29, was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). Cells were cultured in McCoy's 5A medium supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum in a humidified incubator 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C. Cells were plated on 75cm² flasks at a density of 3 x 10⁶ cells/flask and were harvested at 60% confluence with trypsin-EDTA and seeded onto 24-well plates at a density of 1 x 10⁴ cells/well for 24h. The drug in solution was prepared at a concentration of 1M and 1:10 cascade dilutions were performed in culture medium to obtain concentrations between 0.0001 and 100µM. The experiment was started by adding 0.5mL of diluted solution. Then cells were incubated at 37°C/5%CO₂/95% air atmosphere. After 72h of incubation, cell survival was determined using the CallTiter 96® AQueous non-radioactive cell proliferation assay kit (Promega, Charbonnières, France). According to the procedure describing by Promega Corporation, 100µl/well of combined MTS/PMA solution was added. After 3h at 37°C, the absorbance at 490nm was recorded using an ELISA plate reader (Multiskan Ascent®, Labsystem, Helsinki, Finland).

2.10 *In vitro transepithelial transport*

The human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) was obtained from the American Type Culture Collection and used between passages 25-35. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, high glucose) supplemented with 15% (v/v) foetal bovine serum, 1% (v/v) non-essential amino acids, 1% (v/v) sodium pyruvate, and 1% antibiotic solution (1x10⁴UI/mL penicillin, 10mg/mL streptomycin, 25µg/mL amphotericin B) in a humidified incubator 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C. Cells were plated on 75cm² flask at a density of 1x10⁶ cells/flask and were then harvested at 80% confluence with trypsin-EDTA and seeded onto polycarbonate membrane filters

(0.4 μ m pore size, 1.12cm² growth area) inside Transwell[®] cell culture chambers (Corning Costar, Cambridge, MA) at a density of 0.1 x 10⁶ cells/insert. The culture medium (0.5mL per insert and 1.5mL per well) was replaced every two days for the first two weeks and every day thereafter. After 21-23 days in culture, cell monolayers were used for the following assays.

The transports of different formulations of Sn38, i.e. free Sn38 and Sn38-loaded LNCs, were studied in the apical to basolateral direction on Caco-2 cells. The test solutions were diluted in HBSS at 5 μ M Sn38 concentrations. The experiment was started by adding 0.5mL of test solution at apical side and 1.5mL of HBSS at basolateral side. Then inserts were incubated 37°C. A sample of 50 μ L and 150 μ L was removed and replaced by PBS at various times intervals at apical and basolateral side respectively. Sn38 content was determined by LC-MS/MS. Apparent permeability coefficient (P_{app}), expressed in centimeters per second, was calculated according to the following equation [22, 23]: $P_{app} = dQ/dt \times 1/AC_0$, where dQ/dt is the rate of drug appearance on the basolateral side (μ g.s⁻¹), C_0 is the initial concentration over the apical side (μ g.mL⁻¹) and A is the surface area of monolayer (cm²).

Before experiments, cell monolayers were washed twice with Hank's buffered salt solution (HBSS) for 15 min at 37°C. The transepithelial electrical resistance (TEER) of monolayers was checked before and after each experiment by using a Millicell[®]-ER system (Millipore Corporation, Bedford, MA). Only cell monolayers with TEER values over 250 Ω .cm² were used. Then, atenolol and propranolol transports were evaluated for 2h to control paracellular and transcellular transport [24]: values of 20 \pm 0.5.10⁶cm.s⁻¹ and 1.0 \pm 0.2.10⁶cm.s⁻¹ for apparent permeability of propranolol and atenolol were accepted.

2.11 Statistical analysis

Results were expressed as mean values \pm S.D. A student t-test was used for statistical comparison/analysis. P<0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1 Preformulation

To date, different formulations of Sn38 were developed: dendrimers [25], liposomes [12, 13] and polymeric micelles [7, 9, 11]. To formulate dendrimers or micelles, Sn38 was covalently complexed with polymer. In the case of liposome formulation, Sn38 was dissolved in mixture of methanol and chloroform and added to different lipid film. To formulate nanovectors such as lipid nanocapsules, Sn38 has to be solubilised preferentially in the components of formulation [26-29] (oil, Solutol®, lipoid®) or in solvents which can be added to the preparation and then evaporated [19]. Consequently, preformulation studies were conducted to investigate the solubility of Sn38 in various oil components and in class 3 solvents. Furthermore, as Transcutol® was used in some emulsions or microemulsions [30-32] as a co-surfactant, the solubility of Sn38 was assayed in this surfactant.

As shown in table I, Sn38 was not solubilised at 0.5% p/p in different oils which suggests that Sn38 cannot be formulated directly using the regular process of LNCs formulation, previously developed by Heurtault et al. [18]. In class 3 solvents, Sn38 was solubilised at 0.5% p/p only in DMSO and formic acid. Nevertheless, the addition of these two solvents does not allow encapsulation of Sn38 in LNCs (table II, formulation A).

However, Sn38 can be solubilised in 0.1M NaOH. In the literature, Zhang *et al.* [12] described a liposome formulation of Sn38 using the pH-dependent solubility and the pH-dependent equilibrium of Sn38. Indeed, Sn38 has a lactone ring ionized in carboxylate form in alkaline solution (figure 1). In the presence of 0.1N NaOH, Sn38 carboxylate is solubilised in aqueous solution but addition of acidic buffer converted Sn38 in the closed lactone ring form which is insoluble in aqueous solution [12, 13]. Based on these properties, a LNC formulation was performed with Sn38 solubilised in NaOH, and in order to encapsulate Sn38 in lactone form into the oily nanocapsules core, the dilution which induced the formation of particles was performed with acidic buffer. With this method, the drug payload and encapsulation efficiency was still low (<5%) which is not acceptable for pharmaceutical production in the industry (table II, formulation B).

Finally, solubilisation of Sn38 was investigated in Transcutol®HP and a solubility of 5mg/g was estimated. As Transcutol® was not a component described in the original process of LNCs [18], some modifications were required.

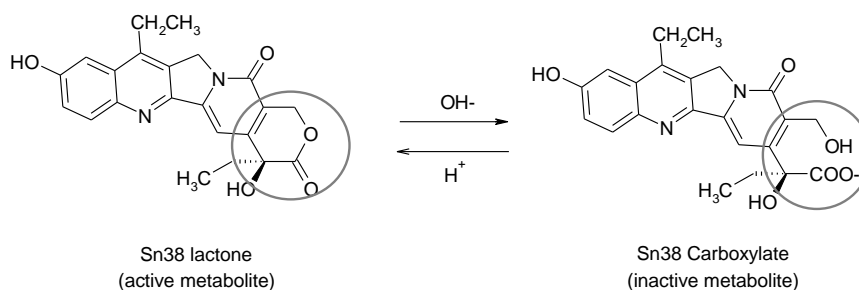


Figure 1: pH-dependent equilibrium of Sn38.

Oil solubilizer/excipient	Solubility at 0.5% p/p	Class 3 solvent	Solubility at 0.5% p/p
Alpha-tocopherol	NS	Acetone	NS
capryol® 90	NS	Anisol	NS
capryol® PGMC	NS	1-butanol	NS
Captex® 200	NS	2-butanol	NS
Captex® 500	NS	ter-butylmethyl ether	NS
Captex® 8000	NS	dimethylsulfoxide	S
Sunflower oil	NS	ethanol	NS
Labrafac® CC	NS	ethyl acetate	NS
Decyl oleate	NS	ethyl ether	NS
Ethyl myristate	NS	ethyl formate	NS
Ethyl oleate	NS	formic acid	S
Inwitor® 380	NS	heptane	NS
Precirol® ATO 5	NS	isobutyl acetate	NS
Labrafil® M 1944 CS	NS	methylisobutyl ketone	NS
Labrasol®	NS	1-pentanol	NS
L.A.S®	NS	1-propanol	NS
Lauroglycol® 90	NS	2-propanol	NS
Lauroglycol® FCC	NS	tetrahydrofurane	NS
Myritol® 318	NS		
Olive oil	NS		
Plurol® isostearique	NS		
Plurol® diisostéarique	NS		
Plurol® oleique	NS		
Rapeseed oil	NS		
Sesame oil	NS		
Stearic acid	NS		

Table I: Solubility of Sn38 in different oils, class 3 solvents (NS: no soluble, S: Soluble).

3.2 Formulation and characterisation of Sn38-loaded LNCs

Based on the Sn38 solubility in Transcutol®, the novel formulation approach was to add this component at the first step of preparation. However, Transcutol® is a co-surfactant and consequently, it cannot replace alone the component used as the oily phase of LNCs. The different modifications performed in order to enhance the drug payload are summarized in figure 2. Labrafil®M1944, an hydrophilic oil in which Transcutol® is soluble, was thus added as oily phase but a drug payload of 0.04mg/g and an encapsulation efficiency of 16% (table II, formulation C) were only obtained.

This low encapsulation efficiency was related to the precipitation of Sn38 during the three phase-inversion steps. To avoid this phenomenon, water was replaced by an alkaline buffer at pH 9. This allowed Sn38 to change into the carboxylate form which is soluble in the aqueous phase of the emulsion. At the last step of the process (dilution with addition of a large quantity of water to form LNCs), an acidic buffer was added in order to change Sn38 in its lipophilic form (lactone), thus ensuring its encapsulation in the oily core of the nanocapsules. The ratio of entrapped Sn38 prepared with this modification was 72% and the drug payload was 0.23mg/g (table II, formulation D).

Finally, Labrafac® was added in order to improve lipophilic surfactant (Lipoïd®) solubilisation which was limited with Labrafil®M1944. The conductivity evolution of this formulation is illustrated in figure 3. The conductivity measurement characterised the phase inversion zone which described the inversion from O/W emulsion to W/O emulsion [18]. The conductivity remained constant (i.e. 7mS/cm) for temperatures below 75°C. After 75°C, a progressive conductivity decrease was observed and the system appeared translucent. This behavior was suggestive of a phase inversion which is representative of the principle used by Heurtault *et al.* [18]. Nevertheless, at low temperature, the emulsion was not characterized by a high conductivity (as 35mS/cm observed by Heurtault *et al.*) while characteristic of the aqueous continuous phase of an O/W emulsion, thus, an w/O/W emulsion system was suggested [33]. Then, when temperature was increased, a rapid conductivity decrease was observed which is characteristic of a W/O emulsion. Furthermore, the phase inversion zone (PIZ) began at 72°C and consequently, the irreversible shock was performed around 70°C (2°C from

the beginning of the PIZ in the w/O/W emulsion). Finally, three cycles were required in order to obtain stable phase inversion.

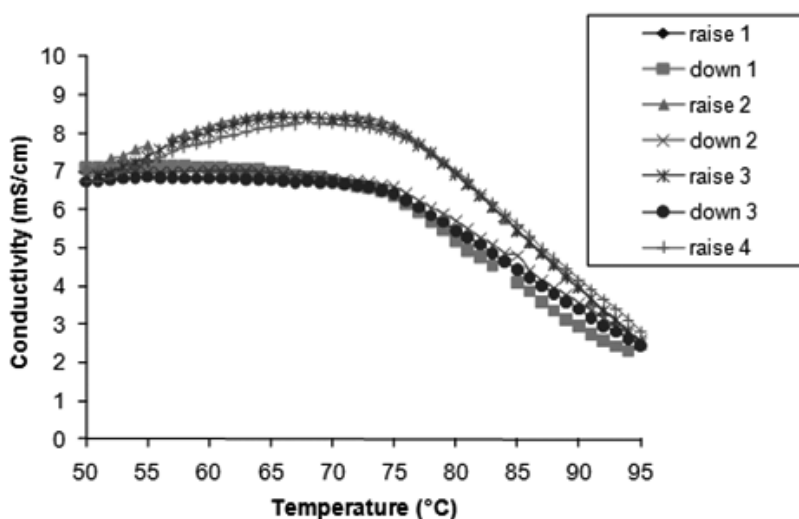


Figure 3: Evolution of the conductivity as a function of the temperature. Three cycles ranging from 50 to 95°C were applied.

Moreover, color change from bright yellow translucent to milk pale yellow was observed during cycling and after cooling-dilution with acidic buffer. This observation characterised microemulsion with Sn38 carboxylate form and dispersion of LNCs with Sn38 lactone form, respectively. So, it was suggested that Sn38 was entrapped in lactone form which is important to keep the inhibitor activity on topoisomerase I [34, 35].

This final formulation has a polydispersity index < 0.25 which demonstrates the monodispersity of the preparation. The zeta potential values ranged from -7 to -9mV and the average size was 38 ± 2 nm. In a recent work [36], our team demonstrated that a size inferior to 100nm was interesting in order to increase transport by endocytosis across the intestinal barrier. In consequence, this size is an advantage to consider an oral administration of LNCs-Sn38.

A drug payload of 0.43 ± 0.06 mg mg/g and encapsulation efficiency higher than 89% was obtained (table II, formulation E). Irinotecan has been administered at maximum of 40mg/kg/d and only 2-8% were metabolised in Sn38 [5] (that corresponded to 0.8mg/kg/d of Sn38). Therefore, the drug payload was compatible with a clinical use.

	Formulation	A	B	C	D	E
Quantity	Solvent (DMSO, acid formic)	0.5ml	/	/	/	/
	Transcutol®HP/Sn38	/	/	0,70g	0,70g	0,70g
	Labrafil®M1944	/	/	1,00g	1,00g	1,00g
	Labrafac®	1.2g	1.2g	/	/	0,40g
	Lipoïd®S75	0.067g	0.067g	0,15g	0,15g	0,15g
	Solutol®HS15	1g	1g	1,00g	1,00g	1,00g
	NaCl	0.073g	0.073g	0,10g	0,10g	0,10g
	Water	1.80g	/	1,80g	1,38g	1,38g
	Alkalin buffer	/	1.80g	/	0,42g	0,42g
	Water at 2°C	11.2ml	/	5ml	/	/
	Acidic buffer at 2°C	/	11.2	/	5ml	5ml
Characteristics	Size (nm)	55	51	26	35	38 ± 2
	Drug payload (mg/g)	0mg/g	>0.02mg/g	>0,04mg/g	>0,23mg/g	0,43±0,06
	Encapsulation efficiency (%)	0%	>5%	>16%	>72%	89±10

Table II: composition and characterisation (size, drug payload and encapsulation efficiency) of different batches of LNCs.

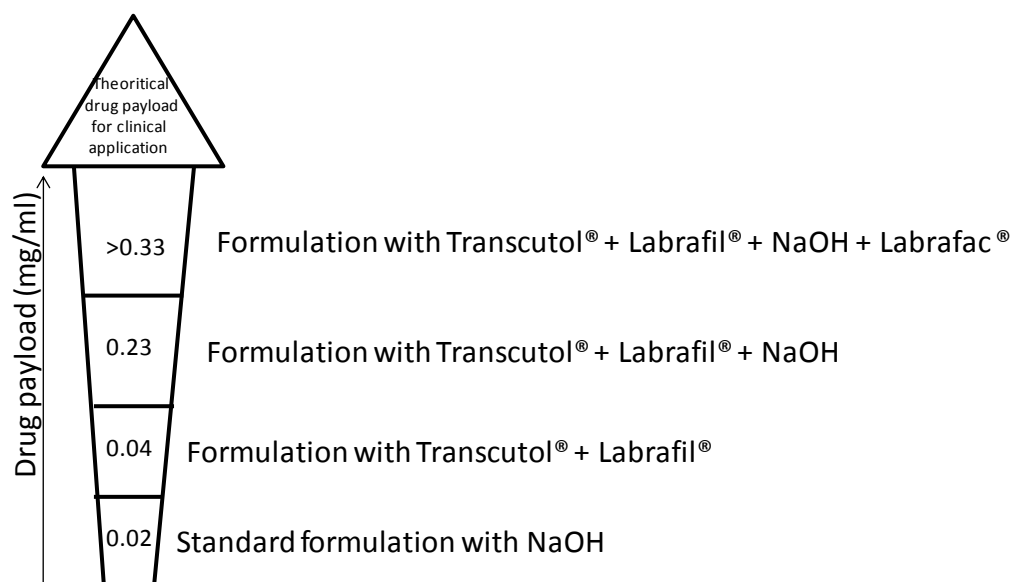


Figure 2: Schema of enhancement of drug payload by modifying formulation parameters.

3.3 *In vitro* release profile

Figure 4 reports the percentages of Sn38 released from LNCs into PBS buffer versus time. After 3 days, the percentage of Sn38 released was about 8% and reached a plateau what demonstrated that Sn38 remained associated with the LNCs formulation during the course of the study. This result was superior to Sn38 released from liposomal formulation (1.9% Sn38 released over 120h) [12], but is still too low. A better profile of release was observed with micelles (>54% at 24h) [9] with which a superior antitumor activity than CPT-11 was demonstrated. Consequently, this incomplete release of Sn38 with LNCs could be a limit to an antitumor activity if it is confirmed *in vivo*.

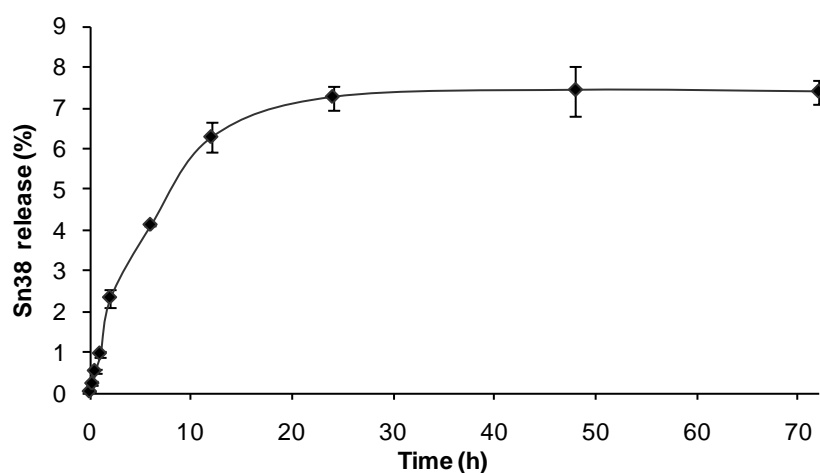


Figure 4: Sn38 release profile from LNCs in PBS (n=3; data are shown as mean±S.D.).

3.4 *Storage stability*

Blank-LNCs and Sn38-loaded LNCs were physically stable at 2-8°C for at least 3months. No significant changes in mean vesicle size, pH and zeta potential were observed. However, a decrease of entrapment yield was observed (Table IV). After 3months, about 20% of Sn38 had crystallized. This release could be explained by the external pH of aqueous phase (pH 7.4). At this pH, a non-negligible fraction of Sn38 was present in the inactive carboxylate form (approximately 60% [12]), which presents a significant aqueous solubility [37, 38] and consequently might be released from the lipid nanocapsules. To overcome this problem, lyophilisation of Sn38-LNCs could be carried out. Indeed, Zhang *et al.* [12] demonstrated no significant changes in drug entrapment of lyophilized liposome-based Sn38 after 6months and a stability for diluted liposomes

over 8h. Moreover, classical LNCs could be freeze-dried in presence of trehalose without any problem [39].

(A)	Times (month)	initial	0.5	1	3
	Size Sn38-LNC (nm)	38±1	39±1	39±1	40±1
	Polydispersity index Sn38-LNC	0,141±0.0	0,147±0.055	0,141±0.037	0,135±0.037
		42			
	Zeta potential Sn38-LNC (mV)	-7,7±1,0	-7,6±0,3	-8,5±0,45	-8,6±0,7
	pH Sn38-LNC	7,3±0,1	7,6±0.08	7,4±0,03	7,5±0,03
	Drug payload (mg/g of dispersion)	0,43±0,06	0,41±0,08	0,34±0,04	0,33±0,06
	Encapsulation yield (%)	89±10	85±13	72±16	68±12

(B)	Times (month)	Initial	0,5	1	3
	Size blank-LNC (nm)	39±3	38±1	39±2	40±2
	Polydispersity index blank-LNC	0,210±0.078	0,156±0.076	0,131±0.046	0,141±0.060
	Zeta potential blank-LNC (mV)	-8±1	-8±1	-9±1	-9±1
	pH blank-LNC	7,4±0,1	7,8±0,04	7,6±0,1	7,7±0,03

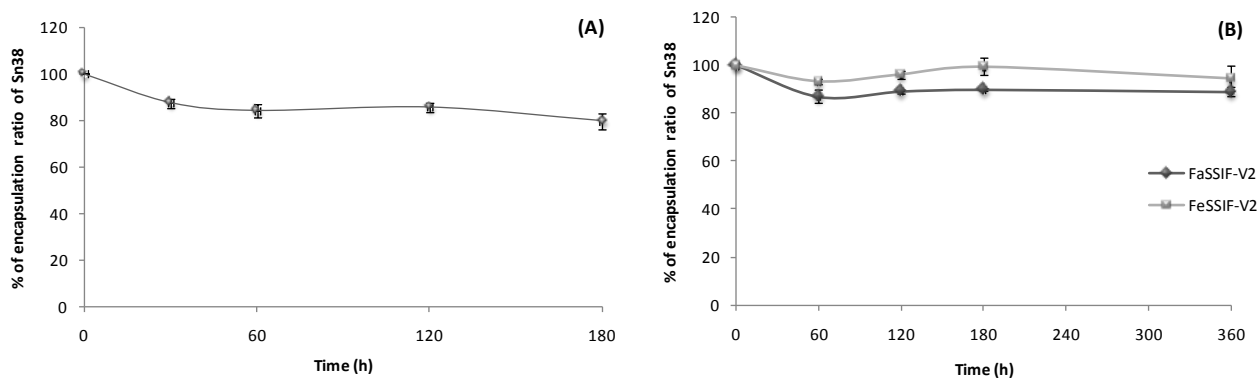
Table IV: Stability data of LNCs stored at 2-8°C (n=6), (A) Sn38-loaded LNCs, (B) blank-LNCs.

3.5 *In vitro stability in gastrointestinal fluids*

The first barrier to overcome after oral administration is constituted by the physicochemical environment of the gastrointestinal tract. Even if a previous study demonstrated that LNCs were stable in gastrointestinal tract [20], we investigated the stability of these Sn38-LNCs which differed from classical LNCs. Firstly, in the gastric fluid characterised by a pH of 1.2 and pepsin, a digestive protease, a release of 20% of the initial amount of encapsulated Sn38 was measured after 3h (figure 5A). Khohatkar *et al.* [25] who demonstrated the potential of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers to improve the oral bioavailability of Sn38, noticed the lack of PAMAM to be stable in the gastric environment. Indeed, acidic pH is responsible for the release of Sn38 from the complex because complexes were formed by ionic interaction of the positive charges of surface amine group of dendrimers with carboxylate Sn38 molecules. In case of LNCs, the Sn38 lactone form was encapsulated into the lipid core of LNCs and was consequently protected by the shell composed by Solutol®. But, some Sn38 molecules could be present on the shell of LNCs and thus, could be released in the acidic environment.

Secondly, stability of Sn38-LNCs was assayed in two different intestinal fluid simulated media. FaSSIF-V2 and FeSSIF-V2 are two recent biorelevant dissolution media

developed by Jantratid *et al.* [40, 41]. These media reflect the influence of digestion processes better than media typically used [42, 43]. Particularly, FeSSIF-V2 contains lipolytic product and pancreatin which requires bile salt in order to be functional in accordance to *in vivo* data. After 6h, Sn38 remains encapsulated in LNCs (figure 5B). Consequently, Sn38-loaded LNCs could be administered in a pre or post-prandial state.



Figures 5: Percentage of encapsulation ratio of Sn38 following incubation in simulated gastric fluid (SGF) (A), simulated, intestinal fluid in the fasted state (FaSSIF-V2) and simulated intestinal fluid in a fed state (FeSSIF-V2) (B). 100% corresponding to the initial rate of encapsulation (n=3; data are shown as mean±S.D.).

3.6 Cellular transport and uptake studies across Caco-2 cell monolayers

Oral bioavailability can also be limited, due to restricted permeability across the intestinal barrier. Consequently, the permeability of Sn38-LNCs was studied across Caco-2 cell monolayers. It is a well-established model to study the intestinal permeability of drugs [22, 44]. After differentiation, Caco-2 cells formed a monolayer of polarized cells which present tight junctions and active transporters such as the P-glycoprotein [22, 23, 44, 45]. Sn38 transport across the Caco-2 cells was evaluated using different dispersions of Sn38 during 6h. The apparent permeability of free Sn38 was $0.31 \pm 0.02 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and remained stable during 6h. When Sn38 was encapsulated in LNCs, an enhancement of transport of Sn38 was observed (figure 6A). At 2h, the apparent permeability was $1.63 \pm 0.56 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and increased to $5.69 \pm 0.87 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ at 6h. Thus, LNCs noticeably improved Sn38 transport across Caco-2 cell monolayers.

Moreover, an increase by a factor 2 of absolute intracellular amounts of Sn38 was observed (figure 6B). Uptake of Sn38 was previously demonstrated [46-48] but it was variable and responsible of severe diarrhea observed in patients treated with CPT-11. Thus, encapsulation in LNCs could solve these two limitations.

Furthermore, Sn38 is actively transported by P-glycoprotein [46, 49, 50]. So, enhancement of Sn38 uptake could be explained by the capacity of LNCs to inhibit the P-gp. Indeed, our group demonstrated that LNCs could inhibit the activity of P-gp [51, 52] due to the presence of Solutol® in their shell [53, 54].

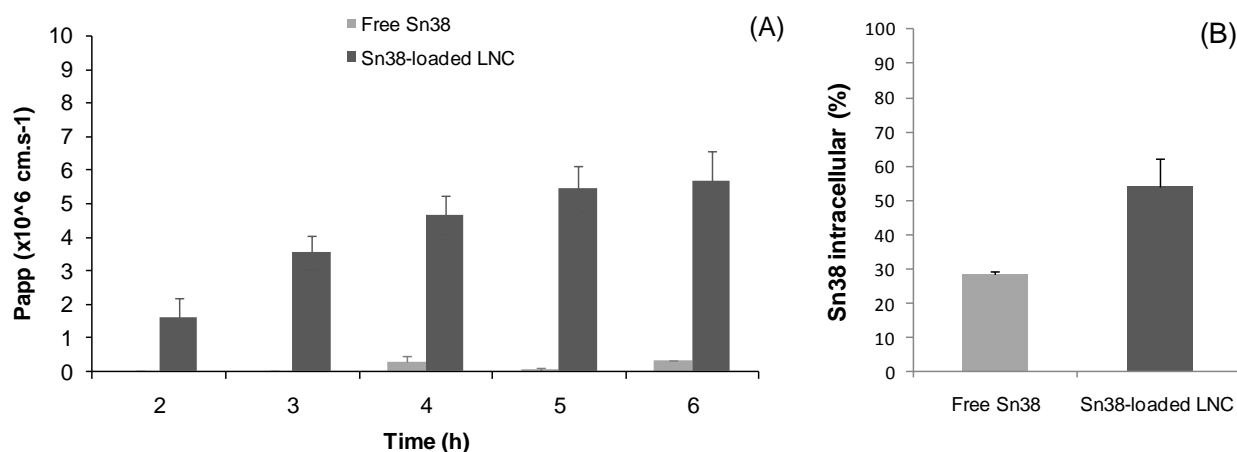


Figure 6: Variation of apparent permeability coefficients and intracellular uptake of Sn38 after 6h of incubation with free Sn38 and Sn38-loaded LNCs. (A) Variation of apparent permeability of Sn38 for 6h; (B) Percentage value indicates the intracellular quantities of Sn38 (%), Initial concentration of Sn38 was considered as 100% of Sn38 intracellular (n=4; data are showed as mean±SD, “*” are displayed for series significant different from control, $p < 0.05$ — student *t*-test).

3.7 *In vitro* cytotoxicity

CPT-11 is actually used in the treatment of current metastatic colorectal cancer; consequently, Sn38 alone, Sn38-LNCs and blank-LNCs cytotoxicities were evaluated *in vitro* on HT-29 cells (human colon cancer cell line). The IC-50 for free Sn38 and Sn38-LNCs were below $0.1 \mu\text{M}$. Cell survival curves were not significantly different between Sn38 in solution and Sn38-loaded LNCs (figure7), showing that activity of the drug was totally recovered *in vitro* after encapsulation. Moreover, these *in vitro* cytotoxicity results were comparable to the data of Sn38 in solution previously reported [55]. Thus, Sn38-LNCs were approximately 250-fold more cytotoxic than CPT-11 [8]. Finally, Sn38-LNCs demonstrated cytotoxic activity on HT-29 cells higher than blank-LNCs, which means that the observed toxicity was related to the anticancer drug and not to the nanocarriers themselves.

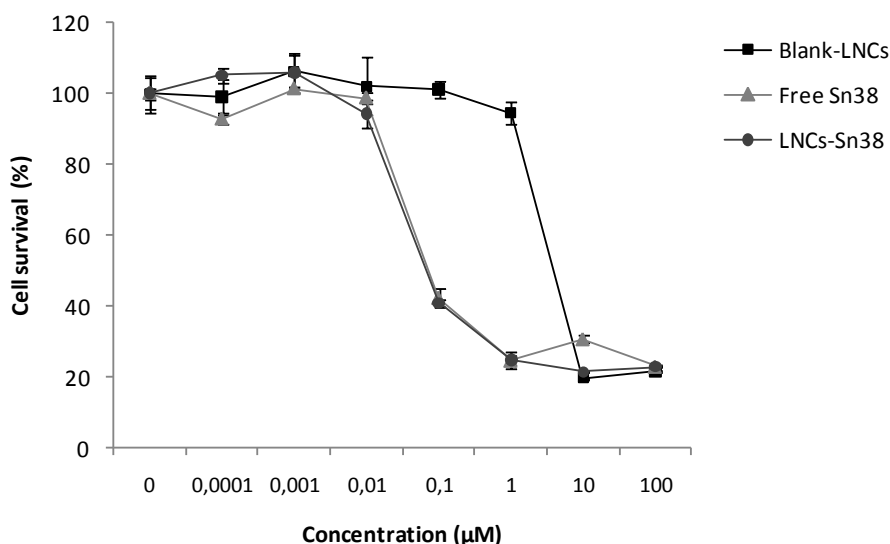


Figure 7: Effect of Sn38, Sn38-loaded LNCs and blank-LNCs on cellular cytotoxicity of HT-29 cells after 72h of incubation and at concentrations between 0 and 100µM. The cytotoxicity was determined by the MTS assay (n=3; data are shown as mean±S.D.).

4. Conclusion

Using Transcutol[®] as a co-surfactant, Labrafil[®] as part of the oily phase and the pH dependent solubility of Sn38, Sn38-loaded LNCs were obtained by the phase inversion temperature method with a size and drug payload potentially compatible with clinical use. The cytotoxicity of Sn38-loaded LNCs is comparable to free Sn38 which is more potent than irinotecan. Therefore, this formulation can deliver Sn38 directly without enzyme conversion and it thus may be more efficient than irinotecan. These carriers presented also an attractive stability in gastrointestinal fluids and improved the transepithelial transport of Sn38. Consequently, these nanocarriers are promising for oral delivery of Sn38. The next objective is to evaluate the potential of these LNCs *in vivo* after oral administration.

Acknowledgment

Emilie Roger was a fellow from Ethypharm supported by “Association National recherche technologie” (ANRT) (41, boulevard des Capucines, 75002 Paris, France).

References

1. Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 1989 Sep 15;49(18):5077-5082.
2. Hsiang YH, Liu LF. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 1988 Apr 1;48(7):1722-1726.
3. Hsiang YH, Liu LF, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Manikumar G, et al. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res* 1989 Aug 15;49(16):4385-4389.
4. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991 Aug 15;51(16):4187-4191.
5. Rothenberg ML, Kuhn JG, Burris HA, 3rd, Nelson J, Eckardt JR, Tristan-Morales M, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. *J Clin Oncol* 1993 Nov;11(11):2194-2204.
6. Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreau P, Fretigny E, et al. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 1999 May;80(3-4):364-370.
7. Matsumura Y. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 May 22;60(8):899-914.
8. Peng CL, Lai PS, Lin FH, Yueh-Hsiu Wu S, Shieh MJ. Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an HT-29 human colon cancer xenograft model using SN-38-loaded chlorin-core star block copolymer micelles. *Biomaterials* 2009 Jul;30(21):3614-3625.
9. Koizumi F, Kitagawa M, Negishi T, Onda T, Matsumoto S, Hamaguchi T, et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* 2006 Oct 15;66(20):10048-10056.
10. Nakajima TE, Yanagihara K, Takigahira M, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, et al. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res* 2008 Nov 15;68(22):9318-9322.
11. Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, Horiguchi A, Ito K, Asano T, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008 Mar 15;68(6):1631-1635.
12. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. *Int J Pharm* 2004 Feb 11;270(1-2):93-107.
13. Sadzuka Y, Takabe H, Sonobe T. Liposomalization of SN-38 as active metabolite of CPT-11. *J Control Release* 2005 Nov 28;108(2-3):453-459.

14. Lei S, Chien PY, Sheikh S, Zhang A, Ali S, Ahmad I. Enhanced therapeutic efficacy of a novel liposome-based formulation of SN-38 against human tumor models in SCID mice. *Anticancer Drugs* 2004 Sep;15(8):773-778.
15. Peikov V, Ugwu S, Parmar M, Zhang A, Ahmad I. pH-dependent association of SN-38 with lipid bilayers of a novel liposomal formulation. *Int J Pharm* 2005 Aug 11;299(1-2):92-99.
16. Williams J, Lansdown R, Sweitzer R, Romanowski M, LaBell R, Ramaswami R, et al. Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *J Control Release* 2003 Aug 28;91(1-2):167-172.
17. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997 Jan;15(1):110-115.
18. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002 Jun;19(6):875-880.
19. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
20. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The Gastrointestinal stability of Lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*; In Press, Accepted Manuscript.
21. Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm* 2009 Sep 11;379(2):260-265.
22. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997 Dec;14(12):1655-1658.
23. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Mar 29;175(3):880-885.
24. Larger P, Altamura M, Catalioto RM, Giuliani S, Maggi CA, Valenti C, et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of reference pharmaceuticals as a method for the characterization of the Caco-2 cell monolayer absorption properties. *Anal Chem* 2002 Oct 15;74(20):5273-5281.
25. Kolhatkar RB, Swaan P, Ghandehari H. Potential oral delivery of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly(amidoamine) dendrimers. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1723-1729.
26. Lacoeyille F, Hindre F, Moal F, Roux J, Passirani C, Couturier O, et al. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 2007 Nov 1;344(1-2):143-149.
27. Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 2004 Jul 8;278(2):407-414.
28. Allard E, Passirani C, Garcion E, Pigeon P, Vessieres A, Jaouen G, et al. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 2008 Sep 10;130(2):146-153.

29. Lamprecht A, Bouligand Y, Benoit JP. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *J Control Release* 2002 Nov 7;84(1-2):59-68.
30. Cirri M, Mura P, Mora PC. Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems. *Int J Pharm* 2007 Aug 1;340(1-2):84-91.
31. Hong J-Y, Kim J-K, Song Y-K, Park J-S, Kim C-K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption. *Journal of Controlled Release* 2006;110(2):332-338.
32. Woo JS, Kim TS, Park JH, Chi SC. Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Arch Pharm Res* 2007 Jan;30(1):82-89.
33. Beduneau A, Saulnier P, Hindre F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 2007 Nov;28(33):4978-4990.
34. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, et al. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 1989 Mar;32(3):715-720.
35. Zufia L, Aldaz A, Giraldez J. Separation methods for camptothecin and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 Nov 25;764(1-2):141-159.
36. Roger E, Lagarce F, Garcion E, Benoit JP. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 2009 Aug 20.
37. Ragot S, Marquet P, Lachatre F, Rousseau A, Lacassie E, Gaulier JM, et al. Sensitive determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human serum using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999 Dec 24;736(1-2):175-184.
38. de Bruijn P, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997;698(1-2):277-285.
39. Dulieu C, Bazile D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm Res* 2005 Feb;22(2):285-292.
40. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1663-1676.
41. Jantratid E, Janssen N, Chokshi H, Tang K, Dressman JB. Designing biorelevant dissolution tests for lipid formulations: case example--lipid suspension of RZ-50. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Jun;69(2):776-785.
42. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res* 1998 Jan;15(1):11-22.
43. US Pharmacopeia XXIV. Rockville, MD, 2006.
44. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today* 2005 Mar 1;10(5):335-343.

45. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990 Sep;7(9):902-910.
46. Itoh T, Itagaki S, Sumi Y, Hirano T, Takemoto I, Iseki K. Uptake of irinotecan metabolite SN-38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005 May;55(5):420-424.
47. Kobayashi K, Ceryak S, Matsuzaki Y, Kudoh S, Bouscarel B. Effect of bile acids on the uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Biochim Biophys Acta* 2001 Feb 16;1525(1-2):125-129.
48. Kobayashi K, Bouscarel B, Matsuzaki Y, Ceryak S, Kudoh S, Fromm H. pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Int J Cancer* 1999 Nov 12;83(4):491-496.
49. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):39-54.
50. Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. *Eur J Pharm Sci* 2008 Dec 24.
51. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1710-1722.
52. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* 2006 May 15;112(2):208-213.
53. Buckingham LE, Balasubramanian M, Safa AR, Shah H, Komarov P, Emanuele RM, et al. Reversal of multi-drug resistance in vitro by fatty acid-PEG-fatty acid diesters. *Int J Cancer* 1996 Jan 3;65(1):74-79.
54. Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res* 1991 Feb 1;51(3):897-902.
55. Lavelle EC, Sharif S, Thomas NW, Holland J, Davis SS. The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;18(1):5-22.

Chapitre 3 :

Evaluation *in vivo* des LNCs de Sn38

Evaluation in vivo des LNCs de Sn38

RATIONNEL

Précédemment, une formulation de LNCs encapsulant du Sn38 (LNCs-Sn38) a été mise au point et les résultats de perméabilité et de stabilité gastro-intestinale obtenus *in vitro* permettent d'envisager une administration orale de ces nanoparticules. De plus, l'étude de toxicité cellulaire des LNCs-Sn38 sur les cellules HT-29 a démontré une activité 250 fois supérieure à l'irinotécan, molécule actuellement administrée.

L'expérimentation animale est souvent désignée comme la phase préclinique du développement d'un médicament. Les expérimentations animales permettent de déterminer la dose de médicament, les concentrations plasmatiques et les effets bénéfiques et toxiques [1].

L'irinotécan qui est la prodrogue du Sn38, est utilisé dans le traitement du cancer du colon. Un modèle humain de cette pathologie a donc été mis en place pour tester l'efficacité des LNCs-Sn38. Un travail bibliographique sur les différentes études menées avec l'irinotécan ou le Sn38 nous a orienté vers les cellules HT-29. Ce sont des cellules humaines de l'adénocarcinome du colon, par conséquent, un modèle animal immunodéficient a été utilisé (souris nudes), permettant ainsi de développer des tumeurs humaines avec toutes leurs caractéristiques (histologie, expression d'antigènes de surface, anomalies chromosomiques...) [2].

OBJECTIF

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, d'évaluer la toxicité de ces nanoparticules *in vivo*. Ensuite, l'activité antitumorale des LNCs-Sn38 a été étudiée après administration par voie orale mais également intraveineuse et intratumorale.

RESULTATS

Les LNCs administrées par voie orale ne se sont pas révélées toxiques. Dans les groupes contrôles où les LNCs étaient administrées par voie IV, une toxicité des LNCs chargées en Sn38 a été observée contrairement aux LNCs blanches. Enfin, une activité antitumorale de courte durée a été observée après administration des LNCs-Sn38 par voies orale, IV et intratumorale.

1. Introduction

Dans la littérature plusieurs schémas d'administration de l'irinotécan sont utilisés lors des études *in vivo* chez la souris (table 1). Des études ont montré que son efficacité antitumorale est dépendante du schéma d'administration [3, 4].

Nous avons donc choisi d'administrer les différents traitements pendant 5 jours de suite et de tester différents cycles de traitement. En effet, ce protocole suit un schéma d'administration répandu (Table 1). De plus, des études cliniques de phase I d'administration orale d'irinotécan ont été réalisées chez l'homme avec le schéma d'administration suivant : traitement 5 jours consécutifs pendant 3 semaines [5-8].

Dans un premier temps la toxicité des LNCs a été étudiée par voie orale. Le volume maximal à administrer en 1 fois chez la souris (environ 1 mL [20]) a été testé. Ensuite, l'efficacité antitumorale des LNCs de Sn38 a été évaluée sur un modèle tumoral HT-29 chez la souris nude. La dose maximale de 200mg/kg d'irinotécan par semaine a été retenue pour le groupe témoin positif traité avec la formulation Campto®. Les études ont d'abord été réalisées avec une administration orale des LNCs-Sn38. Afin de comprendre les résultats obtenus au cours des études *per os*, des études avec un traitement par voie intraveineuses et intratumorale ont été réalisées.

Modèle tumoral	Protocole adm.	Voie adm.	Formulation testée	Concentration totale administrée	Réf.
HT-29, Capan-1, MX-1	J0 ou 5jrs de suite	IV	Liposomes de Sn38	10, 20 et 40mg Kg de Sn38	[9, 10]
			CPT-11	10, 20 et 40mg /Kg d'irinotécan	
HT-29	J0, J4, J8	IV	Micelles de Sn38	22.5, 45 et 90mg/Kg de Sn38	[11]
			CPT-11	200mg/Kg d'irinotécan	
Renca, SKRC-49	J0, J4 et J8	IV	Micelles de Sn38	60mg/Kg de Sn38	[12]
			CPT-11	90mg/Kg d'irinotécan	
HT-29, HCT 116	J0, J4, J8	IV	Micelles de Sn38	15 et 30mg/Kg de Sn38	[13, 14]
			CPT-11	15 et 30mg/Kg d'irinotécan	
HT-29	J0, J3, J7, J10	IV	Nanoparticules de Sn38	1.5mg et 1.98mg/souris de Sn38	[15]
			CPT-11	3.6mg et 9mg/souris d'irinotécan	
IGRM11, GRM13, IGRM21, IGRM33	5jrs de suite, 1sem. ou 4sem.	IV	CPT-11	135 et 200mg/Kg d'irinotécan	[16]
Colon 29, COLO 320DM	J0, J4, J7	IV	Liposomes de CPT-11	30 et 60mg/Kg d'irinotécan	[17]
			CPT-11	180mg /Kg d'irinotécan	
HT-29	J0, J7, J14, J21	IV	CPT-11	200mg/Kg d'irinotécan	[18]
NB-1771	5jrs de suite, 2 ou 4sem. consécutives	VO	CPT-11	125 et 250mg/Kg/sem. d'irinotécan	[4]
MX-1	10jrs de suite	VO	CPT-11	100mg/Kg d'irinotécan	[19]

Table 1 : Synthèse des études d'efficacité *in vivo* de formulation de CPT-11 ou Sn38. (Adm. : administration, Capan-1=cellules humaines de carcinome pancréatique ; MX-1= cellules humaines du cancer du sein ; P388=leucémie, IGRM11, IGRM13, IGRM21, IGRM33= cellules de medulloblastome ; HT-29, COLO 320DM, HCT116=cellules humaines de carcinome du colon ; Renca, SKTC=cellules humaines de carcinome rénal, NB-1771, TNB9= cellules de neuroblastome).

2. Matériels et méthodes

2.1 Animaux utilisés

Des souris swiss nudes femelles âgées de 7 à 9 semaines (14 à 23g) ont été utilisées pour les expériences *in vivo* (Laboratoire Charles River, L'Arbresle, France). Les soins des animaux ont été effectués selon les réglementations strictes du ministère de l'agriculture français.

2.2 Etude de toxicité

Les souris ont été pesées individuellement au début de l'expérience (J0). Entre les jours 0 et 5, les souris ont été gavées avec des LNCs-Sn38 ou des LNCs blanches à la concentration de 20mg/Kg/j soit un volume de gavage d'environ 1mL (correspondant au volume maximal à administrer en 1 fois chez la souris [20]). Les souris ont été observées pendant la période de l'étude : mortalité, signes cliniques de toxicité (par exemple, diminution de l'activité, déshydratation). Le poids des souris a été mesuré. Pour les animaux présentant des signes cliniques ou une perte de poids supérieur à 25%, le traitement était considéré comme toxique et les souris euthanasiées.

2.3 Implantation du modèle tumorale

La culture des cellules HT-29 est décrite dans le chapitre 2, partie II. Les cellules HT-29 sont repiquées lorsqu'une confluence de 60% est atteinte puis injectées en sous-cutanée sur le flanc droit des souris à la densité de 1.10^6 cellules (cellules reprises dans 100 μ l d'HBSS). La longueur (a) et la largeur (b) de la tumeur sont mesurées avec un pied à coulisse IP66 Coolant Proof Caliper (Mitutoyo corporation, Kawasaki-Shi, Japan). Le volume tumoral est calculé selon la formule suivante : $TV=(a \times b^2)/2$. Quand la tumeur atteint un volume tumoral compris entre 70 et 170mm³, les souris sont réparties au hasard dans les différents groupes et l'étude est débutée (J0).

2.4 Etudes d'efficacité antitumorale : protocoles d'administration

Les formulations de LNCs-Sn38 utilisées sont préparées le jour même ou la veille de l'étude *in vivo*. Chaque étude est composée d'un groupe témoin traité avec de l'irinotécan

(molécule actuellement commercialisée) : Campto®100mg/5ml (Pfizer, Nerviano, Italie) dilué au tiers dans une solution NaCl à 9%.

Pour les études par voie intraveineuse, les souris sont anesthésiées à l’Isoflurane (5%) puis placées sous un masque diffusant 1 à 1.5% d’isoflurane pendant la durée de l’injection. L’injection est réalisée au niveau de la veine caudale de la queue des souris. Tout au long des études, le poids des souris et le volume tumoral ont été mesurés régulièrement. Les souris ont été sacrifiées à J21±4, date à laquelle le volume tumoral est supérieur à 1000mm³. Au total, 6 études ont été réalisées. Pour chaque étude, le protocole d’administration a été schématisé : voie, formulation, dose administrée, durée.

Etude 1 : LNCs-Sn38 VO vs Campto® VO ou IV

Dans cette première étude, l’effet antitumorale des LNCs-Sn38 par voie orale a été recherché et comparé au traitement IV actuellement administré en clinique.

Cette expérience a été réalisée sur 5 groupes : 2 groupes traités par voie orale avec les LNCs-Sn38, un groupe témoin négatif qui n’a pas reçu de traitement et un groupe témoin positif qui a reçu le traitement commercial par voie IV (Figure 1).

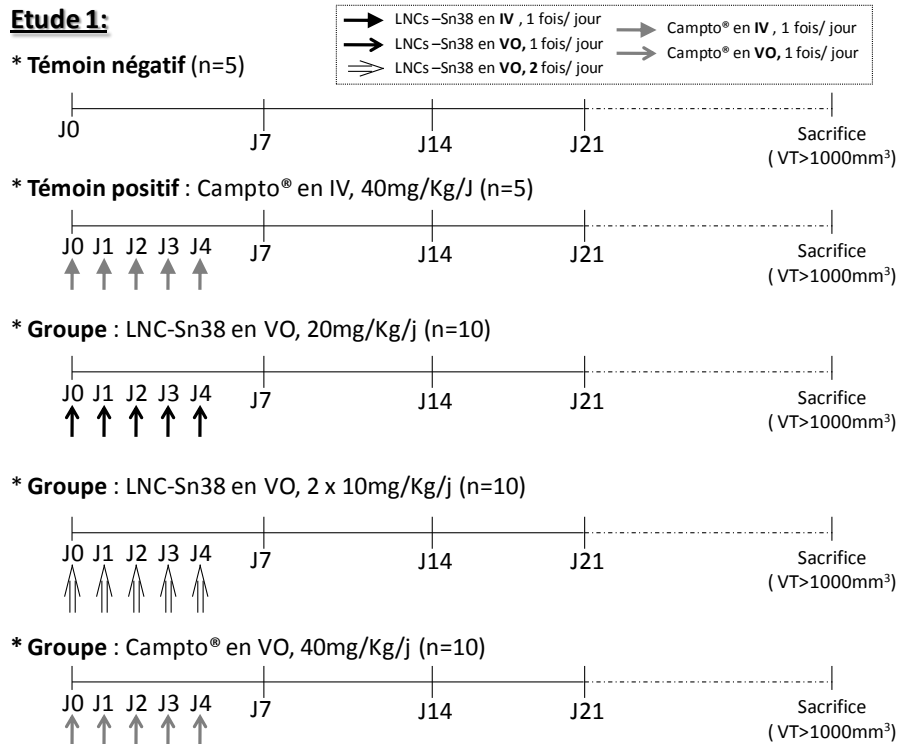


Figure 1: Schéma d’administration de l’étude *in vivo* n°1.

Etude 2 : LNCs Sn38 avec 1 ou 4 cycles de traitement en VO vs IV

Dans cette 2^{ème} expérience, l'administration des LNCs Sn38 par voie orale a été étudiée avec plusieurs cycles de traitement. Ces mêmes traitements ont également été administrés par voie intraveineuse (Figure 2).

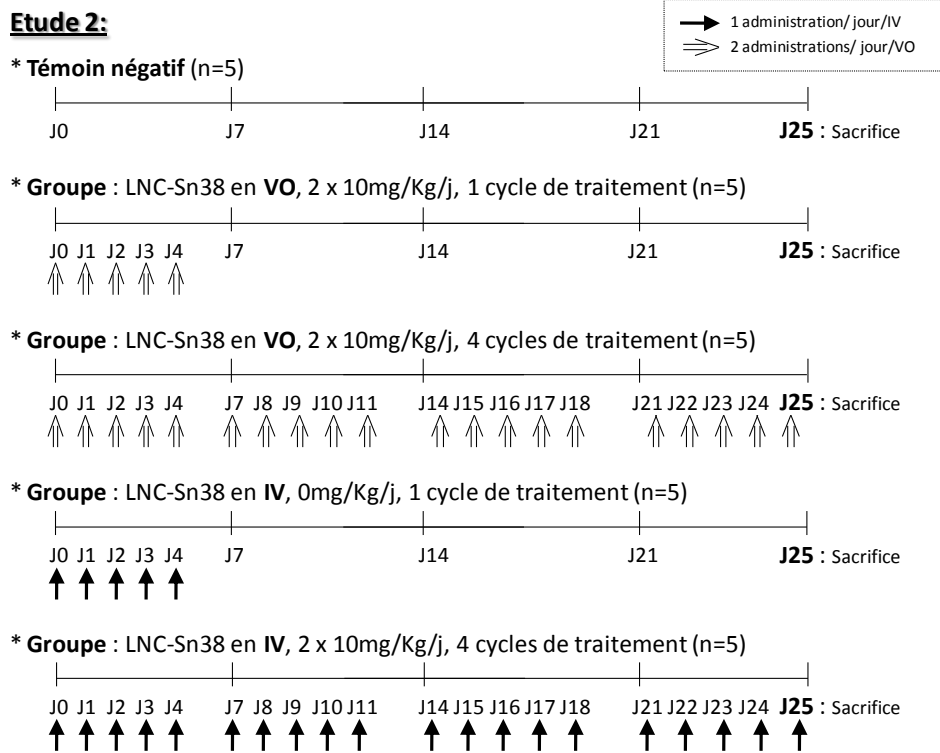


Figure 2: Schéma d'administration des 5 groupes de l'étude *in vivo* n°2.

Etude 3 : LNCs-Sn38 vs Campto® en IT

Dans cette étude l'efficacité des LNCs-Sn38 ou de la Campto® injectés directement en intratumoral a été comparée au groupe sans traitement.

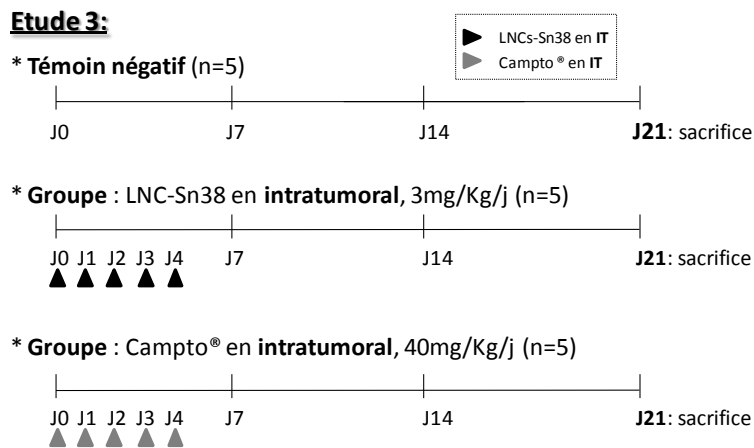


Figure 3: Schéma d'administration de l'étude *in vivo* n°3.

Etude 4 : LNCs Sn38, LNCs blanches, Campto® en IV

A partir de cette étude, l'efficacité des LNCs-Sn38 a été étudiée par voie IV avec plusieurs protocoles d'administration. Cette étude a comparé les LNCs-Sn38, au traitement actuellement administré en clinique (campto®). Un effet des LNCs blanches a également été recherché. Quatre groupes ont donc composé cette étude (Figure 4).

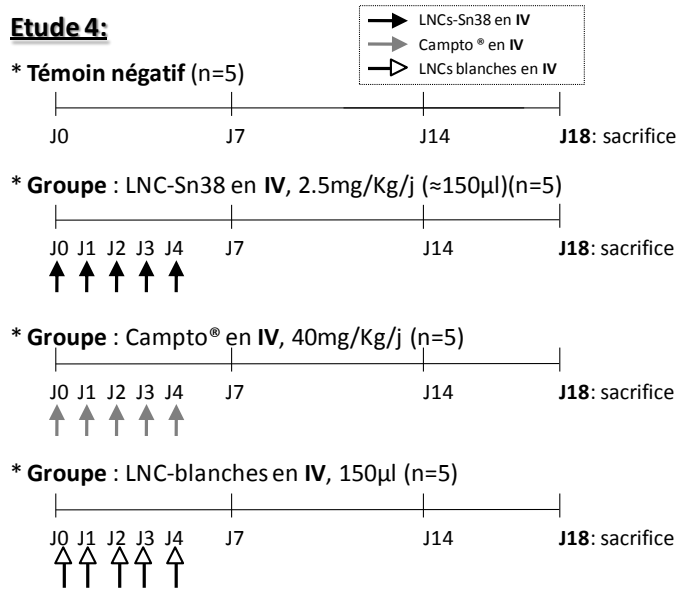


Figure 4: Schéma d'administration de l'étude *in vivo* n°4.

Etude 5 : LNCs-Sn38 vs Campto® à 2 concentrations en IV

Au cours de cette étude, la concentration administrée en Sn38 avec la formulation LNCs-Sn38 a été doublée à 5mg/Kg/j par rapport à la concentration précédente. Deux concentrations de Campto® (40mg/kg/j et 2mg/Kg/j) ont été testées afin de situer l'efficacité des LNCs-Sn38 par rapport cette concentration. L'étude a été réalisée sur 3 groupes (Figure 5).

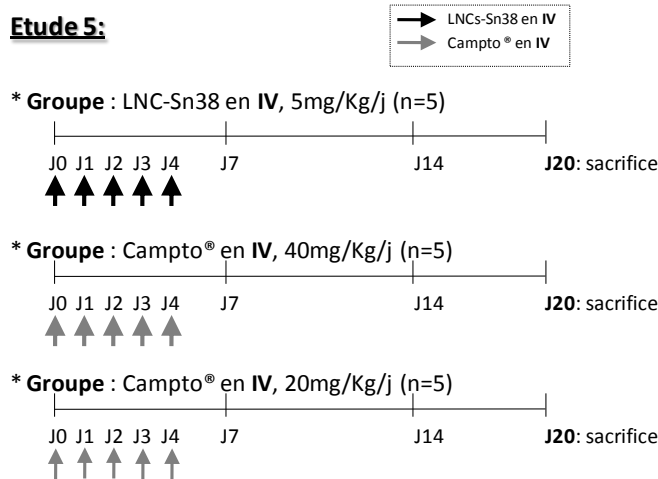


Figure 5: Schéma d'administration de l'étude *in vivo* n°5.

Etude 6 : LNCs Sn38 en IV à différentes doses

Pour cette dernière étude, 3 doses de LNCs-Sn38 ont été administrées par voie intraveineuse : 2.7, 5.4 et 10 mg/kg/j et comparées à la concentration clinique d'irinotécan (40/mg/kg/j).

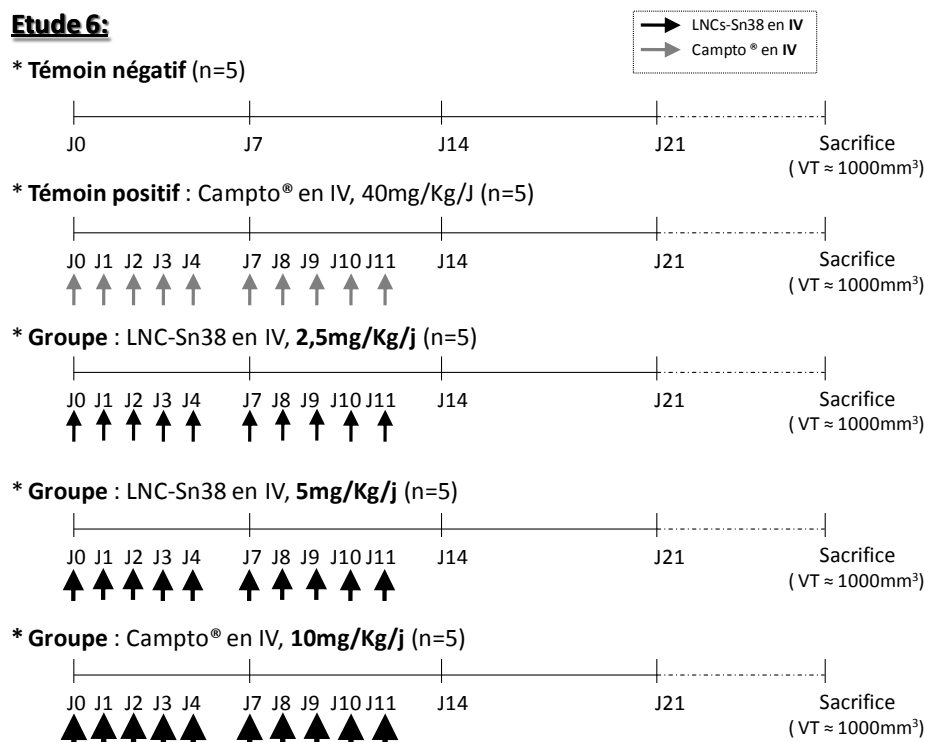


Figure 6 : Schéma d'administration de l'étude *in vivo* n°6.

3. Résultat

3.1 Etude de la toxicité après administration orale

Une perte de poids de 4.9% et de 4.3% est observée jusqu'au jour 5 pour les souris traitées avec des LNCs-Sn38 ou les LNCs blanches respectivement. Le poids initial est retrouvé pour les 2 groupes 4 jours après la fin du traitement (J9), et les animaux prennent ensuite du poids : plus 3.4% et 4.2% pour les souris traitées avec des LNCs-Sn38 ou LNCs blanches, respectivement au jour 15. Dans les 2 groupes, les animaux n'ont pas montré de symptômes cliniques de toxicité.

3.2 Etudes d'efficacité antitumorale

Etude 1 : LNCs-Sn38 VO vs Campto® VO ou IV

Deux souris du groupe LNCs-SN38 gavées 2 fois par jour, 3 souris du groupe LNCs-Sn38 gavées une fois par jour et une souris injectée avec de l'irinotécan sont mortes.

Une diminution du volume tumoral est observée dans les groupes traités avec du CPT-11 par voie IV ou orale. Cette régression tumorale n'est pas significativement différente entre les 2 voies d'administration.

Le volume tumoral des souris traitées avec 20 mg/kg/j de LNCs-Sn38 (soit LNCs-Sn38 VO x1) ne diffère pas significativement du groupe témoin n'ayant pas reçu de traitement (figure 7).

La figure 7C est un grossissement des 7 premiers jours de l'étude des courbes de croissance des 5 groupes. Une augmentation du volume tumoral plus lente pour les souris traitées avec les LNCs est observée au début du traitement. En effet, avec ce traitement à J2 une faible augmentation (significativement différente des autres groupes ($P < 0.05$)) est observée. A J4, le volume tumoral pour le groupe LNCs-Sn38 x2 augmente mais diffère toujours du groupe témoin et du groupe traité par voie intraveineuse avec du CPT-11. En revanche, il n'y a plus de différence significative avec le groupe traité avec du CPT-11 par voie orale. A partir du jour 7, le volume tumoral du groupe LNCs-SN38 x2 n'est plus différent des autres groupes. Une augmentation du volume tumoral est observée pendant la suite de l'étude avec ce groupe et le groupe témoin sans traitement alors qu'une diminution est observée pour les groupes traités avec du CPT-11.

Le traitement LNCs-Sn38 à la dose de 20mg/kg/j de Sn38 n'est donc pas efficace malgré un effet d'inhibition ou de retard de croissance de la tumeur au tout début du traitement.

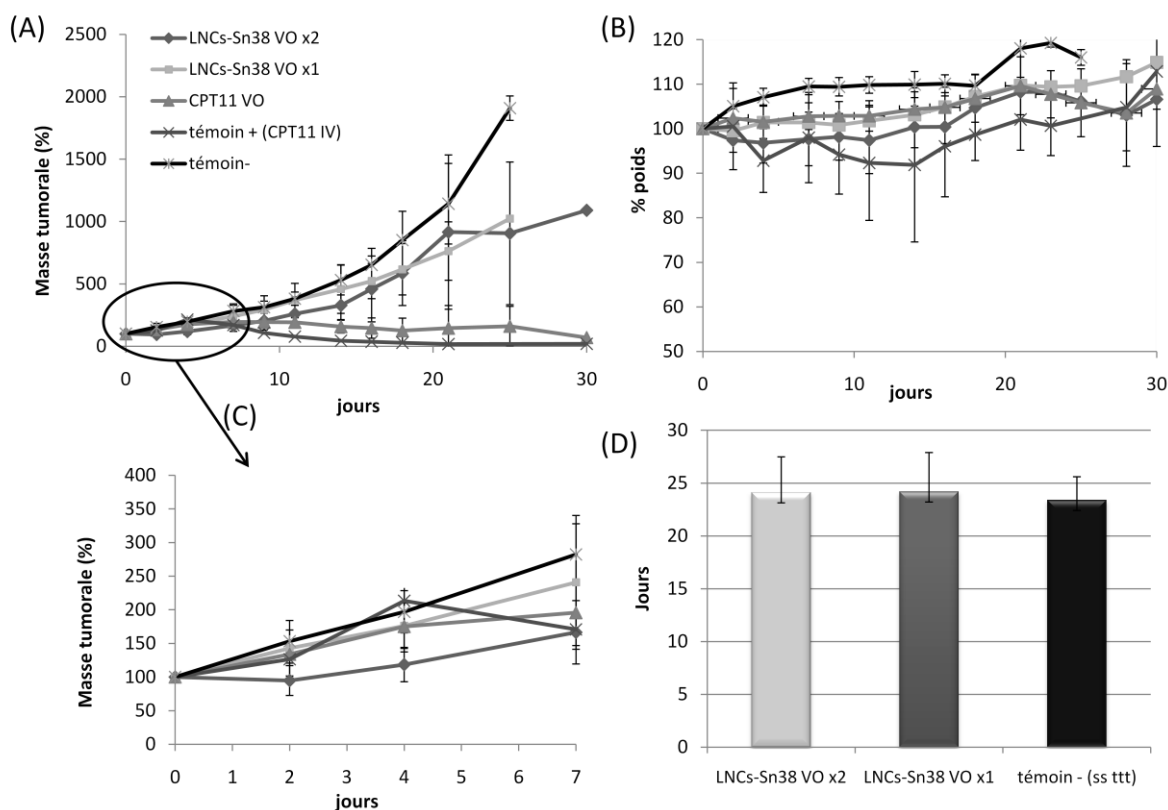


Figure 7 : Activité antitumorale des LNCs-Sn38 par voie orale et du CPT-11 par voie orale et IV sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) et (C) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) suivi du poids des souris (100% correspond au poids initial à J0). (C) grossissement de J0 à J7 pour les groupes LNCs-Sn38 (VO x2), CPT11 VO et CPT11 IV. (D) Durée pour atteindre un volume tumoral de 1000mm^3 pour le groupe témoin et les groupes LNCs-Sn38 VO administré en 1 et 2 fois.

Etude 2 : LNCs Sn38 avec 1 ou 4 cycles de traitement en VO vs IV

Trois souris du groupe LNCs-Sn38 gavées 2 fois par jour pendant 1 semaine, deux souris du groupe LNCs-Sn38 gavées 2 fois par jour pendant 4 semaines et une souris injectée avec de l'irinotécan sont mortes au cours de cette étude.

Une diminution du volume tumoral est observé pour les groupes traités avec du CPT-11 par voir IV (Figure 8A). Dans le groupe irinotécan traité pendant 1 semaine, une reprise de l'accroissement tumoral est observée environ 10 jours après la fin du traitement. Cette reprise est confirmée par le poids des tumeurs à J25 puisque le poids des tumeurs des souris traitées pendant 1 semaine ($0.074 \pm 0.033\text{g}$) est significativement supérieur à celui des souris traitées pendant 4 semaines ($0.002 \pm 0.003\text{g}$). Une diminution du poids des souris est observé dans le groupe traité pendant 4 semaines avec du CPT-11 (Figure 8B).

Comme dans l'étude précédente, à partir du 4^{ème} jour, les souris traitées avec la formulation de LNCs-Sn38 présentent un accroissement tumoral semblable au groupe

témoin sans traitement. A J25, le poids de la tumeur n'est pas significativement différent entre le groupe traité pendant 1 cycle et le groupe traité pendant 4 cycles. Ces groupes traités avec des LNCs-Sn38 ne diffèrent pas du groupe témoin non traité.

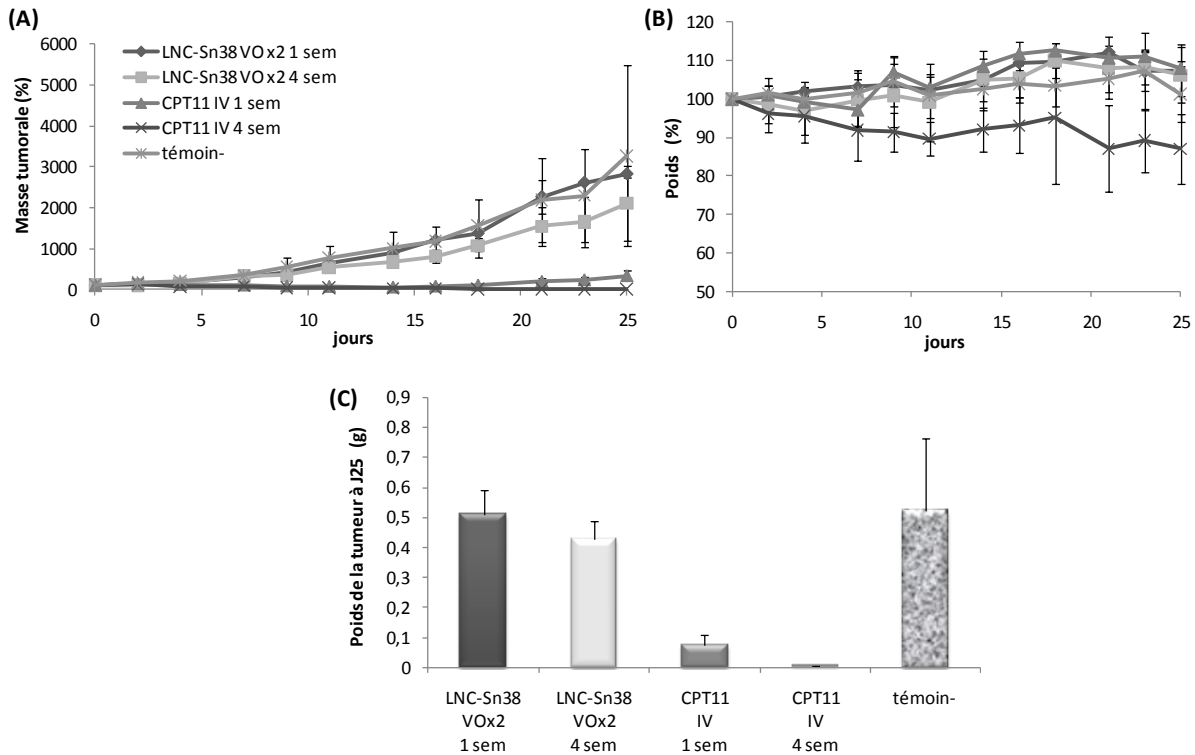


Figure 8 : Activité antitumorale des LNCs-Sn38 par voie orale et du CPT-11 par voie IV sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) suivi du poids des souris (100% correspond au poids initial à J0) et (C) représente le poids des tumeurs prélevées après euthanasie des souris à J25.

Etude 3 : LNCs-Sn38 vs Campto® en IT

A partir de J7, une régression tumorale significative ($P > 0,05$) est observée pour les 2 groupes traités par voie intratumorale par rapport au groupe témoin sans traitement (Figure 9A). Il n'y a pas de différence significative entre le groupe traité avec de l'irinotécan et celui traité avec des LNCs-Sn38. A partir de J12, le volume tumoral des souris traitées avec des LNCs-Sn38 augmente, et diffère significativement du groupe traité avec de l'irinotécan. De J12 à J21, la croissance tumorale du groupe LNCs-Sn38 augmente mais reste significativement inférieure au groupe témoin sans traitement. A J21, le volume tumoral du groupe LNCs-Sn38 n'est plus significativement différent du groupe témoin sans traitement, mais l'écart type du groupe témoin à J21 est très important. Le suivi du poids des souris ne montre pas de différence significative entre le 3 groupes (Figure 9A).

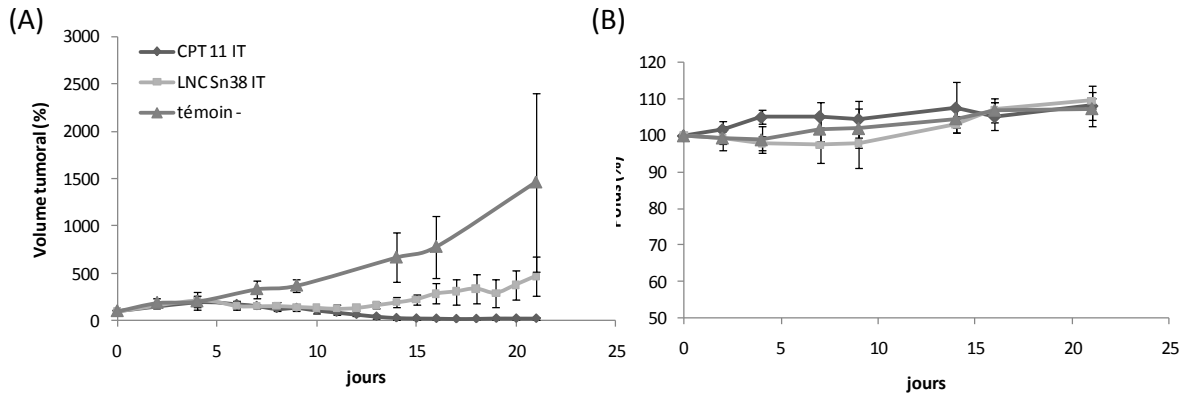


Figure 9 : Activité antitumorale des LNCs-Sn38 et du CPT-11 par voie intratumorale sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) suivi du poids des souris (100% correspond au poids initial à J0).

Etude 4 : LNCs Sn38, LNCs blanches, Campto® en IV

Une augmentation du volume tumoral est observée dans les 4 groupes jusqu'à J10. A partir de J10, une diminution du volume tumoral est observée chez les souris traitées par le CPT-11. A J18 cette régression est évaluée à 17%. En revanche, dans les 3 autres groupes le volume tumoral augmente jusqu'à J18 pour atteindre un volume supérieur à 500% du volume tumoral initial (figure 10A). LNCs blanches et les LNCs-Sn38 n'ont donc pas d'effet inhibiteur sur la croissance tumorale. Dans le groupe témoin négatif (sans traitement), LNCs blanches et LNCs-Sn38, aucune perte de poids n'est observée alors que dans le groupe traité avec du CPT-11, une perte de poids significative est observée dès J1. Les souris retrouvent ensuite leurs poids initiaux à partir de J14 (figure 10B).

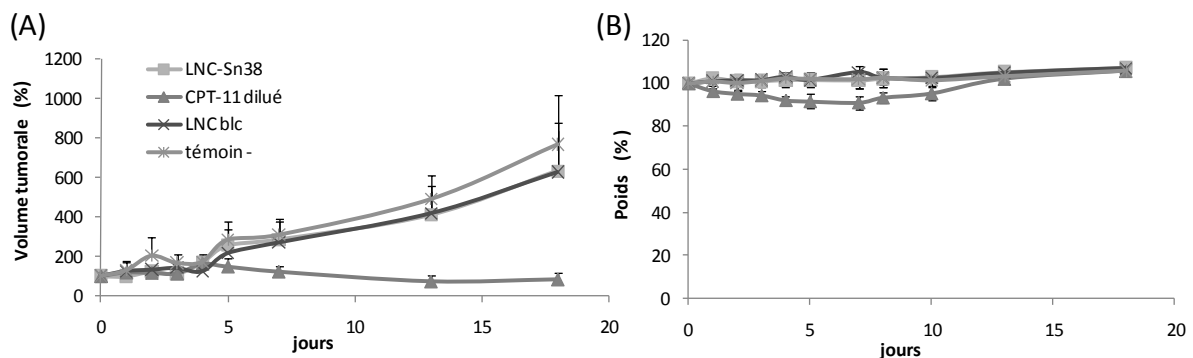


Figure 10 : Effet des LNCs-Sn38 et du CPT-11 par voie IV sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) suivi du poids des souris (100% correspond au poids initial à J0).

Etude 5 : LNCs-Sn38 vs Campto® à 2 concentrations en IV

Jusqu'à J15, la croissance tumorale est similaire pour les 3 groupes étudiés. A J20 une différence significative est observée entre le groupe traité avec 5mg/kg/j de LNCs-Sn38 et le groupe traité avec 40mg/kg/j de CPT-11. Ce résultat est confirmé par le poids des tumeurs mesurées à J20 entre ces 2 groupes. En revanche, la croissance tumorale ainsi que le poids des tumeurs sont comparables entre le groupe traité avec les LNCs- Sn38 et le groupe traité avec le CPT-11 à la concentration de 20mg/Kg/j. Enfin, les courbes de poids sont semblables.

Ainsi, en augmentant la dose de LNCs-Sn38 à 5mg/kg/j, l'activité d'inhibition du Sn38 est comparable à un traitement avec de l'irinotécan à la concentration de 20mg/Kg/j. A cette concentration, les LNCs-Sn38 ont toujours une activité d'inhibition inférieure à celle du CPT-11 à la concentration 40mg/kg/ml.

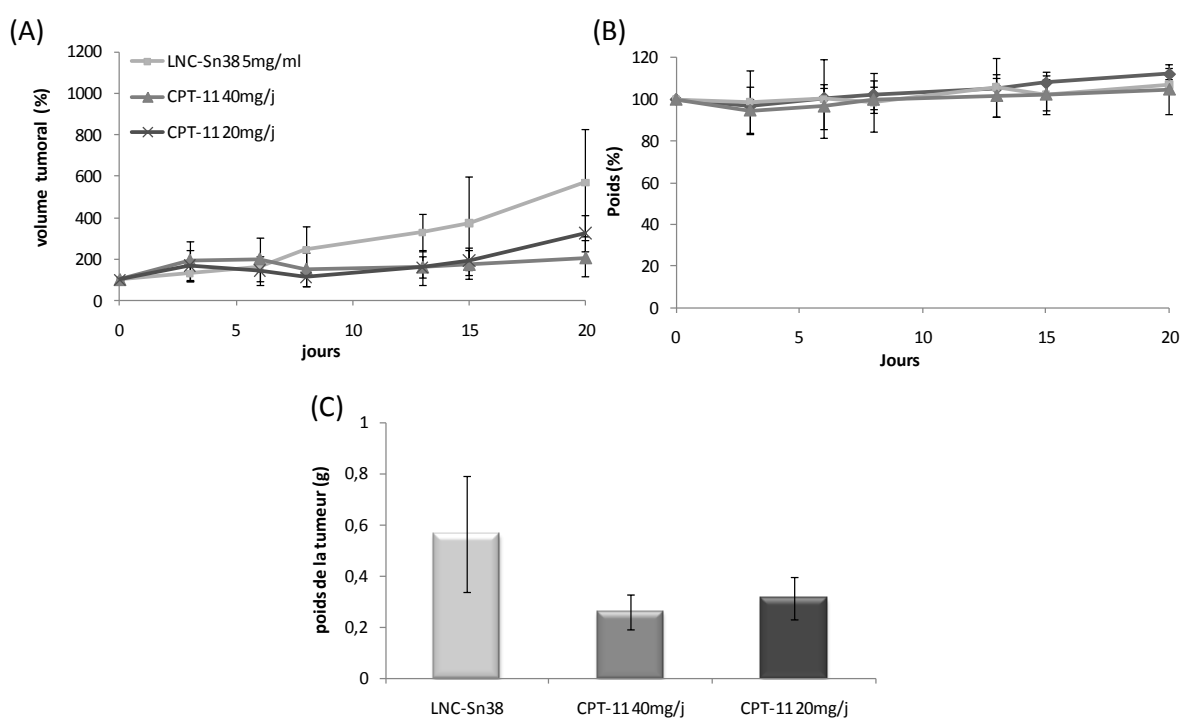


Figure 11 : Activité antitumorale des LNCs-Sn38 et du CPT-11 pour voie IV sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) suivi du poids des souris (100% correspond au poids initial à J0). (C) poids des tumeurs prélevées après euthanasie des souris à J20.

Etude 6 : LNCs Sn38 en IV à différentes doses

A partir de J10, le volume tumoral du groupe témoin (sans traitement) croît plus rapidement que les 4 autres groupes. Si l'on compare les 3 groupes traités avec des LNCs-Sn38, il n'y a pas de différence significative selon la dose administrée. Pour les groupes traités avec 5.4 et 10mg/kg/j, des nécroses au niveau du point d'injection ont été observées laissant supposer une administration déficiente (seringue sortie de la veine pendant l'administration). Enfin, si l'on compare la durée nécessaire pour que la tumeur atteigne un volume tumoral de 1000mm³, aucune différence significative n'est observée entre les 3 groupes traités avec des LNCs-Sn38. L'administration de LNCs-Sn38 ralentie donc l'accroissement tumoral par rapport au témoin sans traitement. En revanche, une durée supérieure à 40jours pour atteindre un volume tumoral de 1000mm³ est observé avec le groupe traité avec du CPT-11. Le traitement par voie IV avec du CPT-11 est donc plus efficace sur la croissance tumorale que les LNCs-Sn38.

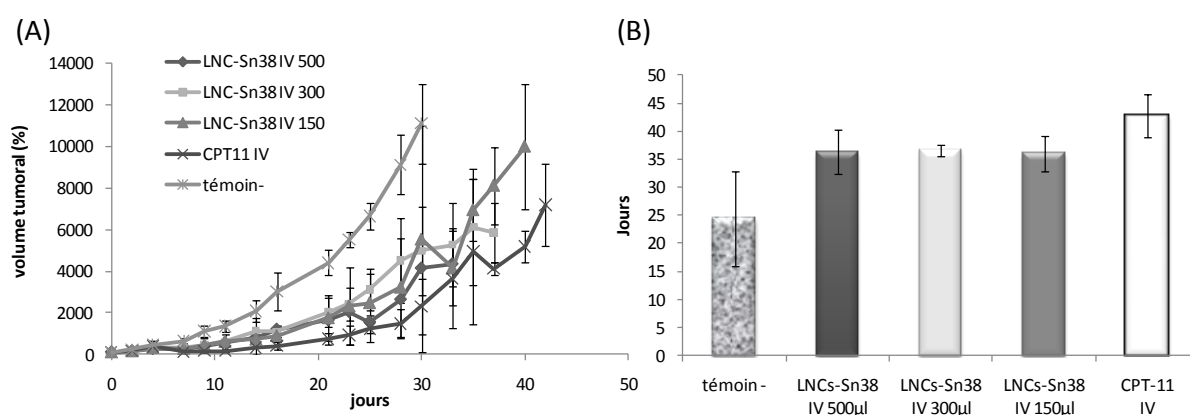


Figure 12 : Effet des LNCs-Sn38 et du CPT-11 par voie IV sur une tumeur sous cutanée induite par des cellules HT-29. (A) Suivi du volume tumoral (100% correspond au volume tumoral initial à J0), (B) jours auxquel les tumeurs ont atteint un volume tumoral de 1000mm³ (euthanasie des souris).

4. Discussion

4.1 Etude de la toxicité après administration orale

Les LNCs-Sn38 et les LNCs blanches (non chargées) sont bien tolérées à la dose maximale d'administration par voie orale. Cette observation peut s'expliquer par la formulation des LNCs qui est composée d'excipients non toxiques aux doses utilisées. En effet, la table 2 compare la DL 50 de chaque excipient donnée par les fabricants ou les agences d'évaluation du médicament et la quantité administrée lors d'une

administration de 1 ml de LNCs par voie orale. Pour tous les excipients, les doses administrées sont inférieures aux DL 50.

Excipients	DL50 (chez le rat) par voie orale	Quantité calculée pour 1mL de LNCs
Transcutol®HP	>5g/Kg	≈ 2.9g/Kg
Labrafil®M1944	≥20ml/kg	≈4.5ml/Kg
Labrafac®	n.d (non toxique par voie intramusculaire)	≈1.7g/Kg
Solutol®HS15	>20g/Kg (même dose chez la souris)	≈4.2g/Kg
Lipoid®S75	n.d	≈0.6g/Kg

Table 2 : DL50 des excipients utilisés pour la formulation des LNCs et calcul des doses de chaque excipient pour l'administration de 1 ml de LNCs par voie orale [21-23]. Le poids moyen des souris est de 23.5±0.8g.

Les LNCs blanches et les LNCs-Sn38 développées, ne présentent donc pas de toxicité lors d'une administration orale répétée. Le travail d'évaluation de ces particules a alors été poursuivi par des études d'efficacité antitumorale.

4.2 Etudes d'efficacité antitumorale

La formulation de LNCs-Sn38 mise au point, administrée au volume maximal acceptable par voie orale [20], ne présente pas d'activité antitumorale significative après 4 jours, que ce soit avec un traitement administré pendant 1 ou 4 semaines. Actuellement, dans la littérature il n'existe pas de travaux démontrant l'efficacité antitumorale d'une administration orale de Sn38, ni d'irinotécan sur le modèle tumorale HT-29. En revanche, Kawato *et al.* [19] ont montré qu'une administration orale d'irinotécan présentait une efficacité antitumorale sur un modèle tumoral du sein au moins aussi efficace que par voie intraveineuse. Cette efficacité de l'irinotécan par voie orale a également été observée par Thompson *et al.* [4] sur un modèle tumoral de neuroblastome. En revanche, par voie orale les effets secondaires de l'irinotécan (diarrhée et neutropénie) ainsi que les variabilités interindividuelles sont similaires à ceux observés avec un traitement par voie intraveineuse [5]. Enfin, les LNCs-Sn38 administrées à dose maximale ont significativement retardé la croissance tumorale par rapport à l'irinotécan administré par voie IV et par voie orale. Une co-administration de LNCs-Sn38 par voie orale et d'irinotécan par voie intraveineuse (Campto®) pourrait

donc permettre de ralentir la croissance tumorale, en attendant que l'irinotécan soit actif.

Afin de comprendre pourquoi le traitement avec les LNCs-Sn38 n'a pas un effet antitumoral maintenu dans le temps après administration *per os*, nous avons donc étudié l'effet anti-tumoral des LNCs-Sn38 par voie intratumorale et intraveineuse. En effet, lors d'une administration orale plusieurs barrières doivent être franchies pour que l'anticancéreux arrive au niveau des cellules tumorales (son site d'action) (cf. Revue bibliographique). Dans le cas d'un passage dans la circulation générale, le principe actif ou la formulation doit présenter une bonne perméabilité vasculaire au niveau de la tumeur et s'y maintenir. De manière générale, la microvascularisation au niveau des tumeurs solides est très perméable aux macromolécules par rapport aux vaisseaux normaux. En revanche, le transport interstitiel peut jouer un rôle important dans la biodisponibilité intratumorale des petites molécules comme le CPT-11 et le Sn38 (poids moléculaire de 586 et 386g.mol⁻¹, respectivement) [24]. En effet, jusqu'à J12 l'administration de LNCs-Sn38 en intratumorale est aussi efficace que le CPT-11. En revanche, après J12, le traitement n'a plus d'effet, et une reprise de la croissance tumorale est observée. Cette diminution de l'activité du Sn38 est peut être due à un transport interstitiel du Sn38, diminuant ainsi sa concentration et donc son activité au niveau des cellules tumorales. La perte d'effet peut aussi être due à un relargage des LNCs à partir de la tumeur. Concernant, l'irinotécan, une activité antitumorale propre à la molécule (sans métabolisation en Sn38) a été démontrée [25, 26]. Cette activité peut également expliquer la différence d'activité dans le temps observée à partir du J12 avec les LNCs-Sn38.

L'activité antitumorale des LNCs-Sn38 a donc été démontrée *in vivo*. La perte d'activité après administration par voie orale n'est donc pas expliquée par une diminution de l'efficacité du Sn38 après encapsulation dans les LNCs. En revanche, cette perte d'activité peut être due à une insuffisance de passage de la circulation générale aux cellules tumorales des LNCs-Sn38 et en particulier à un effet de premier passage hépatique. Par conséquent, l'efficacité thérapeutique des LNCs-Sn38 a été étudiée après administration intraveineuse. Une injection dans la veine caudale permet de shunter l'effet de premier passage hépatique.

Les études effectuées par cette voie IV n'ont malheureusement pas permis de conclure à une efficacité des LNCs-Sn38 par rapport au CPT-11. Lorsque les LNCs-Sn38

se retrouvent dans la circulation générale, elles peuvent entraîner une réaction immunitaire, comme tout corps étrangers introduit dans l'organisme. Cette réaction immunitaire peut alors entraîner leur destruction ou leur évacuation de l'organisme. Une des caractéristiques essentielles que doivent donc posséder des nanovecteurs est la furtivité. Ainsi, les LNCs classiques ont une demi-vie de 20min [27], cette demi-vie reste inférieure à celle démontrée par les liposomes (plusieurs heures). Au laboratoire, une méthode permet d'évaluer *in vitro* l'activation du système immunitaire des nanovecteurs [28]. Cette technique, (test CH50) permet de mettre en évidence l'activation du système du complément, un des composants majeurs du système immunitaire [29]. L'activation du complément est évaluée en mesurant la capacité hémolytique du système complément après contact avec les LNCs. Si les particules sont activatrices, celles-ci sont reconnues par les composants du complément qui ne pourra pas, dans la suite de l'expérience, lyser les globules rouges ajoutés. Cette étude a été réalisée sur les LNCs-Sn38 mais également sur les LNCs blanches seules ou associées à du Sn38 libre (Figure 13). Une activation du complément a été observée avec les LNCs-Sn38. Par conséquent, avec le Sn38 les nanocapsules perdent leurs furtivité, et une dégradation ou une élimination de ces particules, ne leurs laissant pas le temps d'atteindre la zone tumorale, est envisageable.

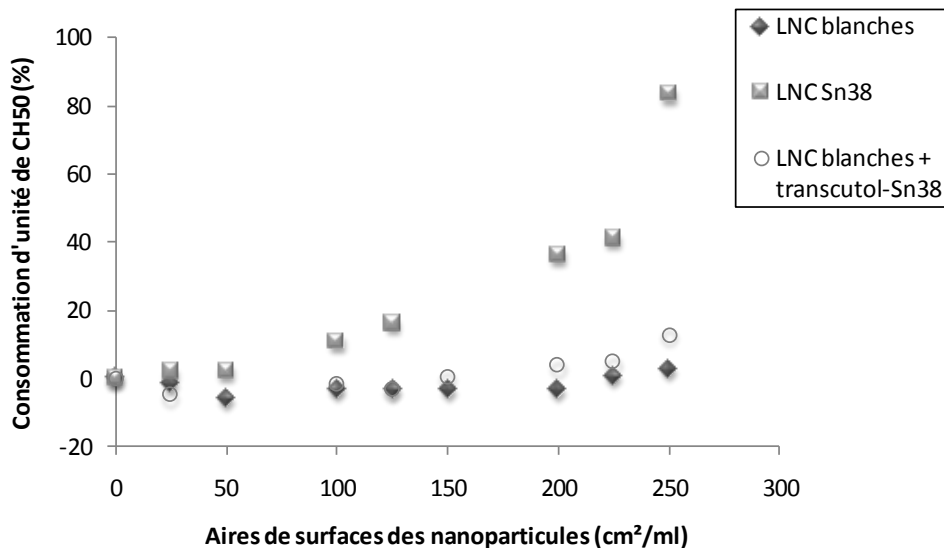


Figure 13 : Consommation du complément à 37°C des LNCs-Sn38, LNCs blanches et LNCs blanches associés à du Sn38 libre.

Ces tests d'immunogénicité permettent donc d'expliquer le manque d'activité par voie IV comparativement à la voie intratumorale. Les LNCs devenue non furtives sont a priori captée par le foie et la rate.

En revanche, la dernière étude réalisée par voie intraveineuse à des doses plus importantes, a montré une relative efficacité thérapeutique. Cette étude a été effectuée sur des souris avec des tumeurs moins développées, et le traitement donné était sur 2 cycles de 5 jours de traitement. Dans ce cas, une activité antitumorale a été observée. Le schéma d'administration a une importance non négligeable sur l'activité de l'irinotécan [3, 4] et probablement sur celle du Sn38. L'absence de furtivité des LNCs-Sn38 est moins critique quand les nanocapsules sont présentes en plus grande quantité. Par conséquent, il serait intéressant de tester une administration sur 4 cycles ou avec des doses plus importantes administrées tout les 4 jours ce qui correspond à un des schémas d'administration décrit dans la littérature (Table 1).

Enfin, il est difficile de comparer l'efficacité de la formulation de Sn38 avec les autres formulations de Sn38 décrites dans la littérature. En effet, les études réalisées avec les micelles de Sn38 ont été effectuées avec un schéma d'administration différent (3 injections) et la dose totale de Sn38 délivrée est de 1.5 à 9 fois supérieure à celle administrée pendant les études avec les LNCs-Sn38 [11, 13, 14]. Quant à l'étude réalisée par Zhang *et al.* [10] avec les liposomes de Sn38, la même dose en CPT-11 et en Sn38 a été administrée alors que seulement 2 à 8% du CPT-11 est métabolisé en Sn38 [30, 31].

5. Conclusion

Les LNCs blanches et les LNCs-Sn38 développées, ne présentent pas de toxicité lors d'une administration orale répétée. En revanche, l'activité antitumorale est de courte durée par voie orale et variable selon les études après administration par voie intraveineuse. Une activité thérapeutique après injection des LNCs dans la tumeur nous laisse toutefois un espoir, car cela signifie que les LNCs de Sn 38 possèdent une activité antitumorale. Le manque de résultat est donc sûrement lié au devenir des nanocapsules dans l'organisme (opsonisation, séquestration par le foie...). Une étude de pharmacocinétique et de biodistribution devra donc être réalisée.

Références

1. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Hoffman BB, Walker MJ. Pharmacologie intégrée. In: Université DB, editor.; 1999; 1999. p. 553-554.
2. Peterson JK, Houghton PJ. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *Eur J Cancer* 2004 Apr;40(6):837-844.
3. Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JD, 2nd, Lutz L, Friedman HS, Danks MK, et al. Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36(5):393-403.
4. Thompson J, Zamboni WC, Cheshire PJ, Richmond L, Luo X, Houghton JA, et al. Efficacy of oral irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Anticancer Drugs* 1997 Apr;8(4):313-322.
5. Drengler RL, Kuhn JG, Schaaf LJ, Rodriguez GI, Villalona-Calero MA, Hammond LA, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of oral irinotecan administered daily for 5 days every 3 weeks in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 1999 Feb;17(2):685-696.
6. Pitot HC, Adjei AA, Reid JM, Sloan JA, Atherton PJ, Rubin J, et al. A phase I and pharmacokinetic study of a powder-filled capsule formulation of oral irinotecan (CPT-11) given daily for 5 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 Aug;58(2):165-172.
7. Schoemaker NE, Kuppens IE, Huinink WW, Lefebvre P, Beijnen JH, Assadourian S, et al. Phase I study of an oral formulation of irinotecan administered daily for 14 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005 Mar;55(3):263-270.
8. Dumez H, Awada A, Piccart M, Assadourian S, Semiond D, Guetens G, et al. A phase I dose-finding clinical pharmacokinetic study of an oral formulation of irinotecan (CPT-11) administered for 5 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol* 2006 Jul;17(7):1158-1165.
9. Lei S, Chien PY, Sheikh S, Zhang A, Ali S, Ahmad I. Enhanced therapeutic efficacy of a novel liposome-based formulation of SN-38 against human tumor models in SCID mice. *Anticancer Drugs* 2004 Sep;15(8):773-778.
10. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. *Int J Pharm* 2004 Feb 11;270(1-2):93-107.
11. Koizumi F, Kitagawa M, Negishi T, Onda T, Matsumoto S, Hamaguchi T, et al. Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* 2006 Oct 15;66(20):10048-10056.
12. Sumitomo M, Koizumi F, Asano T, Horiguchi A, Ito K, Asano T, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008 Mar 15;68(6):1631-1635.
13. Peng CL, Lai PS, Lin FH, Yueh-Hsiu Wu S, Shieh MJ. Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an HT-29 human colon cancer xenograft model using SN-38-

- loaded chlorin-core star block copolymer micelles. *Biomaterials* 2009 Jul;30(21):3614-3625.
14. Nakajima TE, Yanagihara K, Takigahira M, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, et al. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res* 2008 Nov 15;68(22):9318-9322.
 15. Williams J, Lansdown R, Sweitzer R, Romanowski M, LaBell R, Ramaswami R, et al. Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *J Control Release* 2003 Aug 28;91(1-2):167-172.
 16. Vassal G, Boland I, Santos A, Bissery MC, Terrier-Lacombe MJ, Morizet J, et al. Potent therapeutic activity of irinotecan (CPT-11) and its schedule dependency in medulloblastoma xenografts in nude mice. *Int J Cancer* 1997 Sep 26;73(1):156-163.
 17. Hattori Y, Shi L, Ding W, Koga K, Kawano K, Hakoshima M, et al. Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors. *J Control Release* 2009 May 21;136(1):30-37.
 18. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002 May;8(5):994-1003.
 19. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991 Aug 15;51(16):4187-4191.
 20. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.
 21. Cordier S, Garnier R, Gazin V, Multigner L, Vasseur P. Ethers de glycol: nouvelles données toxicologiques: Inserm; 2005.
 22. Gattefossé. Fiche de donnée de sécurité (selon 2001/58/CE).
 23. products Cfvm. Polyethylene glycol Stearates and Polyethylene Glycol 15 hydroxystearate. UK: EMEA: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Inspections; 2003 june 2003. Report No.: EMEA/MRRL/392/98-FINAL-Rev.1.
 24. Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, Verbeken E, Landuyt B, Landuyt W, et al. Effect of antivasular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer* 2003 Jun 16;88(12):1979-1986.
 25. Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R. Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur J Cancer* 2000 Oct;36(16):2120-2127.
 26. Rouits E. Place des outils pharmacogénétique, biochimique et pharmacocinétique dans l'optimisation thérapeutique de l'irinotécan. Angers: Université d'Angers; 2003.
 27. Ballot S, Noiret N, Hindre F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, et al. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006 May;33(5):602-607.

28. Peracchia MT, Vauthier C, Passirani C, Couvreur P, Labarre D. Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sci* 1997;61(7):749-761.
29. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008 Aug-Sep;29(24-25):3477-3496.
30. Rothenberg ML, Kuhn JG, Burris HA, 3rd, Nelson J, Eckardt JR, Tristan-Morales M, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. *J Clin Oncol* 1993 Nov;11(11):2194-2204.
31. Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreau P, Fretigny E, et al. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 1999 May;80(3-4):364-370.

DISCUSSION GENERALE

La voie orale est actuellement la voie préférée par le patient. Néanmoins, cette voie d'administration est limitée pour certains principes actifs dont les propriétés physico-chimiques limitent leur absorption sous forme active dans la circulation générale. L'encapsulation de ces molécules dans des vecteurs colloïdaux s'est avérée être une solution prometteuse pour envisager leur administration orale. Les objectifs pour ces systèmes particuliers sont nombreux : dissoudre la molécule au sein du vecteur, la protéger vis-à-vis des dégradations des milieux biologiques rencontrés le long du tractus gastro-intestinal, améliorer l'absorption à travers l'épithélium intestinal et la protéger de l'effet de premier passage hépatique. Dans ce contexte, l'utilisation des nanocapsules lipidiques comme vecteurs pour la voie orale a été envisagée. Une étude *in vivo* a montré que l'encapsulation du paclitaxel dans ce système particulière améliorerait la biodisponibilité de cette molécule après administration orale [1]. C'est à partir de ce résultat que ce travail de thèse a trouvé son origine.

La problématique de ce projet est double. Tout d'abord nous avons étudié les propriétés des LNCs qui permettent d'améliorer la biodisponibilité orale du paclitaxel (utilisé ici comme drogue modèle). L'objectif principal est de savoir si le vecteur reste intact après administration orale. En parallèle, nous avons envisagé l'utilisation de cette forme médicamenteuse pour formuler un nouveau vecteur d'une autre molécule anticancéreuse : le Sn38.

1. Propriétés des nanocapsules lipidiques pour une administration orale : intégrité conservée

Cette première partie, qui est un travail de recherche fondamentale sur le comportement des LNCs, nouveau système colloïdal, a pour objectif de montrer l'intérêt et les potentiels des LNCs après administration par voie orale. Résultant de ces observations, l'objectif principal est d'optimiser le vecteur pour une administration clinique.

Maintenir l'intégrité de la particule après administration orale des nanocapsules lipidiques est essentiel pour conserver l'activité du principe actif encapsulé jusqu'à son site d'action. En effet, la première génération de nanovecteurs a été développée afin d'acheminer des anticancéreux jusqu'aux cellules malades, puis, la deuxième génération a permis de convoier les molécules vers leurs sites d'action en évitant par exemple le foie grâce à la propriété de furtivité, enfin, la troisième génération consiste à cibler plus spécifiquement des récepteurs de la cellules malades grâce à la présence de ligands. Tout au long du tractus gastro-intestinal, la particule va rencontrer de nombreuses barrières qui peuvent ainsi modifier les propriétés de ces nanovecteurs et donc limiter le transport du principe actif dans la circulation générale. L'administration orale de ces nanovecteurs nécessite donc la présence de nouvelles propriétés.

Peltier *et al.* [2] ont montré que les LNCs de paclitaxel améliorent la biodisponibilité orale du paclitaxel par un facteur 3. Cependant, le mécanisme d'amélioration n'est pas connu et le comprendre pourrait permettre une optimisation de la formulation et donc de la biodisponibilité. Ainsi, comme nous l'avons présenté dans notre revue bibliographique (partie I), différentes propriétés des particules sont à étudier pour comprendre le transport de la molécule dans la circulation sanguine : (a) vérifier la stabilité des nanocapsules dans le tractus gastro-intestinal, (b) caractériser le mécanisme d'absorption à travers l'épithélium intestinal, (c) étudier leurs devenir après passage de l'enterocyte.

Dans ce but nous avons développé un ensemble d'outils au sein du laboratoire pour étudier le comportement des LNCs. Ces outils sont des modèles *in vitro* reflétant au mieux les conditions *in vivo*. Néanmoins ces modèles ont leurs limites et même s'ils nous ont permis de donner plusieurs conclusions quant au comportement des LNCs, il est

important de rappeler que ces résultats sont relatifs et peuvent différer chez l'être humain.

1.1 Stabilité gastro-intestinale

Après ingestion, les particules se retrouvent en contact avec les milieux gastro-intestinaux. Pour reconstituer cette étape nous avons utilisé des milieux simulés. Le choix des ces milieux gastro-intestinaux simulés s'est avéré difficile. En effet, les milieux gastro-intestinaux sont très complexes et variables en termes de composition, volume en fonction de l'individu, du temps et des conditions d'ingestion [3, 4]. Ils ne possèdent jamais toutes les caractéristiques des milieux de l'organisme. De plus, les milieux décrits dans la littérature sont principalement utilisés, et ont donc été formulés, pour étudier la solubilité du principe actif, or dans notre cas nous cherchons à étudier la stabilité d'un vecteur colloïdal. Il faut donc vérifier que le milieu est bien pertinent pour cette nouvelle utilisation. Ainsi, ces études pourraient être complétées par des études *in vivo* : administration par voie orale puis suivi de la stabilité des particules. Mais cette méthodes est plus difficile, plus couteuse à mettre en place et ne peut pas être utilisée comme méthode de screening des formulations.

Vient ensuite l'évaluation de la stabilité du vecteur dans le milieu. Pour affirmer que l'intégrité du vecteur est conservée après contact avec les milieux simulés, il nous faut montrer que sa structure est restée constante et que le principe actif est toujours encapsulé. Une des premières difficultés dans ce travail a ainsi été la recherche de méthodes d'analyse de notre vecteur. Tout d'abord la taille a été mesurée car elle est une des caractéristiques fondamentales des LNCs et doit à priori varier en cas d'instabilité des LNCs. Afin de pouvoir être comparées, les mesures ont été effectuées par diffusion de la lumière avec fixation de l'atténuateur (valeur obtenue lors de la mesure initiale de la dispersion de LNCs diluées dans le milieu). En effet, l'appareil est sensible et influencé par le milieu dans lequel la mesure est faite. En fixant l'atténuateur, l'appareil reste dans les mêmes conditions et donc les mesures en intensité correspondant aux nanoparticules peuvent être comparées, sauf si le milieu dans lequel on travaille forme des particules de même taille. Afin de disposer de plusieurs preuves de l'intégrité des nanocapsules d'autres méthodes d'études ont été recherchées. Dans ce but, des essais de mesures de la turbidité à 580nm ont été réalisés, l'hypothèse étant que les constituants des LNCs détruites feraient augmenter la turbidité. Néanmoins, comme la turbidité du

milieu varie également en fonction du temps, cette méthode ne s'est pas avérée assez discriminante et n'a pas été présentée dans la publication (partie I, chap. 1). De même, une méthode enzymatique de dosage de la phosphatidylcholine (PC) [5-7] a été évaluée afin de différencier la PC libre (non incorporée dans la coque des LNCs) de celle incorporée dans la coque des LNCs intactes (Figure 1). En effet, une augmentation du dosage de la PC libre reflèterait une dégradation des LNCs. Cette méthode s'est également avérée non spécifique car de la phosphatidylcholine est présente dans les milieux intestinaux simulés.

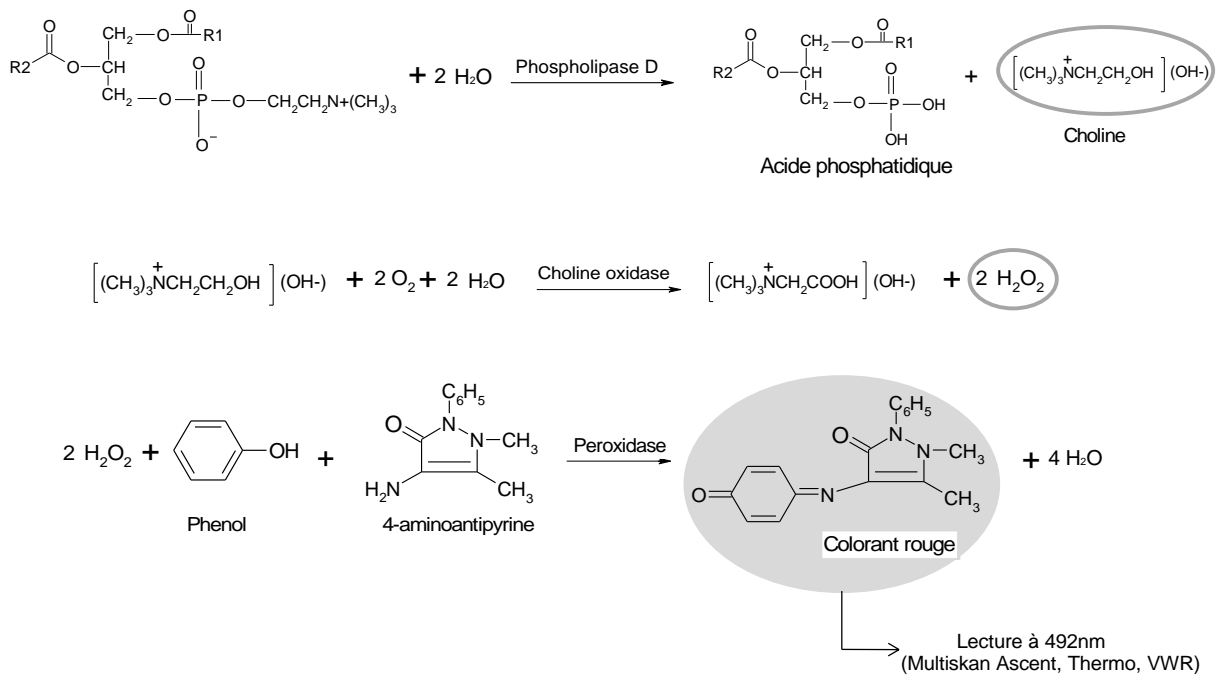


Figure 1 : Méthode enzymatique pour quantifier la phosphatidylcholine.

Enfin, des études de stabilité ont été réalisées avec les LNCs contenant du paclitaxel. Ces particules sont plus difficiles à formuler mais permettent par voie indirecte de savoir si les LNCs sont intactes. En effet, en mesurant la quantité de paclitaxel encapsulée dans les LNCs, il est possible de connaître par différence la quantité libérée par les particules. Si la quantité libérée est importante dans un temps court alors les LNCs doivent être à priori détruites par les milieux et sont donc considérées comme instables.

Deux méthodes ont permis de conclure quant à la stabilité des LNCs dans les milieux gastro-intestinaux : (a) la mesure de la taille permet de démontrer la présence de nanoparticules de manière qualitative (l'intégrité de l'ensemble des particules n'est pas certaine), (b) la mesure du taux d'encapsulation (méthode quantitative) permet de

démontrer que le principe actif est toujours encapsulé et indirectement que l'intégrité de la structure de la nanocapsule est conservée.

Le milieu gastrique est composé principalement de pepsine, lipase gastrique et de sécrétions acides qui font varier le pH entre 1,2 et 4,5 au cours du processus de digestion [8]. La lipase gastrique est capable de digérer les chaînes moyennes et longues d'acide gras, mais elle est active à un pH compris entre 3 et 6, par conséquent son action est limitée dans l'estomac [9]. La pepsine est une endopeptidase qui hydrolyse les protéines ingérées. Comme aucun composé protéique n'entre dans la composition des LNCs, nous avons considéré que la concentration en ion H^+ était le principal facteur pouvant dénaturer les LNCs en milieu gastrique. En effet, les LNCs sont composées d'une coque solide d'une épaisseur de 2 à 10nm comprenant de l'hydroxystéarate de polyéthylène glycol (PEG), de la phosphatidylethanolamine et de la phosphatidylcholine [10] qui présentent différentes fonctions ester pouvant être hydrolysées en milieu acide. Par conséquent, seul le milieu décrit par la pharmacopée, qui présente un pH de 1,2 a été testé [11], celui-ci étant un milieu discriminant pour les LNCs. Même si pour de nombreux vecteurs colloïdaux le pH reste le facteur limitant la stabilité gastrique, la présence de pepsine dans ce milieu le rend pertinent pour d'autres nanovecteurs. Ainsi, par exemple, il permettrait de vérifier la stabilité de vecteurs encapsulant des peptides ou protéines pour lesquelles la voie orale est actuellement exclue.

Après 3h d'incubation dans ce milieu la taille des LNCs est conservée. On peut donc supposer que les chaînes de PEG présentes à la surface permettent de stabiliser les LNCs. Des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules de PLA, pour lesquelles l'ajout de PEG permet d'améliorer la stabilité dans le milieu gastrique [12-15].

Après l'estomac, les LNCs passent dans l'intestin qui a un pH compris entre 5,5 et 7 et de nombreuses enzymes (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, amylase, sucrase, lactase, lipase) [16]. La composition est également variable, en particulier les concentrations en sels biliaires, selon que l'individu soit nourri ou à jeun. Afin de déterminer un éventuel « effet repas », la stabilité des LNCs a été testée dans un milieu mimant l'état à jeun (FaSSIF-V2) et un milieu mimant l'état nourri (FeSSIF-V2) récemment mis au point et qui semblent être les plus représentatifs des milieux *in vivo* [17]. Une conservation de la taille a été observée dans les deux milieux testés après 6h

d'incubation. En revanche, dans le milieu mimant l'état nourri, une libération de 30% de paclitaxel a été mesurée. Le milieu mimant l'état nourri contient de la lipase, enzyme capable d'hydrolyser les acides gras, tel que la phosphatidylcholine et la phosphatidylethanolamine (constituants du Lipoid® qui entre dans la formulation des LNCs). Dans ce cas, nous pouvons supposer que la présence de PEG ne suffit pas totalement à empêcher l'action de la lipase. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette libération :

- soit une partie des LNCs est détruite, libérant ainsi une fraction du Paclitaxel encapsulé dans le tractus gastro-intestinal ;
- soit une fraction du paclitaxel diffuse à travers la coque des LNCs. Dans ce cas une fragilisation de la structure des LNCs par la lipase peut être suspectée.

Au cours de cette expérience, nous avons été confrontés aux limites des méthodes d'analyses utilisées. En effet, avec les techniques dont nous disposons, nous ne pouvons pas affirmer que la totalité des LNCs reste intacte, ni que la structure des LNCs n'est pas altérée. Néanmoins, la concentration en sels biliaires utilisés dans le milieu FeSSIF-V2 (10mM) [17] correspond à une concentration maximale par rapport à la sécrétion *in vivo* qui est comprise entre 5,2mM et 11,2mM [18]. Nous sommes dans ce cas, dans des conditions extrêmes, il serait intéressant d'étudier l'influence de la concentration en sels biliaires sur la libération du paclitaxel. En effet, les sels biliaires permettent l'adsorption de la lipase à la surface des particules et par conséquent, augmentent son activité enzymatique. Nous aurions aussi pu ajouter d'autres techniques de caractérisation, mais beaucoup ne sont pas simples à mettre en place. Ainsi, une technique de microscopie paraît tentante pour observer les LNCs mais, du fait de leur petite tailles, peu de détails sont visibles, de plus la formation de micelles dans les milieux les plus riches en sels biliaires pourrait gêner l'observation.

Les résultats *in vitro* nous permettent donc de conclure à une stabilité des LNCs dans les milieux gastro-intestinaux, et notamment à un maintien de l'encapsulation du principe actif lors d'une administration à jeun. Pour une administration clinique, il serait donc conseillé de prendre la formulation de LNCs-Ptx à jeun. Toutefois, les LNCs restent raisonnablement stables comparées aux nanoparticules de PLA ou de chitosan et aux liposomes [19-21], pour lesquelles un enrobage avec du PEG ou un sucre tel que la mucine est nécessaire pour inhiber l'action de la lipase [15, 20, 22-24]. Pour une

administration optimale dans toutes les conditions (à jeun, nourri), une optimisation pourrait être envisagée en reprenant les stratégies de stabilisation utilisées pour les nanocapsules de PLA. Les PEG utilisés pour enrober les particules ont une longueur de chaîne de 5000 [12, 15] ou 2000 [24, 25]. Le PEG utilisé dans la formulation des LNCs (Solutol®H15) est un PEG 660. Augmenter la longueur de la chaîne du PEG dans notre formulation pourrait donc améliorer la stabilité dans les milieux gastro-intestinaux des LNCs. Une formulation de LNCs avec du PEG 1500 est disponible au sein du laboratoire : le Solutol® est remplacé par du DUB SPEG 30S® (PEG1500 stéarate)[26]. De plus, du PEG 2000 peut être ajouté à la surface des LNCs par la méthode de post-insertion [27]. Il serait donc intéressant de comparer la stabilité de ces particules avec celles testées dans notre étude.

1.2 Absorption intestinale

Plusieurs modèles (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) permettent d'étudier l'absorption intestinale. Comme dans le cas des études de stabilité gastro-intestinale, nous avons choisi de travailler avec un modèle de type « screening » c'est à dire permettant de faciliter la répétition des expériences menées.

L'absorption des LNCs de paclitaxel à travers un modèle *in vitro* de Caco-2, utilisé pour mimer la barrière intestinale, a ainsi été étudiée. Nous avons démontré que les LNCs améliorent le transport du paclitaxel à travers la barrière intestinale d'un facteur 3,5 par rapport à la formulation Taxol® (Partie I, chapitre 2). Au cours des études de biodisponibilité réalisées au sein du laboratoire sur la même formulation de LNC-Ptx [2], une augmentation d'un facteur 3 du paclitaxel retrouvé dans la circulation sanguine a été obtenue. Le résultat obtenu *in vivo* prend en compte le transit gastro-intestinal et la perméabilité intestinale. La différence de 0,5 entre les deux facteurs obtenus *in vitro* et *in vivo*, peut s'expliquer par les erreurs expérimentales. Une autre explication pour cette différence pourrait également être une libération du paclitaxel des LNCs au cours du transit gastro-intestinal. Cette hypothèse serait alors corrélée avec les résultats de stabilité obtenus précédemment dans les milieux simulés. A ce stade des recherches, nous pouvons donc spéculer que le paclitaxel est toujours protégé par les LNCs lorsqu'il atteint l'épithélium intestinal.

Le mécanisme de transport des LNCs a ensuite été étudié dans un souci d'optimisation de la formulation. Tout d'abord, les LNCs ne modifient pas la structure

des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Par conséquent, l'amélioration du transport du paclitaxel n'est pas due à une libération du paclitaxel suivie d'un passage par voie paracellulaire. En effet, un transport par cette voie dépend des jonctions serrées qui limitent un espace intercellulaire compris entre 3Å et 10Å de diamètre [28, 29]. Les LNCs, qui ont une taille comprise entre 20 et 130nm, ne peuvent donc pas rester intactes pour être transportées par cette voie. Par conséquent, comme nous avons démontré qu'il n'y a pas de passage par voie paracellulaire, une préservation de l'intégrité des particules reste probable à ce stade. De plus, l'absence d'ouverture des jonctions serrées signifie également que les LNCs ne sont pas toxiques et par conséquent les fonctions physiologiques de la barrière intestinale sont conservées comme par exemple, empêcher des fuites d'eau et de NaCl par voie digestive, et empêcher le passage de toxine [30].

Enfin nous avons étudié le mécanisme d'endocytose des LNCs par les entérocytes. Plusieurs voies d'endocytose sont décrites : la macropinocytose, l'endocytose médiée par des récepteurs tel que la clathrine, les cavéoles [31, 32]. De plus, du mécanisme d'endocytose dépend le mécanisme d'exocytose : passage par le lysosome [33] ou exocytose directe dans le cas d'une endocytose cavéole dépendante [34]. Nous avons montré que les LNCs sont endocytées par un mécanisme actif, clathrine-dépendant et cavéole-dépendant appartenant aux microdomaines lipidiques de la membrane cellulaire qui contiennent également la P-glycoprotéine [35] (Partie I, chapitre 3). Toutes les voies d'endocytose sont donc possibles pour le transport des LNCs à travers l'entérocyte (Figure 2).

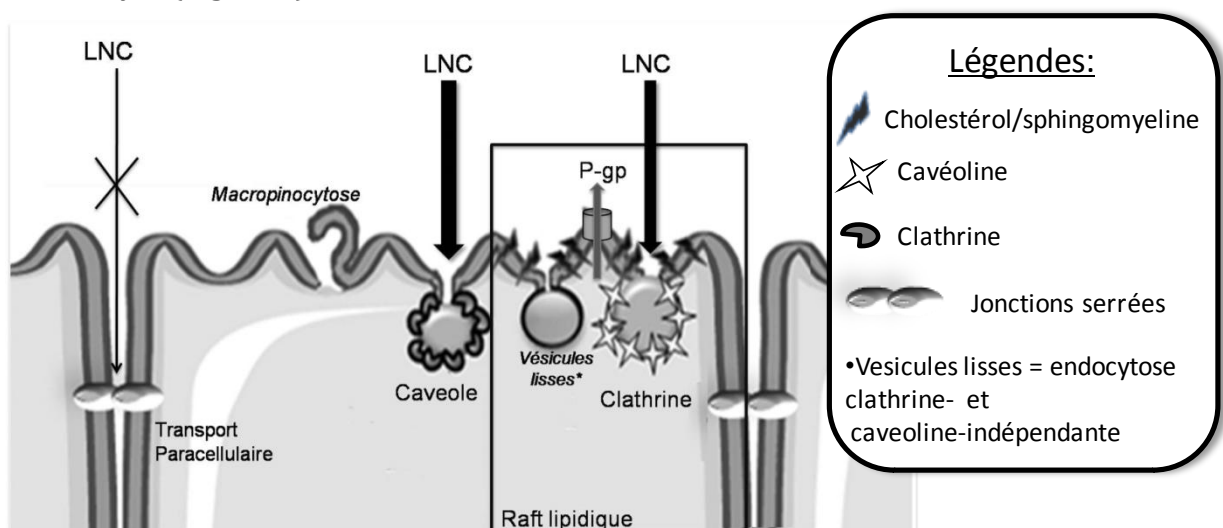


Figure 2 : Représentation schématique des différentes voies de transport des LNCs à travers la barrière intestinale.

Un transport direct des LNCs intactes dans la circulation générale est probable. Néanmoins, dans le cas d'une endocytose non cavéole-dépendant, le devenir des LNCs devra être étudié. Les LNCs échappent-elles aux vésicules endo-lysosomales comme les nanoparticules de PLGA ou les liposomes cationiques [36-38] ? Dans ce cas les LNCs sont-elles stables dans le cytosol ? Ou les LNCs sont-elles dégradées dans les lysosomes et le principe actif libéré et absorbé par le système lymphatique ? De plus, lors d'une endocytose cavéole-dépendant, un transport à travers l'enterocyte évitant l'endosome, le lysosome et l'appareil de golgi est possible. Dans ce cas les particules endocytées sont prises en charge par le caveosome [34] et exocytées par un mécanisme de permutation au niveau de la barrière basolatérale. La conservation de l'intégrité de la particule est alors plus probable. Le greffage de molécules comme l'acide folique, l'albumine ou l'IRQ (nouveau peptide spécifique des cavéoles [39]) pourrait permettre un adressage plus spécifique des LNCs par les cavéoles. Ces molécules peuvent être liées à la surface des LNCs par la méthode de post-insertion, comme a été ajouté l'OX-26 par Béduneau *et al.* [26].

Afin de répondre à ces questions et de savoir si les LNCs restent intactes, nous avons essayé de déterminer si l'intégrité des LNCs est conservée après passage de l'épithélium intestinal. Comme pour les études de stabilité gastro-intestinale, nous avons été limités par les méthodes d'analyses. Par microscopie électronique à transmission, nous avons mis en évidence la présence de « nano-objets » au pôle basolatéral lorsque des nanoparticules sont déposées au pôle apical de la barrière intestinale simulée par des cellules Caco-2. Nous les nommons « nano-objets » car les particules observées présentent une taille comprise entre 100 et 120nm alors que les LNCs déposées au niveau apical ont une taille comprise entre 50 et 60nm. De plus, par cette méthode nous ne pouvons pas prouver qu'il s'agit des mêmes particules modifiées. Des essais d'ultracentrifugation en gradient de densité du milieu basolatéral ont également été réalisés afin de séparer le paclitaxel libre (Figure 3A) du paclitaxel encapsulé dans les LNCs (Figure 3B). A la concentration de 5µM en paclitaxel (concentration déposée au niveau apical), nous avons réussi à affirmer que les LNCs sont dans la première fraction (figure 3).

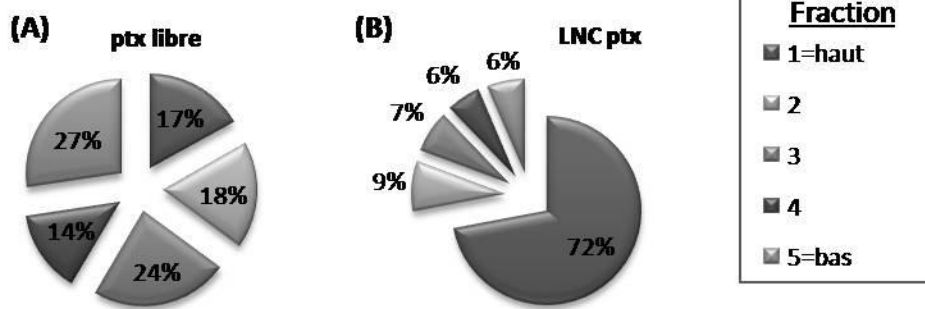


Figure 3 : Répartition du paclitaxel dans un gradient de densité de 1,063 après ultracentrifugation de 24h.

En revanche, après 2h d'incubation, une concentration en paclitaxel de l'ordre de 0,5 μ M est mesurée et à cette concentration, la dilution réalisée dans le gradient de densité ne permet pas une analyse par LC-MS/MS. Différentes études peuvent être envisagées avec :

- des concentrations plus élevées ;
- un temps d'incubation plus long ;
- une diminution de la dilution dans le gradient de densité ;
- une concentration des échantillons après ultracentrifugation ;
- une méthode d'analyse plus sensible.

La conservation de structure de la nanocapsule après passage du tractus gastro-intestinal et de l'épithélium intestinal reste donc à démontrer. Une technique de double marquage de la coque et du cœur des LNCs comme la technique de transfert d'énergie de fluorescence (ou FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer ou RET pour Resonance Energy Transfer) permettrait de suivre le vecteur dans son intégralité. Au début de ce travail de thèse, cette technique a été évoquée pour le suivi des nanoparticules mais les collaborations n'ont pas abouties. Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif d'une molécule donneuse vers une molécule acceptrice, ce transfert résultant généralement en une émission de fluorescence de la molécule acceptrice [40] (Figure 4A). L'excitation d'un premier fluorophore (molécule donneuse) provoque une émission de fluorescence de celui-ci. Lorsque cette molécule se trouve à proximité d'un deuxième fluorophore (molécule acceptrice), un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur entraîne une diminution du signal de la

fluorescence du donneur et une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Dans le cas des LNCs, un marquage du cœur avec une molécule donneuse, et un marquage de la coque avec une molécule acceptrice permettrait de suivre l'intégrité de la nanoparticule car dans le cas d'une destruction, il y aurait absence d'émission de fluorescence (Figure 4B). Cette technique peut être utilisée *in vitro* mais également *in vivo* par station d'imagerie en fluorescence (possibilité de suivre en temps réel de façon non invasive la biodistribution au sein d'un organisme).

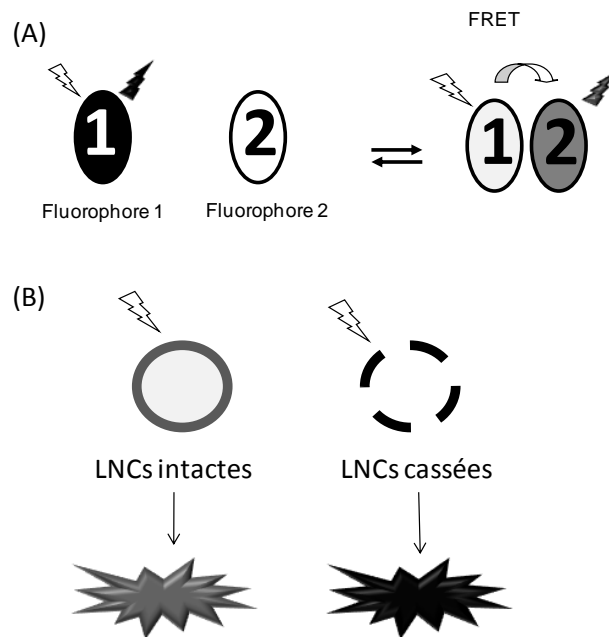


Figure 4 : (A) schéma du principe du FRET, (B) schéma d'application du FRET aux LNCs.

1.3 Effet de la P-gp

La P-gp est actuellement connue comme étant une limite pour l'absorption de nombreux anticancéreux au sein des cellules tumorales mais également par les entérocytes.

Etonnamment, au cours des études *in vitro* à travers le modèle cellulaire Caco-2, un effet de la P-gp sur le transport des LNCs a été mis en évidence. En effet, en présence d'inhibiteur de la P-gp une augmentation de 98% du transport du paclitaxel a été mesurée. De plus, au sein de notre laboratoire des études ont démontré que les LNCs [41, 42] possèdent la capacité d'inhiber la P-gp grâce à la présence du Solutol® [43, 44] qui constitue la coque des particules. Nous avons alors testé le propre effet inhibiteur des LNCs sur le transport du paclitaxel encapsulé dans les LNCs. Une augmentation du transport du paclitaxel a été mesurée. Cliniquement, pour une administration orale de

LNCs de paclitaxel, un pré-traitement avec des LNCs blanches pourrait donc permettre d'améliorer le transport et par conséquent la biodisponibilité du paclitaxel. Des études *in vivo* devront être menées pour évaluer l'efficacité d'un tel pré-traitement ainsi que sa durée, sa concentration, le délai d'administration avant l'ingestion des LNCs de paclitaxel et son innocuité.

1.4 Autres mécanismes d'absorption envisagés

Le modèle utilisé au cours de ce travail (modèle cellulaire Caco-2) présente comme principal inconvénient l'uniformité des cellules présentes (entérocytes) ce qui ne reflète pas l'épithélium intestinal (notamment absence des cellules M). De nombreuses équipes ont montré une internalisation de différents vecteurs colloïdaux par les cellules M (tableau 3, revue bibliographique). Ces cellules M sont présentes dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale (voie lymphatique) présents au niveau des plaques de Peyer. Des modèles *in vitro* de co-culture de cellules caco-2 et de follicules lymphoïdes humains (FAE) [45, 46] ou lymphocytes B (cellules de raji) [47] existent et permettent de mimer une barrière intestinale composée d'entérocytes et de cellules M. Une étude de transport du paclitaxel encapsulé dans les LNCs sur ces modèles devrait alors être envisagée.

En effet, une absorption prédominante des systèmes particuliers par les cellules M a été largement démontrée mais la fraction de particules absorbées sous forme intacte reste marginale [48-53]. Cette voie d'absorption présente néanmoins un intérêt majeur pour une administration orale des peptides, des protéines et des vaccins pour lesquels une libération de la molécule encapsulée est préférable. En effet, des macrophages et des lymphocytes, cellules responsables de la réponse immunitaire, sont retrouvés dans la cavité située au pôle basolatéral des cellules M. Dans le cas de molécule active tel que le paclitaxel, l'intérêt d'une absorption par les cellules M puis le système lymphatique réside dans l'absence d'un effet de premier passage hépatique. Jung *et al.* [51] ont montré qu'une surface hydrophobe associée à une charge négative est préférable pour une absorption par les cellules M. De plus, la taille n'est pas une limite pour l'absorption des vecteurs nanométriques (<1 μ m) puisqu'en général les particules avec une taille proche de 1 μ m sont exocytées au niveau basolatéral des cellules M et donc dirigées vers le système lymphatique, alors que les particules de tailles supérieures à 5 μ m restent piégées au niveau des plaques de Peyer [50]. Les LNCs présentent une taille favorable à

une internalisation par les cellules M et donc un passage vers la circulation lymphatique. En revanche, le caractère hydrophile de la surface des nanocapsules attribué à la présence de Solutol®HS15 peut être un facteur limitant leur capture par le système lymphatique. Utiliser ces modèles *in vitro* de co-culture pourrait donc permettre de connaître la capture lymphatique des LNCs et être une alternative aux méthodes *in vivo*. En effet, au cours d'essais *in vivo* de dosage du paclitaxel dans la lymphe après administration orale de LNCs de paclitaxel par canulation du canal mésentérique de rats [54], les faibles volumes lymphatiques recueillis et les négligeables quantités de paclitaxel mesurées (<0.01%), n'ont pas permis de conclure sur un passage lymphatique.

2. Mise au point d'une nouvelle formulation de nanocapsules lipidiques encapsulant le Sn38

Le travail de cette deuxième partie a trouvé son origine dans ces trois constats :

- L'administration directe de la molécule Sn38 limite le problème de variation interindividuelle. En effet, l'activité de l'irinotécan (utilisé dans le traitement des cancers colorectaux avancés) est principalement due à son métabolite actif le Sn38. La transformation enzymatique de l'irinotécan en Sn38 met en jeu une carboxylestérase qui induit une variabilité importante entre patients sur la quantité de Sn38 produite, à laquelle s'ajoute une réaction d'hydrolyse par les Cytochromes P450 qui transforme l'irinotécan en métabolite inactif.
- L'encapsulation de cette molécule permet de contrôler sa pharmacocinétique puisque la clairance métabolique du Sn38 est également sous dépendance polymorphique.
- L'encapsulation dans les LNCs permet de faciliter l'absorption après administration par voie orale dont nous avons précédemment expliqué l'intérêt.

2.1 Formulation et caractérisation physico-chimique des LNCs-Sn38

Au cours de l'étape de formulation nous avons été confrontés à plusieurs problématiques: (1) solubiliser le Sn38 dans un excipient compatible avec la préparation des LNCs, (2) mettre au point une formulation compatible avec le développement industriel, (3) envisager des essais pré-cliniques de cette formulation.

2.1.1 Solubilisation et formulation du Sn38 dans les LNCs

La solubilisation du principe actif dans les excipients est une étape nécessaire à une encapsulation dans des vecteurs colloïdaux.

Du fait du caractère lipophile du Sn38 et des propriétés biopharmaceutiques des LNCs, le Sn38 est, à priori, un bon candidat pour une encapsulation dans le cœur lipidique des LNCs. Néanmoins, dès les premiers essais de solubilisation du Sn38 dans des composés huileux, nous avons été confrontés à une insolubilité de cette molécule (Partie II, Chapitre 2, Table I). Lors de nos investigations pour trouver un composé huileux capable de solubiliser le Sn38, l'utilisation du Transcutol®, un co-tensioactif soluble dans certains composés huileux, a été évoqué par un des fournisseurs d'excipient huileux. Les essais de solubilisation furent concluants. Néanmoins, le Transcutol® (éther monoéthylique de diéthylène glycol) dont la densité est de 0,985 à 0,991 n'est pas un composé huileux et il n'a pas permis d'obtenir des LNCs. Il s'apparente aux surfactants et il ne peut pas se substituer au composé huileux qui permet de formuler une émulsion initiale H/E puis les nanocapsules lipidiques par la méthode PIT (phase inversion température), principe de « basse énergie ». Un composé lipophile a alors été recherché pour pouvoir être ajouté aux excipients des LNCs et permettre d'obtenir une émulsion. Nous avons alors été confrontés à une nouvelle difficulté puisque l'ajout du Transcutol® aux huiles (acide caprylique et caprique) habituellement utilisées pour formuler les LNCs (Labrafac®, Captex®) ne permettait pas d'obtenir de transition de phase au cours des cycles de refroidissement et de chauffage. L'ajout d'une huile dite hydrophile, le Labrafil®M1944, composée de triglycérides associés à des esters de polyéthylène glycol, a alors permis d'obtenir une émulsion. Une huile dite lipophile a également été ajoutée pour augmenter le taux d'encapsulation par solubilisation de l'huile hydrophile. La formation d'une émulsion E/H/E est alors suspectée. En effet, dans notre cas, le Solutol® possède des chaînes de PEG tout comme le Labrafil®M1944. Or, comme le prévoit le DHL (déviation hydrophile lipophile), variable de formulation qui décrit l'évolution de l'affinité pour l'huile et l'eau des composés non ioniques pégylés [55], une huile lipophile devait être ajoutée dans notre formulation. Notre formulation est composée d'un mélange initial constitué d'une phase aqueuse (eau et Transcutol®) plus importante que dans la formulation des LNCs

conventionnelles. La phase aqueuse est probablement trop importante pour être dispersée entièrement dans l'huile.

De plus, cette nouvelle formulation pourrait être utilisée pour encapsuler d'autres molécules dont la solubilisation est impossible dans les excipients classiquement utilisés pour formuler les LNCs. En effet, le Transcutol® est utilisé dans de nombreuses formulations (émulsion [56], microémulsion [57, 58], SMEDDS [59-61], SNEDDS [51, 62], SEDDS [63]), pour solubiliser des principes actifs peu solubles dans les composés huileux seuls.

2.1.2 Optimisation pour un meilleur rendement d'encapsulation

A ce stade de recherche, les LNCs ne sont utilisées qu'à l'échelle « laboratoire ». Néanmoins, dès le développement de formulations avec de nouveau principe actif, il est important d'essayer de mettre au point une préparation compatible avec un développement industriel. De ce fait, encapsuler des principes actifs avec un bon rendement est bien sûr obligatoire dans une visée industrielle à condition que le taux d'encapsulation soit compatible avec un effet clinique. Cela implique aussi que le principe actif soit libéré sous forme active. Dans ce but une optimisation de la formulation a été réalisée.

L'affinité du Transcutol® pour l'eau, nous a confronté à un nouvel obstacle. En effet, le Sn38, solubilisé dans le Transcutol®, précipitait lorsqu'il se trouvait en contact avec la phase aqueuse. La molécule Sn38 possède une fonction carboxyle qui s'ionise à pH basique (Figure 5). La forme carboxylate est soluble en milieu aqueux mais c'est une forme inactive du Sn38.

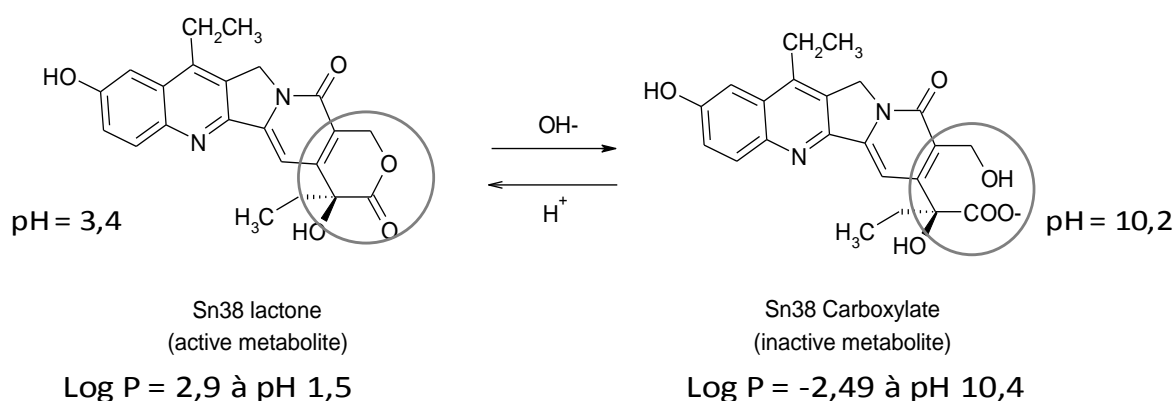


Figure 5: Equilibre pH-dépendent du Sn38 [64].

Nous nous sommes inspirés des travaux de Zhang *et al.* [64] qui consistent à utiliser cette propriété d'équilibre acide/base du Sn38 pour formuler des liposomes de Sn38. Ainsi, au moment de l'ajout de la phase aqueuse, une solution basique a également été ajoutée afin de transformer le Sn38 libéré dans la phase aqueuse en forme carboxylate. Dans ce cas, le Sn38 non soluble, libéré du Transcutol®, était solubilisé dans l'eau sous forme carboxylate et ne précipitait pas. L'idée était ensuite de re-transformer ce Sn38 en forme lactone (forme active) au moment de la formation des particules grâce à une trempe acide. La transformation du Sn38 en forme carboxylate était visible par une coloration jaune fluorescent caractéristique (Figure 6B). Un changement de couleur de jaune fluorescent à jaune pâle au moment de la trempe a été observé. Dans la zone d'inversion de phase, le système est sous forme de microémulsion bicontinue où l'huile est entièrement « solubilisée » dans l'eau, ce qui explique l'aspect parfaitement translucide de la formulation (Figure 6). Ces caractéristiques visibles à l'œil pourraient alors être utilisées comme « paramètre de suivi qualité » au moment d'une préparation industrielle.

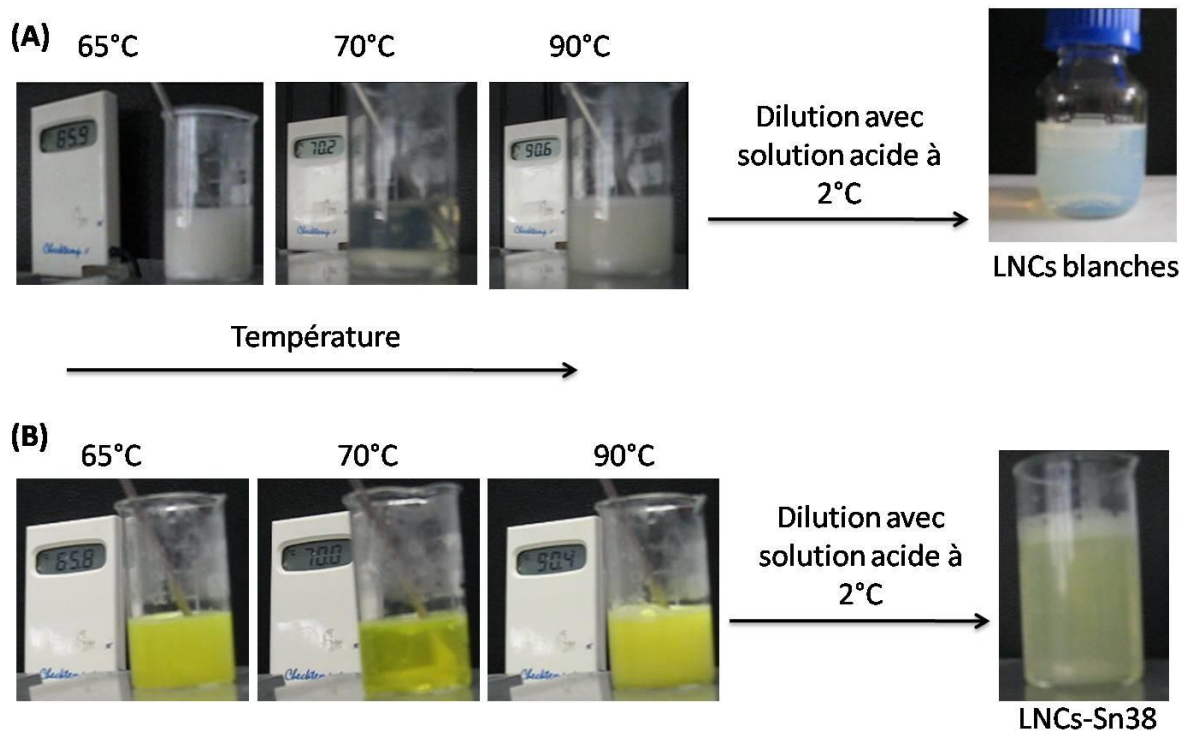


Figure 6 : Observation des différentes émulsions au cours d'un cycle de température et d'une formulation obtenue après la trempe, (A) préparation d'une formulation de LNCs blanches, (B) préparation d'une formulation de LNCs-Sn38.

L'utilisation des propriétés acide-base de la molécule au cours de la formulation, nous a alors confronté à une nouvelle problématique : s'assurer de la réelle encapsulation du Sn38 dans les LNCs mais également sous quelle forme (carboxylate ou lactone).

Dans un premier temps, nous avons dû nous assurer que le Sn38 était bien encapsulé dans les LNCs et non solubilisé dans la phase aqueuse externe. En effet, le pH de la formulation finale est d'environ 7,4. A ce pH, le Sn38 se trouve approximativement à 60% sous forme carboxylate (forme soluble en milieu aqueux) et donc à 40% sous forme lactone [64]. La difficulté était donc de différencier les deux formes. Nous avons alors de nouveau utilisé les propriétés de solubilité de la molécule aux différents pH. En effet, à $\text{pH} < 3$, le Sn38 est à 100% sous forme lactone : forme insoluble en milieux aqueux. Dans ces conditions, une acidification de la formulation puis une filtration permet d'éliminer le Sn38 libre présent dans la phase aqueuse dispersant les LNCs.

Le taux d'encapsulation obtenu est de $0.43 \pm 0.06 \text{ mg/g}$ de dispersion de LNCs, ce qui correspond à un rendement de $89 \pm 10\%$. Ce rendement est intéressant dans l'optique d'un développement industriel. En effet, le coût du Sn38 est élevé et le minimum de perte au cours du processus de fabrication est préférable.

Le taux d'encapsulation du Sn38 reste néanmoins faible, et même si les doses de Sn38 produisant une activité antitumorale restent inconnues, une interrogation subsiste sur une administration orale de cette formulation dans des conditions acceptables. Comme cette formulation se présente sous forme de dispersion, une administration telle ou dans des « capsules molles » est envisageable. Pour un développement industriel la forme « comprimé » est la plus communément fabriquée. Plusieurs techniques pourraient permettre d'envisager cette forme avec les LNCs, par exemple, la lyophilisation, le spray drying ou le spray coating. Une lyophilisation des LNCs est possible avec l'ajout d'un cryoprotecteur [65], mais dans ce cas, les propriétés biopharmaceutiques des LNCs devront également être entièrement réétudiées. La mise sur le marché d'une formulation industrialisable type comprimé ou autres contenant les LNCs est donc envisageable mais de nombreux paramètres restent à étudier pour une telle fabrication en particulier le changement d'échelle.

2.1.3 Evaluation pré-clinique des LNCs

Dans l'objectif d'encapsuler du Sn38 avec de bons rendements d'encapsulation nous avons donc été obligé de modifier totalement la formulation standard des LNCs. Ainsi les propriétés biopharmaceutiques de ces nouvelles nanocapsules devaient être entièrement réétudiées (stabilité *in vivo*, biodistribution, furtivité, inhibition de la Pgp...).

Etudes *in vitro* des LNCs-Sn38

Lorsque l'on encapsule une molécule dans le but de l'administrer par voie orale, la première caractéristique à vérifier est la stabilité des particules et l'éventuelle libération du principe actif au cours du temps le long du tractus gastro-intestinal. Plusieurs méthodes sont disponibles pour étudier la stabilité des colloïdes en milieu digestif (revue bibliographique). Nous avons choisi d'étudier la stabilité des LNCs-Sn38 dans les milieux *in vitro*. Une libération de Sn38 de l'ordre de 20% a été observée dans le milieu gastrique. Dans la première partie, nous avons démontré que les LNCs-paclitaxel étaient stables. Une première différence de comportement de ces nouvelles LNCs-Sn38 est ainsi démontrée. La présence de PEG 660 permet de stabiliser les particules dans le milieu gastrique (revue bibliographique) et était l'argument, avec la présence du Solutol®, qui nous permettait d'expliquer la stabilité des LNCs classiques de paclitaxel. Dans notre nouvelle formulation, nous avons ajouté des composés contenant du PEG-6 (Labrafil®) et un monoester de diéthylène glycol (Trancutol®), un changement de configuration des chaînes de PEG provenant du Solutol® à la surface des LNCs peut alors être suspecté et expliquer cette perte relative de stabilité dans le milieu gastrique.

Une telle libération dans le milieu gastrique est une limite pour une administration orale car l'idéal est de conserver la totalité de l'anticancéreux jusqu'à la cible d'action. Un travail d'optimisation a donc été envisagé (cf. 2.2).

En revanche, ces particules sont stables dans les milieux intestinaux à jeun et nourri ce qui n'était pas le cas des LNCs classiques.

Le deuxième obstacle qu'il est important de vérifier pour une administration orale, est l'absorption intestinale. Une évaluation sur un modèle *in vitro* permet ainsi de d'évaluer en série les molécules et également les formulations. Comme pour les LNCs de

paclitaxel, une augmentation du transport du Sn38 est observée lorsqu'il est encapsulé dans les LNCs. Cependant, il est important de rappeler que le système cellulaire utilisé ne prend en compte que le transport à travers l'entérocyte. *In vivo* un transport par les cellules M est possible. Dans la première partie de ce travail, le transport des LNCs-ptx à travers l'entérocyte a été analysé. Néanmoins, nous ne pouvons pas affirmer que ces nouvelles nanocapsules utilisent les mêmes mécanismes de transport. En effet, des modifications de la formulation initiale de LNCs ont été réalisées pour encapsuler le Sn38 : ajout de Transcutol® et Labrafil®, diminution de l'eau de trempe, ajout de base et trempe acide pouvant modifier les caractéristiques préalablement démontrées des LNCs. Il serait donc intéressant d'étudier le mécanisme de transport de ces nouvelles particules à travers la barrière intestinale.

Devant l'intérêt de ces LNCs-Sn38 *in vitro*, l'évaluation *in vivo* a été réalisée.

Etudes *in vivo* des LNCs-Sn38

Par voie orale nous n'avons pas observé d'activité antitumorale significative après 1 ou 4 semaines de traitement. Néanmoins, un retard transitoire de la croissance tumorale a été observé en début de traitement par rapport à l'administration d'irinotécan. Une co-administration avec l'irinotécan, qui a une action antitumorale plus tardive, pourrait être envisagée pour un traitement plus efficace.

Afin de comprendre pourquoi le traitement était peu efficace par voie orale, des études ont ensuite été menées par voie intratumorale et intraveineuse. En effet, une des hypothèses pouvant expliquer la faible activité du Sn38 encapsulé, est son faible taux de libération (8% en 3jours). Le fait d'injecter directement les LNCs dans la tumeur permet de savoir si la faible activité des LNCs est due à un trop faible relargage de principe actif. Au cours de l'étude évaluant la voie intratumorale, une activité a été observée montrant que le Sn38 garde son activité après encapsulation dans les LNCs. Néanmoins, une reprise de la croissance tumorale est observée avec les LNCs-Sn38 par rapport à l'irinotécan.

La cause de la faible activité des LNCs-Sn38 après administration par voie orale se situe donc entre l'absorption intestinale et l'entrée dans la tumeur, puisqu'*in vitro* nous avons montré que les LNCs amélioraient le passage du Sn38. Plusieurs hypothèses peuvent ensuite être émises sur le comportement des LNCs après passage dans la circulation générale ; soit elles subissent un effet de premier passage hépatique, soit

elles ne possèdent pas une furtivité suffisante et s'accumulent dans le foie et la rate. Dans les deux hypothèses, l'anticancéreux n'atteint pas ou peu la cible tumorale. Nous avons montré que les LNCs de Sn38 sont activatrices du complément. Par conséquent, la deuxième hypothèse de manque de furtivité des particules semble probable. De plus, avec les LNCs-ptx, nous avons montré la présence de nano-objets après passage de l'entérocyte. Nous sommes possiblement dans le même cas avec les LNCs-Sn38. Ces objets sont peut être également non-furtifs et le Sn38 peut être sous forme non encapsulée. Une étude de pharmacocinétique et de biodistribution après administration orale doit donc être menée afin de savoir si le Sn38 passe *in vivo* la barrière intestinale puis atteint sa cible dans le tissu tumoral ou s'il est rapidement éliminé.

De plus, Peltier *et al.* [2] ont montré une amélioration de la biodisponibilité du paclitaxel encapsulé dans les LNCs, mais l'activité anti-tumorale de cette formulation n'a pas été étudiée. Dans l'étude de biodisponibilité, le paclitaxel total (libre et encapsulé dans les nanocapsules) est mesuré. Il serait donc également intéressant de réaliser une étude d'efficacité anti-tumorale avec la formulation de LNCs-Ptx, afin d'identifier si l'absence d'efficacité des LNCs-Sn38 est due à la formulation ou non.

Enfin, des résultats différents selon le protocole d'administration ont été observés. Par conséquent, de nouvelles études devront être réalisées par voie orale. En effet, l'efficacité anti-tumorale des dérivés de la camptothécine est dose et administration dépendantes [66, 67]. Il est donc important de tester différents schémas d'administration avant d'exclure une activité thérapeutique de ces LNCs par voie orale.

Optimisation de la formulation

Les nouvelles LNCs n'ont pas montré toutes les mêmes qualités biopharmaceutiques que les LNCs standards en particulier sur la furtivité et la stabilité gastrique. Un travail (non décrit dans ce manuscrit) a été débuté afin d'optimiser la formulation. Dans la revue bibliographique il a été démontré que la présence de PEG évite la dégradation des particules dans les milieux gastro-intestinaux et qu'en présence d'une charge positive, l'internalisation par les entérocytes était augmentée [68-71]. De plus, le Solutol® inhibe la P-gp [43, 44](effet confirmé chapitre 3 de la partie I) dont le Sn38 est également substrat [72-74]. Par conséquent, du Solutol® a été ajouté à différentes quantités, à la trempe ou par post-insertion [75], à la formulation mise au point. En parallèle, des tests pour ajouter une charge positive à la surface de la formulation de LNCs ont été réalisés.

Dans une récente revue, Morille *et al.* [38] ont résumé les principaux systèmes conférant une charge positive. Nous en avons testé quatre (Table 1), et les meilleurs résultats en terme de charge mais également de conservation du taux d'encapsulation ont été obtenues avec la stéarylamine.


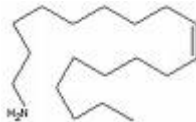
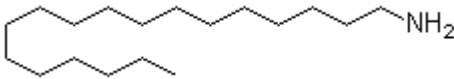
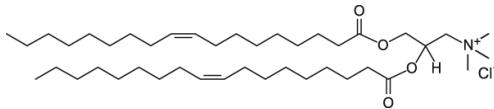
Formule chimique		
Dodecylamine	$C_{12}H_{27}N$	
Oleylamine	$C_{18}H_{37}N$	
Stéarylamine	$C_{18}H_{39}N$	
DOTAP	$C_{42}H_{80}ClNO_4$ (C_{17} au niveau de la chaîne)	

Table 1 : Formule chimique des différents lipides cationiques utilisés pour modifier la formulation de LNCs-Sn38.

Une amélioration de la stabilité dans le milieu gastrique (absence de libération de Sn38) et une augmentation du transport du Sn38 à travers le modèle cellulaire Caco-2 ont ainsi été démontrées *in vitro*. Des études *in vivo* devront alors être réalisées afin de montrer l'intérêt de ces optimisations.

Dans le cas hypothétique d'une amélioration de l'activité avec les LNCs modifiées avec de la stéarylamine, des études de toxicité devront également être réalisées avant d'envisager son administration chez l'être humain. En effet, actuellement, seul des études de toxicité aiguë ont été effectuée chez le rat et la souris par voie orale les DL 50 étant 2395mg/Kg et 300mg/kg respectivement. Un effet comportemental : somnolence, activité générale diminuée a également été observé.

Ces premiers résultats montrent donc qu'une optimisation de ces LNCs-Sn38 est encore possible.

Références

1. Müller RH, Rühl D, Runge SA. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutics* 1996;144(1):115-121.
2. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
3. Lindahl A, Ungell AL, Knutson L, Lennernas H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharm Res* 1997 Apr;14(4):497-502.
4. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm* 2008 Dec 8;364(2):213-226.
5. Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 1977 Aug 15;79(1):93-98.
6. Nanjee MN, Gebre AK, Miller NE. Enzymatic fluorometric procedure for phospholipid quantification with an automated microtiter plate fluorometer. *Clin Chem* 1991 Jun;37(6):868-874.
7. Grohganz H, Ziroli V, Massing U, Brandl M. Quantification of various phosphatidylcholines in liposomes by enzymatic assay. *AAPS PharmSciTech* 2003 Dec 15;4(4):E63.
8. Washington N, Washington C, Wilson CG. *Physiological pharmaceutics: Barriers to drug absorption*. second ed, 2001.
9. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Biochimie de Harper*. 25 ed, 2003.
10. Heurtault B, Saulnier P, Benoit JP, Proust J, Pech B, Richard J, inventors; Mainelab, université Angers, assignee. *Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament*. France, 2001.
11. *US Pharmacopeia XXIV*. Rockville, MD, 2006.
12. des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, Detrembleur C, Alonso-Sande M, Van Gelder J, et al. Helodermin-loaded nanoparticles: characterization and transport across an in vitro model of the follicle-associated epithelium. *J Control Release* 2007 Apr 23;118(3):294-302.
13. García-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003;27(2-3):159-168.
14. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 2008 Nov;4(6):1752-1761.
15. Tobío M, Sánchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato JL, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2000;18(3-4):315-323.

16. Anya M, Hillery AW, LaJS. Drug Delivery and Targeting for Pharmacist and Pharmaceutical Scientists. New York: Taylor & Francis, 2001.
17. Jantravid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res* 2008 Jul;25(7):1663-1676.
18. Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res* 2006 Jan;23(1):165-176.
19. Woodley JF. Liposomes for oral administration of drugs. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1985;2(1):1-18.
20. Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, Veillard M, Kreuter J. Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials* 1996 Apr;17(7):715-723.
21. Trapani A, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology* 2008;19(18).
22. Li H, Song JH, Park JS, Han K. Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. *Int J Pharm* 2003 Jun 4;258(1-2):11-19.
23. Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Morimoto K, Kakemi M, Yamashita S, et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: Improvement of stability of insulin in GI tract. *International Journal of Pharmaceutics* 1997;157(1):73-80.
24. Minato S, Iwanaga K, Kakemi M, Yamashita S, Oku N. Application of polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes for oral vaccine: effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity. *J Control Release* 2003 Apr 29;89(2):189-197.
25. Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Kakemi M, Morimoto K, Yamashita S, et al. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 1999 Feb;88(2):248-252.
26. Beduneau A, Saulnier P, Hindre F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 2007 Nov;28(33):4978-4990.
27. Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E, Leroux JC. Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2004 Oct;21(10):1783-1789.
28. des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, Preat V, Schneider YJ, Artursson P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *Eur J Pharm Sci* 2005 Jul-Aug;25(4-5):455-465.
29. Nellans HN. (B) Mechanisms of peptide and protein absorption: (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1991;7(3):339-364.
30. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, et al. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 1989 Mar;32(3):715-720.
31. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.

32. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 2005 Jun;7(7-8):997-1004.
33. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003 Feb 24;55(3):329-347.
34. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 1994 Dec;127(5):1217-1232.
35. Orłowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci* 2006 May;63(9):1038-1059.
36. Panyam J, Labhasetwar V. Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 2003 Feb;20(2):212-220.
37. Park JS, Han TH, Lee KY, Han SS, Hwang JJ, Moon DH, et al. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: endocytosis, exocytosis and drug release. *J Control Release* 2006 Sep 28;115(1):37-45.
38. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008 Aug-Sep;29(24-25):3477-3496.
39. Mudhakir D, Akita H, Tan E, Harashima H. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Control Release* 2008 Jan 22;125(2):164-173.
40. Valeur B. Invitation à la fluorescence moléculaire. 1 ed, 2004.
41. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 2006 Jul;5(7):1710-1722.
42. Lamprecht A, Benoit JP. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release* 2006 May 15;112(2):208-213.
43. Buckingham LE, Balasubramanian M, Safa AR, Shah H, Komarov P, Emanuele RM, et al. Reversal of multi-drug resistance in vitro by fatty acid-PEG-fatty acid diesters. *Int J Cancer* 1996 Jan 3;65(1):74-79.
44. Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res* 1991 Feb 1;51(3):897-902.
45. des Rieux A, Fievez V, Theate I, Mast J, Preat V, Schneider YJ. An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur J Pharm Sci* 2007 Apr;30(5):380-391.
46. Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997 Aug 15;277(5328):949-952.

47. Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW, et al. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Dec 29;279(3):808-813.
48. Wawrezynieck A, Pean JM, Wuthrich P, Benoit JP. [Oral bioavailability and drug/carrier particulate systems]. *Med Sci (Paris)* 2008 Jun-Jul;24(6-7):659-664.
49. Norris DA, Puri N, Sinko PJ. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Dec 1;34(2-3):135-154.
50. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 2006 Nov;116(1):1-27.
51. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Jul;50(1):147-160.
52. Brayden DJ. Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Eur J Pharm Sci* 2001 Oct;14(3):183-189.
53. Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 2005 Sep 1;10(17):1145-1157.
54. Lebrun V. Mise en place d'une plateforme de screening pour l'évaluation des performances de nanocapsules destinées à la voie orale. *Diplôme d'état d'études approfondies de pharmacotechnie et biopharmacie. Université de Paris XI, Faculté de Châtenay-Malabry: Ecole doctorale: Innovation thérapeutique, pôle pharmacotechnie et biopharmacie; 2005.*
55. Nardello V, Chailloux N, Poprawski J, Salager JL, Aubry JM. HLD concept as a tool for the characterization of cosmetic hydrocarbon oils. *Polymer International* 2003;52(4):602-609.
56. Lamas MC, Villaggi L, Nocito I, Bassani G, Leonardi D, Pascutti F, et al. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int J Pharm* 2006 Jan 13;307(2):239-243.
57. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC, Ronchi C, De Moraes CA. Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(3):762-768.
58. Elshafeey AH, Bendas ER, Mohamed OH. Intranasal microemulsion of sildenafil citrate: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. *AAPS PharmSciTech* 2009;10(2):361-367.
59. Zhang P, Liu Y, Feng N, Xu J. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm* 2008 May 1;355(1-2):269-276.
60. Singh AK, Chaurasiya A, Singh M, Upadhyay SC, Mukherjee R, Khar RK. Exemestane loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS): development and optimization. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(2):628-634.
61. Chen Y, Li G, Wu X, Chen Z, Hang J, Qin B, et al. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of vinpocetine: formulation development and in vivo assessment. *Biol Pharm Bull* 2008 Jan;31(1):118-125.
62. Mahmoud EA, Bendas ER, Mohamed MI. Preparation and evaluation of self-nanoemulsifying tablets of carvedilol. *AAPS PharmSciTech* 2009;10(1):183-192.

63. Atef E, Belmonte AA. Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur J Pharm Sci* 2008 Nov 15;35(4):257-263.
64. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. *Int J Pharm* 2004 Feb 11;270(1-2):93-107.
65. Dulieu C, Bazile D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm Res* 2005 Feb;22(2):285-292.
66. Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JD, 2nd, Lutz L, Friedman HS, Danks MK, et al. Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36(5):393-403.
67. Thompson J, Zamboni WC, Cheshire PJ, Richmond L, Luo X, Houghton JA, et al. Efficacy of oral irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Anticancer Drugs* 1997 Apr;8(4):313-322.
68. Gershanik T, Benita S. Positively charged self-emulsifying oil formulation for improving oral bioavailability of progesterone. *Pharm Dev Technol* 1996 Jul;1(2):147-157.
69. Gershanik T, Benita S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Jul;50(1):179-188.
70. Gershanik T, Haltner E, Lehr CM, Benita S. Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *Int J Pharm* 2000 Dec 15;211(1-2):29-36.
71. Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Feb 2;353(1):26-32.
72. Itoh T, Itagaki S, Sumi Y, Hirano T, Takemoto I, Iseki K. Uptake of irinotecan metabolite SN-38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005 May;55(5):420-424.
73. Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. *Eur J Pharm Sci* 2008 Dec 24.
74. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Mar 23;47(1):39-54.
75. Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett* 1996 May 20;386(2-3):243-246.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a porté sur l'administration d'anticancéreux par voie orale encapsulé dans un vecteur particulière : la nanocapsule lipidique. Pour ce faire, le paclitaxel, dont une formulation de LNCs est disponible au sein du laboratoire [1], a été étudié comme molécule modèle pour évaluer l'intérêt de son encapsulation dans les LNCs lors d'une administration orale. Ensuite, le Sn38, qui est la molécule active de la prodrogue irinotecan, et dont il n'existe pas actuellement de formulation sur le marché, a été encapsulé dans les nanocapsules lipidiques.

La première partie de ce travail a consisté à mettre en évidence les avantages pour la voie orale, d'une encapsulation dans les nanocapsules lipidiques. Ces particules présentent une stabilité et une conservation de l'encapsulation du paclitaxel dans les milieux gastro-intestinaux. De plus, une amélioration de la perméabilité du paclitaxel à travers la barrière intestinale a été démontrée *in vitro* lorsqu'il est encapsulé dans les LNCs. Les études de mécanistique ont montré que les nanocapsules étaient endocytées par un mécanisme actif, clathrine et cavéole dépendants et que des nano-objets étaient exocytées par les entérocytes. Une action réciproque entre l'effet effluent de la P-gp et l'endocytose des LNCs a également été mise en évidence.

Une formulation de nanocapsules lipidiques de Sn38 a ensuite été mise au point et caractérisée. La stabilité gastro-intestinale et l'augmentation de la perméabilité intestinale du Sn38 avec cette formulation a également été confirmée *in vitro*. Au cours des études *in vivo*, une faible activité antitumorale des LNCs-Sn38 à la dose de 20mg/kj/j par voie orale a été observée. Cette dose est 3,3 fois inférieure à la dose d'irinotécan recommandée par voie orale (66mg/kg/j), or le Sn38 est approximativement 1000 fois plus actif que l'irinotécan *in vitro* [2-4]. Cette faible activité après administration orale n'est actuellement pas expliquée.

Les prochains travaux devront être axés sur la détermination de la structure des LNCs après passage du tractus gastro-intestinal et des entérocytes. Dans le cas d'une dégradation de la particule, une optimisation devra être réalisée afin de protéger la molécule encapsulée jusqu'à son site d'action. L'optimisation devra augmenter la stabilité des LNCs dans les milieux gastro-intestinaux et dans l'entérocyte tout en permettant une libération de la molécule sur son site d'action. De plus, la connaissance

du mode de transcytose devrait permettre d'optimiser la formulation en répondant à ces différentes interrogations:

- les particules se retrouvent-elles dans les endo-lysosomes et y sont-elles stables ?
- sont-elles capables d'échapper aux endo-lysosomes, dans ce cas sont-elles stables dans le cytoplasme et par quel mécanisme sont-elles exocytés ?
- les particules passent-elles dans le système lymphatique ?

L'utilisation d'un modèle *in vitro* associant des cellules M et des entérocytes permettrait d'évaluer la capacité de transport des LNCs par les plaques de Peyer. L'influence de la surface pourrait alors être étudiée dans le but d'axer plus spécifiquement le mode d'endocytose des LNCs au niveau de l'épithélium intestinal.

Dans le cas d'un passage intact, un travail d'optimisation sur les LNCs-Sn38 devra être réalisé pour que ces particules possèdent une faible activation du système du complément ce qui favoriserait une action ciblée de la molécule encapsulée. En effet, normalement les nanocapsules lipidiques possèdent une faible activation du système du complément [5] et un temps de demi-vie de 20 à 30min après injection chez le rat [6].

Par ailleurs, afin de savoir si les LNCs-Sn38 peuvent présenter une activité thérapeutique, des études sur d'autres modèles tumoraux murins devront être envisagées. Une lyophilisation de la formulation pourra également être réalisée afin d'augmenter la dose administrable par voie orale. L'activité thérapeutique du Sn38 étant potentialisée en présence d'irradiation [7], une combinaison LNCs-Sn38 par voie orale et irradiation pourra être testée. Enfin, lorsque les injections sont plus nombreuses, une activité antitumorale des LNCs-Sn38 équivalente à l'irinotécan a été démontrée après injection par voie intraveineuse. Le traitement actuellement proposé avec l'irinotécan (Campto®) présente comme inconvénient majeur une forte variation interindividuelle due, notamment, au métabolisme du CPT-11 en Sn38. Cette formulation de LNCs-Sn38 pourrait donc être une alternative à ces variations interindividuelles lors d'une administration intraveineuse.

Pour finir, les modifications apportées à la formulation des nanocapsules lipidiques développées pour encapsuler le Sn38 pourraient s'appliquer à de nombreuses molécules thérapeutiques. En effet, le Transcutol® est utilisé dans de nombreuses formulations [8-15] pour solubiliser un principe actif. De plus, certaines molécules présentent une différence de solubilité en fonction du pH. Par conséquent, la stratégie d'ajout d'une base à la place de l'eau au moment de la préparation de l'émulsion et la formation des LNCs avec une trempe acide, pourrait être adaptée à la formulation classique et élargir le panel de molécules pouvant être encapsulées dans les LNCs. Ces modifications constituent donc de nouvelles alternatives pour encapsuler des principes actifs dans les nanocapsules lipidiques.

Ainsi, le développement de systèmes particuliers pour l'encapsulation d'anticancéreux constitue une stratégie prometteuse pour l'administration orale des molécules présentant une faible biodisponibilité. La fabrication des LNCs devra maintenant être transposée à l'échelle industrielle et la formulation d'une forme sèche de ces particules, actuellement dispersée dans une phase aqueuse, pourra être envisagée. De plus, la première étape dite « essai préclinique » d'une administration par voie intraveineuse et orale des LNCs-Sn38 a été débutée, une poursuite des essais pourrait être envisagée pour l'utilisation de cette formulation pour le traitement de tumeur du colon, par exemple.

Même si de nombreux challenges restent à relever, l'administration orale des chimiothérapies a donc un avenir. Nous espérons que dans quelques années, cette voie d'administration sera plus largement utilisée lors d'un traitement anticancéreux afin d'améliorer la qualité de vie du patient.

Références

1. Peltier S, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoit JP. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res* 2006 Jun;23(6):1243-1250.
2. Dumez H, Awada A, Piccart M, Assadourian S, Semiond D, Guetens G, et al. A phase I dose-finding clinical pharmacokinetic study of an oral formulation of irinotecan (CPT-11) administered for 5 days every 3 weeks in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol* 2006 Jul;17(7):1158-1165.
3. Drengler RL, Kuhn JG, Schaaf LJ, Rodriguez GI, Villalona-Calero MA, Hammond LA, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of oral irinotecan administered daily for 5 days every 3 weeks in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 1999 Feb;17(2):685-696.
4. Chabner BA, Longo DL. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. Philadelphia, Baltimore, New-York, 2005.
5. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J Biomed Mater Res A* 2006 Sep 1;78(3):620-628.
6. Ballot S, Noiret N, Hindre F, Denizot B, Garin E, Rajerison H, et al. ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006 May;33(5):602-607.
7. Omura M, Torigoe S, Kubota N. SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, potentiates the cytotoxic effect of radiation in human colon adenocarcinoma cells grown as spheroids. *Radiother Oncol* 1997 May;43(2):197-201.
8. Chen Y, Li G, Wu X, Chen Z, Hang J, Qin B, et al. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of vinpocetine: formulation development and in vivo assessment. *Biol Pharm Bull* 2008 Jan;31(1):118-125.
9. Atef E, Belmonte AA. Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur J Pharm Sci* 2008 Nov 15;35(4):257-263.
10. Zhang P, Liu Y, Feng N, Xu J. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm* 2008 May 1;355(1-2):269-276.
11. Mahmoud EA, Bendas ER, Mohamed MI. Preparation and evaluation of self-nanoemulsifying tablets of carvedilol. *AAPS PharmSciTech* 2009;10(1):183-192.
12. Elshafeey AH, Bendas ER, Mohamed OH. Intranasal microemulsion of sildenafil citrate: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. *AAPS PharmSciTech* 2009;10(2):361-367.
13. Xi J, Chang Q, Chan CK, Meng ZY, Wang GN, Sun JB, et al. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS PharmSciTech* 2009;10(1):172-182.
14. Lamas MC, Villaggi L, Nocito I, Bassani G, Leonardi D, Pascutti F, et al. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benzimidazole. *Int J Pharm* 2006 Jan 13;307(2):239-243.
15. Singh AK, Chaurasiya A, Singh M, Upadhyay SC, Mukherjee R, Khar RK. Exemestane loaded self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS): development and optimization. *AAPS PharmSciTech* 2008;9(2):628-634.

ANNEXE

Emilie ROGER

Née le 06/12/80 à Baugé (49)

Nationalité française

✉ : 6 place de la paix, 49100 Angers

☎ : 09 50 43 06 12 - 06 16 41 19 51

✉ : rogeremilie6@gmail.com

Situation actuelle

Etudiante en 3^{ème} années de THESE DE DOCTORAT en convention CIFRE

Ethypharm, Saint Cloud (92) / INSERM U646 (49), dirigé par le Pr. JP Benoit et le Dr F. Lagarce.

Sujet thèse : **Mise au point de vecteurs colloïdaux destinés à améliorer l'absorption de médicaments utilisés par voie orale**

Formations

2005 - 2006

MASTER RECHERCHE PHYSICO-CHIMIE, FORMULATION, VECTORISATION ET PRODUCTION DES PRODUITS DE SANTE, Mention bien

Faculté de Pharmacie, Paris XI, Université de Chatenay Malabry (Pr E Fattal)

1998 - 2006

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE, Université d'Angers.

Thèse d'exercice : Mention Très Bien (Déc. 2006)

Sujet : Intérêt de l'utilisation des formulations lipidiques dispersées pour faciliter l'absorption intestinale des principes actifs lipophiles : application au Paclitaxel

1998

Baccalauréat Scientifique, spécialité mathématique

Autres formations :

- Expérimentation animale - Niveau I

- LC-MS(/MS) School (Waters)

- Initiation à la prévention des risques professionnels en laboratoire de recherche

- Formation de veille technologique (ANRT)

Autres connaissances :

Langues : Anglais : Lu, écrit, parlé

Informatique: Word, Excel, Power-Point, Pubmed, Scopus, Endnote, Adobe Photoshop, ImageJ

Expériences Professionnelles

Depuis nov. 2006

THESE DE DOCTORAT

Ethypharm, Saint Cloud (92) - INSERM U646, Université d'Angers (49)

Compétences : Formulation : nanocapsules.

Caractérisation : taille, zêta, dosage (HPLC-UV, spectro UV, LC-MS/MS).

In vitro : culture cellulaire (Caco-2, HT-29), FACS, MTS.

In vivo : mise place d'un modèle de cancer du colon sous cutané, étude pharmacodynamie.

Gestion projet, présentation orale et rapport d'activité.

Encadrement : 1étudiante Erasmus (Allemande) en 3^{ème} année de pharmacie (6 mois) ; 1étudiante en 2^{ème} année d'IUT (2mois) ; 4 étudiants en 2^{ème} année de médecine (1mois) et 1 étudiante en 2^{ème} année de pharmacie (1 mois).

2009

ENSEIGNEMENTS : TP de galénique de 2^{èmes} années de pharmacie (11x4h)

UFR des Sciences Pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Angers (49)

2006 - 9mois **STAGE DE MASTER ET 6^{ème} ANNEE DE PHARMACIE**
INSERM U646, Université d'Angers (49)

Projet : Optimisation de la formulation de nanocapsules lipidiques de Paclitaxel destinées à la voie orale

Compétences : Formulation nanocapsules, HPLC-UV, LC-MS/MS, validation du modèle cellulaire Caco-2, FACS.

2004 - 3mois **STAGE ERASMUS - INITIATION A LA RECHERCHE**
Université d'Utrecht (Pays-Bas), laboratoire de Biopharmacie (Pr. W. Hennink)

Sujet de recherche : Incorporation d'un polymère biodégradable dans la double couche de phospholipides de liposomes afin de contrôler la libération de Principes Actifs.

Compétences : Formulation (liposome), caractérisation (taille, DSC, NMR, HPLC-UV)

2003 - 1mois **STAGE DE DECOUVERTE EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE**
Laboratoire Brothier, Fontevraud l'Abbaye (49)

Mission : Adéquation d'une méthode de dosage existante à l'analyse d'un nouveau dispositif médical.

2004 - 1an **STAGES HOSPITALIERS, 5^{ème} ANNEE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**
CHU d'Angers (49)

Pharmacie centrale – Laboratoire de contrôle : mise en place de procédure, contrôle des matières premières et produits finis, fabrication de préparations hospitalières

Service de réanimation chirurgicale: découverte d'un service clinique, travail bibliographique sur les incompatibilités physico-chimique par voie intraveineuse.

Gérontologie : découverte d'un service clinique

Centre de recherche clinique : participation aux études cliniques en cours, mise en place de procédures.

Autres expériences :

2005-2006 Cours particuliers avec Complétude : cours de mathématique (niveau 6^{ème}, 4^{ème}, 3^{ème}, 1^{ère} et terminal), cours de physique-chimie (niveau 1^{ère} et terminale)

2001-2005 (samedis et vacances scolaires)
Pharmacie : délivrance d'ordonnances, rangement des commandes.

Autres travaux saisonniers : travaux d'usine, baby-sitting, travaux agricoles, services hôtelier.

Centres d'intérêts

Associatif : Secrétaire de l'association Dalilou, membre de l'association Jokala Mali

Sports: Danse Africaine, squash, footing.

Voyages : Espagne, Angleterre, Tunisie, Canada, Turquie, Pays-Bas, Cambodge, Philippines, Crète, Laos, Floride, Mali.

Autres : musique (joue du piano).

Productions scientifiques

Publications

The gastrointestinal stability of Lipid Nanocapsules

E. Roger, F. Lagarce, J-P Benoit (publiée dans *International Journal of Pharmaceutics*)

Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis.

E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J-P Benoit (publiée dans *Journal of controlled release*)

Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells

E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J-P Benoit (soumise à *Biomaterials*)

Oral delivery of nanocarriers: why and how should particle integrity be sought?

E. Roger, F. Lagarce, J-P Benoit (soumise à *Nanomedicine U.K*)

Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel.

Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Clavreul A, Roger E, Kempf M, Racineux JL, Diot P, Benoit JP, Urban T. (publiée dans *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*)

Brevet

Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament.

Date de dépôt de la demande septembre 2009.

Communication orale

First clues in elucidating the transport mechanism of Paclitaxel Lipid Nanocapsules across intestinal Barrier

E. Roger, F. Lagarce, A. Clavreul, A. Paillard, E. Garcion, J-P Benoit
XXIIème Journées Scientifiques du GTRV, Strasbourg, Décembre 2007

Communications écrites

Lipid nanocapsules improve Paclitaxel transport across a human intestinal barrier model through a P-gp related mechanism

E. Roger, F. Lagarce, C. Gaillard, E. Garcion, J-P Benoit
6th World meeting on Pharmaceutics biopharmaceutics and pharmaceutical technology, Barcelone, Avril 2008

Lipid nanocapsules improve Paclitaxel transport across a human intestinal barrier model through a P-gp related mechanism

E. Roger, F. Lagarce, C. Gaillard, E. Garcion, J-P Benoit
1ère journée thématique de l'IFR 132, Avril 2008

Gastrointestinal stability of Lipid Nanocapsules

E. Roger, F. Lagarce, J-P Benoit
XXIIIème Journées Scientifiques du GTRV, Angers, Décembre 2008.

Divers

Réalisation et rédaction du « **nouveau chapitre de la thèse : valorisation des compétences** ». Ecole doctorale, Université d'Angers et l'ABG (Association Bernard Gregory).

Sélectionnée et participation à la **4^{ème} école d'été du Leem recherche (journées François Hyafil)** : « Recherche et développement du médicament : La recherche pré-clinique », septembre 2009.

Titre : Mise au point de vecteurs colloïdaux pour améliorer l'absorption d'anticancéreux utilisés par voie orale.

Résumé

Ces travaux de thèse ont porté sur l'utilisation d'un nouveau vecteur particulière lipidique (LNCs) destiné à la voie orale. Ce système devrait permettre d'encapsuler une molécule anticancéreuse et améliorer sa biodisponibilité.

Notre premier axe de recherche a été d'étudier les propriétés *in vitro* des LNCs encapsulant du paclitaxel en vue d'une administration par voie orale. La stabilité *in vitro* dans les milieux gastro-intestinaux simulés a été démontrée. De plus, les études de transport à travers l'épithélium intestinal (modèle cellulaire Caco-2) ont montré que les LNCs permettaient d'augmenter le transport du paclitaxel grâce à un mécanisme d'endocytose actif clathrine- et cavéole-dépendant situé dans le microenvironnement de la P-gp. Nous avons aussi mis en évidence les interactions entre l'endocytose des nanocapsules et l'activité de la P-gp.

Notre second axe de recherche a porté sur l'application des LNCs pour encapsuler un nouvel anticancéreux : le Sn38 qui est le métabolite actif de l'irinotécan. Une formulation modifiée de nanocapsules lipidiques a été obtenue en utilisant un co-tensioactif et une huile hydrophile en plus des excipients standards. Les propriétés physico-chimiques et la stabilité, l'absorption épithéliale et la toxicité *in vitro* de cette formulation ont ensuite été vérifiées. Enfin, une activité antitumorale de courte durée après administration orale chez la souris a été observée.

Ce travail fait donc la preuve de concept de l'absorption d'anticancéreux après administration par voie orale à l'aide de vecteurs colloïdaux. Néanmoins, certaines optimisations restent encore à réaliser pour prévoir une application clinique.

Mots clés : Paclitaxel, Sn38, nanocapsules lipidiques, voie orale, absorption, stabilité, tractus gastro-intestinal, modèle cellulaire Caco-2.

Title: Development of colloidal vectors to improve absorption of anticancer drug used by oral route.

Abstract

This work of thesis concerns the use of new lipidic nanocarriers (LNCs) for oral administration. This system should make it possible to encapsulate anticancer drug and to improve its bioavailability after oral administration.

In the first part of our work, *in vitro* properties of paclitaxel-loaded LNCs were studied in view of oral administration. The gastrointestinal stability was demonstrated after contact with *in vitro* simulated media. Moreover, studies of transport through the intestinal epithelium (Caco-2 cell model) showed that LNCs improve paclitaxel transport by active endocytic processes, especially via caveolae- and clathrin-mediated endocytosis and located in the microenvironment of the P-gp. The interaction of LNCs endocytocys and P-gp was also determined.

In the second part, lipid nanocapsules were formulated with a new anticancer drug: Sn38 which is the active metabolite of irinotecan. The physicochemical and stability, intestinal absorption and cytotoxicity *in vitro* properties of this formulation were checked. Finally, an antitumor activity of short duration after oral administration in the mouse was observed.

This work is the proof of concept of absorption of anticancer drug using after oral administration of colloidal carriers. Nevertheless, some optimizations still remain to be realized to consider a clinical application.

Keywords : Paclitaxel, Sn38, lipid nanocapsules, orale route, absorption, stability, gastro-intestinal tract, Caco-2 cells.

Laboratoire d'accueil : INSERM U646, 10 rue André Boquel, 49100 Angers, France.