HAL
open science

Évaluation d'une forme galénique à base d'alpha cyclodextrine et d'huile végétale pour l'administration par voie orale de molécules actives peu solubles dans l'eau

Mounira Cherifa Hamoudi

To cite this version:

Mounira Cherifa Hamoudi. Évaluation d'une forme galénique à base d'alpha cyclodextrine et d'huile végétale pour l'administration par voie orale de molécules actives peu solubles dans l'eau. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114826 . tel-00769948

HAL Id: tel-00769948

https://theses.hal.science/tel-00769948v1

Submitted on 4 Jan 2013

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ÉCOLE DOCTORALE:

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE: DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ
PÔLE: PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

ANNÉE 2011-2012 SÉRIE DOCTORAT N° 1182

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

Melle Mounira Chérifa HAMOUDI

"ÉVALUATION D'UNE FORME GALÉNIQUE À BASE D'ALPHA CYCLODEXTRINE ET D'HUILE VÉGÉTALE POUR L'ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE MOLÉCULES ACTIVES PEU SOLUBLES DANS L'EAU"

Soutenue le: ***13 Juillet 2012***

JURY:	Mme Le Docteur Amélie BOCHOT	Directeur de thèse
	Mme Le Professeur Dominique DUCHÊNE	Examinateur
	M. Le Professeur Elias FATTAL	Examinateur
	Mme Le Docteur Géraldine PIEL	Examinateur
	M. Le Professeur Juergen SIEPMANN	Rapporteur
	M. Le Professeur Denis WOUESSIDJEWE	Rapporteur

A la mémoire de mon père,

A ma mère,

A toute ma famille,

A tous mes amis,

En témoignage de mon affection

Ce travail a été effectué au sein de l'UMR CNRS 8612, au laboratoire de Physico-Chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie de la Faculté de Pharmacie (Université Paris-Sud 11) dans le cadre de l'Ecole Doctorale «Innovation Thérapeutique: du Fondamental à l'Appliqué».

Je remercie vivement Monsieur Le Professeur ***Marc PALLARDY***, pour m'avoir accueillie au sein de cette Ecole Doctorale, dont il assure la Direction.

Mes remerciements les plus vifs vont également à Monsieur Le Professeur ***Elias FATTAL***, Directeur de l'UMR CNRS 8612, pour son accueil chaleureux au sein de son unité de Recherche et de son équipe. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude pour son soutien continu tout au long de ces années.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame Le Docteur ***Amélie BOCHOT****,*
Je tiens à lui exprimer ici ma profonde reconnaissance pour avoir assuré la direction scientifique de cette thèse et m'avoir fait profiter de ses compétences et de son savoir-faire qu'elle a su me transmettre tout au long de ces années. Je la remercie vivement pour son aide précieuse, ses conseils avisés et ses critiques pertinentes au cours de nos discussions fructueuses qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je remercie également très particulièrement Madame ***Dominique DUCHÊNE***, Professeur Emérite à la Faculté de Pharmacie (Université Paris-Sud 11), pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de faire partie du Jury.

Monsieur ***Juergen SIEPMANN***, Professeur de Pharmacotechnie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2 et

Monsieur ***Denis WOUESSIDJEWE***, Professeur de Pharmacotechnie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de *Grenoble* - Université Joseph Fourier Grenoble 1
ont accepté d'être les rapporteurs scientifiques de ce travail. Je les prie de bien vouloir trouver ici mes plus vifs remerciements pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Le Docteur ***Géraldine PIEL***, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de faire partie du Jury.

Ce travail est le fruit d'une collaboration interdisciplinaire entre plusieurs équipes qui ont contribué de manière importante aux résultats obtenus.

Je remercie vivement:

Madame Le Docteur ***Claire GUEUTIN*** de l'UMR CNRS 8612, pour son amabilité et sa disponibilité pour les dosages par chromatographie liquide haute performance.

Madame Le Docteur ***Valérie NICOLAS*** de la Plateforme Imagerie Cellulaire, IFR 141, de la Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, grâce à qui les analyses en microscopie confocale ont pu être menées à bien.

Madame Le Docteur ***Johanna SAUNIER*** de l'équipe EA 401, Matériaux et Santé, de la Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, pour les Analyses Thermogravimétriques et en Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier.

Madame Le Docteur ***Fanchon BOURASSET*** de l'équipe EA 2706, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique, de la Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, pour m'avoir si gentiment fait profiter de ses compétences sur les interprétations pharmacocinétiques des résultats obtenus *in vivo* chez le rat.

Madame ***Valérie DOMERGUE-DUPONT*** de l'IPSIT, de la Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, pour son assistance dans l'étape éprouvante du gavage des rats lors des études *in vivo.*

Rym SKANJI qui m'a aidée à calmer des rats surexcités, surtout en début de manipulation. Un grand merci Rym pour ton sourire et ta disponibilité.

Je suis également infiniment reconnaissante envers Le *Docteur Simon HARRISSON* qui a mis, sans réserve, ses compétences à mon service dans les corrections et relectures des articles en anglais. Merci pour ton amitié et ta disponibilité Simon et soit assuré de ma profonde amitié.

Je remercie tous les stagiaires qui ont travaillé avec moi sur ce sujet: *Luise DEMMLER, Sophie BOYER, Anthony BUSSIERE et Christophe DURAND.*

Je tiens à associer à ces remerciements Mesdames *Patriciat LIVET*, *Lucie LANDRY* et *Nadine ROBETTE* pour leur gentillesse et leur efficacité à régler toutes mes affaires administratives.

Une pensée émue pour toutes les personnes avec qui j'ai partagé un bureau, un café ou un repas, qui m'ont offert leur amitié et leur soutien inconditionnel tout au long de ces années de thèse. Qu'ils me permettent de leur exprimer ici toute ma gratitude et mes remerciements les plus chaleureux. Le climat de sympathie et de convivialité qu'ils ont su créer a rendu mon séjour agréable au sein du laboratoire: *Nadège, Franceline, Romain, Marion, Nathalie, Amélie, Olivier* et le groupe des chimistes toujours de bonne humeur et prêts à aider: *Nicolas, Benjamin, Lucien et Davidé.*

Enfin, mes remerciements s'adressent tout particulièrement à toi maman, ma meilleure amie depuis toujours, mon coach au quotidien, toi qui n'a jamais cessé de croire en moi et de m'encourager en trouvant toujours les mots qui me font aller de l'avant. Ta présence et tes encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci pour tout maman.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE 8

2. TRAVAUX ANTÉRIEURS 14

Introduction 17

2.1. Les systèmes auto (micro, nano) émulsionnants 20

2.2. Les émulsions sèches 32

2.3. Les systèmes lipidiques à base de cyclodextrines: Publication I: Interactions entre les cyclodextrines et les triglycérides: de la stabilisation des émulsions à l'obtention d'un nouveau système galénique appelé «billes» 40

Conclusion 51

Références 53

3. TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX 62

Chapitre 1: Etude de l'encapsulation de la progestérone dans les billes: effet de la concentration en progestérone dans l'huile de soja sur la formation des billes et leurs caractéristiques 64

Introduction 66

Matériel et méthodes 66

Résultats 70

Conclusions 76

Références 77

Chapitre 2: Potentiel des billes de cyclodextrine et d'huile de soja pour l'administration par voie orale de molécules lipophiles: Etudes *in vitro* dans les milieux digestifs simulés

Publication II: Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: *In vitro* studies in simulated gastro-intestinal fluids 78

Abstract 81

Introduction 82

Materials and methods 83

Results 89

Discussion 97

References 101

Chapitre 3: Formulations à base d'alpha cyclodextrine et d'huile de soja: une approche pour moduler la libération par voie orale de principes actifs lipophiles
Publication III: Formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil: An approach to modulate the oral release of lipophilic drugs 104
Abstract 107
Introduction 108
Materials and methods 109
Results 114
Discussion 121
Conclusions 124
References 126
Annexe 130
Introduction 132
Matériel et méthodes 132
Résultats 132
Conclusion 134
Chapitre 4: Influence du mode de séchage sur les propriétés des billes, la libération de la molécule encapsulée et la stabilité des billes pendant leur conservation
Publication IV: Beads made of alpha-cyclodextrin and soybean oil: the drying method influences bead properties and drug release 136
Abstract 139
Introduction 140
Materials and methods 140
Results 146
Discussion 152
Conclusion 155
References 157
Annexe 160
Introduction 162
Matériel et méthodes 162
Résultats et discussion 162
Conclusion 164
4. DISCUSSION GÉNÉRALE 166
5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 192

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les avancées rapides de la chimie permettent d'identifier un très grand nombre de nouvelles molécules intéressantes d'un point de vue pharmacologique. Toutefois, celles-ci sont souvent apolaires. En effet, à ce jour, plus de 40% des principes actifs (PA) en développement sont peu solubles dans l'eau *(Kommuru et al., 2001, Dahan and Hoffman, 2008, Miller et al., 2012)* et appartiennent aux classes II (peu solubles mais perméables) et IV (peu solubles et faiblement perméables) de la classification biopharmaceutique *(Amidon et al., 1995)*. Selon ce système de classification, l'absorption d'une molécule active est régie par deux principaux facteurs: (i) les caractéristiques de solubilité et de dissolution de la molécule dans les fluides digestifs et (ii) sa capacité à traverser les membranes intestinales *(Amidon et al., 1995, Lobenberg and Amidon, 2000, Martinez and Amidon, 2002, Yu et al., 2002, Dahan et al., 2009)*. Etant donné qu'un PA doit au préalable se dissoudre dans le tractus gastro-intestinal avant d'être absorbé et que les molécules apolaires présentent de faibles solubilités dans l'eau, celles-ci ont souvent une biodisponibilité non suffisante pour obtenir l'action thérapeutique souhaitée. Le devenir *in vivo* de ces molécules dépend non seulement de la molécule en elle-même mais aussi du système galénique qui doit la libérer de façon optimale pour obtenir l'effet thérapeutique recherché *(Mehnert and Mader, 2001)*. Le développement de systèmes d'administration par voie orale, permettant de formuler ces molécules apolaires pour une utilisation en thérapeutique, représente donc un grand défi pour l'industrie pharmaceutique *(Porter et al., 2007, Dahan et al., 2008, O'Driscoll and Griffin, 2008, Mudie et al., 2010, Sugano, 2010, Di Maio and Carrier, 2011)*. Le recours à des formulations lipidiques est l'une des stratégies possibles pour formuler ces PA *(Shively, 1993, Dahan and Hoffman, 2008, Porter et al., 2008)* car elles peuvent améliorer leur biodisponibilité par voie orale.

Un nouveau système contenant des cyclodextrines (CD) (oligosaccharides cycliques) et de l'huile se présentant sous la forme de particules de 1,6 mm a été breveté *(Bochot et al., 2006)* et développé au sein de l'UMR CNRS 8612. Ces particules, appelées billes, sont fabriquées à partir d'un mélange de CD naturelles, d'eau et d'huile, selon un procédé innovant, n'impliquant qu'une agitation orbitale externe et continue (quelques jours) de la formulation. Les matières premières de ce système sont non toxiques, approuvées par les diverses autorités de santé (monographies à la Pharmacopée Européenne, Américaine et Japonaise) et produites à l'échelle industrielle sans coût excessif. La caractérisation et la compréhension du mécanisme de formation des billes a fait l'objet de la thèse de Laury Trichard *(Trichard, 2007)*. Très riches en huile (80%), les billes peuvent encapsuler des PA lipophiles comme l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)* et l'adapalène *(Trichard et al., 2008)*. Lyophilisées, ces particules sont administrables dans des gélules. *In vivo*, la biodisponibilité de l'isotrétinoïne encapsulée dans les billes et administrée par voie orale à des

rats est doublée par rapport à celle obtenue avec le contenu d'une capsule molle de Roaccutane® *(Trichard et al., 2007)*.

L'objectif général de ce travail de thèse a consisté à étudier le potentiel des billes pour l'administration orale de PA de classe II. Pour cela, leur comportement *in vitro* dans des milieux digestifs simulés et *in vivo* a été étudié.

Ce manuscrit s'articule en deux grandes parties:

Une première partie bibliographique nous permet de positionner les billes d'α-CD et d'huile par rapport aux systèmes émulsionnés décrits dans la littérature et utilisés pour tenter d'améliorer la biodisponibilité par voie orale des molécules actives peu solubles dans l'eau. Les procédés d'obtention des systèmes, leurs compositions et caractéristiques ainsi que leurs intérêts sont largement développés dans cette partie.

La seconde partie du manuscrit, qui concerne les travaux expérimentaux, est rédigée sous forme d'un recueil de publications et chapitres:

Le **chapitre 1** est consacré à l'étude de l'encapsulation de la progestérone, choisie comme PA modèle, dans les billes nues (billes étudiées précédemment par L. Trichard), ainsi qu'à l'effet de sa concentration dans l'huile de soja sur la formation et les caractéristiques de ces dernières.

Le **chapitre 2** s'intéresse au comportement des billes nues et au mécanisme de libération de la progestérone, à partir de celles-ci, dans des milieux digestifs simulés.

Le **chapitre 3** porte sur la formation et la caractérisation d'une coque d'α-CD autour des billes nues et la modulation de la libération d'un PA modèle, l'indométacine, à partir d'une émulsion sèche, des billes nues et des billes coquées, après administration par voie orale chez le rat nourri et à jeun.

Le **chapitre 4** présente l'influence du mode de séchage (lyophilisation ou séchage à l'étuve) sur le comportement *in vitro* des billes nues et coquées. Une étude de stabilité au cours du temps des billes séchées dans différentes conditions de conservation est également présentée.

Une discussion générale résume l'intérêt et les potentialités des billes nues pour l'encapsulation de PA peu solubles dans l'eau. Elle propose un mécanisme global de libération du PA à partir des billes et débat de l'impact de la coque et de la méthode de séchage sur leur comportement *in vitro*.

La conclusion fait le point sur l'ensemble des avancées apportées par ce travail et sur les perspectives de recherche proposées pour compléter et approfondir la compréhension des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Références

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharm Res,* 12, 413-420.

Bochot, A., Alphandary, H., Duchêne, D. and Fattal, E. 2006. *Microencapsulation systems and applications of same*. US: 20060188464.

Dahan, A., Duvdevani, R., Shapiro, I., Elmann, A., Finkelstein, E. and Hoffman, A. 2008. The oral absorption of phospholipid prodrugs: in vivo and in vitro mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration. *J Control Release,* 126, 1-9.

Dahan, A. and Hoffman, A. 2008. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J Control Release,* 129, 1-10.

Dahan, A., Miller, J. M. and Amidon, G. L. 2009. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J,* 11, 740-746.

Di Maio, S. and Carrier, R. L. 2011. Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery. *J Control Release,* 151, 110-122.

Kommuru, T. R., Gurley, B., Khan, M. A. and Reddy, I. K. 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm,* 212, 233-246.

Lobenberg, R. and Amidon, G. L. 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm,* 50, 3-12.

Martinez, M. N. and Amidon, G. L. 2002. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J Clin Pharmacol,* 42, 620-643.

Mehnert, W. and Mader, K. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev,* 47, 165-196.

Miller, J., Beig, A., Carr, R., Webster, G. and Dahan, A. 2012. The solubility-permeability interplay when using cosolvents for solubilization: revising the way we use solubility-enabling formulations. *Mol Pharm,* 9 (3), 581-590.

Mudie, D. M., Amidon, G. L. and Amidon, G. E. 2010. Physiological Parameters for Oral Delivery and in Vitro Testing. *Mol Pharm*.

O'driscoll, C. M. and Griffin, B. T. 2008. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility--the potential impact of lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev,* 60, 617-624.

Porter, C. J., Trevaskis, N. L. and Charman, W. N. 2007. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov,* 6, 231-248.

Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F. and Charman, W. N. 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.,* 60, 673-691.

Shively, M. L. 1993. Characterization of Oil-in-Water Emulsions Prepared from Solid-State Emulsions - Effect of Matrix and Oil Phase. *Pharm. Res.,* 10, 1153-1156.

Sugano, K. 2010. Aqueous Boundary Layers Related to Oral Absorption of a Drug: From Dissolution of a Drug to Carrier Mediated Transport and Intestinal Wall Metabolism. *Mol Pharm*.

Trichard, L. 2007. Billes à base de cyclodextrines et d'huile : étude du mécanisme de formation et évaluation du potentiel en formulation et en thérapeutique. Pharm: Paris-Sud 11. p 1-203

Trichard, L., Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H., Fattal, E. and Bochot, A. 2008. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. *Pharm Res,* 25, 435-440.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M. and Bochot, A. 2007. Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. *J Control Release,* 122, 47-53.

Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., Shah, V. P., Lesko, L. J., Chen, M. L., Lee, V. H. and Hussain, A. S. 2002. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res,* 19, 921-925.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

La partie des travaux antérieurs intitulée «**Les systèmes lipidiques à base de cyclodextrines»** a été publiée dans les *annales pharmaceutiques françaises,* complétée et mise à jour jusqu'à décembre 2011

Hamoudi, M., Trichard, L., Grossiord, J. L., Chaminade, P., Duchêne, D., Le Bas, G., Fattal, E. and Bochot, A. 2009. **Interactions entre les cyclodextrines et les triglycérides: de la stabilisation des émulsions à l'obtention d'un nouveau système galénique appelé «billes»**. *Annales Pharmaceutiques Françaises,* 67 (6), 391-398.

Introduction **17**
1. Les systèmes auto (micro, nano) émulsionnants (S(M,N)EDDS) **20**
1.1. Définition, classification et caractéristiques 20
1.2. Composition 21
1.3. Mécanisme de l'auto-émulsification 23
1.4. Micro-émulsions et SMEDDS 24
1.5. Nano-émulsions et SNEDDS 25
1.6. Intérêts 27
1.6.1. Réduction des variabilités intra- et inter-individuelles 27
1.6.2. Amélioration de la biodisponibilité 28
1.7. Limites 31
2. Les émulsions sèches **32**
2.1. Définition et caractéristiques 32
2.2. Composition 32
2.3. Méthodes d'obtention 33
2.4. Méthodes de caractérisation 33
2.4.1. Sur l'émulsion sèche 33
2.4.2. Sur l'émulsion reconstituée 34
2.5. Intérêts 35
2.5.1. Amélioration de la biodisponibilité et de la solubilisation des PA encapsulés 35
2.5.2. Amélioration de la stabilité lors de la conservation 38
2.5.3. Possibilité de transformer la poudre d'ES en formes unitaires sèches 38
2.6. Limites 38
3. Les systèmes lipidiques à base de cyclodextrines **40**
3.1. Emulsions simples et multiples stabilisées par les cyclodextrines 41
3.1.1. Aptitude des cyclodextrines à stabiliser les émulsions 41
3.1.2. Mécanisme de stabilisation des émulsions en présence de cyclodextrines 42
3.2. Billes à base de cyclodextrines naturelles et d'huile 44
3.2.1. Présentation et mode d'obtention des billes 44
3.2.2. Autres matières premières permettant l'obtention des billes 46
3.2.3. Encapsulation de principes actifs lipophiles dans les billes 48
3.2.4. Exemples d'utilisation des billes 49
Potentialités des billes pour la voie orale 49
Potentialités des billes pour la voie cutanée 49
Conclusion **51**

Introduction

40% des molécules actuellement en développement sont apolaires et donc peu solubles en milieu aqueux. Lorsqu'une administration par voie orale est recherchée pour obtenir une action systémique du principe actif (PA), une faible solubilité ainsi qu'une vitesse de dissolution lente dans les fluides digestifs, une possible dégradation dans le tractus gastro-intestinal (TGI), une faible perméabilité membranaire ou bien une élimination pré-systémique de ce dernier peuvent entraîner une biodisponibilité réduite *(Aungst, 1993)*. La biodisponibilité est une caractéristique d'un médicament administré à un organisme vivant intact, exprimant simultanément la vitesse et l'intensité de mise à disposition de cet organisme du PA qu'il renferme *(Le Hir et al.)*. Lors d'une administration par voie orale, deux étapes majeures peuvent limiter le passage systémique des PA. Dans un premier temps, le composé doit se dissoudre dans les liquides du TGI. Une fois dissous, le PA devra ensuite traverser la muqueuse intestinale afin de rejoindre la circulation sanguine. Si le PA est peu soluble mais facilement absorbable, il sera absorbé dès sa dissolution, disparaîtra du milieu, permettant ainsi la dissolution d'une nouvelle fraction facilement absorbable. Néanmoins, la vitesse de dissolution sera un des facteurs essentiels de son absorption. Seuls les PA à l'état moléculaire, non ionisés et relativement lipophiles seront à même de franchir la barrière intestinale par transport passif.

Le système de classification biopharmaceutique (SCB) *(Amidon et al., 1995, Yu et al., 2002)* est un outil d'orientation pour la prédiction de l'absorption d'un PA en fonction de sa solubilité dans les fluides digestifs et de sa perméabilité gastro-intestinale. Il est basé sur le fait que ces deux paramètres fondamentaux contrôlent à la fois la vitesse et la quantité de molécule absorbée. Quatre classes ont été définies (Tableau 1). Les molécules apolaires appartiennent aux classes II (peu solubles mais perméables) et IV (peu solubles et faiblement perméables).

Tableau 1: Système de classification biopharmaceutique *(Amidon et al., 1995, Yu et al., 2002)*.

	Solubilité élevée	Faible solubilité
Perméabilité élevée	Classe I	**Classe II**
Faible perméabilité	Classe III	**Classe IV**

Un PA possède une solubilité élevée lorsque la plus forte dose administrée est soluble dans un volume ≤ 250 ml de milieu aqueux (à 37°C sur une gamme de pH de 1 à 7,5). Il présente une

perméabilité élevée lorsque 90% ou plus de la dose traverse la paroi intestinale *(Amidon et al., 1995)*.

Le SCB permet de prévoir le comportement des molécules *in vivo* et d'entreprendre des améliorations de formulation.

- *Classe I*: Le PA étant facilement absorbé, deux facteurs peuvent limiter la vitesse d'absorption : (i) la vitesse de dissolution, (ii) le temps de transit gastro-intestinal qui devient le facteur limitant si la dissolution est très rapide. 5% uniquement des PA appartiennent à cette classe *(Wu and Benet, 2005, Benameur, 2006, Chen et al., 2011)*.
- *Classe II*: La vitesse d'absorption est limitée par la vitesse de dissolution du PA. 70% des PA appartiennent à cette classe *(Wu and Benet, 2005, Benameur, 2006, Chen et al., 2011)*.
- *Classe III*: La perméabilité intestinale est le facteur limitant la vitesse d'absorption; ces PA présentent souvent l'inconvénient de fortes variations inter-individuelles et de biodisponibilité. 5% des PA appartiennent à cette classe *(Wu and Benet, 2005, Benameur, 2006, Chen et al., 2011)*.
- *Classe IV*: L'administration orale nécessite de contourner les problèmes de solubilisation ainsi que d'absorption de ce type de PA. Dans le cas où la galénique n'arrive pas à lever ces verrous, ces molécules peuvent être administrées par voie parentérale. 20% des PA appartiennent à cette classe *(Wu and Benet, 2005, Benameur, 2006, Chen et al., 2011)*.

Seule une faible proportion des molécules commercialisées ou en cours de développement entre dans la classe I du SCB et 90% d'entre elles sont apolaires et appartiennent aux classes II et IV. Dès lors, l'amélioration de la biodisponibilité devient l'un des principaux défis à relever. A moins que la dose thérapeutique soit assez faible, il est toujours souhaitable d'augmenter la quantité absorbée, pour des raisons thérapeutiques et économiques.

La connaissance de la classification des PA permet donc d'optimiser la biodisponibilité en améliorant la solubilité, la vitesse de dissolution, la perméabilité intestinale ou le temps de transit de ces derniers *(Yu et al., 2002)*. Ceci est possible en apportant des modifications sur le PA: modifications chimiques (synthèse de pro-drogues ou le choix d'un sel plus hydrosoluble) ou physiques (s'il est stable, choix d'une forme amorphe du PA, car plus soluble qu'une forme cristalline sinon choix de la forme cristalline la plus soluble dans l'eau; en cas de polymorphisme, choix d'une forme anhydre plus soluble qu'une forme hydratée, réduction de la taille des particules de façon à augmenter la surface de contact entre solide et liquide). La formulation est également un moyen d'améliorer la biodisponibilité: utilisation de solvants miscibles à l'eau pour les PA faiblement ionisés ou apolaires, complexation du PA à l'aide de cyclodextrines (CD), réalisation de dispersions solides contenant un pourcentage élevé en excipients hydrophiles, ajout d'agents tensio-actifs afin d'accroître la mouillabilité des

particules, de solubiliser le PA (solution micellaire) mais aussi d'augmenter la perméabilité par un effet promoteur d'absorption et enfin l'utilisation de systèmes lipidiques (solutions et suspensions huileuses, micro et nano-émulsions, systèmes auto-émulsionnants, émulsions sèches…).

Les systèmes lipidiques ont largement été étudiés pour l'administration de PA de classes II et IV du SCB *(Stella et al., 1978, Palin et al., 1986, Toguchi et al., 1990, Charman et al., 1992, Wu et al., 2006, Hauss, 2007)*. Certains d'entre eux sont commercialisés depuis plus de deux décennies et représentent 2 à 4% des médicaments disponibles sur le marché, selon une enquête datant de 2004 *(Strickley, 2004)*. Les exemples démontrant l'augmentation de la biodisponibilité de PA peu solubles dans l'eau grâce aux formulations lipidiques sont très nombreux dans la littérature (certains seront développés tout au long de ce chapitre). En revanche, les mécanismes d'amélioration de l'absorption sont très complexes, impliquant souvent plusieurs mécanismes à la fois: une meilleure solubilisation des PA, la formation de micelles mixtes, l'ouverture des jonctions serrées ou encore l'amélioration du transport lymphatique *(Charman, 2000, Khoo et al., 2003, Porter et al., 2007)*. Compte tenu de la composition des billes développées au laboratoire (huiles et molécules de CD) et afin d'évaluer et de comparer plus en détail dans la partie expérimentale de la thèse, leur potentiel pour l'administration de PA peu solubles dans l'eau par voie orale, nous nous intéresserons dans cette partie bibliographique aux systèmes lipidiques de type émulsions car ce sont les systèmes les plus proches des billes *(Bochot et al., 2007)*. Nous passerons ainsi en revue les systèmes auto (micro et nano) émulsionnants, les micro-émulsions, les nano-émulsions et les émulsions sèches. Enfin, nous présenterons les émulsions stabilisées par des CD naturelles et évoquerons les travaux ayant été faits jusqu'à ce jour sur les billes à base d'huile et de CD. Chaque système sera défini et brièvement présenté puis les principaux intérêts seront illustrés d'exemples choisis, issus de la littérature. Nous n'aborderons pas les émulsions simples classiques et multiples stabilisées par des tensio-actifs car elles nécessitent en général l'administration de volumes importants pour atteindre la dose thérapeutique *(Kajita et al., 2000)*. Elles sont thermodynamiquement instables, et leur formation nécessite un apport d'énergie, généralement par le biais d'une action mécanique et la présence d'eau exige l'ajout de conservateurs *(Shively, 1997, Baloch and Hameed, 2005, Farahmand et al., 2006, Shahiwala and Amiji, 2008)*.

1. Les systèmes auto (micro, nano) émulsionnants (S(M,N)EDDS)

1.1. Définition, classification et caractéristiques

Les systèmes auto-émulsionnants (S(M,N)EDDS) sont des solutions isotropiques d'huile, de tensio-actif et de PA, qui forment des émulsions, des micro-émulsions (ME) ou des nano-émulsions (NE), huile dans eau, après une mise en contact avec un milieu aqueux et sous faible agitation *(Greiner and Evans, 1990, Shah et al., 1994, Kawakami et al., 2002, Kang et al., 2004, Singh et al., 2009)*. Une autre dénomination de systèmes lipidiques auto-émulsionnants (SEOF pour «Self Emulsifying Oily Formulation») peut être rencontrée dans la littérature *(Garrigue, 2002)*. Ces systèmes destinés à la voie orale seront davantage développés dans les sections 1.4 et 1.5. Ils sont souvent conditionnés dans des gélules ou des capsules, à mastiquer ou à avaler avec un grand verre d'eau. La motilité de l'estomac et celle de l'intestin fournissent une agitation suffisante au processus d'émulsification *in vivo.* Le contenu de la gélule peut également être reconstitué dans un verre d'eau, juste avant administration. L'auto-émulsification se fait alors *in vitro,* avec une simple agitation *(Kommuru et al., 2001, Date and Nagarsenker, 2007, Ruan et al., 2010, Jeevana and Sreelakshmi, 2011, Xie et al., 2011)*.

Après émulsification, les SEDDS donnent des émulsions dont la taille des gouttelettes est inférieure à 5 µm , alors que les SMEDDS et SNEDDS permettent de former respectivement des ME et des NE de taille nanométrique. Une confusion entre les ME thermodynamiquement stables et les NE thermodynamiquement instables (mais stables d'un point de vue cinétique) est très souvent rencontrée dans la littérature *(Anton and Vandamme, 2011)*. Anton *et al* ont consacré un article de revue afin de tenter de clarifier les différences fondamentales entre les deux types d'émulsion *(Anton and Vandamme, 2011)*.

Comparativement aux émulsions classiques, l'augmentation de la surface de contact, surtout avec les ME et les NE, favorise la libération des PA dissous dans l'huile ainsi que leur absorption *(Kawakami et al., 2002, Nazzal et al., 2002, Date and Nagarsenker, 2007, El-Laithy, 2008, Patel and Sawant, 2009, Xi et al., 2009, Date et al., 2010)*. Ces systèmes peuvent être liquides mais aussi semi-solides selon la nature des excipients utilisés *(Wang et al., 2010, Agüeros et al., 2011)*. Dans une approche de formulation destinée à la voie orale, l'emploi des S(M,N)EDDS, présente de nombreux intérêts tels qu'une formation spontanée, un fort pouvoir solubilisant des PA apolaires *(Gursoy and Benita, 2004, Patel and Sawant, 2009, Singh et al., 2009, Date et al., 2010)*, une transposition d'échelle aisée, un coût de production faible ainsi que la possibilité de présenter des solutions huileuses stables dans des gélules ou des capsules molles, avec auto-émulsification *in vivo (Gursoy and Benita, 2004)*. A l'heure actuelle, nous pouvons citer comme exemples de spécialités formulées sous forme de SEDDS: le Norvir® (ritonavir) *(Gursoy and Benita, 2004, Fatouros et al., 2007,*

Zhang et al., 2011a), le Fortovase® (saquinavir) *(Gursoy and Benita, 2004, Fatouros et al., 2007, Zhang et al., 2011a)* et l'Aptivus® (tipranavir) *(Gao and Morozowich, 2006)* alors que le Néoral® (ciclosporine A) est un SMEDDS *(Constantinides, 1995, Gursoy and Benita, 2004)*.

1.2. Composition

Ces systèmes sont toujours composés d'un couple huile/tensio-actif et très souvent l'ajout de co-tensio-actifs et de co-solvants est nécessaire à l'auto-émulsification. Des études de formulation ont montré que seules certaines combinaisons d'excipients pharmaceutiques permettent d'obtenir une auto-émulsification efficace *(Charman et al., 1992, Chanana and Sheth, 1995, Hauss et al., 1998, Pouton, 2000)* qui dépend de la nature des excipients utilisés, de la teneur en tensio-actifs ainsi que de la température *(Wakerly et al., 1986, Gursoy and Benita, 2004, Gao and Morozowich, 2006)*.

Les huiles

Certains types d'huiles permettent d'obtenir des S(M,N)EDDS beaucoup plus stables que d'autres. Ainsi, les huiles végétales naturelles (par exemple l'huile d'olive et l'huile d'amande douce) sont moins efficaces que leurs dérivés hydrolysés ou hémi-synthétiques (exemple des monoglycérides diacétylés d'acides gras à 18 carbones (Myvacet 9-45®)) *(Gursoy and Benita, 2004, Arida et al., 2007)*. L'huile choisie a également une influence sur la viscosité, la consistance finale de la préparation et sur les étapes de production: plus l'huile est fluide, plus le remplissage des gélules sera aisé *(Singh et al., 2009, Aggarwal et al., 2012)*. Les triglycérides à chaîne moyenne (TCM) sont quant à eux peu sujets à l'oxydation et constituent donc un excellent choix pour la formulation (Miglyol® 812 *(El-Laithy, 2008, Wang et al., 2010)*, Neobee M5® *(Shah et al., 1994)*, Labrafac® CC *(Strickley, 2004)*). Les mélanges d'huiles ont un meilleur pouvoir solubilisant *(Kawakami et al., 2002)*. Les NE obtenues après émulsification des SNEDDS sont le plus souvent formulées avec des huiles riches en acides gras polyinsaturés essentiels (omégas 3 et 6) par exemple: l'huile de cacahuète, l'huile de graines de lin, de carthame, de soja et la triacétine *(Shafiq et al., 2007, Jain and Patravale, 2009, Zheng et al., 2010)*.

Les tensio-actifs

Les tensio-actifs non ioniques avec une balance hydrophile/lipophile relativement élevée sont le plus souvent utilisés dans la formulation des S(M,N)EDDS. En effet, une hydrophilie des tensio-actifs est nécessaire pour l'émulsification spontanée des gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse *(Gursoy and Benita, 2004)*. A titre d'exemple, l'obtention de ME de type huile dans eau à partir de SMEDDS nécessite l'utilisation d'un tensio-actif avec une valeur de balance

hydrophile/lipophile qui varie entre 12 et 18 *(Kawakami et al., 2002)*. Les tensio-actifs non ioniques les plus couramment retrouvés dans ces formulations sont: les polysorbates (le monooléate de sorbitane polyoxyéthyléné (Tween®80), le monolaurate de sorbitane polyoxyéthyléné (Tween ®20)), les esters de sorbitane (monooléate de sorbitane (Span ®80)), les stéarates de polyoxyéthylène (Myrj53®, 49® et 59®), les glycérides oléiques polyoxyéthylénés, l'huile de ricin hydrogénée polyoxyéthylénée 35 ou 40 (Crémophor EL®, Crémophor® RH 40) *(Hu et al., 2011)*, les glycérides caprylique/caprique polyoxyéthylénés (Labrasol®) *(Charman et al., 1992, Kang et al., 2004, Wang et al., 2006, El-Laithy, 2008, Date et al., 2010, Jeevana and Sreelakshmi, 2011)* et le monooléate de diglycéryle (DGMO-C) *(Kawakami et al., 2002, Ghosh et al., 2006, Ghosh and Murthy, 2006)*.

Il existe également des tensio-actifs polymères qui ont un effet stabilisateur dans la formulation de micro/nano-émulsions. Ce sont par exemple, le d-α-tocophérol polyéthylène glycol 1000 succinate (la vitamine E TPGS), ou les poloxamers (copolymères d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène (Pluronic®)) *(Ke et al., 2005, Goddeeris and Van den Mooter, 2008)*.

Le taux de tensio-actifs peut atteindre dans certains cas la valeur de 60% de la masse totale de la formulation. Cette forte teneur en tensio-actifs procure à ces systèmes un fort pouvoir solubilisant et permet ainsi l'administration de doses de PA supérieures à celles qu'on peut obtenir avec des émulsions classiques *(Charman et al., 1992, Shah et al., 1994, Kim et al., 2000, Kim and Ku, 2000, Kommuru et al., 2001, Breitenbach, 2002, Gursoy and Benita, 2004, Singh et al., 2009, Date et al., 2010, Jeevana and Sreelakshmi, 2011, Meng and Hu, 2011)*.

Plusieurs raisons conditionnent le choix des excipients pour la formulation des S(M,N)EDDS destinés à la voie orale. En effet, la toxicité de ces composants pour les membranes digestives est à prendre en considération. Il est à noter que les tensio-actifs cationiques sont plus toxiques que les anioniques et que les non ioniques sont généralement préférés car mieux tolérés *(Davis et al., 1970)*.

Les co-tensio-actifs et co-solvants

Les co-tensio-actifs les plus fréquemment utilisés sont: l'éther du di-éthylène glycol monoéthylique (Transcutol®), l'ester de polyéthylène glycol de l'huile de ricin hydrogénée polyoxyéthylénée (HCO-40), l'ester oléique de polyglycérol (Plurol Oléique®) *(Kawakami et al., 2002, Ghosh and Murthy, 2006, Yin et al., 2009a, Yin et al., 2009b)*, le dodécyle sulfate et le désoxycholate de sodium, le monolaurate de propylène glycol (Lauroglycol®), le 12-(hydroxy)-stéarate de polyéthylèneglycol-660 (Solutol HS-15) *(Kommuru et al., 2001, Kang et al., 2004, Jeevana and*

Sreelakshmi, 2011). Certains jouent également le rôle d'agents inducteurs de charges comme l'acide désoxycholique et la stéarylamine *(Shafiq et al., 2007, Jain and Patravale, 2009, Zheng et al., 2010)*.

Des co-solvants peuvent être ajoutés à la formulation. Il s'agit principalement de solvants organiques miscibles à l'eau (éthanol, propylène glycol, polyéthylène glycol…), compatibles avec une administration orale *(Schott, 1990, Strickley, 2004)*. Ils augmentent les quantités de PA dissous dans la formulation, favorisent la miscibilité entre excipients (condition nécessaire à la formation de micro/nano-émulsions stables) et jouent également un rôle de promoteurs d'absorption. Dans la formulation des S(M,N)EDDS, les co-solvants contribuent à la stabilisation de l'ensemble du système *(Gan-Zuo and Friberg, 1982)*. Ils permettent d'atteindre le domaine de la ME par action sur le rayon de courbure et la taille de la gouttelette. L'efficacité du co-solvant va dépendre de sa structure moléculaire ou de sa chaîne hydrocarbonée *(Saint Ruth et al., 1995)*.

Des antioxydants comme l'α-tocophérol peuvent être ajoutés dans la formulation *(Tiwari and Amiji, 2006)* pour prévenir l'oxydation des lipides.

1.3. Mécanisme de l'auto-émulsification

L'hypothèse avancée pour expliquer l'auto-émulsification fait intervenir des notions de thermodynamique sur deux éléments fondamentaux de l'état des systèmes: l'entropie et l'énergie libre. L'auto-émulsification a lieu lorsque l'entropie du système (son désordre) en faveur de la dispersion est plus grande que l'énergie requise pour augmenter la surface de la dispersion. Dans le cas des S(M,N)EDDS, l'énergie libre requise pour former une émulsion est soit très faible et positive, soit négative (dans ce cas, le processus d'émulsification est spontané; sinon il requiert une faible agitation) *(Craig et al., 1995)*. L'auto-émulsification nécessitant un très petit apport d'énergie, implique alors des phénomènes de déstabilisation à travers la contraction de régions inter-faciales locales *(Dabros et al., 1999)*. C'est l'abaissement de l'énergie libre qui engendre le processus d'auto-émulsification après une simple et légère agitation du mélange.

1.4. Micro-émulsions et SMEDDS

Les ME peuvent être administrées sous forme diluée par voie orale, ou bien sous forme de capsules molles contenant des systèmes auto-micro-émulsionnants (SMEDDS) avec formation de la ME *in vivo*. Le concept ME a été introduit pour la première fois par Hoar et Schulman en 1943 *(Hoar and Schulman, 1943)*. Ces derniers ont préparé la première ME en dispersant de l'huile dans une solution aqueuse contenant un surfactant et un alcool. Les ME ne sont pas constituées de très petites gouttelettes, comme le pensait Schulman lorsqu'il proposa cette dénomination en 1959 *(Schulman et al., 1959)*, mais de systèmes monophasiques dans lesquels un tensio-actif performant rend possible la coexistence, à l'échelle quasi moléculaire, des phases aqueuse et huileuse *(Danielsson and Lindman, 1981)*. Contrairement aux macro-émulsions classiques, les ME sont des systèmes thermodynamiquement stables, optiquement isotropiques, transparents ou translucides *(Lawrence and Rees, 2000, Vandamme et al., 2007)* et généralement de faible viscosité *(Danielsson and Lindman, 1981, Constantinides, 1995)*. La limpidité qui succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux d'une émulsion sert de critère pour fixer les limites du domaine d'existence des ME. Elles se forment spontanément et ont une large gamme de structures de taille nanométrique (de 10 à 50 nm) impliquant la formation d'une, deux ou trois phases en équilibre. Ces phases peuvent être de géométries très différentes (bicontinue, éponge, hexagonale, micelle gonflée…) *(Kahlweit et al., 1990)*. Les ME son également connues pour leur grande stabilité à la centrifugation *(Poré, 1992)*. En fonction de leurs formulations, elles présentent à l'équilibre, une ou plusieurs phases: soit une ME seule (Winsor IV), soit une ME en équilibre avec une phase huileuse (Winsor I) ou une phase aqueuse (Winsor III), soit une ME en équilibre à la fois, avec une phase huileuse et une phase aqueuse (Winsor II) *(Komesvarakul et al., 2006, Vandamme et al., 2007)*.

Les ME destinées à la voie orale sont faciles à formuler et à conserver *(Ghosh and Murthy, 2006, Jadhav et al., 2006, Zeng et al., 2010)*. En revanche, elles sont sensibles aux variations de température ainsi qu'à la dilution. En effet, les nano-structures (type de géométrie et taille) des ME sont fortement affectées, voire déstabilisées par les changements de ces deux facteurs, contrairement aux gouttelettes des NE (voir section 1.5) qui, elles, restent stables dans de telles conditions *(Pouton, 1997, Anton and Vandamme, 2011)*.

Les proportions des différents constituants dans les SMEDDS sont: phase huileuse (20-40%, m/m), surfactants (50-60%, m/m), co-surfactants (10-20%, m/m) *(Kim et al., 2000, Kang et al., 2004, Wang et al., 2006, Zhang et al., 2008)* tandis que pour les ME elles sont : phase huileuse (10-30%, m/m), surfactants (30-60%, m/m), co-surfactants et/ou co-solvants (1-5%, m/m) et phase aqueuse

(30-50%, m/m) *(Araya et al., 2005, Ghosh and Murthy, 2006, Shafiq et al., 2007, Vyas et al., 2008, Jain and Patravale, 2009, Zheng et al., 2010)*.

1.5. Nano-émulsions et SNEDDS

Les nano-émulsions (NE) sont administrées par voie orale sous forme préformée *(Tiwari and Amiji, 2006, Vyas et al., 2008, Shen et al., 2011)* ou bien sous forme de capsules molles contenant des systèmes auto-nano-émulsionnants (SNEDDS). Les NE sont une sous classe d'émulsions dont le diamètre des gouttelettes est compris dans une gamme nanométrique. Cependant, il n'y a pas encore de consensus dans la littérature pour définir précisément cette gamme, qui peut varier entre 10-100 nm *(Sonneville-Aubrun et al., 2004, Shafiq et al., 2007)* et 20-200 nm *(Sonneville-Aubrun et al., 2004, Solans et al., 2005, Sole et al., 2006, Shafiq et al., 2007, Rajpoot et al., 2011)*. Elles apparaissent transparentes à l'œil nu ou translucides *(Solans et al., 2005, Gutierrez et al., 2008)*. Comme les émulsions classiques, les NE sont instables du point de vue thermodynamique. Elles sont néanmoins stables du point de vue cinétique (la déstabilisation est très lente et peut prendre plusieurs mois) *(Tadros et al., 2004, Anton et al., 2008, Anton and Vandamme, 2009)* car la taille des gouttelettes est suffisamment petite pour s'affranchir des phénomènes de déstabilisation comme le crémage et la sédimentation *(Solans et al., 2005, Shafiq et al., 2007, Ganta et al., 2010, Rajpoot et al., 2011)*.

Les proportions des différents constituants des SNEDDS sont: phase huileuse (50-60%, m/m), surfactants (30-40%, m/m), co-surfactants (10%, m/m) *(Date and Nagarsenker, 2007, Porter et al., 2008, Ruan et al., 2010)* tandis que pour les NE elles sont de: phase huileuse (15-25%, m/m), surfactants (5-20%, m/m), co-surfactants et/ou co-solvants (5%, m/m) et phase aqueuse (60-70%, m/m) *(Shafiq et al., 2007, Vyas et al., 2008, Jain and Patravale, 2009, Zheng et al., 2010)*.

Les NE peuvent être préparées par deux types de méthodes: soit par émulsification à haute énergie (homogénéisation à haute pression *(Desrumaux et al., 2003, Gutierrez et al., 2008)*, ultrasons *(Canselier et al., 1999, Gutierrez et al., 2008)*) ou bien à basse énergie (émulsification spontanée à partir de SNEDDS *(Bouchemal et al., 2004)*, technique de température d'inversion de phase (PIT)) *(Izquierdo et al., 2002, Anton et al., 2007, Gutierrez et al., 2008)*). Les techniques à haute énergie sont plus coûteuses et nécessitent un appareillage spécifique par rapport à celles à basse énergie *(Tadros et al., 2004)*. En revanche, les techniques d'émulsification avec un homogénéisateur à haute pression ou par les ultrasons permettent de mieux contrôler le procédé et les NE sont alors obtenues de façon plus reproductible, avec des tailles de gouttelettes plus monodisperses, comparativement à celles formulées spontanément à partir de SNEDDS.

Néanmoins, ces derniers peuvent être considérés comme des NE latentes, reconstituées extemporanément et très intéressantes pour la formulation de PA sensibles à l'hydrolyse ou au cisaillement. Les SNEDDS présentent également l'avantage de profiter des propriétés physico-chimiques intrinsèques des différents composants de la préparation pour former la NE. En bref, le procédé consiste uniquement à mélanger deux phases liquides, l'une lipophile dans laquelle un tensio-actif hydrophile est solubilisé (contient parfois un co-solvant, un co-tensio-actif et un PA) et l'autre hydrophile, qui peut être de l'eau pure ou les fluides biologiques selon que la reconstitution se fasse, respectivement, *in vitro* de façon extemporanée ou *in vivo*. Une fois que les deux phases sont mises en contact, les espèces hydrophiles (tensio-actifs) contenues dans la phase huileuse sont rapidement solubilisées dans la phase aqueuse, induisant ainsi la formation de nano-gouttelettes, immédiatement stabilisées par les amphiphiles. La taille des gouttelettes des NE peut être modulée en fonction du choix du tensio-actif et du rapport massique huile/tensio-actif *(Tadros et al., 2004, Anton and Vandamme, 2009)*.

C'est souvent la simplicité du processus de formulation (simple mélange de deux phases liquides) qui induit la confusion entre les NE et les ME *(Anton and Vandamme, 2011)*. Cependant, l'ordre d'incorporation des composants est très important pour la formation des NE. En effet, ces dernières ne sont obtenues que si le tensio-actif est d'abord mélangé à la phase huileuse. Si celui-ci est au préalable incorporé dans la phase aqueuse, seule une émulsion classique peut être obtenue. Les ME, quant à elles, sont obtenues quel que soit l'ordre dans lequel les composés sont mélangés *(Anton and Vandamme, 2011)*.

Un pourcentage de 5 à 20% (m/m) en tensio-actifs suffit à la formulation des NE préparées par les méthodes d'émulsification à haute énergie, ce qui représente un avantage par rapport aux ME et S(M)EDDS qui peuvent en contenir jusqu'à 60% *(Tadros et al., 2004)*. Toutefois, la taille des gouttelettes des NE ainsi que leur indice de polydispersité diminuent avec l'augmentation de la concentration en tensio-actifs dans la formulation *(Solans et al., 2005)*.

La principale source d'instabilité des NE, identifiée dans la littérature, est le mûrissement d'Ostwald *(Sonneville-Aubrun et al., 2004, Li and Chiang, 2011)*. Les propriétés physiques de la phase huileuse ainsi que la nature des surfactants ont également un impact considérable sur ce phénomène. Les NE préparées avec des huiles telles que les triglycérides à chaînes longues (TCL), ont des gouttelettes de taille plus élevée, comparativement à celles préparées avec des huiles de faible viscosité. Elles présentent néanmoins l'avantage de ne pas subir le mûrissement d'Ostwald et d'être physiquement plus stables. En effet, le mûrissement d'Ostwald est freiné par l'encombrement stérique dû aux TCL, créant ainsi une barrière cinétique *(Wooster et al., 2008)*. La formulation sous forme de SNEDDS pourrait également éviter ce phénomène de déstabilisation.

1.6. Intérêts

Il existe une bibliographie très riche concernant les intérêts des S(M,N)EDDS, des ME et des NE destinées à la voie orale, pour la formulation des PA peu solubles dans l'eau appartenant aux classes II et IV du SCB. Nous présentons ci-dessous une liste non exhaustive de leurs principaux avantages.

1.6.1. Réduction des variabilités intra- et inter-individuelles

L'exemple qui revient le plus souvent et qui illustre le mieux le bénéfice apporté par une formulation auto-émulsionnante par rapport à une émulsion simple est celui de la ciclosporine A *(Noble and Markham, 1995, Erkko et al., 1997)*. Il s'agit d'une molécule de classe II avec une très faible solubilité dans l'eau (28 µg/ml à 25°C) *(Ismailos et al., 1991, Fahr, 1993)*. La ciclosporine A destinée à la voie orale a tout d'abord été commercialisée sous la forme émulsion et sous le nom de Sandimmun®. Les performances biopharmaceutiques du Sandimmun® étaient cependant relativement faibles parce que l'absorption était variable (biodisponibilité comprise entre 7 et 90% et T_{max} compris entre 1,5 et 22 heures) *(Constantinides, 1995, Dunn et al., 2001)*, incomplète et affectée par l'alimentation *(Gupta et al., 1990)*. Pour palier ces fluctuations, une nouvelle formulation auto-émulsionnante de marque commerciale Néoral® a été développée *(Gursoy and Benita, 2004)*. La biodisponibilité relative du Néoral® par rapport à la forme conventionnelle Sandimmun® varie de 174 à 239% selon la dose. Tout en améliorant la biodisponibilité, cette dernière formulation a permis de réduire les variations inter- et intra-individuelles et d'obtenir une meilleure linéarité dose/exposition *(Talaulikar et al., 2003, Strickley, 2004)*. Ceci se traduit par une meilleure sécurité d'emploi pour cette molécule dont l'index thérapeutique est faible. La formulation Néoral® conduit à la formation *in vivo* d'une ME. L'amélioration de la reproductibilité du profil plasmatique a également été observée avec l'antiviral WIN 54954 (5-[5-[2,6-dichloro-4-(4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-yl) phénoxy) pentyl]-3-méthyl-1,2-oxazole) appartenant à la classe IV *(Woods et al., 1989)* et formulé sous forme de SEDDS *(Charman et al., 1992)*. Cette formulation a été comparée à une solution de polyéthylène glycol 600. Après administration des deux formulations sous forme de capsules molles à des chiens, aucune différence significative de la biodisponibilité absolue du WIN54954 n'a été observée. En revanche, la formule SEDDS a amélioré la reproductibilité du profil plasmatique, à savoir, la concentration maximale obtenue (Cp_{max} varie entre 1,05 et 1,75 µg/ml au lieu d'une variation entre 0,34 et 1,19 µg/ml avec la solution de PEG) ainsi que le temps nécessaire pour atteindre cette concentration maximale (T_{max} de 1 heure avec le SEDDS contre 1 à 3 heures avec la solution de PEG) *(Charman et al., 1992)*.

1.6.2. Amélioration de la biodisponibilité

De nombreuses études biopharmaceutiques démontrent une amélioration de la biodisponibilité par voie orale de PA peu solubles avec les systèmes S(M,N)EDDS, ME et NE (voir Tableau 2).

Les raisons avancées pour expliquer cette amélioration sont les suivantes:

- Les PA se trouvent totalement solubilisés dans des globules huileux de faible taille, ce qui augmente considérablement la surface d'échange pour l'absorption intestinale *(Kim et al., 2000, Kang et al., 2004, Tuleu et al., 2004, Araya et al., 2005, Shafiq et al., 2007, ElShaer et al., 2011)*.
- La principale voie d'absorption de ces formulations, après une administration par voie orale, est le système lymphatique qui permet d'éviter l'effet du premier passage hépatique. Le débit lymphatique étant plus lent que le débit sanguin, cela peut prolonger l'absorption de ces PA *(Khoo et al., 2003, Singh et al., 2009)*.
- La perméabilité des PA est accrue. Plusieurs excipients couramment utilisés pour la formulation des S(M,N)EDDS, des ME et des NE, tels que les surfactants ou co-surfactants, peuvent jouer un rôle de promoteurs d'absorption au niveau de la barrière gastro-intestinale *(Constantinides, 1995)* (Cremophor®, Tween 80®, E-TPGS®, Labrasol® et Transcutol®) tout en inhibant la fonction de la P-glycoprotéine (P-gp), en leur servant de substrat *(Yu et al., 1999a, Polli et al., 2002, Takahashi et al., 2002, Tiwari and Amiji, 2006, Lin et al., 2007, Vyas et al., 2008)*. La P-gp joue le rôle d'un transporteur de plusieurs PA lipophiles (beaucoup d'anticancéreux), empêchant leur accumulation en quantité suffisante dans les cellules. Ceci rend les formulations qui en contiennent très intéressantes pour certains PA sensibles aux pompes d'efflux comme le docétaxel *(Yin et al., 2009b)*, le paclitaxel *(Tiwari and Amiji, 2006, Nornoo et al., 2009)* et le saquinavir *(Vyas et al., 2008)*.
- Le PA est protégé de la dégradation lorsqu'il est piégé dans les gouttelettes d'huile comme cela a été montré avec les NE de paclitaxel et de saquinavir *(Tiwari and Amiji, 2006, Vyas et al., 2008)*.
- Dans certains cas, des modifications du T_{max} peuvent être observées selon la nature du tensio-actif utilisé dans la formulation, avec une amélioration ou pas de la biodisponibilité *(Kawakami et al., 2002)*.

Tableau 2: Exemples de molécules actives (pris de la littérature, liste non exhaustive) dont la biodisponibilité par voir orale a été améliorée grâce aux formulations S(M,N)EDDS, ME et NE.

Forme	Molécule active	Résultats des études biopharmaceutiques	Références
SEDDS	Indométacine (II)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 2 chez le rat/suspension aqueuse.	*(Kim and Ku, 2000, ElShaer et al., 2011)*
	Progestérone (II)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 9 chez le chien/suspension aqueuse.	*(Tuleu et al., 2004, Miller et al., 2011)*
SMEDDS	Simvastatine (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 1,5 chez le chien/comprimés (Zocor®).	*(Serajuddin et al., 1991, Kang et al., 2004)*
	Docétaxel (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 5 chez le rat/solution (Taxotere®).	*(Van Herwaarden et al., 2007, Yin et al., 2009b)*
SNEDDS	Carvédilol (II)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 1,5 chez le rat/comprimés (Carvedilol®).	*(Singh et al., 2011)*
	Extrait de feuille de plaqueminier : mélange de quercétine (IV) et de kaempférol (IV)	Biodisponibilités de la quercétine et du kaempférol augmentées d'un facteur 1,5 chez le chien/comprimés (Naoxinqing).	*(Chen et al., 2010, Li et al., 2011, Smith et al., 2011)*

ME	Ibuprofène (II)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 9 chez le rat/suspension aqueuse.	*(Araya et al., 2005, Alvarez et al., 2011)*
	Acyclovir (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 12,8 chez le rat/comprimés (Aquivir®).	*(Ghosh et al., 2006, Arnal et al., 2008)*
	Nitrendipine (IV)	L'ASC est inchangée après administration chez le rat de la ME préparée avec le Tween 80® mais avec un T_{max} 3 fois plus court/solution huileuse. L'ASC est augmentée d'un facteur 3 par rapport à celle obtenue avec de l'HCO-60, avec un T_{max} 2 fois plus important/solution huileuse.	*(Kawakami et al., 2002, Wang et al., 2006)*
NE	Ramipril (II)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 2,9 et 5,4 chez le rat/gélules (Corpril®5) et suspension respectivement.	*(Shafiq et al., 2007, Ekambaram and Abdul, 2011)*
	Paclitaxel (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 2 chez la souris/solution aqueuse.	*(Tiwari and Amiji, 2006, Agüeros et al., 2011)*
	Saquinavir (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 2,5 chez la souris/suspension aqueuse.	*(Vyas et al., 2008, Pathak et al., 2010)*

1.7. Limites

Certaines limites doivent néanmoins être considérées:

- La formulation des systèmes auto-émulsionnants (S(M,N)EDDS) ainsi que des ME nécessite des quantités relativement élevées de surfactants et co-surfactants. Lors d'une administration par voie orale, cette forte teneur peut irriter la muqueuse gastro-intestinale et conduire à une toxicité systémique chronique *(Gursoy and Benita, 2004, Gasco et al., 2009, Buyukozturk et al., 2010, He et al., 2010, Zheng et al., 2010)*.
- Les S(M,N)EDDS ont une capacité de solubilisation des PA dans le mélange d'excipients, limitée d'un point de vue thermodynamique. Si la molécule d'intérêt thérapeutique est active à forte dose et présente une faible solubilité dans les excipients lipidiques, la dose de PA devra être fractionnée en plusieurs prises journalières (exemple du Néoral® dont la dose de cyclosporine est limitée à 100 mg par capsule) *(Dorosz, 2002)*.
- Les S(M,N)EDDS conditionnés dans des gélules ou capsules molles peuvent présenter des incompatibilités avec certains excipients, notamment certains co-solvants *(Constantinides, 1995, Cole et al., 2008)*. A titre d'exemple, l'éthanol peut migrer au travers de la gélatine, fragilisant ainsi l'enveloppe de la capsule et modifiant la composition initiale de la formulation.
- Le PA est solubilisé dans les gouttelettes d'huile de la macro/micro/nano-émulsion obtenue après émulsification des S(M,N)EDDS au contact des fluides digestifs. En revanche, la lipolyse des lipides est plus ou moins rapide selon leur nature, ce qui peut entraîner la précipitation du PA *(Vandamme et al., 2007)*.
- De plus, étant donnés leurs faibles diamètres, les NE sont très sensibles au mûrissement d'Ostwald, qui est de ce fait la cause majeure de vieillissement de ces systèmes colloïdaux. Le mûrissement d'Ostwald intervient quand la phase dispersée est soluble (même faiblement) dans la phase continue. La différence de pression de Laplace qui existe entre les globules de faible diamètre et ceux de taille plus importante va entraîner une migration des molécules de la phase dispersée des petits globules vers les plus gros *(Goutayer, 2008)*.

2. Les émulsions sèches

2.1. Définition et caractéristiques

Une émulsion sèche (ES) est une formulation solide, préparée par séchage d'une émulsion liquide qui contient dans sa phase aqueuse un support solide (polymère ou sucre) et à partir de laquelle une émulsion à phase continue peut être reconstituée après réhydratation *in vitro* *(Macheras and Reppas, 1986, Shively and Thompson, 1995, Pedersen et al., 1998, Remon and Corveleyn, 1998b)* ou *in vivo* lors d'une administration par voie orale *(Takeuchi et al., 1991, Shively and Thompson, 1995, Remon and Corveleyn, 1998a)*.

Selon la nature de la phase dispersée, il existe deux types d'ES: (i) huile dans eau, (ii) eau dans l'huile. Dans les ES de type huile dans eau, les gouttelettes d'huile (leur taille peut varier d'une ou plusieurs dizaines de micromètres à une dizaine de nanomètres selon qu'il s'agisse d'une macro-, micro- ou nano-émulsion) sont dispersées dans une matrice hydrosoluble *(Christensen et al., 2001a, Christensen et al., 2001b)*. Les ES de type eau dans l'huile ne seront pas développées dans ce chapitre car elles concernent les PA hydrophiles.

2.2. Composition

Avant d'être séchées, les émulsions sont préparées à partir :

- d'une phase huileuse (10-20%, m/m): des TCM (comme le Miglyol® 812 *(Remon and Corveleyn, 1998a, Dollo et al., 2004, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*, le Phosal®53 MCT, le Labrafac®CC), des huiles végétales à TCL (l'huile de soja *(Pedersen et al., 1998)*, de maïs, de sésame *(Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*), des glycérides polyglycolysés insaturés (Labrafil® M 1944 CS), du polyglycéryl-6-di-oléate (Plurol® Oléique CC 497) *(Takeuchi et al., 1991, Christensen et al., 2001a)*;

- d'un ou de plusieurs surfactants (2-4%, m/m): Caséinates de sodium *(Pedersen et al., 1998, Dollo et al., 2003)*, copolymère à bloc de polyéthylène glycol/polypropylène glycol (Poloxamer® 188) *(Christensen et al., 2001a)*, monooléate de polyoxyéthylène de sorbitane (Tween® 80) *(Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Ahmed et al., 2008)*;

- d'une phase aqueuse (70-80%, m/m) qui contient des polymères hydrophiles (amidons naturels *(Hansen et al., 2005)* ou modifiés *(Christensen et al., 2001a)*, méthylcellulose Methocel® E15LV *(Remon and Corveleyn, 1998a, Remon and Corveleyn, 1998b)*..) ou des sucres (5-30%, m/m) (les maltodextrines *(Remon and Corveleyn, 1998b, Corveleyn and Remon, 1999, Heinzelmann and Franke, 1999, Dollo et al., 2003, Jang et al., 2006)*, le lactose *(Pedersen et al., 1998, Heinzelmann and Franke, 1999, Yin et al., 2009b)*, le

tréhalose, le mannitol *(Hansen et al., 2004)* et le saccharose *(Myers and Shively, 1993, Shively, 1993b, Shively and Thompson, 1995, Christensen et al., 2002)).*

2.3. Méthodes d'obtention

Les émulsions sèches sont obtenues par élimination de l'eau libre d'une émulsion huile dans eau, par séchage par atomisation *(Richter and Steiger-Trippi, 1961, Pedersen et al., 1998, Christensen et al., 2002, Dollo et al., 2003, Jang et al., 2006, Ge et al., 2008, Yin et al., 2009a, Hatanaka et al., 2011, Zhang et al., 2011b, Zhang et al., 2011c)*, par lyophilisation *(Lladser et al., 1968, Corveleyn and Remon, 1998, Corveleyn and Remon, 1999, Heinzelmann and Franke, 1999, Toorisaka et al., 2005, Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Ahmed et al., 2008)* ou par évaporation de la phase aqueuse sous vide *(Myers and Shively, 1992, Myers and Shively, 1993, Shively, 1993a, Shively and Thompson, 1995, Zhang et al., 2011)*.

Les procédés de séchage par atomisation et lyophilisation sont les plus utilisés. La poudre ainsi obtenue peut, soit être utilisée directement, telle quelle, pour remplir des gélules, soit subir des traitements comme par exemple une étape de granulation humide en milieu non aqueux, un compactage ou encore une compression donnant lieu à des comprimés *(Christensen et al., 2001a, Hansen et al., 2005)*. Lorsque l'émulsion est réhydratée, les gouttes d'huile sont libérées pour former à nouveau une émulsion huile dans eau. La forme et la taille des gouttelettes obtenues sont influencées par le procédé de séchage mis en œuvre *(Pedersen et al., 1998)*.

2.4. Méthodes de caractérisation

Il est nécessaire de caractériser ces ES afin d'en maîtriser le procédé de fabrication avec ses points critiques, pour permettre d'assurer la reproductibilité et la qualité des formulations. Plusieurs méthodes de caractérisation peuvent être mises en œuvre.

2.4.1. Sur l'émulsion sèche

Caractérisation physico-chimique

Afin de vérifier la qualité de l'étape de séchage, l'humidité résiduelle est évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG) ainsi qu'à l'aide d'une balance infrarouge *(Christensen et al., 2002, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*. La détermination de l'état physique de la poudre (amorphe ou cristallin) est réalisée par diffraction des rayons X *(Christensen et al., 2002, Dixit and Nagarsenker, 2007)*. Le suivi des constituants des émulsions au cours du traitement thermique est effectué par analyse calorimétrique différentielle (DSC) *(Christensen et al., 2002, Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Dixit and Nagarsenker, 2007)*.

Propriétés de dissolution et de libération du PA in vitro

Ces tests sont le plus souvent réalisés dans un dissolutest à palettes tournantes, référencé par la pharmacopée européenne, contenant des milieux digestifs simulés thermostatés à 37°C et soumis à une agitation des pales comprise entre 50 et 100 tours par minute *(Remon and Corveleyn, 1998b, Remon and Corveleyn, 1998a, Corveleyn and Remon, 1999, Dollo et al., 2003, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*. Des prélèvements sont effectués à des intervalles réguliers de la cinétique et filtrés pour éliminer les particules non dissoutes. L'essai de dissolution est généralement réalisé en comparaison avec des formulations de référence (comprimés à libération immédiate, poudre du PA) *(Remon and Corveleyn, 1998a, Toorisaka et al., 2005, Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Dixit and Nagarsenker, 2007)*.

Etude de stabilité pendant la conservation

Des études de vieillissement accéléré sont souvent réalisées sur les ES (6 mois à 40°C/75% HR) afin de tester leur stabilité au cours du temps et en fonction des conditions de conservation (atmosphère sèche, humide, à l'abri de la lumière). L'aspect macroscopique, la prise en eau, le temps de reconstitution ainsi que la taille des gouttelettes sont suivis au cours de ces études *(Christensen et al., 2002, Hansen et al., 2005)*.

2.4.2. Sur l'émulsion reconstituée

Après reconstitution de l'ES, *in vitro* dans l'eau ou *in vivo* après administration par voie orale, il est important de comparer la taille et la distribution de taille des gouttelettes de l'émulsion avant le séchage et après reconstitution. La taille des gouttelettes des émulsions est évaluée soit par diffraction laser soit par corrélation de photons *(Szejtli, 1988, Christensen et al., 2002, Dollo et al., 2004)*. La distribution de leur taille *(Ragno et al., 2003, Ahmed et al., 2008)* et le temps nécessaire pour la reconstitution de l'émulsion sont également évalués et des mesures de turbidité peuvent être effectuées *(Lladser et al., 1968, Szejtli, 1988, Shimada et al., 1991, Myers and Shively, 1993)*.

La reconstitution de l'émulsion à partir de la poudre d'ES est réalisée en général en dispersant la poudre dans le même volume d'eau distillée que celui utilisé pour préparer l'émulsion de départ, puis en agitant quelques secondes *(Myers and Shively, 1993, Shively and Thompson, 1995)*.

Différentes instabilités peuvent être observées après reconstitution:

- Les émulsions reconstituées peuvent montrer une distribution de taille plus large. Cela est particulièrement observé avec les poudres conservées dans un milieu humide *(Pedersen et al., 1998)*. La distribution de taille des gouttelettes entre l'émulsion avant le séchage et celle reconstituée a tendance à augmenter avec la teneur en lipides dans l'ES. En effet, les ES ayant une teneur en

lipides inférieure à 50% reforment l'émulsion de départ avec une taille de gouttelettes inchangée. Des systèmes présentant une distribution de taille à deux populations sont retrouvés avec les émulsions dont la teneur en lipides est supérieure à 50% *(Christensen et al., 2001a)*. En revanche, le changement de la nature du polymère ou du sucre ne semble pas modifier cette distribution de taille *(Christensen et al., 2001a)*.

- L'observation en microscopie optique peut révéler la formation de grosses gouttes lipidiques, formées par coalescence au cours du séchage par atomisation ou lors de la reconstitution, ainsi que la présence de cristaux de lipides agglomérés *(Shimada et al., 1992, Dollo et al., 2004, Ahmed et al., 2008)*.

2.5. Intérêts

Plusieurs études rapportées dans la littérature ont permis de mettre en évidence les intérêts de la forme ES. L'avantage principal est l'augmentation de la biodisponibilité par voie orale des substances actives peu solubles (l'atorvastatine *(Yin et al., 2009a)*, la lovastatine *(Ge et al., 2008)*, l'amlodipine *(Jang et al., 2006)*, la griséofulvine *(Ahmed et al., 2008)*…) conjointement à une amélioration de leur stabilité sur le plan physico-chimique et à la possibilité de les présenter sous forme unitaire *(Myers and Shively, 1993, Te Wierik et al., 1994, Yu et al., 1999b, Ragno et al., 2003, Bochot and Duchêne, 2006)*.

2.5.1. Amélioration de la biodisponibilité et de la solubilisation des PA

Ces améliorations peuvent être expliquées comme suit:

- Amélioration de la solubilisation des PA *(Jang et al., 2006, Ahmed et al., 2008, Ge et al., 2008, Yin et al., 2009a, Zhang et al., 2011b)*.
- Après reconstitution, ces formes se délitent et libèrent l'émulsion, ce qui permet de développer une grande surface d'échange avec les milieux digestifs *(Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*. Plus les gouttelettes de l'émulsion sont petites, meilleure est l'absorption *(Tarr and Yalkowsky, 1989, Jang et al., 2006, Ahmed et al., 2008)*.
- Des teneurs élevées en lipides peuvent être atteintes (80% de lipides avec l'hydroxypropyl méthylcellulose *(Christensen et al., 2001a)*), ce qui peut être très intéressant pour l'encapsulation de PA lipophiles (voir Tableau 3).
- La réduction des délais d'action (diminution du T_{max}) avec les lyophilisats oraux d'ES, comparativement aux comprimés conventionnels à avaler avec un verre d'eau, serait due au fait que ce soient des formes unitaires sèches, d'aspect poreux, très avides d'eau. Une fois hydratées,

ces formulations se désintègrent rapidement, permettant une absorption rapide des PA libérés *(Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Ahmed et al., 2008)*.

- Un effet protecteur contre le métabolisme dans l'intestin grêle a également été observé avec certains PA *(Ge et al., 2008, Zhang et al., 2011b)*.

Tableau 3: Exemples de molécules actives apolaires (pris de la littérature, liste non exhaustive) dont la solubilisation ou la biodisponibilité par voie orale ont été améliorées grâce à la formulation d'ES.

Molécule active	Résultats des études biopharmaceutiques	Références
Griséofulvine (II)	*In vitro*, augmentation d'un facteur 2 et 10 des quantités de PA passé en solution/aux comprimés conventionnels à libération immédiate (Fulvin®) et à la poudre de PA respectivement. *In vivo*, absorption plus rapide chez l'homme (T_{max} raccourci de 4 heures), Cp_{max} triplée et ASC_{0-24h} améliorée d'un facteur 1,8/Fulvin®.	*(Ahmed and Aboul-Einien, 2007, Ahmed et al., 2008, Aggarwal et al., 2012)*
Amlodipine (II)	Cp_{max} et ASC_{0-24h} augmentées d'un facteur 2,9 et 2,6 chez le rat/poudre non formulée et comparables/comprimés (Norvasc®) respectivement.	*(Ragno et al., 2003, Jang et al., 2006)*
5-phényle-1,2-dithiole-3-thione (5-PDTT) (II)	Biodisponibilité améliorée d'un facteur 3 chez le rat/son complexe avec la sulfobutyl éther-βCD en solution.	*(Dollo et al., 2003)*
Lu 28-179 (Siramesine) (II)	Biodisponibilité améliorée d'un facteur 1,5 chez le chien/à la solution huileuse.	*(Hansen et al., 2005, Holm et al., 2011)*
ZLR-8 (II) (dérivé du diclofénac)	Biodisponibilité améliorée d'un facteur 105 chez le rat/suspension aqueuse.	*(Zhang et al., 2011b)*
Malotilate (II)	L'ASC et la Cp_{max} ont été augmentées d'un facteur 2,3 et 2,9 respectivement chez le rat/suspension aqueuse.	*(Zhang et al., 2011c)*
Atorvastatine (II)	*In vitro*, libération et absorption augmentées d'un facteur 2,5 et 2,3 respectivement/poudre non formulée.	*(Yin et al., 2009a, Anwar et al., 2011)*
Lovastatine (IV)	Biodisponibilité augmentée d'un facteur 1,8 et 1,4 chez le rat/suspension et complexe avec HP-β-cyclodextrine respectivement.	*(Sharma et al., 2005, Ge et al., 2008)*

2.5.2. Amélioration de la stabilité lors de la conservation

Les émulsions liquides sont des formes plus ou moins visqueuses posant différents problèmes de conservation et de stabilité. La tendance actuelle va vers le développement de formes nouvelles semi-solides et solides, permettant d'utiliser les technologies des formes sèches. Les ES permettent de s'affranchir des problèmes de conservation liés à la présence d'eau (la dégradation des PA sensibles à l'hydrolyse, les phénomènes d'oxydation des lipides et les risques de contamination microbiologique) tout en réduisant la masse et le volume du produit fini. Les produits obtenus ont une humidité résiduelle très faible et gardent ainsi leurs propriétés pendant toute leur durée de conservation *(Shively, 1993a, Shively, 1993b)*.

Les ES réduisent la photo-dégradation de PA photosensibles. La forme ES protège l'amlodipine après irradiation aux UV (5,6% de photo-dégradation avec l'ES contre 66,9% avec la poudre d'amlodipine, après 24 h) *(Jang et al., 2006)*. Cette protection est plus importante que celles obtenues avec les autres formulations de l'amlodipine à savoir: les comprimés, les liposomes et les CD *(Ragno et al., 2003)* et serait attribuée à la barrière physique, compacte, conférée par la dextrine.

2.5.3. Possibilité de transformer la poudre d'ES en formes unitaires sèches

La poudre obtenue après séchage des émulsions liquides présente également l'avantage de pouvoir être formulée sous forme de comprimés ou bien par mise en gélules, ce qui facilite l'administration par voie orale *(Hansen et al., 2005, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*. Il est également possible de lyophiliser directement l'émulsion liquide dans des conditionnements particuliers (alvéoles), permettant ainsi d'obtenir des lyophilisats oraux *(Remon and Corveleyn, 1998b, Remon and Corveleyn, 1998a, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*.

2.6. Limites

La formulation des ES n'est cependant pas simple à mettre en œuvre; le séchage reste une étape critique. La lyophilisation est un procédé complexe, exigeant et qui coûte cher (investissement et consommation énergétique). Les ES présentent donc certains inconvénients: les poudres obtenues après séchage des émulsions sont généralement volumineuses, cohésives, avec une mauvaise coulabilité, ce qui les rend difficiles à manipuler sans traitement supplémentaire *(Christensen et al., 2001a, Christensen et al., 2001b)*. Il est possible d'améliorer les propriétés des poudres en ajoutant du saccharose dans la formulation pour augmenter la densité *(Christensen et al., 2001a, Christensen et al., 2001b)*.

Après avoir passé en revue les différents systèmes lipidiques émulsionnés proposés pour améliorer la biodisponibilité par voie orale de PA lipophiles, il est possible d'arriver aux conclusions suivantes:

- Les excipients lipidiques utilisés dans la formulation de ces systèmes sont généralement liquides ou semi-solides, ce qui permet une administration dans des gélules ou des capsules molles.
- Ces systèmes ont un fort pouvoir solubilisant des PA lipophiles et contiennent dans leur formulation une teneur plus ou moins importante en surfactants; les quantités les plus importantes étant retrouvées avec les ME et les SMEDDS.
- Les tensio-actifs au sein de ces formulations améliorent également la perméabilité des PA au niveau de la muqueuse gastro-intestinale (rôle promoteur d'absorption surtout pour les molécules de classe IV).
- Des co-solvants sont souvent ajoutés à la formulation pour augmenter les quantités dissoutes en PA.
- Les ME et SMEDDS, très riches en tensio-actifs, semblent plus adaptés à la formulation de molécules de classe IV alors que les autres (SEDDS, SNEDDS, NE et ES) sont souvent utilisés avec celles de classe II.
- Ces systèmes lipidiques peuvent aussi moduler, voire améliorer la reproductibilité dans le temps du profil de libération des PA encapsulés, tout en réduisant les variabilités inter et intra-individuelles.
- Les techniques de préparation de ces systèmes sont relativement faciles à mettre en œuvre.
- L'absorption de ces formulations, après une administration par voie orale, peut se faire par le biais du système lymphatique qui permet d'éviter l'effet du premier passage hépatique. Le débit lymphatique étant plus lent que le débit sanguin, cela peut prolonger l'absorption de ces PA *(Khoo et al., 2003, Singh et al., 2009)*.

3. Les systèmes lipidiques à base de cyclodextrines

Les CD ont été découvertes par Villiers il y a plus d'un siècle, en 1891. Les premières CD, dites «naturelles», sont issues de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon *(Saenger, 1980, Szejtli, 1988)*. Elles se composent d'un petit nombre de sous unités glucosidiques (6, 7 et 8 pour l'α-, la β- et la γ-CD respectivement) reliées entre elles pour former un cycle fermé (Figure 1)

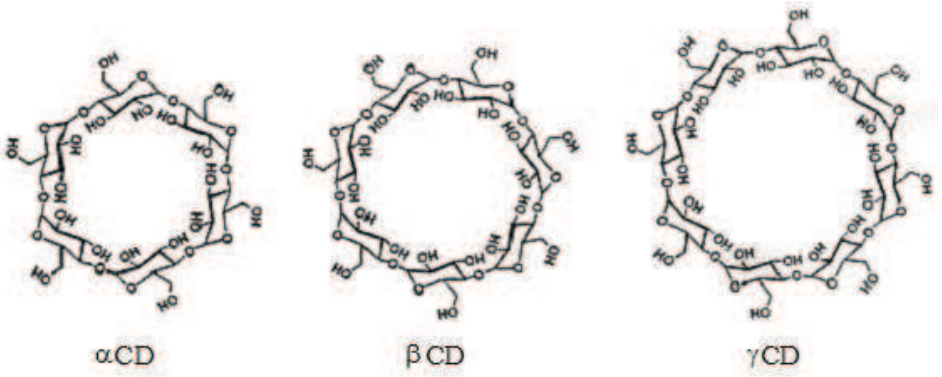


Figure 1. Structure des α-, β- et γ-CD.

Cette structure chimique particulière leur donne la forme d'un tronc conique creux. Dans les années 1970, les chimistes ont commencé à les modifier afin d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques, ce qui a conduit, jusqu'à aujourd'hui, à la synthèse d'une multitude de dérivés, solubles ou insolubles dans l'eau, neutres ou chargés. La structure particulière des CD leur confère la possibilité d'inclure dans leur cavité des molécules ou parties de molécules apolaires, en modifiant ainsi leurs caractéristiques physico-chimiques. La capacité d'une CD à inclure une molécule dans sa cavité dépend, entre autres, de l'encombrement stérique de la molécule invitée. Cet encombrement doit être compatible avec les dimensions de la cavité de la CD concernée. En effet, elle doit être suffisamment large afin de permettre l'entrée de la molécule invitée, mais pas trop large non plus pour permettre l'établissement de liaisons entre les molécules hôte et invitée. La molécule incluse dans une CD naturelle, ou l'un de ses dérivés, est totalement, sinon au moins partiellement masquée par la CD, vis-à-vis de l'environnement. Ceci donne au complexe formé des propriétés physico-chimiques souvent très intéressantes par rapport à celles de la molécule invitée: meilleure stabilité, meilleure solubilité apparente dans l'eau, facilitation du passage. Pour toutes ces raisons, l'inclusion est souvent beaucoup plus intéressante sur le plan de la formulation et donc de l'application que la molécule d'origine *(Bochot and Duchêne, 2006, Loftsson and Duchene, 2007)*. A ce jour, un certain nombre de spécialités

renferme des CD. Une liste de ces dernières ainsi que des produits cosmétiques contenant des CD est présentée dans un article de revue publié en 2009 *(Duchene et al., 2009)*. L'utilisation des CD a également été mise à profit dans des secteurs aussi variés que l'agriculture (production, maturation), l'industrie chimique (insecticides, pesticides, détergents, séparation de molécules chirales par méthode chromatographique ou électrophorétique) *(Bressolle et al., 1996, Han, 1997, Fanali, 2000)*, ou encore l'agroalimentaire (conservation d'arômes, masquage de goûts ou d'odeurs) *(Duchene and Wouessidjewe, 1992)*. Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, il se développe dans le domaine de la Pharmacie galénique, une nouvelle utilisation des molécules de CD visant à mettre à profit leurs propriétés originales au sein de systèmes dispersés *(Trichard et al., 2006, Trichard, 2007)* tels que les micro- et nano-particules, les vésicules lipidiques au sens large (liposomes et niosomes) mais aussi les émulsions et les billes. Dans ces systèmes, les CD peuvent être utilisées classiquement, sous forme de complexes d'inclusion, pour formuler des molécules généralement hydrophobes ou encore de façon plus originale comme excipient constitutif du système dispersé (matériau, émulsionnant).

Dans la suite de cette présentation, nous développerons plus particulièrement deux de ces applications qui résultent des interactions se produisant entre les molécules de CD et les triglycérides contenus dans les huiles végétales. Nous verrons tout d'abord comment les CD peuvent être utilisées comme agent émulsionnant pour la formulation d'émulsions simples ou multiples, puis nous présenterons un nouveau système galénique appelé «billes» qui résulte directement de cet effet.

3.1. Emulsions simples et multiples stabilisées par les cyclodextrines

3.1.1. Aptitude des cyclodextrines à stabiliser les émulsions

La littérature scientifique est relativement pauvre concernant les propriétés émulsionnantes des CD lorsqu'elles sont en présence de lipides. Il existe toutefois de nombreux brevets déposés et un certain nombre de travaux qui démontrent, clairement, l'efficacité émulsionnante des complexes formés avec les CD naturelles *(Tanaka et al., 1989, Shimada et al., 1991, Yu et al., 1999b, Yu et al., 2001, Yu et al., 2003)* ou les CD modifiées *(Ishigami et al., 1989, Tanaka et al., 1989, Hashimoto, 1991)*. Plus récemment, le pouvoir émulsionnant des CD a également été montré en présence d'autres huiles telles que les alcanes *(Inoue et al., 2008, Inoue et al., 2009)*, les paraffines liquides ou bien encore les silicones *(Trichard et al., 2008b)*.

L'intérêt de l'utilisation des CD naturelles dans la formulation des émulsions, réside dans leur faible pouvoir détergent vis-à-vis de la peau, ainsi que dans leur absence de pouvoir irritant, comparativement aux tensio-actifs traditionnels *(Bochot and Duchêne, 2006)*. Shimada *et al* *(Shimada*

et al., 1991) ont été les premiers à évaluer le pouvoir émulsionnant des trois CD naturelles (α-, β- et γ-CD) sur une émulsion huile de soja/eau, en utilisant un ratio volumique de 1:1. Ils ont également tenté d'expliquer la cause de ce pouvoir émulsionnant. En effet, les CD naturelles ne possèdent aucune propriété émulsionnante; la tension de surface est de 71,0 dyn/cm à l'interface air/eau ou air/solution aqueuse de β-CD à 1%. Pour être émulsionnantes, les CD doivent être utilisées à une concentration dite minimale qui n'est pas la même selon la CD utilisée. En effet, alors que la concentration minimale de la β-CD est de 0,25%, celles de l'α- et de la γ-CD sont respectivement de 0,5% et 2%. Pour obtenir la même activité émulsionnante, il faut donc huit fois plus de γ-CD que de β-CD dans la formulation. L'augmentation de la proportion de CD dans la formulation permet d'augmenter l'activité émulsionnante et donc la stabilité des émulsions *(Shimada et al., 1991)*.

3.1.2. Mécanisme de stabilisation des émulsions en présence de cyclodextrines

Afin d'expliquer le pouvoir émulsionnant des CD naturelles, Shimada *et al* *(Shimada et al., 1992)* ont étudié les complexes d'inclusion de l'α- et de la β-CD à l'interface eau/huile en mesurant les variations de tension interfaciale par un tensiomètre à pointe de Wilhelmy. Leurs travaux ont montré une diminution de la tension interfaciale en présence de CD dans la phase aqueuse. A titre d'exemple, la tension interfaciale huile de soja/eau distillée passe de 22,8 dyn/cm en absence de CD à 21 dyn/cm pour des concentrations en α-CD de 9 mM (0,88%) et de β-CD de 3 mM (0,34%) *(Shimada et al., 1992)*. Au niveau de l'interface eau/huile, les molécules de CD forment un complexe d'inclusion partiel avec les constituants majoritaires des huiles végétales que sont les triglycérides, en interagissant avec une seule chaîne d'acide gras de ces derniers (Figure 2).

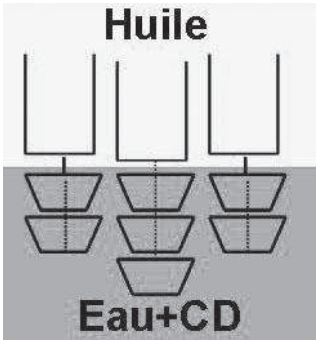


Figure 2. Représentation schématique des interactions entre une molécule de triglycéride et des molécules de CD à l'interface eau/huile *(Shimada et al., 1992)*.

La formation de ce complexe d'inclusion partiel reconstitue *in situ* une molécule de tensio-actif avec le pôle hydrophile représenté par la chaîne d'acide gras masquée par l'inclusion dans les CD et le pôle lipophile représenté par les deux chaînes d'acides gras non incluses *(Shimada et al., 1991, Shimada et al., 1992)*. L'émulsification est plus efficace pour des acides gras à longue chaîne dont une partie n'est pas incluse dans la cavité de la CD. Les acides gras dont la chaîne est composée de 12 carbones, constituent la limite inférieure en dessous de laquelle il y aurait une solubilisation totale du complexe et donc une perte de son pouvoir émulsionnant. Avec la β-CD, il est montré que l'activité émulsionnante diminue lorsque la température d'émulsification augmente, allant même jusqu'à disparaître à partir de 50°C *(Shimada et al., 1991)*, par déstabilisation du complexe. Il n'est donc pas utile de chauffer lors de la préparation d'émulsions stabilisées avec des CD, ce qui, dans certains cas, peut constituer un avantage. Les travaux de Yu *et al*, *(Yu et al., 1999b, Yu et al., 2001, Yu et al., 2003)* ont montré que des émulsions simples (huile dans eau) mais aussi multiples (huile dans eau dans huile), stables, pouvaient être formulées avec des CD naturelles (Figure 3). Cependant, le pouvoir émulsionnant de ces dernières dépend de la nature de la CD utilisée (α- ≥ β- >> γ-CD).

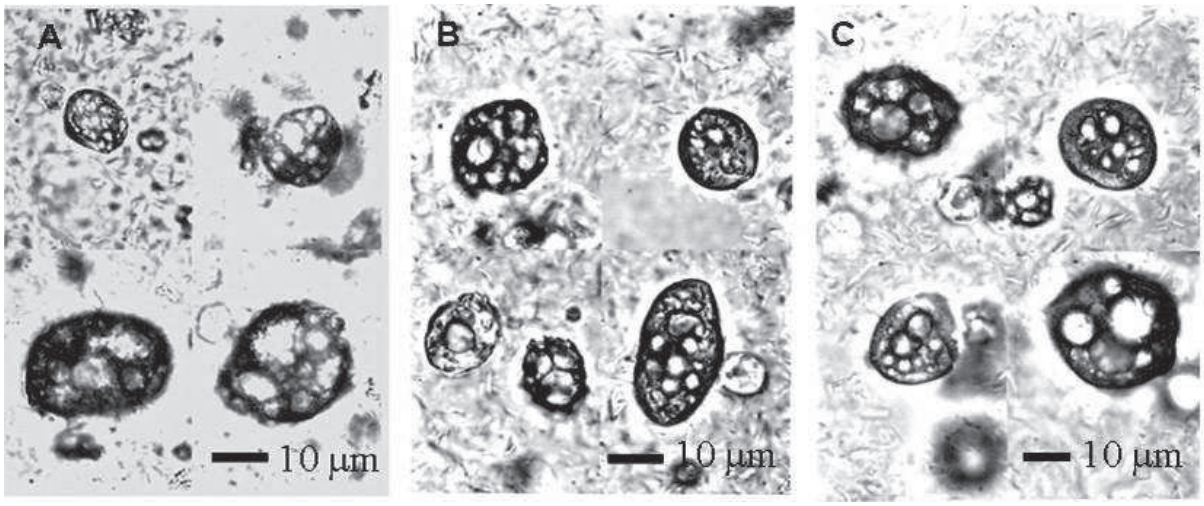


Figure 3. Emulsions multiples préparées avec de l'α-CD (A), β-CD (B) et γ-CD (C) *(Yu et al., 1999b)*.

En effet, la cavité de la γ-CD serait trop large, par rapport à celles de l'α et de la β-CD, pour former un complexe suffisamment stable à l'interface eau/huile entre les CD et les triglycérides *(Yu et al., 1999b, Duchene et al., 2003)*. Dans ce cas, une coalescence des globules internes est effectivement observée. Pour ce qui est de la charge des émulsions par une molécule d'intérêt

lipophile, préalablement dissoute ou dispersée dans la phase huileuse, cette dernière ne doit pas présenter d'interactions notables avec la cavité de la CD employée. La molécule risque en effet de déplacer la chaîne d'acide gras incluse dans la cavité des CD, par un effet de compétition, et donc de détruire l'inclusion qui stabilise l'émulsion. Cet effet a été clairement mis en évidence avec une molécule telle que le camphre qui forme un complexe d'inclusion avec l'α-, la β- et la γ -CD *(Yu et al., 2001, Yu et al., 2003)*. En sa présence, toutes les émulsions sont déstabilisées. Il est cependant possible de penser que des molécules d'intérêt de masse moléculaire élevée et possédant une très faible affinité pour la CD mise en œuvre, puissent être formulées sous forme d'émulsions stabilisées par cette CD. En effet, des émulsions huile dans eau et huile dans eau dans huile contenant de la benzophénone et de l'α-CD pour laquelle la benzophénone n'a aucune affinité, sont stables dans le temps *(Yu et al., 1999b, Yu et al., 2001)*.

3.2. Billes à base de cyclodextrines naturelles et d'huile

3.2.1. Présentation et mode d'obtention des billes

De façon intéressante, il a été rapporté récemment que le mélange α-CD, huile végétale et eau ne conduisait pas exclusivement à la formation d'émulsions *(Bochot et al., 2007)*. En effet, des particules, de 1 à 2 mm de diamètre, appelées «billes», sont obtenues à partir d'une solution aqueuse d'α-CD mélangée à de l'huile de soja, selon un procédé innovant n'impliquant qu'une agitation orbitale externe et continue (quelques jours) de la formulation. D'un point de vue macroscopique, les étapes conduisant à l'obtention des billes peuvent être décrites de la façon suivante (Figure 4).

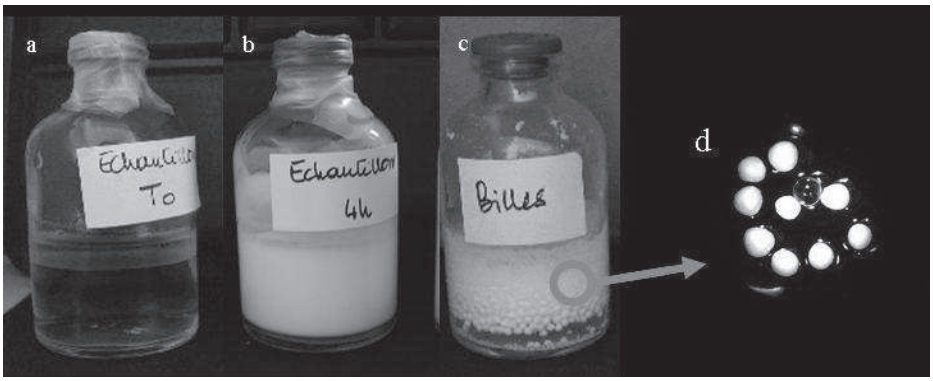


Figure 4. Photographies des formulations au cours du procédé de fabrication: a) avant agitation, b) après 4 heures d'agitation, c) à la fin du procédé de fabrication, d) zoom des billes après fabrication et élimination du milieu de dispersion après l'étape de lavage. Une bille de verre calibrée, de 2 mm, est utilisée pour déterminer la taille des billes. Modifiée d'après *(Bochot et al., 2007)*.

Dans une première étape, dès que l'huile de soja est déposée sur la solution aqueuse d'α-CD, il y a formation d'un film à l'interface eau/huile. Sous l'action d'une agitation orbitale externe, une émulsion se crée. La viscosité du milieu augmente alors progressivement au fur et à mesure de l'agitation jusqu'à l'obtention de billes en suspension dans un milieu turbide. L'augmentation du diamètre des billes est perceptible au cours du temps. A la fin de la fabrication, des billes bien calibrées en taille sont finalement obtenues en suspension dans un milieu limpide. Ce procédé mis en œuvre pour la fabrication des billes est original et apparaît particulièrement intéressant comparativement à ceux décrits dans la littérature *(Trichard et al., 2006)*. En effet, il ne nécessite pas l'utilisation d'un solvant organique pouvant présenter des risques toxiques et dont l'élimination s'avère souvent difficile. De plus, à l'inverse de nombreux systèmes dispersés, l'ajout d'un tensio-actif, dont l'administration en grande quantité peut être néfaste, n'est nécessaire ni à la formation ni à la stabilité des billes. De même, la présence d'un agent réticulant n'est pas requise comme cela est le cas pour la préparation de certaines microparticules ou polymères à base de CD *(Trichard et al., 2006)*. Enfin, le procédé est particulièrement doux dans la mesure où il n'implique pas d'énergie mécanique ou thermique importante (28°C). Pour ces raisons il semble particulièrement adapté à l'encapsulation de molécules fragiles. Toutefois, ce procédé d'obtention des billes est relativement long, ce qui peut constituer une limite. Les proportions optimales entre l'huile de soja, l'α-CD et l'eau sont importantes à prendre en compte pour la formation des particules et ont été définies, après avoir établi un diagramme ternaire, comme étant respectivement de 12-24% (m/m), 3-6% (m/m) et 70-82% (m/m) (Figure 5) *(Bochot et al., 2007)*.

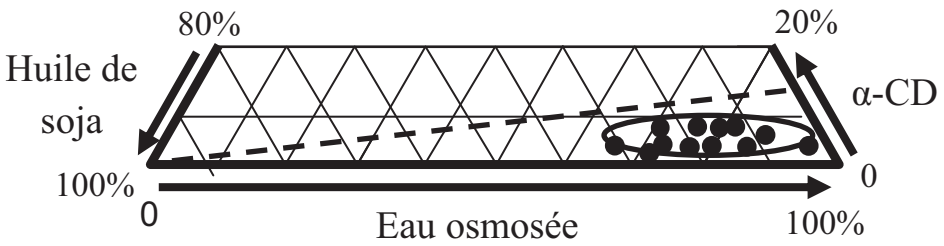


Figure 5. Diagramme ternaire huile de soja/ α-CD/ eau à 25°C. Chaque échantillon a subi une agitation continue à 200 tours/min à 25°C. (●) Billes.

En dehors du domaine d'obtention des billes il peut également se former des émulsions fluides ou visqueuses. La fabrication de lots reproductibles en termes d'homogénéité de taille et de rendements de fabrication (>80%) est maîtrisée. Les billes ainsi formées puis lyophilisées sont

composées de micro-domaines d'huile (80%, m/m) entourés d'une matrice cristalline constituée de CD (20%, m/m) (Figure 6) *(Bochot et al., 2007)*.

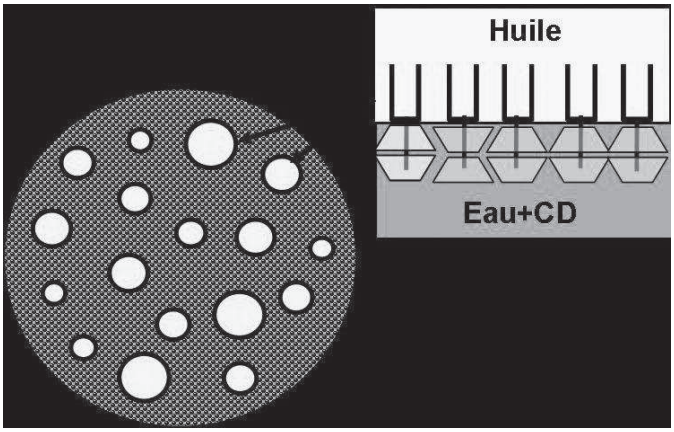


Figure 6. Représentation schématique d'une bille d'α-CD et d'huile de soja constituée de microdomaines huileux dispersés dans une matrice cristalline d'α-CD. Les gouttelettes huileuses sont stabilisées par des complexes d'inclusion formés entre les CD et les triglycérides de l'huile.

Le développement de ce nouveau système galénique nécessite la réalisation d'une étude approfondie sur la stabilité des billes au cours du temps dans différentes conditions de stockage (en milieu aqueux et après séchage). En effet, les billes contenant des huiles végétales en forte proportion pourraient présenter des problèmes d'oxydation ou d'hydrolyse des triglycérides, à long terme.

3.2.2. Autres matières premières permettant l'obtention des billes

Il est également possible d'élargir les matières premières pouvant être utilisées pour la formulation des billes. Ainsi, des billes préparées à partir d'huiles de germes de blé, d'amande douce ou d'onagre ont pu être fabriquées, avec des rendements de fabrication similaires à ceux obtenus avec l'huile de soja *(Trichard, 2007)*. Ces huiles, tout comme l'huile de soja, sont très riches en triglycérides (>99%) *(Trichard et al., 2011)*. Les billes préparées à partir d'huile de soja sont plus grosses (1,6 ± 0,2 mm) que celles obtenues avec les huiles de germe de blé (0,9 ± 0,3 mm) et d'amande douce (0,7 ± 0,2 mm) *(Trichard et al., 2011)*. Trichard *et al* ont expliqué cette observation par la présence de traces de produits de dégradation des triglycérides (avec l'huile de soja). L'huile de bourrache conduit seulement à un mélange fluide qui ne permet pas d'obtenir des billes. En effet, l'indice d'acide de cette huile est important (14,1 ± 0,2 mg de KOH/g d'huile) et la teneur en triglycérides homogènes est de 68% uniquement, démontrant ainsi la présence

d'une quantité importante de produits de dégradation des triglycérides *(Trichard et al., 2011)*. Une autre étude s'est intéressée aux autres CD naturelles (β- et γ-CD) ainsi qu'à des huiles de nature chimique différente de celle des huiles végétales, à savoir les huiles minérales et les huiles de silicone qui sont largement employées en formulation *(Trichard et al., 2008b)*. Les huiles minérales ou huiles de paraffine sont constituées d'un mélange d'hydrocarbures saturés linéaires, droits ou ramifiés, ou bien cycliques. Les huiles de silicone, sont, quant à elles, des huiles synthétiques, composées d'un mélange de chaînes polymères où alternent des atomes d'oxygène et de silicium, ces derniers portant des radicaux organiques. La viscosité de ces huiles varie directement avec le degré de polymérisation des chaînes. L'étude de l'influence de la nature de la CD d'une part et de la composition des huiles d'autre part, sur l'obtention et les caractéristiques des billes, a révélé que les billes peuvent se former avec de l'huile de paraffine (Marcol® 82) formulée avec de l'α-CD et de l'huile de silicone (Silicone 50cSt) combinée à de la γ-CD (Figure 7) *(Trichard et al., 2008b)*.

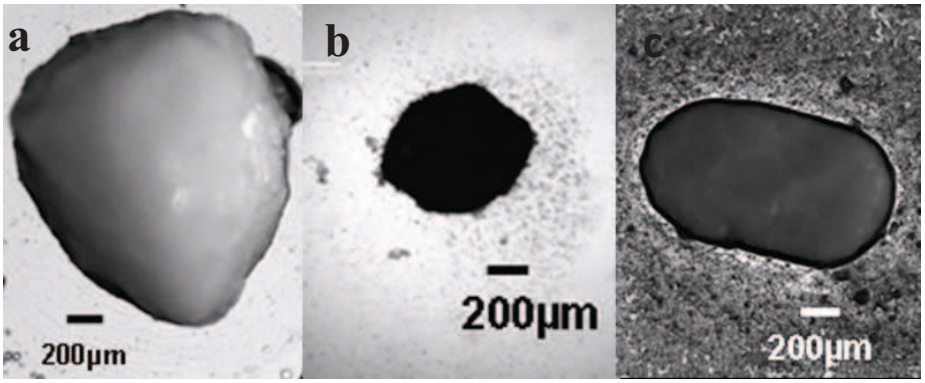


Figure 7. Billes formulées à partir d'un mélange a) α-CD/huile de soja, b) α-CD/Marcol® 82, c) γ-CD/Silicone 50cSt *(Trichard et al., 2008b)*.

Le caractère amphiphile des complexes formés entre les molécules de CD et les composés des huiles, semble jouer un rôle important et largement dépendant de la nature des groupements chimiques des constituants de l'huile ainsi que de la longueur des chaînes (grade de l'huile). Pour ces couples huile/CD, les rendements de fabrication des billes sont néanmoins nettement inférieurs à ceux mesurés avec les huiles végétales *(Trichard et al., 2008b)*.

3.2.3. Encapsulation de principes actifs lipophiles dans les billes

Compte-tenu de la forte teneur en huile au sein des billes, celles-ci sont particulièrement adaptées à l'encapsulation de molécules lipophiles comme par exemple l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)*, l'adapalène *(Trichard et al., 2008a)*, la progestérone *(Hamoudi, 2007-2008)* ou bien encore le diazépam *(Oudinet, 2005-2006, Pacary, 2006-2007)*. Il suffit simplement de dissoudre ou de disperser le PA dans l'huile de départ avant de l'ajouter à la solution aqueuse d'α-CD. Les rendements d'encapsulation de ces PA (correspondant à la quantité de PA, dosée par chromatographie liquide haute performance, dans les billes lyophilisées après extraction, par rapport à la quantité de PA préalablement introduite dans l'huile) peuvent atteindre les 90-100% *(Trichard et al., 2007, Trichard et al., 2008a, Trichard et al., 2008b)* y compris pour des molécules fragiles (isotrétinoïne) *(Trichard et al., 2007)*. Il est possible de faire varier la teneur en PA (mg de PA par g de billes lyophilisées) en modifiant simplement la concentration de la solution ou de la suspension huileuse de départ. La teneur élevée en PA dans les billes lyophilisées est compatible avec une utilisation en thérapeutique. Par exemple, la quantité d'isotrétinoïne encapsulée permet d'envisager une utilisation comparable aux formes actuellement commercialisées, aussi bien pour l'administration cutanée que l'administration orale. En effet, l'isotrétinoïne est commercialisée pour la voie cutanée sous la forme d'un gel alcoolique à 0,05% (Roaccutane® gel), dose qui est facilement atteinte avec les billes (3 mg/g de billes lyophilisées). Pour l'administration orale, l'isotrétinoïne se présente sous forme de capsules molles (Roaccutane® capsules) dont le plus faible dosage est de 5 mg. L'administration d'une telle dose correspondrait à une quantité d'environ 1,5 g de billes lyophilisées. Dans ce cas, il pourrait être utile de préparer des billes à partir d'une suspension et non d'une solution huileuse d'isotrétinoïne afin de diminuer la quantité de billes par prise, ce qui s'avère en particulier indispensable pour des dosages plus élevés en isotrétinoïne. Quant à l'adapalène, il est actuellement commercialisé sous la forme d'un gel ou d'une crème à 0,1% (Différine®) ce qui correspond à un dosage environ 3 fois inférieur à celui obtenu avec les billes lyophilisées.

Par rapport aux billes non chargées en PA, la taille des billes contenant une molécule active est légèrement augmentée (isotrétinoïne et adapalène) et le temps nécessaire pour l'obtention d'une population de billes homogène en taille est plus long.

Avant de retenir une molécule en vue de son encapsulation dans les billes, il est important de vérifier l'absence de formation de complexe d'inclusion entre le PA et l'α-CD. En effet, il est indispensable d'éviter une compétition entre le PA et les triglycérides vis à vis de la cavité des CD, sous peine de bloquer la formation des billes, comme cela est observé lorsque de l'acide oléique est ajouté à l'huile de soja. Ce pré-requis constitue une limite dans la sélection des PA

pouvant être encapsulés dans les billes. Cependant, cela n'exclut qu'un faible nombre de molécules puisque peu d'entre elles sont capables d'être incluses dans la cavité de l'α-CD, de par sa petite taille (4,7-5,3 Å).

3.2.4. Exemples d'utilisation des billes

Potentialités des billes pour la voie orale

Les PA en développement sont le plus souvent apolaires et appartiennent aux classes II et IV du SCB. Ces caractéristiques sont défavorables à l'obtention d'une biodisponibilité satisfaisante par voie orale. Le recours à des formulations lipidiques telles que les billes est une des stratégies possibles pour formuler ces PA. La lyophilisation des billes permet à la fois de faciliter leur manipulation (mise en gélule par exemple) et d'obtenir un système particulaire très riche en huile sous forme sèche. De plus, les billes constituent une forme divisée d'huile puisque leur structure interne contient des globules d'huile dispersés au sein d'une matrice d'α-CD. Cette structure particulière semble modifier la biodisponibilité orale de certains PA comme cela a été montré avec l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)*. En effet, les premiers essais réalisés *in vivo* chez le rat montrent qu'après administration des billes par voie orale, la biodisponibilité de cette molécule est doublée par rapport à celle obtenue avec le contenu d'une capsule molle (contenu lipidique à base d'huile de soja) de la spécialité Roaccutane®. Ces résultats encourageants pourraient être dus à la mise à disposition du PA sous forme divisée (microgouttelettes d'huile), à des interactions entre les molécules de CD et les lipides de l'épithélium de la muqueuse digestive ou bien encore à une plus grande protection *in vivo* de l'isotrétinoïne. Des études approfondies sont actuellement en cours pour tenter de comprendre comment les billes se comportent dans les fluides digestifs et libèrent leur contenu.

Potentialités des billes pour la voie cutanée

Les billes de CD et d'huile peuvent également être considérées comme une forme galénique tout à fait intéressante pour une application cutanée. En effet, leur consistance semi-solide permet de les appliquer aisément sur la peau par un léger massage. Des études (observations cliniques, chromamétrie et mesure de TEWL (Trans Epidermal Water Loss)) réalisées sur le volontaire sain, ont montré que les billes non chargées en PA sont bien tolérées par la peau et qu'elles possèdent un effet occlusif qui pourrait être mis à profit pour améliorer la pénétration de certains PA. Une étude a également mis en évidence par la technique de tape-stripping, effectuée sur de la peau abdominale de porc, que les billes libèrent l'adapalène (molécule antiacnéique) dans le *stratum corneum,* au moins aussi efficacement que les formules commercialisées (Différine® gel

et crème) (*Trichard et al., 2008a*). Les billes semblent particulièrement adaptées pour la formulation de molécules lipophiles irritantes, comme par exemple l'isotrétinoïne. En effet, cette molécule est formulée dans un gel alcoolique (Roaccutane® gel). La présence d'alcool, qui permet sa solubilisation dans le gel, potentialise aussi son effet irritant pour la peau. Les billes pourraient ainsi présenter une alternative intéressante pour formuler ce type de molécules, évitant l'utilisation d'alcool (solubilisation dans l'huile de soja) et pouvant assurer un effet émollient grâce à leur forte teneur en huile.

Conclusion

Dans cette partie bibliographique, nous nous sommes intéressés aux systèmes lipidiques émulsionnés afin de les comparer aux «billes» composées de microgouttelettes d'huile dispersées dans une matrice de CD. Les billes présentent des similitudes avec les systèmes lipidiques décrits précédemment. En effet, il s'agit d'un système émulsionné (comme les S(M,N)EDDS, les ME, les NE et les ES). Elles sont faciles à obtenir et se forment spontanément sous l'action d'une simple agitation orbitale externe. Contrairement aux NE préformées, elles ne nécessitent pas une consommation importante d'énergie. La fabrication des billes ne requiert pas l'utilisation de co-solvants contrairement à la majorité des systèmes lipidiques développés dans cette partie. Leur teneur élevée en huile *(Bochot et al., 2007)* (supérieure à celle des S(M,N)EDDS et des ES) leur permet d'encapsuler des quantités de PA lipophiles pouvant être compatibles avec une utilisation en thérapeutique *(Trichard, 2007, Trichard et al., 2007)*. Il est possible de formuler des billes encapsulant des PA à l'état dispersé à partir de suspensions huileuses sursaturées en PA *(Trichard et al., 2008a)*. Contrairement aux systèmes lipidiques émulsionnés présentés dans cette synthèse, la formation des billes s'effectue en absence de surfactants et de co-surfactants. Cette différence constitue un avantage majeur en termes de toxicité lors d'administrations répétées. Lyophilisées, les billes peuvent être introduites dans des gélules de la même façon que la poudre des ES. Comme les ES, elles sont constituées de micro-globules huileux dispersés au sein d'une matrice hydrophile de CD avec la possibilité de les lyophiliser. En revanche, elles ne contiennent pas de tensio-actifs et présentent deux niveaux de division : (i) système particulaire (entre 1 et 2 mm de diamètre) (ii) système émulsionné (microgouttelettes huileuses dispersées dans une matrice hydrophile de CD); ce qui pourrait avoir des répercussions sur les profils de libération des molécules actives encapsulées.

Abréviations

ASC : aire sous la courbe

CD : cyclodextrine

Cp_{max} : concentration plasmatique maximale

ES : émulsion sèche

ME : micro-émulsion

NE : nano-émulsion

PA : principe actif

P-gp : P-glycoprotéine

SCB: système de classification biopharmaceutique

S(M,N)EDDS : système auto (micro, nano) émulsionnant

TCM : triglycérides à chaînes moyennes

TCL : triglycérides à chaînes longues

TGI : tractus gastro-intestinal

T_{max} : temps nécessaire pour atteindre la Cp_{max}

Références

Aggarwal, N., Goindi, S. and Mehta, S. D. 2012. Preparation and evaluation of dermal delivery system of griseofulvin containing vitamin E-TPGS as penetration enhancer. *AAPS Pharm Sci Tech,* 13, 67-74.

Agüeros, M., Espuelas, S., Esparza, I., Calleja, P., Peñuelas, I., Ponchel, G. and Irache, J. M. 2011. Cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles as new vehicles for oral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv,* 6, 721-734.

Ahmed, I. S. and Aboul-Einien, M. H. 2007. In vitro and in vivo evaluation of a fast-disintegrating lyophilized dry emulsion tablet containing griseofulvin. *Eur J Pharm Sci,* 32, 58-68.

Ahmed, I. S., Aboul-Einien, M. H., Mohamed, O. H. and Farid, S. F. 2008. Relative bioavailability of griseofulvin lyophilized dry emulsion tablet vs. immediate release tablet: a single-dose, randomized, open-label, six-period, crossover study in healthy adult volunteers in the fasted and fed states. *Eur J Pharm Sci,* 35, 219-225.

Alvarez, C., Nunez, I., Torrado, J. J., Gordon, J., Potthast, H. and Garcia-Arieta, A. 2011. Investigation on the possibility of biowaivers for ibuprofen. *J Pharm Sci,* 100, 2343-2349.

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res,* 12, 413-420.

Anton, N., Benoit, J. P. and Saulnier, P. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *J Control Release,* 128, 185-199.

Anton, N., Gayet, P., Benoit, J. P. and Saulnier, P. 2007. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int J Pharm,* 344, 44-52.

Anton, N. and Vandamme, T. F. 2009. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm,* 377, 142-147.

Anton, N. and Vandamme, T. F. 2011. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res,* 28, 978-985.

Anwar, M., Warsi, M. H., Mallick, N., Akhter, S., Gahoi, S., Jain, G. K., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J. and Khar, R. K. 2011. Enhanced bioavailability of nano-sized chitosan-atorvastatin conjugate after oral administration to rats. *Eur J Pharm Sci,* 44, 241-249.

Araya, H., Tomita, M. and Hayashi, M. 2005. The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. *Int J Pharm,* 305, 61-74.

Arida, A. I., Al-Tabakha, M. M. and Hamoury, H. A. 2007. Improving the high variable bioavailability of griseofulvin by SEDDS. *Chem Pharm Bull (Tokyo),* 55, 1713-1719.

Arnal, J., Gonzalez-Alvarez, I., Bermejo, M., Amidon, G. L., Junginger, H. E., Kopp, S., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S., Dressman, J. B. and Barends, D. M. 2008. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: aciclovir. *J Pharm Sci,* 97, 5061-5073.

Aungst, B. J. 1993. Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *J Pharm Sci,* 82, 979-987.

Baloch, M. K. and Hameed, G. 2005. Emulsification of oil in water as affected by different parameters. *J Colloid Interface Sci,* 285, 804-813.

Benameur, H. 2006. Liquid and semi-solid formulations for enhancing oral absorption. *BT Gattefossé,* 99, 63-75.

Bochot, A. and Duchêne, D. 2006. Cyclodextrines. In: Actifs et Additifs en cosmétologie, Paris, TEC and DOC, p 993-1018.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J. L., Duchene, D. and Fattal, E. 2007. alpha-Cyclodextrin/oil beads: An innovative self-assembling system. *Int J Pharm,* 339, 121-129.

Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E. and Fessi, H. 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm,* 280, 241-251.

Breitenbach, J. 2002. Melt extrusion: from process to drug delivery technology. *Eur J Pharm Biopharm,* 54, 107-117.

Bressolle, F., Audran, M., Pham, T. N. and Vallon, J. J. 1996. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: Basic principles and new developments. *J Chromatogr B,* 687, 303-336.

Buyukozturk, F., Benneyan, J. C. and Carrier, R. L. 2010. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J Control Release,* 142, 22-30.

Canselier, J. P., Abismail, B., Wilhelm, A. M., Delmas, H. and Gourdon, C. 1999. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem,* 6, 75-83.

Chanana, G. D. and Sheth, B. B. 1995. Particle size reduction of emulsions by formulation design-II: effect of oil and surfactant concentration. *PDA J Pharm Sci Technol,* 49, 71-76.

Charman, S. A., Charman, W. N., Rogge, M. C., Wilson, T. D., Dutko, F. J. and Pouton, C. W. 1992. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems - Formulation and Biopharmaceutic Evaluation of an Investigational Lipophilic Compound. *Pharm Res,* 9, 87-93.

Charman, W. N. 2000. Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts. *J Pharm Sci,* 89, 967-978.

Chen, M. L., Amidon, G. L., Benet, L. Z., Lennernas, H. and Yu, L. X. 2011. The BCS, BDDCS, and regulatory guidances. *Pharm Res,* 28, 1774-1778.

Chen, Z. P., Sun, J., Chen, H. X., Xiao, Y. Y., Liu, D., Chen, J., Cai, H. and Cai, B. C. 2010. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of Ginkgo biloba extracts, Ginkgo biloba extract phospholipid complexes and Ginkgo biloba extract solid dispersions in rats. *Fitoterapia,* 81, 1045-1052.

Christensen, K. L., Pedersen, G. P. and Kristensen, H. G. 2001a. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *Int J Pharm,* 212, 187-194.

Christensen, K. L., Pedersen, G. P. and Kristensen, H. G. 2001b. Technical optimisation of redispersible dry emulsions. *Int J Pharm,* 212, 195-202.

Christensen, K. L., Pedersen, G. P. and Kristensen, H. G. 2002. Physical stability of redispersible dry emulsions containing amorphous sucrose. *Eur J Pharm Biopharm,* 53, 147-153.

Cole, E. T., Cade, D. and Benameur, H. 2008. Challenges and opportunities in the encapsulationof liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv Drug DelivRev,* 60(6), 747-756.

Constantinides, P. P. 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res,* 12, 1561-1572.

Corveleyn, S. and Remon, J. P. 1998. Bioavailability of hydrochlorothiazide: Conventional versus freeze-dried tablets. *Int J Pharm,* 173, 149-155.

Corveleyn, S. and Remon, J. P. 1999. Stability of freeze-dried tablets at different relative humidities. *Drug Dev Ind Pharm,* 25, 1005-1013.

Craig, D. Q. M., Barker, S. A., Banning, D. and Booth, S. W. 1995. An Investigation into the Mechanisms of Self-Emulsification Using Particle-Size Analysis and Low-Frequency Dielectric-Spectroscopy. *Int J Pharm,* 114, 103-110.

Danielsson, I. and Lindman, B. 1981. The Definition of Micro-Emulsion. *Coll Surf,* 3, 391-392.

Date, A. A., Desai, N., Dixit, R. and Nagarsenker, M. 2010. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine (Lond),* 5, 1595-1616.

Date, A. A. and Nagarsenker, M. S. 2007. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil. *Int J Pharm,* 329, 166-172.

Davis, W. W., Pfeiffer, R. R. and Quay, J. F. 1970. Normal and promoted gastrointestinal absorption of water-soluble substances. I. Induced rapidly reversible hyperabsorptive state in the canine fundic stomach pouch. *J Pharm Sci,* 59, 960-963.

Desrumaux, A., Floury, J., Axelos, M. A. V. and Legrand, J. 2003. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *J Food Process Eng,* 58, 227-238.

Dixit, R. P. and Nagarsenker, M. S. 2007. Dry adsorbed emulsion of simvastatin: optimization and in vivo advantage. *Pharm Dev Technol,* 12, 495-504.

Dollo, G., Le Corre, P., Guerin, A., Chevanne, F., Burgot, J. L. and Leverge, R. 2003. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Sci,* 19, 273-280.

Dorosz, P. 2002. Guide pratique des médicaments, Paris, Editions Maloine, p 882-883.

Duchene, D., Bochot, A. and Loftsson, T. 2009. Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. *STP Pharma Pratiques* 19, 15-27.

Duchene, D., Bochot, A., Yu, S. C., Pepin, C. and Seiller, M. 2003. Cyclodextrins and emulsions. *Int J Pharm,* 266, 85-90.

Duchene, D. and Wouessidjewe, D. 1992. Industrial uses of cyclodextrins and their derivates. *J Coord Chem,* 27, 233-236.

Dunn, C. J., Wagstaff, A. J., Perry, C. M., Plosker, G. L. and Goa, K. L. 2001. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs,* 61, 1957-2016.

Ekambaram, P. and Abdul, H. S. 2011. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril. *J Young Pharm,* 3, 216-220.

El-Laithy, H. M. 2008. Self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced bioavailability and improved hepatoprotective activity of biphenyl dimethyl dicarboxylate. *Curr Drug Deliv,* 5, 170-176.

Elshaer, A., Khan, S., Perumal, D., Hanson, P. and Mohammed, A. R. 2011. Use of Amino Acids as Counterions Improves the Solubility of the BCS II Model Drug, Indomethacin. *Curr Drug Deliv,* 8, 363-372.

Erkko, P., Granlund, H., Nuutinen, M. and Reitamo, S. 1997. Comparison of cyclosporin A pharmacokinetics of a new microemulsion formulation and standard oral preparation in patients with psoriasis. *Br J Dermatol,* 136, 82-88.

Fahr, A. 1993. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet,* 24, 472-495.

Fanali, S. 2000. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *J Chromatogr A,* 875, 89-122.

Farahmand, S., Tajerzadeh, H. and Farboud, E. S. 2006. Formulation and evaluation of a vitamin C multiple emulsion. *Pharm Dev Technol,* 11, 255-261.

Fatouros, D. G., Karpf, D. M., Nielsen, F. S. and Mullertz, A. 2007. Clinical studies with oral lipid based formulations of poorly soluble compounds. *Ther Clin Risk Manag,* 3, 591-604.

Gan-Zuo, L. and Friberg, S. E. 1982. Surfactant/cosurfactant association and emulsion stability. *J Am Oil Chem Soc,* 59(12), 569-572.

Ganta, S., Deshpande, D., Korde, A. and Amiji, M. 2010. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Mol Membr Biol,* 27, 260-273.

Gao, P. and Morozowich, W. 2006. Development of supersaturatable self-emulsifying drug delivery system formulations for improving the oral absorption of poorly soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv,* 3, 97-110.

Garrigue, J. S. 2002. Les systèmes auto-émulsionnants pour l'administration orale de principes actifs lipophiles: influence de la formulation sur les aspects biopharmaceutiques., Faculté de pharmace de Châtenay Malary. Université Paris Sud 11. p 1-80.

Gasco, M. R., Priano, L. and Zara, G. P. 2009. Chapter 10 - Solid lipid nanoparticles and microemulsions for drug delivery The CNS. *Prog Brain Res,* 180, 181-192.

Ge, Z., Zhang, X. X., Gan, L. and Gan, Y. 2008. Redispersible, dry emulsion of lovastatin protects against intestinal metabolism and improves bioavailability. *Acta Pharmacol Sin,* 29, 990-997.

Ghosh, P. K., Majithiya, R. J., Umrethia, M. L. and Murthy, R. S. 2006. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS Pharm Sci Tech,* 7, 73-77.

Ghosh, P. K. and Murthy, R. S. 2006. Microemulsions: a potential drug delivery system. *Curr Drug Deliv,* 3, 167-180.

Goddeeris, C. and Van Den Mooter, G. 2008. Free flowing solid dispersions of the anti-HIV drug UC 781 with Poloxamer 407 and a maximum amount of TPGS 1000: investigating the relationship between physicochemical characteristics and dissolution behaviour. *Eur J Pharm Sci,* 35, 104-113.

Goutayer, M. 2008. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie. p 1-241.

Greiner, R. W. and Evans, D. F. 1990. Spontaneous Formation of a Water-Continuous Emulsion from a W/O Microemulsion. *Langmuir,* 6, 1793-1796.

Gupta, S. K., Manfro, R. C., Tomlanovich, S. J., Gambertoglio, J. G., Garovoy, M. R. and Benet, L. Z. 1990. Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol,* 30, 643-653.

Gursoy, R. N. and Benita, S. 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother,* 58, 173-182.

Gutierrez, J. M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M. and Nolla, J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr Opin Colloid Interface Sci,* 13, 245-251.

Hamoudi, M. 2007-2008. Billes à base de cyclodextrines et d'huile pour l'administration de principes actifs lipophiles par voie orale : Etudes in vitro dans des milieux digestifs simulés. *Master recherche : Pharmacotechnie et Biopharmacie, Université Paris-sud 11.*

Han, S. M. 1997. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. *Biomed Chromatogr,* 11, 259-271.

Hansen, T., Holm, P., Rohde, M. and Schultz, K. 2005. In vivo evaluation of tablets and capsules containing spray-dried o/w-emulsions for oral delivery of poorly soluble drugs. *Int J Pharm,* 293, 203-211.

Hansen, T., Holm, P. and Schultz, K. 2004. Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. *Int J Pharm,* 287, 55-66.

Hashimoto, H. 1991. Preparation, structure, property and application of branched cyclodextrins. Chapter 3, In: New trends in cyclodextrins and derivatives, Paris, Edition de santé, p 97-156.

Hatanaka, J., Shinme, Y., Kuriyama, K., Uchida, A., Kou, K., Uchida, S., Yamada, S. and Onoue, S. 2011. In Vitro and In Vivo characterization of New Formulations of St. John's Wort Extract with Improved Pharmacokinetics and Anti-nociceptive Effect. *Drug Metab Pharmacokinet*, 551-558.

Hauss, D. J. 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv Drug Deliv Rev,* 59, 667-676.

Hauss, D. J., Fogal, S. E., Ficorilli, J. V., Price, C. A., Roy, T., Jayaraj, A. A. and Keirns, J. J. 1998. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor. *J Pharm Sci,* 87, 164-169.

He, Z. G., He, C. X. and Gao, J. Q. 2010. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv,* 7, 445-460.

Heinzelmann, K. and Franke, K. 1999. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloids Surf B Biointerfaces,* 12, 223-229.

Hoar, T. P. and Schulman, J. H. 1943. Transparent water in oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature,* 152, 102-110.

Holm, R., Jorgensen, E. B., Harborg, M., Larsen, R., Holm, P., Mullertz, A. and Jacobsen, J. 2011. A novel excipient, 1-perfluorohexyloctane shows limited utility for the oral delivery of poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci,* 42, 416-422.

Hu, L., Yang, J., Liu, W. and Li, L. 2011. Preparation and evaluation of ibuprofen-loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability. *Drug Deliv,* 18, 90-95.

Inoue, M., Hashizaki, K., Taguchi, H. and Saito, Y. 2008. Emulsion preparation using beta-cyclodextrin and its derivatives acting as an emulsifier. *Chem Pharm Bull,* 56, 1335-1337.

Inoue, M., Hashizaki, K., Taguchi, H. and Saito, Y. 2009. Preparation and Characterization of n-Alkane/Water Emulsion Stabilized by Cyclodextrin. *J Oleo Sci,* 58, 85-90.

Ishigami, H., Takahashi, H., Kagei, N., Kuwabara, N. and Hara, K. 1989. Production and application of branched cyclodextrins. *Monthly Food Chem*, 32-44.

Ismailos, G., Reppas, C., Dressman, J. B. and Macheras, P. 1991. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *J Pharm Pharmacol,* 43, 287-289.

Izquierdo, P., Esquena, J., Tadros, T. F., Dederen, C., Garcia, M. J., Azemar, N. and Solans, C. 2002. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir,* 18, 26-30.

Jadhav, K. R., Shaikh, I. M., Ambade, K. W. and Kadam, V. J. 2006. Applications of microemulsion based drug delivery system. *Curr Drug Deliv,* 3, 267-273.

Jain, R. and Patravale, V. B. 2009. Development and evaluation of nitrendipine nanoemulsion for intranasal delivery. *J Biomed Nanotechnol,* 5, 62-68.

Jang, D. J., Jeong, E. J., Lee, H. M., Kim, B. C., Lim, S. J. and Kim, C. K. 2006. Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. *Eur J Pharm Sci,* 28, 405-411.

Jeevana, J. B. and Sreelakshmi, K. 2011. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system of flutamide. *J Young Pharm,* 3, 4-8.

Kahlweit, M., Strey, R. and Busse, G. 1990. Microemulsions - a Qualitative Thermodynamic Approach. *J Phys Chem* 94, 3881-3894.

Kajita, M., Morishita, M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S. and Nagai, T. 2000. Enhanced enteral bioavailability of vancomycin using water-in-oil-in-water multiple emulsion incorporating highly purified unsaturated fatty acid. *J Pharm Sci,* 89, 1243-1252.

Kang, B. K., Lee, J. S., Chon, S. K., Jeong, S. Y., Yuk, S. H., Khang, G., Lee, H. B. and Cho, S. H. 2004. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm,* 274, 65-73.

Kawakami, K., Yoshikawa, T., Hayashi, T., Nishihara, Y. and Masuda, K. 2002. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. II. In vivo study. *J Control Release,* 81, 75-82.

Ke, W. T., Lin, S. Y., Ho, H. O. and Sheu, M. T. 2005. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *J Control Release,* 102, 489-507.

Khoo, S. M., Shackleford, D. M., Porter, C. J., Edwards, G. A. and Charman, W. N. 2003. Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs. *Pharm Res,* 20, 1460-1465.

Kim, H. J., Yoon, K. A., Hahn, M., Park, E. S. and Chi, S. C. 2000. Preparation and in vitro evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems containing idebenone. *Drug Dev Ind Pharm,* 26, 523-529.

Kim, J. Y. and Ku, Y. S. 2000. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *Int J Pharm,* 194, 81-89.

Komesvarakul, N., Sanders, M. D., Szekeres, E., Acosta, E. J., Faller, J. F., Mentlik, T., Fisher, L. B., Nicoll, G., Sabatini, D. A. and Scamehorn, J. F. 2006. Microemulsions of triglyceride-based oils: The effect of co-oil and salinity on phase diagrams. *J Cosmet Sci,* 57, 309-325.

Kommuru, T. R., Gurley, B., Khan, M. A. and Reddy, I. K. 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm,* 212, 233-246.

Lawrence, M. J. and Rees, G. D. 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev,* 45, 89-121.

Le Hir, A., Chaumeil, J. C. and Brossard, D. Pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments MASSON, p 1-377.

Li, P. H. and Chiang, B. H. 2011. Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrason Sonochem,* 19, 192-197.

Li, W., Yi, S., Wang, Z., Chen, S., Xin, S., Xie, J. and Zhao, C. 2011. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. *Int J Pharm,* 420, 161-171.

Lin, Y., Shen, Q., Katsumi, H., Okada, N., Fujita, T., Jiang, X. and Yamamoto, A. 2007. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol Pharm Bull,* 30, 1301-1307.

Lladser, M., Medrano, C. and Aranciba, A. 1968. The use of supports in the lyophilization of oil-in-water emulsions. *J Pharm Pharmacol,* 20, 450-455.

Loftsson, T. and Duchene, D. 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm,* 329, 1-11.

Macheras, P. E. and Reppas, C. I. 1986. Studies on drug-milk freeze-dried formulations. I: Bioavailability of sulfamethizole and dicumarol formulations. *J Pharm Sci,* 75, 692-696.

Meng, J. and Hu, L. 2011. Positively-charged microemulsion for improving the oral bioavailability of alendronate: in-vitro and in-vivo assessment. *J Pharm Pharmacol,* 63, 400-408.

Miller, J. M., Beig, A., Krieg, B. J., Carr, R. A., Borchardt, T. B., Amidon, G. E., Amidon, G. L. and Dahan, A. 2011. The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol Pharm,* 8, 1848-1856.

Myers, S. L. and Shively, M. L. 1993. Solid state emulsion: the effect of maltodextrin on microcrystalline aging. *Pharm Res,* 10, 1389-1391.

Nazzal, S., Smalyukh, Ii, Lavrentovich, O. D. and Khan, M. A. 2002. Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of emulsion formation. *Int J Pharm,* 235, 247-265.

Noble, S. and Markham, A. 1995. Cyclosporine - a Review of the Pharmacokinetic Properties, Clinical Efficacy and Tolerability of a Microemulsion-Based Formulation (Neoral). *Drugs,* 50, 924-941.

Nornoo, A. O., Zheng, H., Lopes, L. B., Johnson-Restrepo, B., Kannan, K. and Reed, R. 2009. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Biopharm,* 71, 310-317.

Oudinet, C. 2005-2006. Caractérisations physico-chimiques et biopharmaceutiques d'une nouvelle forme galénique à base de cyclodextrines et d'huile pour l'administration d'un principe actif modèle par voie orale. *Master recherche : Pharmacotechnie et Biopharmacie, Université Paris-Sud 11.*

Pacary, S. 2006-2007. Evaluation d'une nouvelle forme galénique à base de cyclodextrines pour l'administration de principes actifs par voie orale » *Master Conception du Médicament,Université de Lille 2 Droit et Santé Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL.*

Palin, K. J., Phillips, A. J. and Ning, A. 1986. The Oral Absorption of Cefoxitin from Oil and Emulsion Vehicles in Rats. *Int J Pharm,* 33, 99-104.

Patel, D. and Sawant, K. K. 2009. Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs. *Curr Drug Deliv,* 6, 419-424.

Pathak, S. M., Musmade, P., Dengle, S., Karthik, A., Bhat, K. and Udupa, N. 2010. Enhanced oral absorption of saquinavir with Methyl-Beta-Cyclodextrin-Preparation and in vitro and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Sci,* 41, 440-451.

Pedersen, G. P., Faldt, P., Bergenstahl, B. and Kristensen, H. G. 1998. Solid state characterisation of a dry emulsion: a potential drug delivery system. *Int J Pharm,* 171, 257-270.

Polli, J. E., Rege, B. D. and Kao, J. P. Y. 2002. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci,* 16, 237-246.

Poré, J. 1992. Emulsions, Micro-émulsions, Emulsions multiples, Neuilly, Editions techniques des industries des corps gras, p 1-270.

Porter, C. J., Trevaskis, N. L. and Charman, W. N. 2007. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov,* 6, 231-248.

Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F. and Charman, W. N. 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev,* 60, 673-691.

Pouton, C. W. 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev,* 25, 47-58.

Pouton, C. W. 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci,* 11 Suppl 2, S93-98.

Ragno, G., Cione, E., Garofalo, A., Genchi, G., Ioele, G., Risoli, A. and Spagnoletta, A. 2003. Design and monitoring of photostability systems for amlodipine dosage forms. *Int J Pharm,* 265, 125-132.

Rajpoot, P., Pathak, K. and Bali, V. 2011. Therapeutic applications of nanoemulsion based drug delivery systems: a review of patents in last two decades. *Recent Pat Drug Deliv Formul,* 5, 163-172.

Remon, J. P. and Corveleyn, S. 1998a. Bioavailability of hydrochlorothiazide: Conventional versus freeze-dried tablets. *Int J Pharm,* 173, 149-155.

Remon, J. P. and Corveleyn, S. 1998b. Formulation of a lyophilized dry emulsion tablet for the delivery of poorly soluble drugs. *Int J Pharm,* 166, 65-74.

Richter, V. A. and Steiger-Trippi, K. 1961. Untersuchungen über die zerstäubungstrocknung von emulgierten arzneizubereitungen. *Pharma Acta Helv,* 36, 322-337.

Ruan, J., Liu, J., Zhu, D., Gong, T., Yang, F., Hao, X. and Zhang, Z. 2010. Preparation and evaluation of self-nanoemulsified drug delivery systems (SNEDDSs) of matrine based on drug-phospholipid complex technique. *Int J Pharm,* 386, 282-290.

Saenger, W. 1980. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew Chem Int,* 19, 344-362.

Saint Ruth, H., Attwood, D., Ktistis, G. and Taylor, C. J. 1995. Phase studies and particule size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm,* 116(2), 253-261.

Schott, H. 1990. Comments on hydrophile-lipophile balance systems. *J Pharm Sci,* 79, 87-88.

Schulman, J. H., Stoeckenius, W. and Prince, L. M. 1959. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *J Phys Chem,* 63, 1677-1680.

Serajuddin, A. T., Ranadive, S. A. and Mahoney, E. M. 1991. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J Pharm Sci,* 80, 830-834.

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K. and Ali, M. 2007. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm,* 66, 227-243.

Shah, N. H., Carvajal, M. T., Patel, C. I., Infeld, M. H. and Malick, A. W. 1994. Self-Emulsifying Drug-Delivery Systems (Sedds) with Polyglycolyzed Glycerides for Improving in-Vitro Dissolution and Oral Absorption of Lipophilic Drugs. *Int J Pharm,* 106, 15-23.

Shahiwala, A. and Amiji, M. M. 2008. Enhanced mucosal and systemic immune response with squalane oil-containing multiple emulsions upon intranasal and oral administration in mice. *J Drug Target,* 16, 302-310.

Sharma, P., Varma, M., Chawla, H. and Panchagnula, R. 2005. Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Farmaco,* 60, 11-12.

Shen, Q., Wang, Y. and Zhang, Y. 2011. Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer. *Int J Nanomedicine,* 6, 1237-1243.

Shimada, K., Kawano, K., Ishii, J. and Nakamura, T. 1992. Structure of Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Triglyceride at Vegetable Oil-Water Interface. *J Food Sci,* 57, 655-656.

Shimada, K., Ohe, Y., Ohguni, T., Kawano, K., Ishii, J. and Nakamura, T. 1991. Emulsifying Properties of Alpha-Cyclodextrins, Beta-Cyclodextrins and Gamma-Cyclodextrins. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* 38, 16-20.

Shively, M. L. 1993a. Characterization of Oil-in-Water Emulsions Prepared from Solid-State Emulsions - Effect of Matrix and Oil Phase. *Pharm Res,* 10, 1153-1156.

Shively, M. L. 1993b. Droplet Size Distribution within Oil-in-Water Emulsions Prepared from Solid-State Dispersions. *J Colloid Interface Sci,* 155, 66-69.

Shively, M. L. 1997. Multiple emulsions for the delivery of proteins. *Pharm Biotechnol,* 10, 199-211.

Shively, M. L. and Thompson, D. C. 1995. Oral Bioavailability of Vancomycin Solid-State Emulsions. *Int J Pharm,* 117, 119-122.

Singh, B., Bandopadhyay, S., Kapil, R., Singh, R. and Katare, O. 2009. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,* 26, 427-521.

Singh, B., Khurana, L., Bandyopadhyay, S., Kapil, R. and Katare, O. O. 2011. Development of optimized self-nano-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of carvedilol with enhanced bioavailability potential. *Drug Deliv*, 599-612.

Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, L., Zaworotko, M. J. and Shytle, R. D. 2011. Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability. *Mol Pharm,* 8, 1867-1876.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. and Garcia-Celma, M. J. 2005. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci,* 10, 102-110.

Sole, I., Maestro, A., Gonzalez, C., Solans, C. and Gutierrez, J. M. 2006. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir,* 22, 8326-8332.

Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J. T. and L'alloret, F. 2004. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci,* 108-109, 145-149.

Stella, V., Haslam, J., Yata, N., Okada, H., Lindenbaum, S. and Higuchi, T. 1978. Enhancement of bioavailability of a hydrophobic amine antimalarial by formulation with oleic acid in a soft gelatin capsule. *J Pharm Sci,* 67, 1375-1377.

Strickley, R. G. 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res,* 21, 201-230.

Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin technology, Kluwer Academic Publishers, p 1-411.

Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J. and Solans, C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci,* 108, 303-318.

Takahashi, Y., Kondo, H., Yasuda, T., Watanabe, T., Kobayashi, S. and Yokohama, S. 2002. Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm,* 246, 85-94.

Takeuchi, H., Sasaki, H., Niwa, T., Hino, T., Kawashima, Y., Uesugi, K. and Osawa, H. 1991. Redispersible dry emulsion system as novel oral dosage form of oily drugs: in vivo studies in beagle dogs. *Chem Pharm Bull,* 39, 3362-3364.

Talaulikar, G. S., John, G. T., Selvakumar, R., Job, V., Thomas, P. P. and Jacob, C. K. 2003. Pre- and postrenal transplantation pharmacokinetics of cyclosporine microemulsion. *Transplant Proc,* 35, 1295-1297.

Tanaka, S., Watanabe, M. and Takaku, H. 1989. Application of branched cyclodextrins to food. *Monthly Food Chem*, 45-53.

Tarr, B. D. and Yalkowsky, S. H. 1989. Enhanced Intestinal-Absorption of Cyclosporine in Rats through the Reduction of Emulsion Droplet Size. *Pharm Res,* 6, 40-43.

Te Wierik, G. H., Eissens, A. C. and Lerk, C. F. 1994. Preparation, characterization, and pharmaceutical application of linear dextrins. III. Drug release from fatty suppository bases containing amylodextrin. *Pharm Res,* 11, 108-110.

Tiwari, S. B. and Amiji, M. M. 2006. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. *J Nanosci Nanotechnol,* 6, 3215-3221.

Toguchi, H., Ogawa, Y., Iga, K., Yashiki, T. and Shimamoto, T. 1990. Gastrointestinal Absorption of Ethyl 2-Chloro-3-[4-(2-Methyl-2-Phenylpropyloxy)Phenyl]Propionate from Different Dosage Forms in Rats and Dogs. *Chem Pharm Bull,* 38, 2792-2796.

Toorisaka, E., Hashida, M., Kamiya, N., Ono, H., Kokazu, Y. and Goto, M. 2005. An enteric-coated dry emulsion formulation for oral insulin delivery. *J Control Release,* 107, 91-96.

Trichard, L. 2007. Billes à base de cyclodextrines et d'huile:étude du mécanisme de formation et évaluation du potentiel en formulation et en thérapeutique. Université Paris-Sud 11. p 1-203.

Trichard, L., Bochot, A. and Duchêne, D. 2006. Cyclodextrins in dispersed systems. In: Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications, Wiley-VCH, p 423-449.

Trichard, L., Chaminade, P., Grossiord, J. L., Le Bas, G., Huang, N., Durand, D., Fattal, E. and Bochot, A. 2011. Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties. *J Drug Del Sci Tech,* 21(2), 189-194.

Trichard, L., Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H., Fattal, E. and Bochot, A. 2008a. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. *Pharm Res,* 25, 435-440.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M. and Bochot, A. 2007. Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. *J Control Release,* 122, 47-53.

Trichard, L., Fattal, E., Le Bas, G., Duchene, D., Grossiord, J. L. and Bochot, A. 2008b. Formulation and characterisation of beads prepared from natural cyclodextrins and vegetable, mineral or synthetic oils. *Int J Pharm,* 354, 88-94.

Tuleu, C., Newton, M., Rose, J., Euler, D., Saklatvala, R., Clarke, A. and Booth, S. 2004. Comparative bioavailability study in dogs of a self-emulsifying formulation of progesterone presented in a pellet and liquid form compared with an aqueous suspension of progesterone. *J Pharm Sci,* 93, 1495-1502.

Van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Van Der Kruijssen, C. M., Van Waterschoot, R. A., Smit, J. W., Song, J. Y., Van Der Valk, M. A., Van Tellingen, O., Van Der Hoorn, J. W., Rosing, H., Beijnen, J. H. and Schinkel, A. H. 2007. Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism. *J Clin Invest,* 117, 3583-3592.

Vandamme, T. F., Poncelet, D. and Subra-Paternault, P. 2007. Microencapsulation: des sciences aux technologies Paris: TEC and DOC. Lavoisier.

Vyas, T. K., Shahiwala, A. and Amiji, M. M. 2008. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int J Pharm,* 347, 93-101.

Wakerly, M. G., Pouton, C. W., Meakin, B. J. and Morton, F. S. 1986. Self-Emulsification of Vegetable Oil-Nonionic Surfactant Mixtures - a Proposed Mechanism of Action. *Acs Symposium Series,* 311, 242-255.

Wang, L., Cui, F. D. and Sunada, H. 2006. Preparation and evaluation of solid dispersions of nitrendipine prepared with fine silica particles using the melt-mixing method. *Chem Pharm Bull (Tokyo),* 54, 37-43.

Wang, Z., Sun, J., Wang, Y., Liu, X., Liu, Y., Fu, Q., Meng, P. and He, Z. 2010. Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm,* 383, 1-6.

Woods, M. G., Diana, G. D., Rogge, M. C., Otto, M. J., Dutko, F. J. and Mckinlay, M. A. 1989. In vitro and in vivo activities of WIN 54954, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. *Antimicrob Agents Chemother,* 33, 2069-2074.

Wooster, T. J., Golding, M. and Sanguansri, P. 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir,* 24, 12758-12765.

Wu, C. Y. and Benet, L. Z. 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res,* 22, 11-23.

Wu, W., Wang, Y. and Que, L. 2006. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm,* 63, 288-294.

Xi, J., Chang, Q., Chan, C. K., Meng, Z. Y., Wang, G. N., Sun, J. B., Wang, Y. T., Tong, H. H. and Zheng, Y. 2009. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS Pharm Sci Tech,* 10, 172-182.

Xie, S., Zhu, L., Dong, Z., Wang, Y., Wang, X. and Zhou, W. 2011. Preparation and evaluation of ofloxacin-loaded palmitic acid solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine,* 6, 547-555.

Yin, Y. M., Cui, F. D., Kim, J. S., Choi, M. K., Choi, B. C., Chung, S. J., Shim, C. K. and Kim, D. D. 2009a. Preparation, characterization and in vitro intestinal absorption of a dry emulsion formulation containing atorvastatin calcium. *Drug Deliv,* 16, 30-36.

Yin, Y. M., Cui, F. D., Mu, C. F., Choi, M. K., Kim, J. S., Chung, S. J., Shim, C. K. and Kim, D. D. 2009b. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: preparation and in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release,* 140, 86-94.

Yu, L., Bridgers, A., Polli, J., Vickers, A., Long, S., Roy, A., Winnike, R. and Coffin, M. 1999a. Vitamin E-TPGS increases absorption flux of an HIV protease inhibitor by enhancing its solubility and permeability. *Pharm Res,* 16, 1812-1817.

Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., Shah, V. P., Lesko, L. J., Chen, M. L., Lee, V. H. and Hussain, A. S. 2002. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res,* 19, 921-925.

Yu, S. C., Bochot, A., Chéron, M., Seiller, M., Grossiord, J. L., Le Bas, G. and Duchêne, D. 1999b. Design and evaluation of an original multiple emulsion containing natural cyclodextrins as the emulsifier. *STP Pharm Sci,* 9, 273-277.

Yu, S. C., Bochot, A., Le Bas, G., Chéron, M., Grossiord, J. L., Seiller, M. and Duchêne, D. 2001. Characteristics of O/W emulsions containing model lipophilic molecules with cyclodextrins as emulsifiers. *STP Pharm Sci,* 11, 129-136.

Yu, S. C., Bochot, A., Le Bas, G., Cheron, M., Mahuteau, J., Grossiord, J. L., Seiller, M. and Duchene, D. 2003. Effect of camphor/cyclodextrin complexation on the stability of O/W/O multiple emulsions. *Int J Pharm,* 261, 1-8.

Zeng, Z., Zhou, G., Wang, X., Huang, E. Z., Zhan, X., Liu, J., Wang, S., Wang, A., Li, H., Pei, X. and Xie, T. 2010. Preparation, characterization and relative bioavailability of oral elemene o/w microemulsion. *Int J Nanomedicine,* 5, 567-572.

Zhang, H., Hollis, C. P., Zhang, Q. and Li, T. 2011a. Preparation and antitumor study of camptothecin nanocrystals. *Int J Pharm,* 415, 293-300.

Zhang, J., Zheng, Z., Gao, Y. and Zhang, Y. 2011b. Spray-dried oil-in-water emulsion to improve the intestinal absorption and oral bioavailability of ZLR-8, a nitric oxide-releasing derivative of diclofenac. *J Pharm Pharmacol,* 63, 1531-1538.

Zhang, J. J., Gao, Y., Qian, S., Liu, X. and Zu, H. 2011c. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of a spray-dried malotilate emulsion. *Int J Pharm,* 414, 186-192.

Zhang, P., Liu, Y., Feng, N. and Xu, J. 2008. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm,* 355, 269-276.

Zheng, W. W., Zhao, L., Wei, Y. M., Ye, Y. and Xiao, S. H. 2010. Preparation and the in vitro evaluation of nanoemulsion system for the transdermal delivery of granisetron hydrochloride. *Chem Pharm Bull (Tokyo),* 58, 1015-1019.

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

Chapitre 1

Etude de l'encapsulation de la progestérone dans les billes: effet de la concentration en progestérone dans l'huile de soja sur la formation des billes et leurs caractéristiques

Ce chapitre n'est pas soumis à publication

Laury Trichard a rapporté dans ses travaux de thèse qu'il était possible d'encapsuler dans les billes des principes actifs lipophiles appartenant à la famille des rétinoïdes. Ces molécules sont actives à faibles doses et de faibles teneurs sont suffisantes pour leur utilisation en thérapeutique. Le but de cette première étude a été de vérifier si ce processus d'encapsulation dans les billes est valable pour d'autres principes actifs peu solubles dans l'eau, actifs à concentrations élevées. La progestérone a été sélectionnée comme principe actif modèle de classe II selon la classification biopharmaceutique. Nous avons voulu savoir si la variation de la concentration en progestérone dans la phase huileuse de départ permettait de moduler sa teneur finale au sein des billes. L'influence de la concentration en progestérone dans l'huile de soja, sur les caractéristiques des billes (diamètre, forme, rendement de fabrication, d'encapsulation et teneur en progestérone), a été étudiée. Pour ce faire, des lots reproductibles de billes, encapsulant la progestérone, ont été préparés à partir de solutions et de suspensions huileuses de concentrations croissantes. La quantification du rendement d'encapsulation de la progestérone ainsi que sa teneur dans les billes, ont été évaluées par chromatographie liquide haute performance. La forme ainsi que le diamètre des billes ont été déterminés par microscopie optique. Pour compléter cette étude, nous avons jugé intéressant d'évaluer l'influence de la durée du temps de fabrication sur les caractéristiques finales des billes.

1. Introduction

Les travaux menés par Laury Trichard au cours de sa thèse *(Trichard, 2007)* ont montré l'intérêt des billes pour l'encapsulation de principes actifs (PA) lipophiles appartenant à la famille des rétinoïdes tels que l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)* et l'adapalène *(Trichard et al., 2008)*. Le procédé utilisé pour charger les billes en PA est très simple et consiste uniquement à solubiliser *(Trichard et al., 2007, Trichard et al., 2008)* ou à disperser *(Trichard et al., 2008)* le PA dans l'huile de soja avant de l'ajouter à la solution aqueuse d'α-cyclodextrines (CD). Dans le cas des rétinoïdes qui sont des molécules actives à faibles doses, de faibles teneurs dans les billes sont suffisantes pour leur utilisation en thérapeutique *(Trichard et al., 2007, Trichard et al., 2008)*. Dans ce chapitre, nous avons voulu savoir s'il était possible de faire varier la teneur en PA encapsulé dans les billes nues lyophilisées, en modifiant sa concentration dans la solution ou la suspension huileuse de départ. L'objectif final étant de pouvoir disposer de doses élevées de PA. Les études ont été réalisées avec de la progestérone (PG) choisie comme molécule modèle appartenant à la classe II *(Miller et al., 2011)* de la classification biopharmaceutique *(Amidon et al., 1995)*. Nous avons étudié l'influence de la concentration en PG dans l'huile de soja sur le temps d'obtention des billes ainsi que sur leurs caractéristiques (rendement de fabrication, d'encapsulation, teneur en PG, diamètre).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

La cyclodextrine utilisée est l'α-cyclodextrine Cavamax® W6 Pharma fournie par Waker-Chimie® (Lyon, France). L'huile de soja super raffinée appartient à la gamme Cropure® et est fournie par Croda® (Trappes, France). La PG de formule brute $C_{21}H_{30}O_2$ et de masse molaire 315 g/mol a été fournie par Sigma-Aldrich® (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Préparation de billes encapsulant la PG

2.2.1. Détermination de la solubilité de la PG dans l'huile de soja

La solubilité de la PG dans l'huile de soja à température ambiante a été déterminée en ajoutant de la poudre de PG en excès à 10 ml d'huile de soja préalablement introduite dans un flacon de 20 ml. Le flacon a été maintenu sous agitation magnétique pendant 48 heures à température ambiante. Après agitation, le contenu du flacon a été centrifugé deux fois à 10.000 tours/min pendant 10 minutes (centrifugeuse, JOUAN, France) avec transfert du surnageant dans un nouveau tube entre les deux centrifugations. Cette opération a eu pour but de séparer la solution huileuse saturée en PG de la partie non dissoute, sédimentée. Les échantillons de la solution

huileuse de PG ont alors été dilués au 1/200ème dans un mélange THF/Méthanol (v/v:1/1) avant d'être dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (voir conditions utilisées paragraphe 2.3.4). La détermination de la solubilité de la PG dans l'huile de soja a été répétée trois fois (n=3).

2.2.2. Encapsulation de la PG à partir de solutions et de suspensions huileuses

La méthode de préparation des billes encapsulant la PG a consisté à mélanger 20 ml d'une solution aqueuse d'α-CD (8,13 g/100 ml) avec 5,76 ml d'une solution (de 3 à 15 mg/ml) ou d'une suspension (de 26 à 301 mg/ml) huileuse de PG. Chaque solution et suspension huileuse de PG a été dosée par CLHP avant la préparation des billes. La solution d'α-CD a été préparée en dissolvant 1,626 g d'α-CD dans 20 ml d'eau Milli Q. La phase huileuse a ensuite été délicatement déposée à la surface de la solution d'α-CD. La préparation ainsi obtenue a été mise sous atmosphère d'azote puis sous agitation continue à 200 tours/min dans un agitateur orbital thermostaté à 28°C (Gyrotory Water Bath Shaker, model G76D EDISON, New Jersey, USA).

Une fois les billes nues formées, le milieu dispersant a été retiré et les billes lavées délicatement à l'eau osmosée à l'aide d'une pipette pasteur afin d'enlever l'α-CD, l'huile et la PG qui n'auraient pas été consommées au cours de leur formation. Les billes sont alors congelées (à -20°C) puis lyophilisées (lyophilisateur USIFROID procédés RIEUTORU, Maurepas, France) pendant 48 heures.

Pour chaque concentration en PG étudiée, 5 lots de billes chargées en PG ont été préparés puis caractérisés.

2.3. Caractérisation des billes

2.3.1. Détermination du temps de fabrication

L'agitation des billes a été arrêtée dès que les billes étaient bien calibrées en taille et n'évoluaient plus (estimation visuelle).

2.3.2. Observation de la forme et détermination du diamètre des billes

Un microscope optique Leitz Diaplan (Leica Microsystèmes, France) a été utilisé pour visualiser la forme des billes de PG lyophilisées et déterminer leur diamètre au grossissement x3. La caméra Photometrics CoolsnapES (Roper Scientific) a permis la capture d'images qui ont été traitées par le logiciel QED Capture. Les mesures ont été effectuées sur 50 billes prises au hasard au sein d'un même lot de fabrication de façon à obtenir un diamètre moyen. Les billes n'étant

pas parfaitement sphériques mais plutôt pyramidales, deux diamètres ont été mesurés pour chacune d'elles et la moyenne des deux a été effectuée pour plus de précision.

2.3.3. Détermination du rendement de fabrication

Le rendement de fabrication (RF) des billes (exprimé en pourcentage) a été calculé après l'étape de lyophilisation, en utilisant la formule suivante:

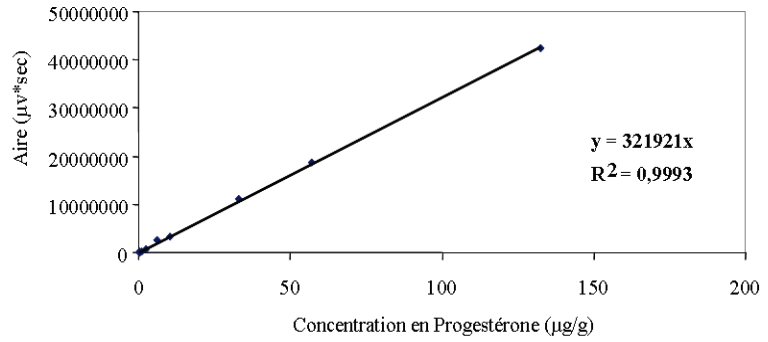
$$\text{RF}\,(\%) = \frac{\text{masse des billes lyophilisées (g)}}{\text{masse d'}\alpha\text{CD (g)} + \text{masse de la solution ou de la suspension huileuse (g)}} \times 100$$

2.3.4. Détermination du rendement d'encapsulation et de la teneur en PG au sein des billes

Dosage de la PG par la méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La PG a été dosée par CLHP avec une colonne de type Interchim (modulo-cart QS Uptisphere 10 ODB 300 mm x 4.0 mm, Montluçons, France). La méthode a été précédemment optimisée puis utilisée au laboratoire à l'aide d'une chaîne équipée d'une pompe Waters 501 reliée à un injecteur waters 717. Le détecteur UV Waters 486 a été réglé sur la longueur d'onde de 241 nm. Lors des analyses, un volume d'injection de 20 µl a été prélevé et le débit de la pompe a été fixé à 1ml/min. Chaque échantillon a été doublé et n'a été injecté qu'une seule fois. La phase mobile utilisée est composée d'un mélange d'acétonitrile (ACN) et d'eau (60/40:v/v). Le temps de rétention de la PG est d'environ 7,5 minutes.

Une courbe d'étalonnage de la PG a été réalisée dans le méthanol pour des concentrations allant de 1 à 100 µg/ml (Figure 1).



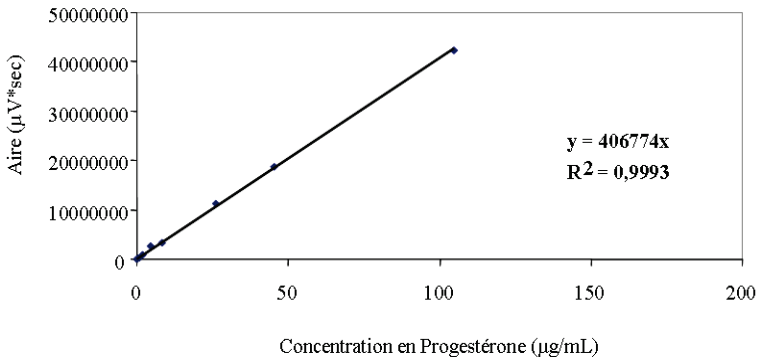


Figure 1. Courbes d'étalonnage de la PG réalisées dans le Méthanol : concentration exprimée en µg/g et µg/ml.

Afin de quantifier le rendement d'encapsulation de la PG (RE) et sa teneur dans les billes lyophilisées, il a été nécessaire de procéder à une étape d'extraction.

Cas des billes préparées à partir d'une solution huileuse de PG

150 mg de billes lyophilisées ont été pesés puis un volume de 1,5 ml de THF a été ajouté. Le mélange a été agité à l'aide d'un vortex, une première fois pendant 10 minutes pour casser les billes, puis, après avoir ajouté 1,5 ml de méthanol le mélange a été agité à nouveau pour s'assurer que les billes étaient complètement déstructurées. 500 µl de la solution obtenue ont été dilués (1/20ème) avec la phase mobile (ACN/H_2O:60/40:v/v) et la PG est alors dosée par CLHP.

Cas des billes préparées à partir d'une suspension huileuse de PG

L'extraction a été réalisée comme décrite ci-dessus à l'exception du fait que la prise d'essai des billes lyophilisées est de 50 mg au lieu de 150 mg et que les volumes de THF et de méthanol sont de 5 ml au lieu de 1,5 ml.

Pour chaque lot de billes, l'extraction a été réalisée sur deux prélèvements afin de vérifier l'homogénéité du lot.

Calculs

Le rendement d'encapsulation (RE) de la PG (exprimé en pourcentage) a été calculé de la façon suivante:

$$RE\ (\%) = \frac{PG\ \text{dosée dans les billes (mg/g)} \times \text{masse des billes lyophilisées (g)}}{PG\ \text{initiale dans l'huile de soja (mg/g)} \times \text{masse de la solution ou de la suspension huileuse de PG (g)}} \times 100$$

La teneur (exprimée en mg de PG/g de billes lyophilisées) en PG au sein des billes lyophilisées a été déterminée selon la relation suivante:

$$\text{Teneur (mg de PG/g de billes lyophilisées)} = \frac{\text{quantité de PG dosée dans les billes lyophilisées (mg)}}{\text{masse des billes lyophilisées (g)}}$$

2.3.5. Détermination de l'influence du temps d'agitation sur les caractéristiques des billes

Après avoir estimé le temps d'agitation comme décrit au paragraphe 2.3.1, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de sa durée sur les caractéristiques finales des billes (leur diamètre moyen, leur rendement de fabrication, d'encapsulation ainsi que leur teneur en PG). Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné les concentrations suivantes en PG dans l'huile: 15, 50, 140 et 200 mg/ml. La détermination des caractéristiques des billes préparées à partir d'une concentration donnée en PG est répétée trois fois pour chaque temps d'agitation (n=3).

3. Résultats

L'objectif de ce chapitre était de voir s'il était possible d'augmenter la teneur en PA dans les billes par rapport aux études réalisées précédemment par Laury Trichard et Cédric Oudinet et évaluer son impact sur la formation des billes et leurs caractéristiques. Les résultats présentés seront de ce fait comparés à ceux obtenus par Trichard *et al* et Oudinet qui ont évalué le potentiel des billes pour l'encapsulation de l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)*, de l'adapalène *(Trichard et al., 2008)* et du diazépam *(Oudinet, 2005-2006)* et également à ceux des billes non chargées *(Bochot et al., 2007)* présentés dans la discussion générale de la thèse.

La solubilité de la PG dans l'huile de soja est de 18 ± 3 mg/ml à température ambiante. Pour fabriquer les billes nues, plusieurs concentrations de PG dans l'huile de soja ont été testées dans lesquelles la PG est soit à l'état dissous (de 3 à 15 mg/ml), soit à l'état dispersé (de 26 à 301 mg/ml).

3.1. Influence de la concentration en PG sur le temps de fabrication des billes

Le temps de formation des billes contenant de la PG (4 à 13 jours) est plus long que celui nécessaire à la fabrication de billes non chargées en PA (3 jours) *(Bochot et al., 2007)* (Figure 2). La concentration en PG dans l'huile de soja influence le temps d'obtention des billes: de l'ordre de 4 jours avec les solutions huileuses (de 3 à 15 mg/ml), environ 8 jours avec les suspensions huileuses dont la concentration varie entre 26 et 111 mg/ml et de l'ordre de 13 jours avec les concentrations supérieures à 111 mg/ml (Figure 2). Dans ce dernier cas, à partir d'une concentration en PG dans l'huile de 184 mg/ml, il est plus difficile d'estimer avec précision le temps d'agitation nécessaire à la fabrication des billes (Figure 2). Cette étude montre que, bien que ralentissant le temps de fabrication des billes, des concentrations élevées en PA dans l'huile de départ ne bloquent pas leur formation.

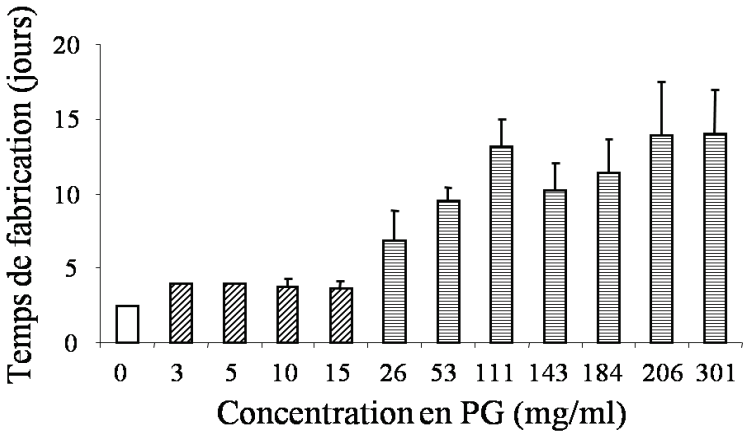


Figure 2. Influence de la concentration en PG dans l'huile de soja (□ billes non chargées en PG, ▨ PG à l'état dissous, ▤ PG à l'état dispersé) sur le temps de fabrication des billes.

3.2. Influence de la concentration en PG sur la forme et le diamètre moyen des billes

La forme pyramidale des billes, précédemment rapportée dans la littérature *(Bochot et al., 2007)*, n'est pas affectée par l'encapsulation de la PG à l'état dissous ou dispersé dans l'huile de soja (Figure 3).

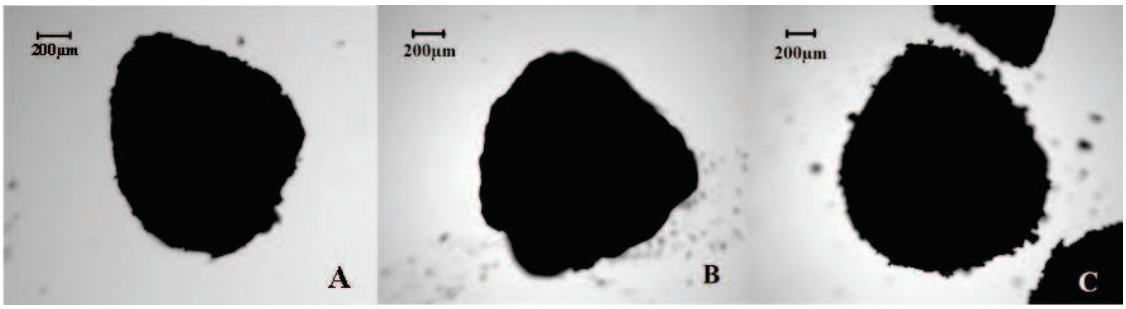


Figure 3. Observation au microscope optique (grossissement x3) de la forme des billes lyophilisées non chargées (A), préparées à partir d'une solution huileuse de PG (15 mg/ml) (B) et d'une suspension huileuse de PG (143 mg/ml) (C).

Il en est de même du diamètre moyen des billes. En effet, quelle que soit la concentration en PG dans l'huile, leur diamètre moyen est de 1,6 ± 0,1 mm (Figure 4). Concernant la PG, son incorporation à l'état dissous ou dispersé dans l'huile de soja, ne modifierait donc pas le caractère émulsionnant des complexes [α-CD-TG] qui stabilisent l'émulsion initiale. Pour une même huile, le diamètre des billes semble donc dépendre de la nature de la molécule encapsulée (cas de l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)* et de l'adapalène *(Trichard et al., 2008)*)

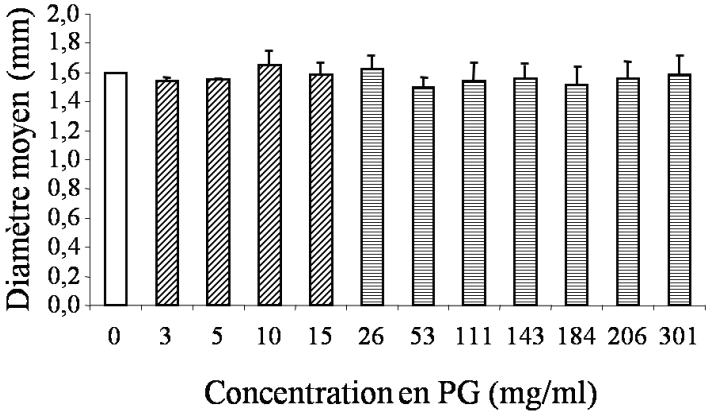


Figure 4. Influence de la concentration en PG dans l'huile de soja (□ billes non chargées en PG, ▨ PG à l'état dissous, ▤ PG à l'état dispersé) sur le diamètre moyen des billes.

3.3. Influence de la concentration en PG sur le rendement de fabrication des billes

Comparativement au rendement de fabrication des billes non chargées, celui des billes chargées (80%) n'est pas affecté par la présence de la PG tant que les concentrations sont comprises entre

3 à 53 mg/ml. Néanmoins, lorsque des concentrations plus élevées (de 111 à 301 mg/ml) sont utilisées, le rendement de fabrication diminue pour atteindre environ les 65% (Figure 5). Ceci pourrait être expliqué par la difficulté à estimer précisément le moment où l'agitation des billes doit être arrêtée dans ce domaine de concentrations.

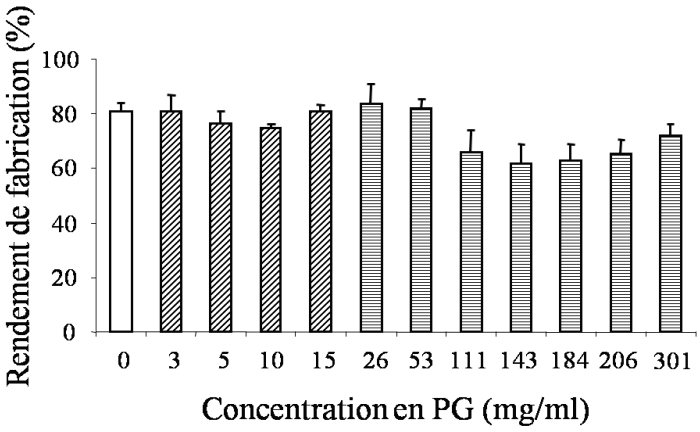


Figure 5. Influence de la concentration en PG dans la phase huileuse (□ billes non chargées en PG, ▨ PG à l'état dissous, ▤ PG à l'état dispersé) sur le rendement de fabrication des billes.

3.4. Influence de la concentration en PG sur le rendement d'encapsulation et la teneur en PG des billes lyophilisées

Les billes permettent l'encapsulation de la PG avec un rendement d'environ 86% pour les concentrations en PG dans l'huile de 3 à 53 mg/ml et d'environ 68% pour les suspensions huileuses de PG dont la concentration est supérieure à 111 mg/ml (Figure 6). Il est néanmoins intéressant de noter que la teneur en PG (exprimée en mg de PG/g de billes) continue à augmenter sur toutes les plages de concentrations étudiées (3 à 301 mg/ml) pour atteindre 212 ± 15 mg de PG/g de billes lyophilisées, lorsque les billes sont préparées avec une suspension de PG à 301 mg/ml. Ces résultats montrent donc qu'il est possible de moduler la teneur des billes en PA en modifiant simplement la concentration de ce dernier dans la solution ou suspension huileuse de départ et que des teneurs relativement élevées peuvent être atteintes. Les billes ne sont donc pas limitées à l'encapsulation de PA à faibles doses comme cela avait été montré avec les rétinoïdes (3,4 mg ± 0,2 mg de rétinoïde/g de billes lyophilisées) *(Trichard et al., 2007, Trichard et al., 2008)*.

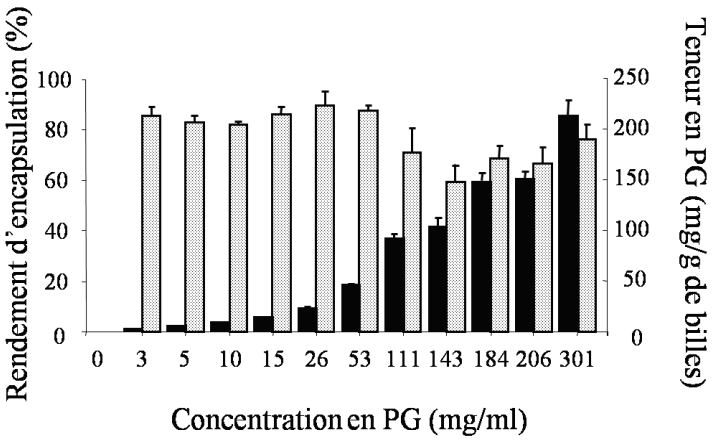


Figure 6. Influence de la concentration en PG dans la phase huileuse sur (▨) le rendement d'encapsulation et (■) la teneur en PG dans les billes lyophilisées.

3.5. Influence du temps d'agitation sur les caractéristiques des billes

Lors de cette étude, nous avons voulu voir si l'augmentation du temps d'agitation des billes modifiait ou non la taille des particules (diamètre moyen) et si elle permettait d'améliorer les rendements de fabrication, d'encapsulation ainsi que l'efficacité d'encapsulation de la PG dans les billes. Pour cela, le temps d'agitation a été doublé par rapport à celui qui a été déterminé dans le paragraphe 3.1. L'étude a été menée sur des billes préparées à partir d'une solution (15 mg/ml) ou d'une suspension (50, 140 et 200 mg/ml) huileuse de PG. Le fait de doubler le temps de préparation des billes ne modifie pas leur taille (1,6 ± 0,1 mm) et ce, quel que soit l'état (dissous ou dispersé) et la concentration de la PG dans l'huile (Tableau 1).

Une agitation plus longue des billes semble améliorer légèrement leur rendement de fabrication pour les quatre concentrations huileuses de PG étudiées (Tableau 1). Le rendement ainsi que l'efficacité d'encapsulation de la PG dans les billes augmentent également légèrement avec l'allongement du temps d'agitation (Tableau 1). Le fait de doubler le temps de fabrication des billes n'affecte pas de façon importante leurs caractéristiques. Cette étude montre que les temps auxquels nous avons arrêté l'agitation sont raisonnables. En effet, pour des raisons de coût, il est préférable d'avoir le temps de fabrication le plus court possible permettant une encapsulation efficace de la PG.

Tableau 1: Influence du temps d'agitation des billes sur leurs caractéristiques (diamètre, RF, RE et teneur).

[PG] dans l'huile (mg/ml)	15		50		140		200	
Temps d'agitation (jours)	3	7	10	20	10	20	10	20
Diamètre moyen (mm)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Rendement de fabrication (%)	80 ± 3	85 ± 2	81 ± 3	86 ± 2	65 ± 5	85 ± 2	65 ± 5	72 ± 4
Rendement d'encapsulation (%)	86 ± 3	94 ± 2	84 ± 2	89 ± 2	63 ± 2	70 ± 3	66 ± 6	70 ± 5
Teneur (mg de PG /g de billes lyophilisées)	13,2 ± 0,9	14,5 ± 0,2	44 ± 1	47 ± 1	90 ± 14	121 ± 9	148 ± 5	160 ± 6

4. Conclusions

Lors de cette étude, des lots reproductibles de billes encapsulant de la PG (à l'état dissous ou dispersé) ont été préparés. Les billes ont pu être chargées avec une teneur importante en PG, tout en conservant un rendement de fabrication satisfaisant et un diamètre comparable à celui des billes non chargées. Toutefois, cette étude a également mis en évidence que de fortes concentrations en PG dans l'huile de soja ralentissent de façon très importante le temps de fabrication des billes. Un compromis entre la durée de fabrication et la teneur des billes en PG doit ainsi être trouvé. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc choisi de travailler sur des billes dosées à 90 mg de PG/g de billes, dont la fabrication est bien maîtrisée à partir d'une concentration en PG dans l'huile de départ de 143 mg/ml. De plus, cette teneur en PG est proche de celle de la forme capsule molle commerciale dosée à 100 mg de PG.

Abréviations

α-CD : α-cyclodextrine

ACN : acétonitrile

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

PA : Principe actif

PG : progestérone

RE : rendement d'encapsulation

RF : rendement de fabrication

THF : Tétrahydrofurane

Références

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharm Res,* 12, 413-420.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J. L., Duchene, D. and Fattal, E. 2007. alpha-Cyclodextrin/oil beads: an innovative self-assembling system. *Int J Pharm,* 339, 121-129.

Miller, J. M., Beig, A., Krieg, B. J., Carr, R. A., Borchardt, T. B., Amidon, G. E., Amidon, G. L. and Dahan, A. 2011. The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol Pharm,* 8, 1848-1856.

Oudinet, C. 2005-2006. Caractérisations physico-chimiques et biopharmaceutiques d'une nouvelle forme galénique à base de cyclodextrines et d'huile pour l'administration d'un principe actif modèle par voie orale. *Master recherche : Pharmacotechnie et Biopharmacie, Université Paris-Sud 11*.

Trichard, L. 2007. Billes à base de cyclodextrines et d'huile : étude du mécanisme de formation et évaluation du potentiel en formulation et en thérapeutique. Pharm: Paris-Sud 11. p 1-203

Trichard, L., Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H., Fattal, E. and Bochot, A. 2008. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. *Pharm Res,* 25, 435-440.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M. and Bochot, A. 2007. Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. *J Control Release,* 122, 47-53.

Chapitre 2

Potentiel des billes de cyclodextrine et d'huile de soja pour l'administration par voie orale de molécules lipophiles: Etudes *in vitro* dans les milieux digestifs simulés

Etude publiée dans *International Journal of Pharmaceutics*

Ce chapitre a pour objectif l'étude *in vitro* de la stabilité des billes ainsi que le mécanisme de libération d'une molécule modèle de classe II, la progestérone, après incubation dans des milieux digestifs simulés. Nous avons également essayé de déterminer le rôle joué par le taurocholate de sodium (sel biliaire), présent dans les milieux intestinaux, sur la stabilité des billes et la libération de la progestérone. Les expériences ont été conduites dans un milieu intestinal, à jeun et à l'état nourri (plus riche en taurocholate de sodium). Un milieu intestinal sans taurocholate de sodium a également été utilisé à titre de contrôle. Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur des billes dosées à 90 mg de progestérone/g de billes, pour les raisons invoquées dans le chapitre 1. Dans une première partie, différents lots de billes, encapsulant de la progestérone ou bien du rouge Nil (un marqueur fluorescent présentant une forte affinité pour l'huile) ont été préparés puis caractérisés. Dans une seconde partie, l'étude de la stabilité des billes dans les milieux digestifs simulés a été menée sur les billes marquées au rouge Nil. Celles-ci ont été collectées, dénombrées puis observées par microscopie optique, de façon à suivre l'évolution de leur forme et de leur diamètre, ainsi que par microscopie confocale. Enfin, dans une troisième partie, des cinétiques de passage en solution de la progestérone encapsulée dans les billes ont été réalisées dans les milieux digestifs simulés. Ces cinétiques ont été comparées à celles obtenues avec la progestérone formulée sous forme d'émulsion sèche ainsi que la forme commerciale en capsules molles.

Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: *In vitro* studies in simulated gastro-intestinal fluids

M. Hamoudi[1], E. Fattal[1], C. Gueutin[1], V. Nicolas[2], A. Bochot[1*]

[1]Univ Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Physico-chimie - Pharmacotechnie, Biopharmacie, IFR 141, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean –Baptiste Clement, Châtenay-Malabry 92296, France
Pharmacotechnie - Biopharmacie, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France
[2]Univ Paris-Sud, Plateforme Imagerie Cellulaire, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France
*To whom correspondence should be addressed. E-mail: amelie.bochot@u-psud.fr
Tel: 33146835579
Fax: 33146835946

Keywords: Beads, Cyclodextrins, Oil, Oral route, Progesterone, Stability.

Abstract

The aim of this work was to investigate the stability *in vitro,* in simulated gastro-intestinal fluids, of beads, made of α-cyclodextrin and soybean oil, and to study the release of progesterone, a model of lipophilic drug. This was evaluated over time by the monitoring of the proportion of intact beads, their volume and the percentage of progesterone dissolved. Their incubation in the simulated gastric fluid provoked a moderate reduction of their number (20%) and a decrease of their volume (50%) after 55 min. Whatever the intestinal medium subsequently introduced, bead number and volume decreased more until bead disintegration that appeared faster in sodium taurocholate rich-medium. In such fluid, the amount of progesterone dissolved increased rapidly between 65 and 180 min, with both beads and emulsion to be equal after 85 min. With soft capsules, the increase was more gradual. In sodium taurocholate free-medium, more progesterone was dissolved from the emulsion than from beads or soft capsules. The release of progesterone from beads resulted from the erosion of their matrix and its partition equilibrium between oily micro-droplets and aqueous phase. The original structure of beads confers to this multiparticulate system interesting properties for the oral delivery of lipophilic drugs.

Keywords: Beads, Cyclodextrins, Oil, Oral route, Progesterone, Stability.

1. Introduction

Approximately 40% of new chemical entities exhibit poor aqueous solubility, which presents a major challenge for their use in therapeutics because it leads to low bioavailability (Abdalla et al., 2008). One possible strategy to improve the efficacy of such drugs is their incorporation into lipid-based systems (Tang et al., 2008).

The utility of lipid-based oral formulations in enhancing the bioavailability of hydrophobic and lipophilic drugs has been recognised for many years (Abdalla et al., 2008; Carrigan and Bates, 1973; Humberstone and Charman, 1997). Since the dissolution is the rate-limiting step in many cases, formulation design can be a useful approach to improve the oral bioavailability of this type of drug candidate (Pouton, 2006).

Two kinds of lipid system have been reported. One class is emulsified systems such as microemulsions (Constantinides, 1995), self emulsifying systems (SEDDS) (Gursoy and Benita, 2004; Kim et al., 2000) or nanoemulsions (Khandavilli and Panchagnula, 2007; Tiwari and Amiji, 2006), and the other class is lipid-based particulate delivery systems such as nanocapsules (Guterres et al., 1995; Nassar et al., 2009), lipid matrices (Savio et al., 1998), solid lipid nanoparticles (Luo et al., 2006; Muller et al., 2006) and nanostructured lipid carriers (Muchow et al., 2008; Yuan et al., 2007).

Among these systems, a new lipid carrier known as “beads”, made of natural cyclodextrins (CD) and oil (Bochot et al., 2007) is opening up new prospects for oral delivery of lipophilic drugs. The bead composition is very rich in oil (Bochot et al., 2007), and as a result they are able to encapsulate lipophilic and fragile drugs such as retinoids (Trichard et al., 2007, 2008). Moreover, the bioavailability of isotretinoin was enhanced two-fold using this new delivery system compared with an oily solution (Trichard et al., 2007). However, complementary studies have to be carried out to understand better the behaviour of beads after their oral administration. The present work focuses on the preparation and characterization of Nile red and progesterone (PG)-loaded beads. PG was selected as a model of lipophilic drug. The behaviour of beads in simulated gastro-intestinal fluids (SGIF) was investigated *in vitro* to determine the mechanism involved in the release of PG. The influence of sodium taurocholate (Na-TC) on the stability of beads and PG release was studied.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Alpha-cyclodextrin (α-CD) (CAVAMAX® W6 Pharma) and soybean oil (Cropure®) were purchased from Wacker-Chimie (Lyon, France) and Croda (Trappes, France), respectively. Nile red, pepsin, progesterone (PG), sodium chloride (NaCl), sodium taurocholate (Na-TC) and 37% hydrochloric acid were supplied from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Lecithin EPC was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4, $2H_2O$) was purchased from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). All the organic solvents used: methanol, tetrahydrofuran, acetonitrile and acetic acid, were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) and were of analytical grade.

Commercially available soft capsules containing 100 mg of PG were purchased from Ratiopharm® laboratory (Maisons-Alfort, France).

2.2. Preparation of Nile red-loaded beads

Nile red-loaded beads were prepared by adding 5.8 ml of an oily saturated solution of Nile red to 20 ml of an aqueous solution (8.1%, w/v) of α-CD. The preparation was continuously shaken at 200 rpm in a gyratory shaker at 28°C until a monodisperse population of beads was obtained. The resulting beads were washed by removing the dispersion medium with a pipette and by replacing it by water which was then withdrawn. The beads were freeze-dried for 48 h to eliminate water (Christ LDC-1 alpha1-4 freeze-dryer, Bioblock Scientific).

2.3. Preparation of PG-loaded beads

2.3.1. Determination of PG solubility in soybean oil

PG was added in excess to 10 ml of soybean oil in sealed tubes that were stirred for 48 h at room temperature. The samples were then centrifuged twice at 10,000 rpm for 10 min (centrifuge, Jouan, France). Portions of the saturated oil solution of PG were diluted in THF/Methanol mixtures (v/v: 1/1) for assay by HPLC (section 2.5.3). PG solubility was determined in triplicate.

2.3.2. Preparation of PG-loaded beads from an oily suspension of PG

PG was dispersed (140 mg/ml) in soybean oil. PG-loaded beads were prepared, washed and freeze-dried as described in Section 2.2.

2.4. Preparation of PG-loaded emulsions

PG-loaded emulsion was prepared by adding 5.8 ml of an oily suspension of PG (118 mg/ml) to 20 ml of an aqueous solution (8.1%, w/v) of α-CD. The preparation was continuously shaken as described in Section 2.2 except that the shaking was stopped after 4 h. At this time, the preparation corresponds to an o/w emulsion (Bochot et al, 2007) which does not contain any beads (Bochot et al, 2007, Trichard et al., 2011). The emulsion was freeze-dried for 48 h.

2.5. Characterization of beads after freeze-drying

2.5.1. Bead size

The diameter of beads was determined on a sample of 50 beads using an optical microscope (Leitz Diaplan microscope, Leica Microsystèmes, France) equipped with a Coolsnap ES camera (Roper Scientific). For each bead, two diameters were measured and an average of the two was calculated for more accuracy.

2.5.2. Bead yield

Bead yield was calculated using the following equation:

$$\text{Bead yield}(\%) = \frac{\text{weight of freeze-dried beads}}{\text{weight } (\alpha\text{CD} + \text{oily phase})}$$

2.5.3. PG encapsulation efficiency and PG loading

Separation and quantification of PG were carried out by HPLC. The analytical column was an Interchim (modulo-cart QS Uptisphere 10 ODB 300 mm x 4.0 mm, Montluçons, France). The system was equipped with a mobile phase delivery pump (binary HPLC pump, Waters 1525, Milford, USA), an auto sampler (Waters model 717 plus, Milford, USA), an on-line degasser, a column oven set at room temperature and a tunable absorbance UV detector (Waters model 2487, Milford, USA). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water (60/40: v/v). The injection volume was set at 20 µl, the flow rate was 1 ml/min and the absorbance measurement was performed at λ = 241 nm. The PG peak was identified on the chromatograms at a retention time of 7.5 min. Calibration curves were drawn up for PG from 1 to 150 µg/ml in methanol.

PG was extracted from the beads and the emulsion by the following method: freeze-dried beads and emulsion were weighed precisely (50 mg) and 5 ml of tetrahydrofuran was added to destroy the bead structure. An equal volume of methanol (5 ml) was then mixed in at room temperature. 500 µL of the resulting solution were diluted (1/20) with the mobile phase and the drug content

quantified by HPLC. For each batch of beads, the extraction was performed on two replicate samples.

PG encapsulation efficiency and PG loading were calculated using the following equations:

$$\text{PG encapsulation efficiency}(\%) = \frac{\text{amount of PG within beads}}{\text{amount of PG in soybean oil}} \times 100$$

$$\text{PG loading (mg of PG/g of beads)} = \frac{\text{amount of PG within beads}}{\text{weight of beads}}$$

Bead diameter, bead yield, PG encapsulation efficiency and PG loading were expressed as mean and standard deviation values ($n \geq 3$).

2.6. Stability study of Nile red-loaded beads in simulated gastro-intestinal fluids (SGIF)

2.6.1. Protocol

The stability of Nile red-loaded beads in SGIF was determined using the apparatus 2 (rotating paddle apparatus conforming to European Pharmacopeia). The paddle rotational speed was set at 55 rpm and the temperature of the medium was maintained at 37 ± 0.5 ºC.

One hundred Nile red-loaded beads were introduced into 200 ml of simulated gastric fluid (SGF). After 55 min, 200 ml of pre-concentrated simulated intestinal fluids (SIF) were added. The initially pre-concentrated SIF was thus diluted two-fold to yield the correct concentration. Four different media were used to simulate the composition of gastro-intestinal fluids:

Simulated gastric fluid (SGF) containing : 2 g of sodium chloride, 3.2 g of pepsin (385 units/mg), 7 ml of hydrochloric acid (37% HCl to adjust pH to 1.2) and completed with water to 1 l.

Pre-concentrated simulated intestinal fluid free of Na-TC and lecithin (pre-concentrated control SIF) used as control and containing: 10.3 g of sodium dihydrogen phosphate, 12.4 g of sodium chloride, 35 ml of sodium hydroxide solution 1N, 7 g of sodium bicarbonate (to adjust pH to 6.5 when mixed with SGF in a ratio of 50/ 50; v/ v) and completed with water to 1l.

Pre-concentrated fasted state simulated intestinal fluid (pre-concentrated FaSSIF) simulating the fasted state containing: 10.3 g of sodium dihydrogen phosphate, 12.4 g of sodium chloride, 35 ml of sodium hydroxide solution 1N, 3.2 g of Na-TC, 1.2 g of lecithin, 6 g of sodium bicarbonate (to obtain, a pH of 6.5 when mixed with SGF in a ratio of 50/50; v/v) and completed with water to 1 l.

Pre-concentrated fed state simulated intestinal fluid (pre-concentrated FeSSIF) simulating the fed state containing: 17.3 g of acetic acid; 23.7 g of sodium chloride, 35 ml of sodium hydroxide solution 1 N, 16.1 g of Na-TC (five-fold higher than in FaSSIF), 1.3 g of lecithin, 14 g of sodium carbonate (to adjust pH to 5 when mixed with SGF in a ratio of 50/50; v/v) and completed with water to 1 l.

To facilitate the understanding of the results, we use the terms control SIF, FaSSIF and FeSSIF for the SGF/pre-concentrated control SIF, SGF/pre-concentrated FaSSIF and SGF/pre-concentrated FeSSIF mixtures (50/50; v/v), respectively.

Beads were collected at different time intervals: 5, 15, 30 and 55 min in SGF and 60, 70, 85, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 960 and 1440 min in control SIF; at 60, 70, 85, 120, 150 and 180 min of incubation in FaSSIF and at 60, 65 and 70 min of incubation in FeSSIF. One hundred Nile red-loaded beads were used for each time and each medium and all the experiments were carried out in triplicate.

2.6.2. Determination of the proportion of intact beads

For each time and each medium, the proportion of intact (non disintegrated) beads was determined. Results are expressed as the mean percentage of bead remaining intact in the medium.

$$\text{Residual amount of beads (\%)} = \frac{\text{intact beads}}{100\,\text{beads}} \times 100$$

2.6.3. Determination of the diameter of beads

For each time and medium, the mean diameter of the intact beads was determined using the optical microscope as described previously in Section 2.5.1 and micrographs were taken to describe their shape.

2.6.4. Determination of the percentage of remaining volume of beads

For each time and medium the mean volume of the intact beads was determined. Results are expressed as the mean percentage of the remaining volume of intact beads in the medium.

$$\text{Remaining volume of beads (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{initial bead diameter - bead diameter at time t})}{\text{initial bead diameter}}\right]^3 \times 100$$

2.6.5. Observation of the beads with a confocal laser scanning microscope (CLSM)

Nile red-loaded beads incubated in SGIF were observed with a LSM-510 META (Zeiss, Germany) confocal laser scanning microscope equipped with a 1 mW helium neon laser, using a Plan-neofluar 10x (NA 0.3/dry) and a Plan-Apochromat 20x (NA 0.75/dry) objective lens equipped with differential interferential contrast (Nomarski). Red fluorescence was collected with a long-pass 560-nm emission filter under illumination from a 543-nm laser. The pinhole diameter was set at 1.0 Airy Unit giving a 12.8 µm and a 2 µm optical slice thickness for 10x and 20x objective lens respectively.

2.7. Study of the PG release in SGIF

2.7.1. Determination of PG solubility in SGIF

PG solubility measurements were carried out in the SGIF described above. PG was added in excess to 10 ml of the SGF, control SIF, FaSSIF and FeSSIF in sealed tubes. Samples were then stirred at 37°C for 24 h and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. The supernatant was filtered through a 0.45 µm Millex-HV filter (Millipore, France). A two-fold dilution of all the samples was made in methanol assay by HPLC (see Section 2.5.3). PG solubility was determined in triplicate in each SGIF.

2.7.2. Determination of PG partition coefficient between soybean oil and SGIF

The apparent soybean oil/SGIF partition coefficients of PG were determined by introducing 10 ml of the SGIF (SGF, control SIF, FaSSIF and FeSSIF) and 10 ml of soybean oil into a separating funnel. The funnel was shaken vigorously to allow the solutes to reach equilibrium. 9 ml of the saturated SGIF were collected into one vial while 9 ml of the saturated soybean oil were recovered into another. 100 mg of PG were introduced into the vial containing soybean oil and placed under magnetic stirring for 4h. 8 ml of SGIF were introduced in the separating funnel and 8 ml of the oily solution of PG were gently deposited on the surface of SGIF. The funnel was shaken for 10 min and each phase was then collected separately (as described above). The PG distributed in SGIF was measured directly by HPLC without dilution. PG in soybean oil was extracted with THF/Methanol (v/v: 1 /1) mixture, then diluted in the mobile phase (as described for PG extraction from beads prepared with the oily solution of PG) and finally assayed by

HPLC. The determination of the partition coefficient of PG between soybean oil and SGIF was carried out in triplicate for each SGIF studied.

$$\text{Partition coefficient of PG}_{\text{(soybean oil/SGIF)}}, P = \frac{\text{PG in oily phase (mg/ml)}}{\text{PG in SGIF (mg/ml)}}$$

2.7.3. Study of the PG release in SGIF

The study of the release of PG was performed *in vitro* in the SGIF, using the protocol reported in section 2.5.1, on the following formulations: PG-loaded beads, PG-loaded emulsion and the lipid content of commercially available PG soft capsules composed of 100 mg of PG, 149 mg of peanut oil and 1 mg of soybean lecithin. A sample portion of each formulation corresponding to 10 mg of PG was introduced into 200 ml of SGF at 37°C under stirring at a speed of 55 rpm. After 55 min, 200 ml of pre-concentrated SIF were added. For each formulation, two samples of 1.5 ml were withdrawn at different times of incubation over 24 h and were immediately filtered through Millex-HV 0.45 mm filters. An equal volume of fresh SGIF at 37°C was then added to maintain a constant volume.

All experiments were run in triplicate. The PG was assayed directly in the filtered samples, without dilution, by HPLC.

3. Results

3.1. Bead properties

Bead diameter (1.5 mm) and bead yield (83 %) were similar for Nile red and PG-loaded beads (Table 1). However, the preparation of PG-loaded beads required a longer time than Nile red-loaded beads to achieve a monodisperse population of particles. Indeed, while only 3 days were necessary for the Nile red-loaded beads, 9 days were required for PG-loaded ones (Table 1). Quantification of PG in beads clearly showed that this drug was very efficiently encapsulated. The PG encapsulation efficiency and PG loading reached 63 ± 2 % and 90 ± 14 mg/g of beads respectively (Table 1).

Table 1 : Properties of Nile red and PG-loaded beads (n ≥ 3 batches; mean ± SD).

	Nile red-loaded beads	Beads prepared from an oily suspension of PG (140 mg/ml)
Bead preparation time (days)	3	9
Bead yield (%)	83 ± 1	82 ± 1
Bead diameter (mm)	1.50 ± 0.10	1.50 ± 0.10
PG encapsulation efficiency (%)	-	63 ± 2
PG loading (mg/g of beads)	-	90 ± 14

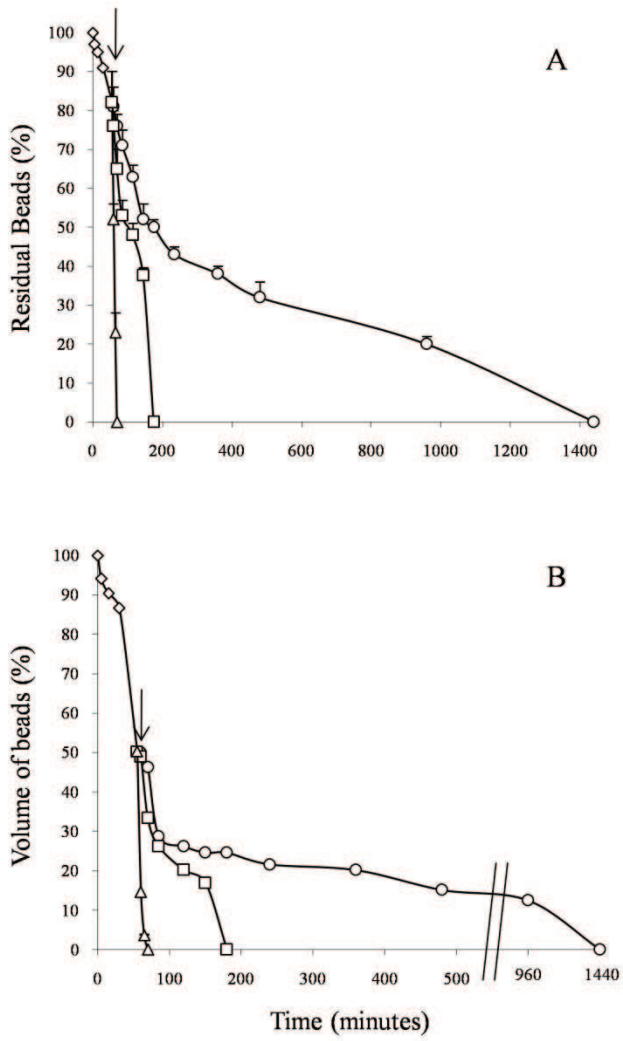


Fig. 1. Proportion (A) and volume (B) of intact Nile red-loaded beads remaining after incubation in different media: SGF (◊), control SIF (○), FaSSIF (□) and FeSSIF (Δ). Beads were incubated 55 min in SGF before addition of SIF.

3.2. Stability of Nile red-loaded beads in SGIF

The incubation of Nile red-loaded beads in the SGF provoked a moderate reduction of their number (Fig. 1A) and a decrease of their volume (Fig. 1B) while preserving their shape (Fig. 2). Thus, 80% of the beads initially introduced in SGF were recovered after 55 min (Fig. 1A). At this time, the mean diameter of the beads was 1.19 ± 0.04 mm (Fig. 2) which corresponded to 50% of their initial volume (Fig. 1B). Whatever the medium (control SIF, FaSSIF or FeSSIF) introduced into the SGF after 55 min, the proportion of beads, their volume (Fig. 1A and B) and their diameter (Fig. 3) continued to decrease over time. However, the stability of the beads was affected differently by the different media: FeSSIF > FaSSIF > control SIF. The times of

incubation in SGIF necessary to reduce the initial number of beads (100 beads) by half were 180, 120 and 60 min in control SIF, FaSSIF and FeSSIF (Fig. 1A) respectively. Moreover, the times required to get a loss of 85% of the initial volume of beads (which corresponded to a decrease of the initial diameter of beads by half) were 480, 150 and 60 min in control SIF, FaSSIF and FeSSIF respectively (Figs. 1B and 3). All beads were disintegrated after 24 h in control SIF (Fig. 1A) and only fragments in a range of 20-120 µm dispersed in oil were observed (Fig. 3M). In FaSSIF, the total disintegration of beads occurred in 180 min (Figs. 1A and 3J) and in 70 min in FeSSIF (Figs. 1A and 3F).

Nile red-loaded beads observed by confocal microscopy 5 min after the addition of pre-concentrated FeSSIF to SGF (corresponding to a total incubation period of 60 min) showed that micro-droplets of oil were shed by the matrix (Fig. 4A). Moreover, numerous fragments of beads dispersed in oil were also seen (Fig. 4B). Similar observations were made in control SIF and FaSSIF. However, bead fragmentation and disintegration appeared more rapidly in FeSSIF than in FaSSIF and more slowly in control SIF (data not shown).

3.3. Study of PG release in SGIF

3.3.1. Evaluation of PG solubility in SGIF and PG partition coefficient (log P) between soybean oil and SGIF

The solubility of PG (11 µg/ml) and the log value (3.7) were similar in SGF and control SIF (Fig. 5A). On the other hand, PG solubility was approximately 3 and 6 times higher in FaSSIF (Fig. 5B) and FeSSIF (Fig. 5C) respectively compared to that determined in SGF or in control SIF (Fig. 5A). Finally, the log P value was lower in FeSSIF (Fig. 5C) than those measured in FaSSIF (Fig. 5B), SGF or control SIF (Fig. 5A). These results showed that Na-TC influenced the solubility of PG and its partition coefficient between soybean oil and SIF.

3.3.2. Study of PG release in SGIF

The study of the PG release in SGIF was performed with PG-loaded beads (90 mg/g), the PG-loaded emulsion (90 mg/g) and the lipid content (oily suspension) of commercially available PG soft capsules (soft capsules 400 mg/g). Only PG dissolved in SGIF was quantified.

In SGF, the emulsion allowed the dissolution of PG more rapidly and more importantly than from beads and soft capsules (Fig. 5A) to reach 16 ± 2 %, 7 ± 1 %, 5 ± 1 %, respectively at time 55 min.

The nature of the medium added to SGF after 55 min strongly influenced the amount of PG dissolved (Fig. 5). Greater and faster effects were obtained in FeSSIF (Fig. 5C) and to a lesser

extent in FaSSIF (Fig. 5B) compared to those seen in control SIF (Fig. 5A). In this medium, the percentages of PG dissolved increased slowly over time to reach values in a range of 12-32% at 24 h compared with 24-52% in FaSSIF and 40-79% in FeSSIF (Table 2).

More PG was dissolved from the emulsion up to 180 min in control SIF and up to 360 min in FaSSIF (Fig. 5A and B) compared to beads and soft capsules for which no real difference was observed (Fig. 5A and B). However, PG dissolved was around two-fold higher with beads and the emulsion than with soft capsules after 24 h in these media (Table 2).

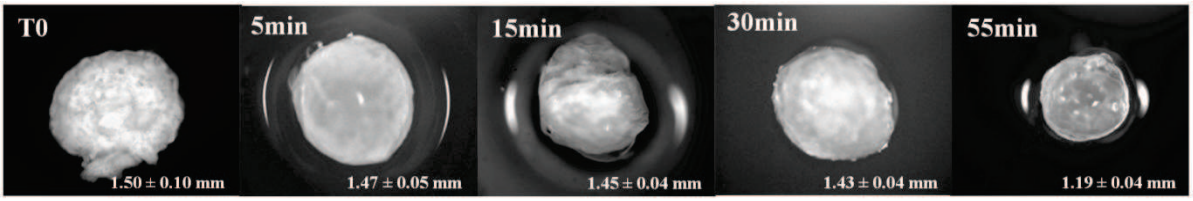


Fig. 2. Optical micrographs of Nile red-loaded beads incubated in SGF as a function of time of incubation. (▬ = 200 µm)

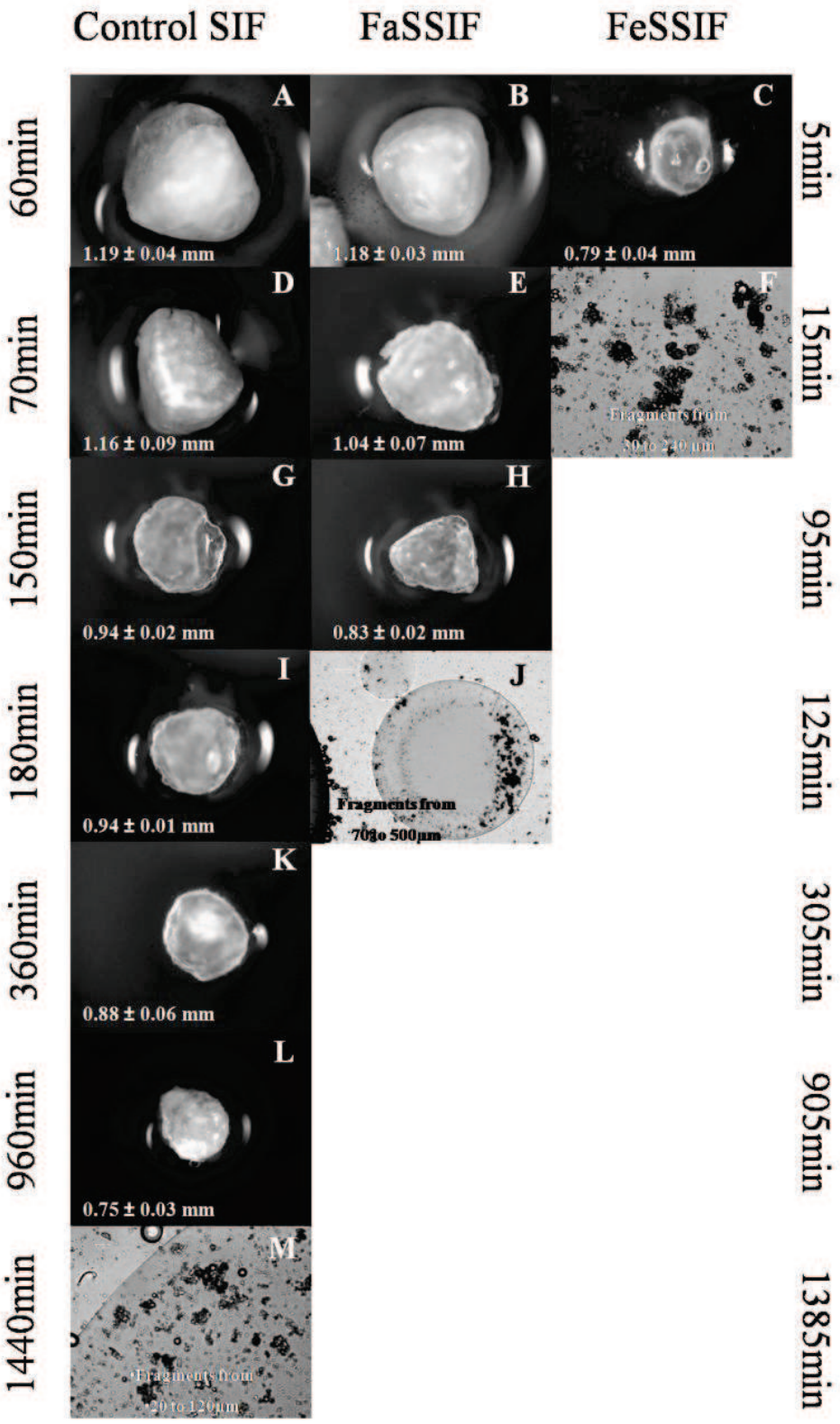


Fig. 3. Optical micrographs of Nile red-loaded beads incubated in control SIF (A, D, G, I, K, L and M), FaSSIF (B, E, H and J) and FeSSIF (C and F) as a function of total time of incubation. Beads were incubated 55 min in SGF before addition of SIF. (▬ = 200 µm)

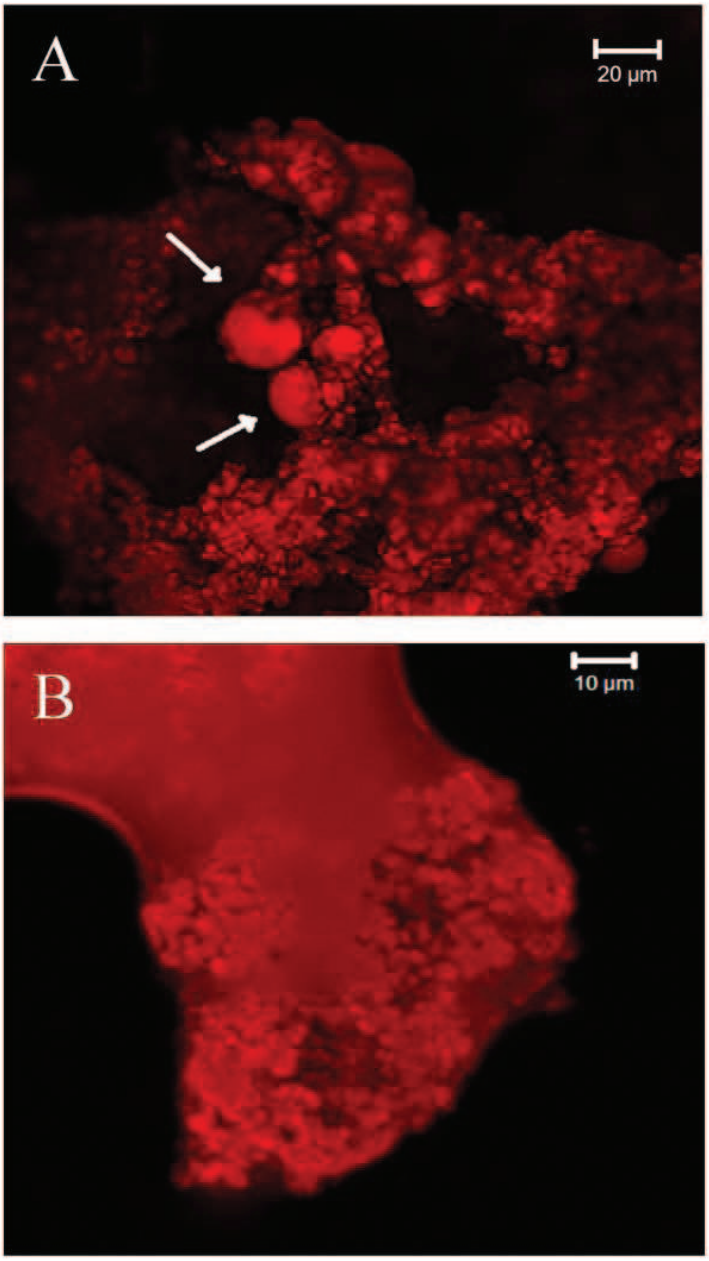


Fig. 4. Nile red-loaded beads observed by confocal microscopy after 60 min of incubation (55 min in SGF and 5 min in FeSSIF). Micro-droplets of oil released from the matrix (A) and fragments of beads dispersed in oil (B).

In FeSSIF, (Fig. 5C) the proportion of PG dissolved from beads and the emulsion increased rapidly between 65 and 180 min to be similar at time 85 min, while the increase was more gradual with soft capsules. The emulsion and beads remained more efficient at releasing PG than the soft capsules (79 ± 8 %, 67 ± 7 % and 40 ± 8 %, respectively) (Table 2). Compared with beads and the emulsion, the amount of dissolved PG from soft capsules was not strongly

influenced by FeSSIF up to 180 min since similar values were found in FeSSIF, FaSSIF and control SIF (between 5 and 18%).

Table 2 : Percentages of PG dissolved from beads, emulsion and soft capsules, after 24 hours of incubation in SGIF.

	Control SIF (%)	FaSSIF (%)	FeSSIF (%)
Beads	25 ± 5	40 ± 5	67 ± 7
Emulsion	32 ± 2	52 ± 2	79 ± 8
Soft capsules	12 ± 4	24 ± 1	40 ± 8

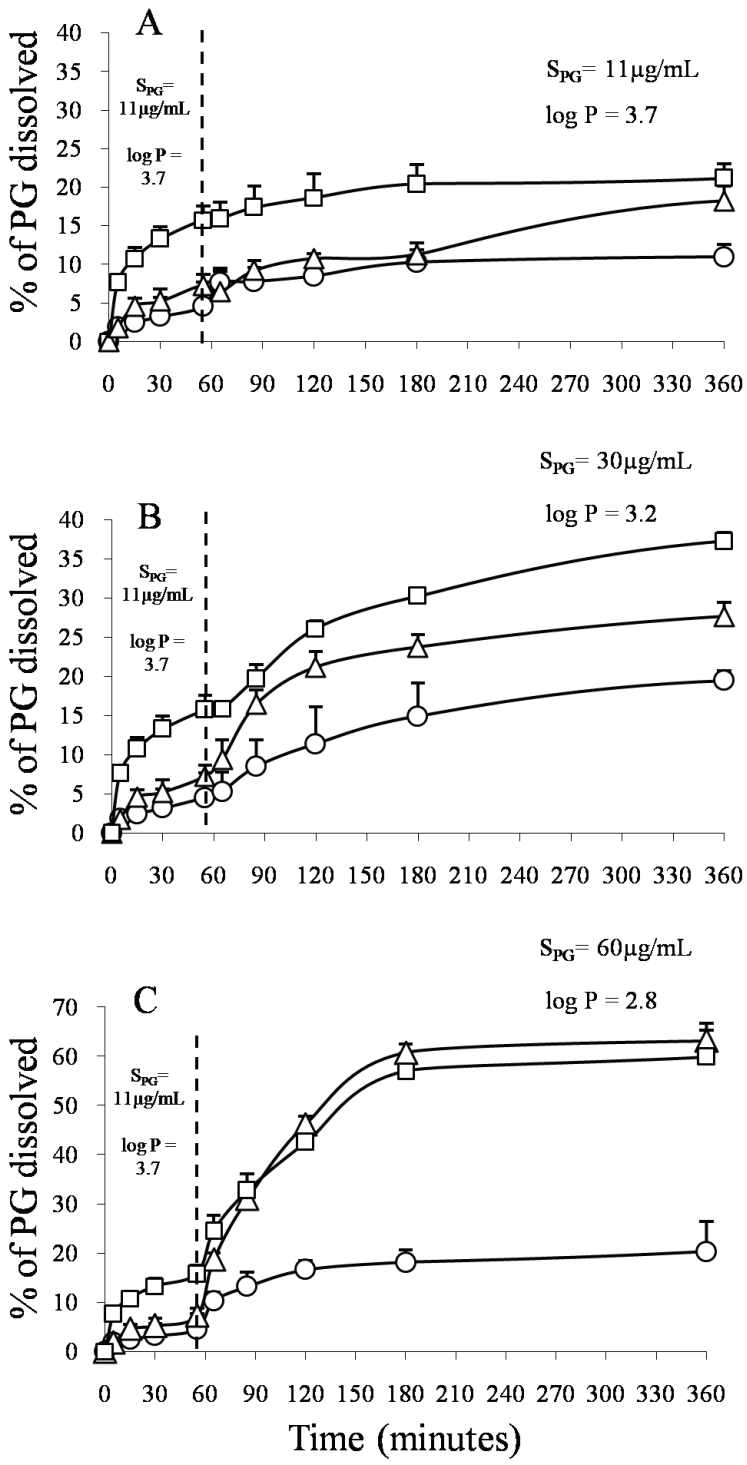


Fig. 5. Percentages of PG dissolved obtained from beads (Δ), emulsion (□) and from the lipid content of a soft capsule (○). Formulations were incubated 55 min in SGF before addition of control SIF (A), FaSSIF (B) and FeSSIF (C). PG solubility (S_{PG}) and the apparent partition coefficient for PG (log P $_{(soybean\ oil/\ SGIF)}$) in the different SGIF are given.

4. Discussion

Our results demonstrate that the addition of Nile red or PG, previously dissolved or dispersed in soybean oil, affected neither the yield nor the diameter of the beads compared with unloaded ones (Bochot et al., 2007). This result is different from those obtained by Trichard et al. (2007, 2008) with other lipophilic drugs such as isotretinoin and adapalene that caused an increase of the initial diameter of beads (Trichard et al.,2007, 2008). Although isotretinoin (Munoz Botella et al., 1996) and progesterone (Uekama et al., 1982) do not form inclusion complexes with α-CD, the physicochemical properties of drugs may influence the interactions between CD and the triglycerides at the oil/water interface necessary for bead formation (Bochot et al., 2007). As previously observed with retinoids (Trichard et al.,2007, 2008), the time required to achieve a monodisperse population of particles was longer in presence of PG. Lipophilic molecules in oil may delay the crystallization of α-CD molecules which is required for the formation of the matrix of beads. PG loading is much higher than that obtained with retinoids (Trichard et al., 2007, 2008). Thus, due to their high oil content (80%, w/w), (Bochot et al., 2007) the applications for these beads may not be limited to the encapsulation of low-dose highly potent drugs. Although PG loading of 200 mg/g could be reached from a concentration of PG of 300 mg/ml in oil (data not shown), a decrease of bead yield was observed. However, compared to other particulate lipid-based systems such as self-emulsifying pellets of 1.2 ± 0.2 mm of diameter (Abdalla et al., 2008), beads are at least 16 times more efficient at entrapping PG. This confirms their potential for the encapsulation of lipophilic compounds.

The main aim of this work was to evaluate *in vitro* the stability of beads in SGIF and to elucidate the mechanisms involved in the release of a lipophilic drug.

The beads do not behave as a fast disintegrating system since most of them are not destroyed after 55 min in SGF. Freeze-dried beads for which the inner structure consists of a partial crystalline matrix of α-CD molecules surrounding micro-droplets of oil (Bochot et al., 2007), undergo a hydration step in contact with SGF (Fig. 6A) followed by a progressive dissolution of α-CD molecules from the surface (Fig. 6B). This explains both the decrease of the volume of beads and the preservation of their shape. The erosion of beads induces the release of micro-droplets of oil (Fig. 6C), as observed by confocal microscopy. PG is then released from the oil according to its partition coefficient value in the SGIF (Fig. 6C).

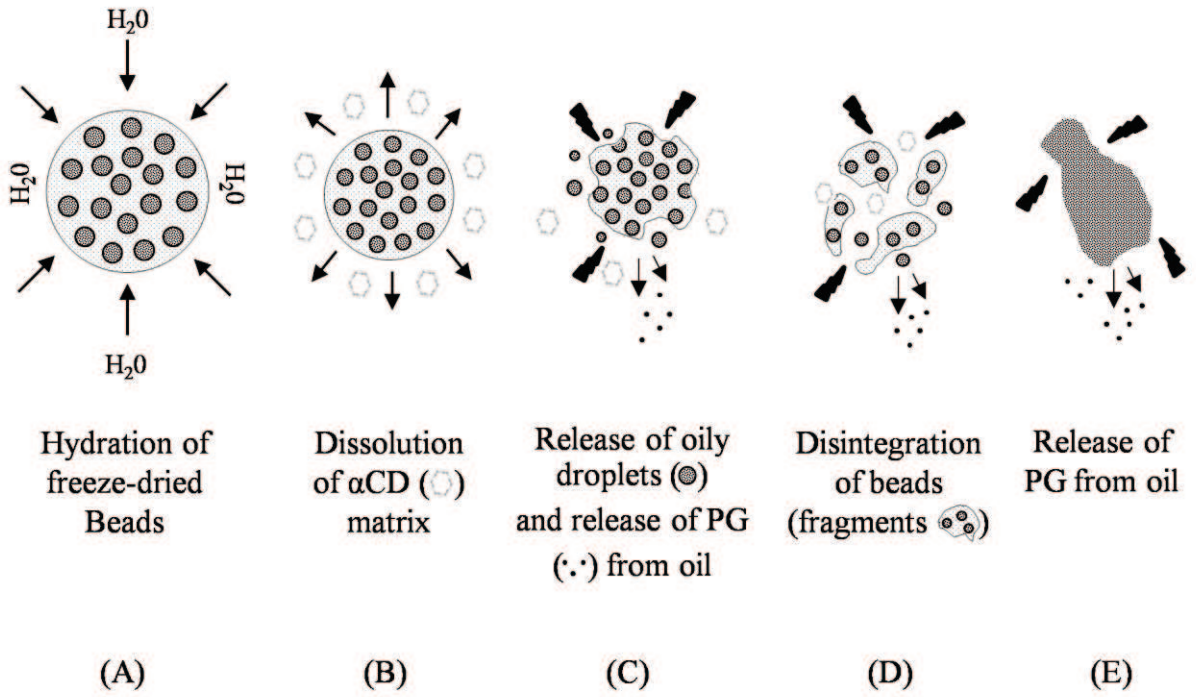


Fig. 6. Behaviour of beads incubated in SGIF. Na-TC ( ) acts intensely in steps C-E and reduces the stability of beads.

The erosion also weakens the beads (Fig. 6C) as shown by the decrease of their number and the observation of fragments in the medium (Fig. 6C). When the volume of beads reaches a critical threshold of around 12.5%, all the beads have disintegrated and only fragments are recovered (Fig. 6D). The fragments themselves act as a reservoir of oil containing PG as long as the α-CD matrix is not totally dissolved. Our results also show that Na-TC greatly reduces the stability of beads and increases the amount of PG dissolved. These effects are more pronounced at the high concentration of Na-TC in FeSSIF. The surfactant properties of Na-TC may facilitate the extraction of the oily droplets (Fig. 6C) and thereby accelerate the fragmentation of the beads (Fig. 6D) and then the release of PG from oil (Fig. 6E). Indeed, Na-TC in SIF decreases the partition coefficient of PG between soybean oil and SIF and improves its solubility, in particular in FeSSIF.

Both the emulsion and beads were prepared from the same components and with the same proportions. However, α-CD molecules in the emulsion formulation are not as well organized as in beads since X-ray diffraction peaks are more intense and narrower in beads (Bochot et al, 2007). It may explain why in SGF, release of PG from the emulsion was faster and two-fold

higher than from beads. The release of PG from beads may be attributed first to the erosion of the matrix allowing the release of oily droplets and second to the affinity of PG for the SGIF. When beads have disintegrated they behave as the emulsion. In this study, the beads were also compared to the contents of the soft capsules which had a similar lipid composition (vegetable oil). Some differences between these two systems can explain why release of PG was faster and higher from beads than from soft capsules in FeSSIF and to a lesser extent in FaSSIF. Since beads are a multiparticulate system, the total surface exposed to SGIF is larger than that of the soft capsules. Moreover, beads release micro-droplets of oil which present a large exchange area with the SGIF as described for other dispersed formulations such as microemulsions (Gursoy and Benita, 2004; Tenjarla, 1999), self-emulsifying pellets (Abdalla et al., 2008), and solid self-emulsifying drug delivery systems (Tang et al., 2008). In SGIF, the lipid content of the soft capsule is released in an agglomerated form which floats on the surface of the medium, even in the presence of Na-TC. Thus, only small amounts of PG can be dissolved. The behaviour of beads in SGIF allows to understand better why isotretinoin-loaded beads were able to efficiently increase the oral bioavailability of this drug in rats compared with the lipid content of a commercial soft capsule (Trichard et al., 2007).

Since beads are a multiparticulate system with an original structure, they constitute an interesting lipid carrier potentially able to improve the oral bioavailability of lipophilic compounds. In such a system, the release of drugs results from the erosion of the α-CD matrix and its partition equilibrium between oil dispersed as micro-droplets and aqueous phase. *In vivo* studies are now in progress to compare the behaviour of drug-loaded beads in the fasted and fed states.

Abbreviations

CD : cyclodextrin

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

Na-TC : sodium taurocholate

PG : Progesterone

SGF : Simulated Gastric Fluid

SGIF : Simulated Gastro-Intestinal Fluids

SIF : Simulated Intestinal Fluids

References

Abdalla, A., Klein, S., Mader, K., 2008. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. Eur.J. Pharm. Sci. 35, 457-464.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J.L., Duchene, D., Fattal, E., 2007. Alpha-cyclodextrin/oil beads: an innovative self-assembling system. Int. J. Pharm. 339, 121-129.

Carrigan, P.J., Bates, T.R., 1973. Biopharmaceutics of drugs administered in lipid-containing dosage forms. I. GI absorption of griseofulvin from an oil-in-water emulsion in the rat. J. Pharm. Sci. 62, 1476-1479.

Constantinides, P.P., 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption - physical and biopharmaceutical aspects. Pharm. Res. 12, 1561-1572.

Gursoy, R.N., Benita, S., 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. Biomed. Pharmacother. 58, 173-182.

Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., 1995. Poly(DL-Lactide) nanocapsules containing nonsteroidal antiinflammatory drugs - gastrointestinal tolerance following intravenous and oral-administration. Pharm. Res. 12, 1545-1547.

Humberstone, A.J., Charman, W.N., 1997. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. Adv. Drug Deliv. Rev. 25, 103-128.

Khandavilli, S., Panchagnula, R., 2007. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. J. Invest. Dermatol. 127, 154-162.

Kim, H.J., Yoon, K.A., Hahn, M., Park, E.S., Chi, S.C., 2000. Preparation and in vitro evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems containing idebenone. Drug Dev. Ind. Pharm. 26, 523-529.

Luo, Y., Chen, D.W., Ren, L.X., Zhao, X.L., Qin, J., 2006. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. J. Control. Release 114, 53-59.

Muchow, M., Maincent, P., Muller, R.H., 2008. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. Drug Dev. Ind. Pharm 34, 1394-1405.

Muller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thunemann, A.F., Souto, E.B., 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. Int. J. Pharm. 317, 82-89.

Munoz Botella, S., Martin, M.A., del Castillo, B., Menendez, J.C., Vazquez, L., Lerner, D.A., 1996. Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of a retinal-beta-cyclodextrin complex. J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 909-915.

Nassar, T., Rom, A., Nyska, A., Benita, S., 2009. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. J. Control. Release 133, 77-84.

Pouton, C.W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. Eur. J. Pharm. Sci. 29, 278-287.

Savio, E., Dominguez, L., Malanga, A., Quevedo, D., Saldana, J., Camarote, C., Ochoa, A., Fagiolino, P., 1998. Lipidic matrix of albendazole: an alternative for systemic infections. Boll. Chim. Farm. 137, 345-349.

Tang, B., Cheng, G., Gu, J.C., Xu, C.H., 2008. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. Drug Discov. Today 13, 606-612.

Tenjarla, S., 1999. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16, 461-521.

Tiwari, S.B., Amiji, M.M., 2006. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. J. Nanosci. Nanotechnol 6, 3215-3221.

Trichard, L., Chaminade, P., Grossiord, J.L., Le Bas, G., Huang, N., Durand, D., Fattal, E., Bochot, A., 2010. Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties. J. Pharm. Sci., submitted for publication.

Trichard, L., Delgado-Charro, M.B., Guy, R.H., Fattal, E., Bochot, A., 2008. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. Pharm. Res. 25, 435-440.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M., Bochot, A., 2007. Alpha-Cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. J. Control. Release 122, 47-53.

Uekama, K., Fujinaga, T., Hirayama, F., Otagiri, M., Yamasaki, M., 1982. Inclusion complexations of steroid hormones with cyclodextrins in water and in solid phase. Int. J. Pharm. 10, 1-15.

Yuan, H., Wang, L.L., Du, Y.Z., You, J., Hu, F.Q., Zeng, S., 2007. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. Colloids Surf B Biointerfaces 60, 174-179.

Chapitre 3

Formulations à base d'α-cyclodextrine et d'huile de soja: une approche pour moduler la libération par voie orale de principes actifs lipophiles

Etude publiée dans *Journal of Controlled Release*

Dans le chapitre précédent, nous avions observé que les billes s'érodaient progressivement dans les milieux digestifs simulés et étaient sensibles à l'action des sels biliaires.

L'objectif de ce chapitre est la modification des billes conventionnelles (appelées «billes nues» dans ce chapitre), décrites dans les chapitres 1 et 2 de la thèse, dans le but de les rendre plus résistantes, de façon à prolonger la libération de la molécule encapsulée. Les billes nues ont été entourées d'une couche d'α-CD, appelée «coque», pour donner lieu à des billes que nous appellerons par la suite «billes coquées». Le rôle de cette coque est de ralentir l'érosion de la matrice ainsi que la désintégration des billes dans les milieux digestifs simulés. Ensuite, il nous a semblé intéressant de voir s'il était possible, en partant d'une même composition qualitative et quantitative du mélange (solution aqueuse d'α-CD et huile de soja), de moduler la libération d'une molécule active encapsulée, en fonction du degré d'organisation du système obtenu: émulsions, billes nues ou billes coquées. Les billes coquées possèdent une couche d'α-CD supplémentaire autour d'un cœur correspondant à une bille nue. Elles ont été préparées en ajoutant à des billes nues lavées, une solution d'α-CD, l'ensemble étant à nouveau soumis à une agitation orbitale. Comparativement aux billes (BN et BC), les émulsions possèdent une organisation cristalline moins importante. Elles ont été obtenues en arrêtant le procédé de fabrication après 4 heures d'agitation.

L'indométacine a été choisie comme molécule modèle de classe II selon la classification biopharmaceutique. Des lots d'émulsions et de billes nues encapsulant l'indométacine ainsi que des lots de billes coquées non chargées, encapsulant du rouge Nil ou de l'indométacine ont été préparés puis caractérisés. Plusieurs techniques ont été utilisées afin de démontrer de façon directe (microscopie confocale, mesure du diamètre, prise de masse) ou indirecte (stabilité des billes coquées *in vitro* et *in vivo*), la présence de la coque d'α-CD. La stabilité des billes coquées ainsi que la libération de l'indométacine encapsulée ont été évaluées *in vitro* par le suivi de la proportion de billes coquées récupérées, leur diamètre ainsi que le pourcentage d'indométacine passée en solution dans les milieux digestifs simulés.

Enfin, des études pharmacocinétiques après administration orale chez des rats à l'état nourri et à jeun, ont été réalisées sur les trois types de formulations lipidiques encapsulant l'indométacine afin d'évaluer l'effet de la formulation sur les paramètres pharmacocinétiques (Cp_{max}, T_{max}, ASC et MRT) ainsi que l'influence des sels biliaires *in vivo*.

Formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil: An approach to modulate the oral release of lipophilic drugs

M. C. Hamoudi[1], F. Bourasset[2], V. Domergue-Dupont[3], C. Gueutin[1], V. Nicolas[4], E. Fattal[1], A. Bochot[1*]

[1]Univ Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Physico-chimie - Pharmacotechnie, Biopharmacie, IFR 141, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean –Baptiste Clement, Châtenay-Malabry 92296, France

Pharmacotechnie - Biopharmacie, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

[2]Univ Paris-Sud, Pharmacokinetics and Clinical Pharmacy, EA2706, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean –Baptiste Clément, Châtenay-Malabry 92296, France

[3]Univ Paris-Sud, IPSIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean –Baptiste Clément, Châtenay-Malabry 92296, France

[4]Univ Paris-Sud, Plateforme Imagerie Cellulaire, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: amelie.bochot@u-psud.fr

Tel: 33146835579

Fax: 33146835946

Keywords: Cyclodextrin beads; dry emulsion; fast release; indomethacin; sustained release; oral delivery.

Abstract

The purpose of this work was to investigate the potential of α-cyclodextrin combined to soybean oil-based formulations to modulate the release of a model drug, indomethacin. Dry emulsion, naked and coated beads were prepared from the same initial formulation using the same manufacturing process. Dry emulsion was selected to accelerate drug release while beads coated with α-cyclodextrin were designed to sustain it. Indomethacin-loaded systems were prepared, characterised and evaluated *in vitro.* Pharmacokinetic studies were performed in fasted and fed rats. The presence of the α-cyclodextrin coat was confirmed by confocal microscopy, and an increase of the mass and diameter of the beads. The layer of α-cyclodextrin improved their resistance in simulated gastro-intestinal fluids. *In vitro,* the dissolution of indomethacin was slower with coated beads than with emulsion and naked beads. Lipid-based formulations showed an increase of relative bioavailability of IND versus Indocid®. Whatever the formulation, greater and faster release of indomethacin was noticed in sodium taurocholate-rich medium and in fed rats. Compared to naked beads, an increased Cp_{max} with a shorter T_{max} were observed with the emulsion while T_{max} and MRT were increased and Cp_{max} reduced with the coated beads. Interestingly, formulations based on alpha cyclodextrin and soybean oil can modify the release of a lipophilic drug depending on the system formed.

Keywords: Cyclodextrin beads; dry emulsion; fast release; indomethacin; sustained release; oral delivery.

1. Introduction

More than 40% of new pharmacologically active chemical entities are lipophilic and poorly soluble in water [1-3]. One approach to improve the oral bioavailability of such molecules is the use of lipid-based formulations [4-5]. Among them, self-emulsifying drug delivery systems [6-7], solid lipid nanoparticles [8-12] and dry emulsions (EM) [13-17] have demonstrated their potential for the formulation of various Class II and IV drug molecules [18]. In previous studies, we developed new lipid-based formulations based on cyclodextrins (CD) and oil. Depending only on the time of external stirring, the same formulation prepared from an aqueous solution of α-CD and soybean oil leads to the formation of an EM [19-21] or of beads [19-21]. Indeed, addition of soybean oil to an α-CD aqueous solution resulted in two immiscible phases separated by a self-forming film present at the oil/water interface. When submitted to gyratory shaking, the preparation progressively turned into a stable milky mixture (after around 1 h) corresponding to an O/W emulsion. This emulsion is obtained as a result of the amphiphilic behaviour of the partial inclusion complexes between triglycerides of soybean oil and α-CD molecules [22-26]. Finally, after continuous shaking for 2.5 days, beads were in suspension in an aqueous medium without any visible trace of oil [19]. The beads were homogeneous in size (1.6 ± 0.2 mm) and pyramidal in shape [19]. In both systems, micro-droplets of oil are dispersed in a partially crystalline matrix of α-CD [19-21], but in EM, α-CD molecules are not as well organised as in the beads [19]. Indeed, during shaking, a notable development of structure is observed in the formulation resulting from nucleation of crystals and their subsequent growth. Freeze-dried beads increase the oral bioavailability of isotretinoin [27]. The release of drugs from beads resulted from the erosion of their hydrophilic matrix by dissolution and its partition equilibrium between oily micro-droplets and the aqueous phase [20]. Bile salts accelerate the erosion of beads and their fragmentation [20]. Freeze-dried EM also appears to be relevant to the oral administration of lipophilic molecules. *In vitro*, the dissolution of the drug is more rapid and occurs to a greater extent than from beads or the content of soft capsules [20]. The aim of this work was to modulate the release of a model drug, indomethacin (IND) from formulations based on α-CD and soybean oil. Dry EM was selected to accelerate the release of IND while a protective coat of α-CD around conventional beads (called naked beads (NB)) was designed to slow their erosion and to prolong the release of IND. EM, naked (NB) and coated beads (CB) were first characterised and evaluated *in vitro.* Pharmacokinetic studies were performed on these formulations in fasted and fed rats and compared to a commercially available hard capsule of IND Indocid®.

2. Materials and methods

2. 1. Materials

Alpha-cyclodextrin (α-CD) (CAVAMAX® W6 Pharma) and soybean oil (Cropure®) were purchased from Wacker-Chimie (Lyon, France) and Croda (Trappes, France), respectively. Nile red, calcein, pepsin, indomethacin (IND), sodium chloride (NaCl), sodium taurocholate (Na-TC), mefenamic acid and 37% hydrochloric acid were supplied from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Lecithin EPC was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4, $2H_2O$) was purchased from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). All the organic solvents used (methanol, tetrahydrofuran, acetonitrile and acetic acid) were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) and were of analytical grade. Commercially available hard capsules containing 25 mg of IND Indocid® were purchased from Uriach laboratory (Spain).

2. 2. Preparation of beads

2. 2. 1. Naked beads (NB)

Unloaded and Nile red-loaded beads were prepared as described previously [19] by adding 5.8 ml of soybean oil with or without Nile red to 20 ml of Milli Q water containing 1.62 g of α-CD. The preparation was continuously shaken at 200 rpm in a gyratory shaker at 28°C for 3 days. When the shaking was stopped, most of beads settled out of the dispersion medium under the influence of gravity over a few minutes. Beads were washed by removing the dispersion medium with a pipette and by replacing it by water and then by removing it again with the pipette. Finally, beads were freeze-dried. IND-loaded beads were prepared as described above except that IND was in suspension in soybean oil (140 mg/ml). The solubility of IND in soybean oil is of 3.1 ± 0.4 mg/ml. Beads obtained by this process are called "naked" beads (NB).

2. 2. 2. Coated beads (CB)

2. 2. 2. 1. Unloaded CB

In a first set of experiments, an optimisation study was performed from unloaded NB to coat them with α-CD. After washing, unloaded NB were reintroduced into around 20 ml of Milli Q water (corresponding to the volume of the dispersion medium removed during washing step) containing increasing amounts (0.4, 0.8, 1.2 and 1.6 g) of α-CD. The preparations were continuously shaken again for 48 hours and then washed and freeze-dried as described previously. The optimal amount of α-CD to coat the beads was determined from freeze-dried

unloaded CB by the measurement of their mean diameter (see section 2. 4. 1) and the determination of the bead yield (see section 2. 4. 2).

2. 2. 2. 2. Loaded coated beads

After washing, Nile red- or IND-loaded NB were introduced into around 20 ml of Milli Q water containing 0.8 g of α-CD. The preparations were then continuously shaken for 48 hours, washed and freeze-dried as described previously. For confocal microscopy study, calcein (a hydrophilic green fluorescent probe) was dissolved in Milli Q water when α-CD was added to Nile red-loaded NB. After washing, Nile red/calcein-loaded CB were frozen and cut using a thin blade.

2. 3. Preparation of Indomethacin-loaded emulsion (EM)

IND-loaded EM was prepared by adding 5.8 ml of an oily suspension of IND (115 mg/ml) to 20 ml of Milli Q water containing 1.62 g of α-CD. The preparation was continuously shaken as described in Section 2. 2. 1 except that the shaking was stopped after 4 hours. EM was freeze-dried.

2. 4. Characterisation of beads

2. 4. 1. Bead diameter

The diameter of beads was determined on a sample of 50 freeze-dried beads using an optical microscope as reported by Hamoudi *et al* [20].

2. 4. 2. Bead Yield

The yield of beads was calculated using the following equation:

$$\text{Bead yield}(\%) = \frac{\text{weight of freeze-dried beads}}{\text{weight } (\alpha\text{CD} + \text{oily phase})} \times 100$$

2. 4. 3. Increase of the mass of unloaded NB after coating with α-CD

The increase in mass with α-CD (%) of unloaded NB after coating was determined as follows:

$$\text{Mass increase}(\%) = \frac{\text{weight of 1000 unloaded CB - weight of 1000 unloaded NB}}{\text{weight of 1000 unloaded CB}} \times 100$$

2. 4. 4. Observation of the Nile red/calcein-loaded CB with a confocal laser scanning microscope (CLSM)

The localisation of the dyes within the Nile red/calcein-loaded CB was determined thanks to a LSM-510 META (Zeiss, Germany) confocal laser scanning microscope equipped with a 1 mW helium neon laser, using a Plan-neofluar 10x (NA 0.3/dry) objective lens equipped with a differential interferential contrast (Nomarski). Red fluorescence (Nile red) was collected with a long-pass 560 nm emission filter under illumination from a 543 nm laser. Green fluorescence (calcein) was observed with a 505-550 nm band-pass emission filter under illumination from a 488 nm laser. The pinhole diameter was set at 1.0 Airy Unit giving a 12.8 µm optical slice thickness for 10x objective lens. Micrographs were taken on the edge of the CB in order to highlight the presence of the α-CD coat. Fluorescence distribution profile was determined for a section of the CB.

2. 4 .5. Indomethacin loading

Separation and quantification of IND were carried out by HPLC. Chromatographic separations were performed on a C18 Interchim® (modulo-cart QK Uptisphere 3 HDO 3 µm, 150 mm x 2.1 mm, Montluçons, France). The system was equipped with a mobile phase delivery pump (binary HPLC pump, Waters 515, Milford, USA), an auto sampler (Waters model 717 plus, Milford, USA), an on-line degasser, a column oven set at room temperature and a tunable absorbance UV detector (Waters model 486, Milford, USA). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and Milli Q water (70/30; v/v) acidified at pH 3.5 with acetic acid. The injection volume was set at 10 µl, the flow rate was 0.2 ml/min and the absorbance measurement was performed at $\lambda = 265$ nm. The IND peak was identified on the chromatograms at a retention time of 6 minutes. Calibration curves were drawn up for IND from 0.25 to 100 µg/ml in the mobile phase.

IND was extracted from the EM, the NB and the CB by the following method: freeze-dried EM and freeze-dried beads were weighed precisely (50 mg) and 5 ml of tetrahydrofuran was added to destroy the EM and the bead structure, followed by an equal volume of methanol (5 ml). The whole was then mixed in room temperature. 500 µL of the resulting solution were diluted (1/20) with the mobile phase and the drug content was quantified by HPLC. For each batch of EM and beads, the extraction was performed on two replicate samples.

IND loading was calculated using the following equation:

$$\text{IND loading (mg of IND/g of beads)} = \frac{\text{amount of IND within beads}}{\text{weight of beads}}$$

2. 5. Behaviour of Nile red-loaded CB in SGIF

The behaviour of Nile red-loaded CB in SGIF was determined at 37°C using the apparatus 2 of the European Pharmacopeia (rotating paddle apparatus). One hundred Nile red-loaded CB were introduced into 200 ml of SGF. After 55 minutes, 200 ml of pre-concentrated FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) or FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid) were added. The initially pre-concentrated media were thus diluted two-fold to yield the correct concentration. To facilitate the understanding of the results, we use the terms FaSSIF and FeSSIF for the SGF/pre-concentrated FaSSIF and SGF/pre-concentrated FeSSIF mixtures (50/50; v/v) respectively.

Details of the composition of the simulated gastro-intestinal fluids used in this study were described previously [20]. Beads were collected at different time intervals : at 5, 15, 30 and 55 minutes in SGF; at 60, 70, 85, 120, 150, 180, 240 and 360 minutes in FaSSIF and at 60, 65, 70 and 85 minutes in FeSSIF. One hundred Nile red-loaded CB were used for each time and each medium. All the experiments were carried out in triplicate. The proportion of residual CB, the determination of the diameter of intact CB and the percentage of remaining volume of CB were performed as reported previously for Nile red NB [20].

2. 6. Study of the Indomethacin dissolution in SGIF

IND solubility measurements were carried out in the SGIF. Powdered IND was added in excess to 10 ml of the SGF (pH 1.2 and 6.5), FaSSIF (pH 6.5) and FeSSIF (pH 6.5). Samples were then stirred at 37°C for 24 hours and centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm. The supernatant was filtered through a 0.45 µm Millex-HV filter (Millipore, France). A two-fold dilution of all the samples was made in the mobile phase before their assay by HPLC (Section 2. 4. 5). IND solubility was determined in triplicate in each SGIF. IND is a weakly acidic and poorly soluble drug (pKa of 4.5) with a very low solubility at pH 1.2 ($S_{IND\ in\ SGF\ pH1.2} = 3.66 \pm 0.12$ µg/ml). As a result of drug solubility limitations at pH 1.2, *in vitro* studies of IND release in SGIF were performed in SGF pH 6.5 ($S_{IND\ in\ SGF\ pH6.5} = 302 \pm 21$ µg/ml), FaSSIF ($S_{IND\ in\ FaSSIF\ pH6.5} = 684 \pm 34$ µg/ml) and FeSSIF ($S_{IND\ in\ FeSSIF\ pH6.5} = 2410 \pm 114$ µg/ml).

In vitro dissolution studies of IND were performed in sink conditions in the SGIF, using the protocol reported in section 2. 5 on the following formulations: IND-loaded NB, IND-loaded CB and IND-loaded EM. Only IND dissolved in SGIF was quantified. A sample portion of each

formulation corresponding to 10 mg of IND was introduced into 200 ml of SGF pH 6.5, at 37°C, under stirring at a speed of 55 rpm. We previously verified that bead was not affected by pH. After 55 minutes, 200 ml of pre-concentrated FaSSIF or FeSSIF pH 6.5 were added. For each formulation, two samples of 1.5 ml were withdrawn at different times of incubation over 24 hours and were immediately filtered through Millex-HV 0.45 µm filters. An equal volume of fresh SGIF at 37°C was then added to maintain a constant volume. All experiments were run in triplicate. The IND was assayed directly in the filtered samples, by HPLC (section 2. 4. 5).

2. 7. *In vivo* Pharmacokinetic study in rats

2. 7. 1. *In vivo* experimental protocol

Groups of six male Wistar rats weighing between 275 and 300 g were obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). For pharmacokinetic experiments, the animals were catheterized at the jugular. In order to study the effect of food ingestion on the level of IND in plasma, each formulation was administered orally in fasted and fed rats. In fasting conditions, rats were placed in single metabolic cages, fitted with wire-net floors and kept fasted overnight. Free access to water and food was allowed after treatment. Fed rats were fed "ad libitum" during the study. The animals were divided into eight groups. Each group received one of the following formulations, in the fasted and fed state, at the dose of 5 mg/kg by oral gastric gavage: (i) Indocid® : hard gelatin capsules of Indocid® (250 mg corresponding to 25 mg of IND) were opened and 15 mg of their content (1.5 mg of IND) was used to fill new capsules to reach the dose of 5 mg/kg, (ii) IND-loaded EM, (iii) IND-loaded NB and (iv) IND-loaded CB. All the formulations were administered inside hard gelatine capsules, size 9 (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Capsules were administered into the lower oesophagus of the rat, using a dosing syringe (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The delivery tube of the dosing syringe is inserted into the animal's oesophagus. When in place, the syringe plunger is pressed to complete the placement of the capsule. Blood samples (200 µl) were collected from the jugular vein in heparinised tubes, at specific post dose time points (0.16, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3, 6, 7, 8, 10 and 24 hours) for all the groups. After each collection, the volume of the recovered sample was replaced by the same volume of lactated Ringer's solution. The cannula was flushed with heparinised normal saline to prevent blood clotting. Plasma samples were obtained by centrifugation of blood samples immediately after blood collection (4000 rpm for 10 minutes) at room temperature by using a microcentrifuge (minispin Eppendorf). Plasma samples were then isolated and frozen at -20°C until HPLC analysis.

2. 7. 2. Indomethacin extraction and quantification of plasma concentration

In order to determine the IND levels in plasma, we adopted a previously published method [28] for which some modifications were made. To a 100 µl aliquot of plasma, 100 µl of internal standard solution (mefenamic acid in acetonitrile, with a concentration of 50 µg/ml) were added. Samples were mixed by vortex-mixing for 60 seconds followed by centrifuging at 8000 rpm for 10 minutes to remove proteins. 100 µl of the supernatant was immediately filtered on syringe driven filter unit (Millex-HV, 0.45 µm PVDF, 4 mm from Millipore, St Quentin en Yvelines, France). IND levels in plasma were then estimated using the previously described HPLC technique (Section 2. 4. 5).

2. 7. 3. Data analysis

Pharmacokinetic parameters of each rat were calculated using WinNonlin® professional version 5.2 software (Pharsight, Sunnyvale, CA, USA). The area under the concentration-time curve (AUC) was calculated from 0 to ∞ using linear trapezoidal rule. The mean residence time (MRT) was calculated from the ratio between the area under the first moment curve over a period of 0 to ∞ ($AUMC_{0-\infty}$) and the $AUC_{0-\infty}$. Relative bioavailability (F_{rel}) was calculated as follows:

$$F_{rel} = \left[\frac{AUC_{0\to\infty}\ (EM/NB/CB)}{AUC_{0\to\infty}\ \text{Indocid}} \right] \times 100$$

All the data were expressed as mean ± standard deviation (SD) and statistical differences were analysed using the ANOVA and Student's t-tests. The acceptable level of statistical significance was set at a probability of less than 0.05.

3. Results

3. 1. Bead properties after the addition of α-CD

Before coating, the preparation of IND-loaded NB required a longer time than unloaded beads (9 days). In order to coat the NB with α-CD molecules, beads were reintroduced, after washing, into water containing α-CD. Beads were then continuously shaken for 48 hours. The addition of 0.8 g of α-CD was found to be an optimal amount (Fig. 1). The unloaded CB prepared in this condition had the largest diameter (1.83 ± 0.05 mm) and the best yield (83 ± 1 %) (Fig. 1). The diameter of the beads remained unchanged when they were not washed before α-CD incorporation.

The increase of the mass and of the diameter of these beads was of 8.4% and 230 µm respectively. An increase of the initial diameter of Nile red and IND-loaded NB between 300 and 400 µm was also shown when the optimal amount of α-CD was used (Table 1). A slight decrease of the bead yield and of the amount of IND per gram of CB was perceived (Table 1). CB retained a pyramidal shape. Nile red added to the oily solution in the preparation of the NB was localised inside the bead (Fig. 2A). Calcein added to α-CD solution for the preparation of CB, was distributed at the periphery of the bead (Fig. 2B) and formed a layer around it (Fig. 2C). Estimated, from the micrograph, the thickness was measured between 100 and 250 µm (Fig. 2B). Small spots of oil were observed at the periphery and in the middle of the coat of α-CD (Fig. 2C).

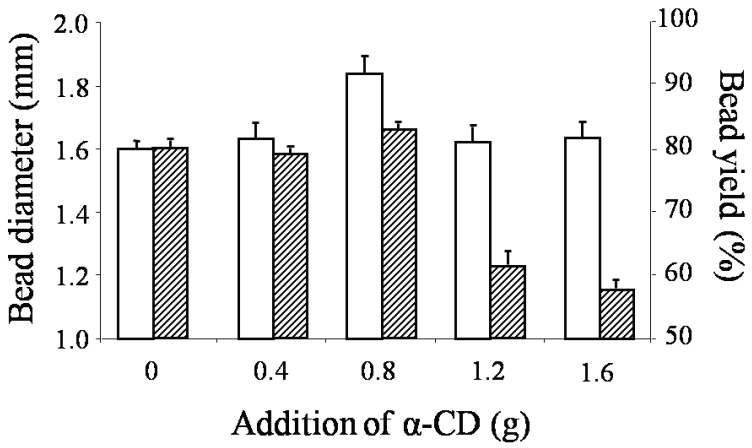


Figure 1. Effect of the addition of α-CD on the diameter (□) and the yield (▨) of unloaded NB (n ≥ 3 batches; mean ± SD).

Table 1. Properties of Nile red and IND-loaded NB and CB (n ≥ 3 batches; mean ± SD).

	Nile red-loaded NB	Nile red-loaded CB	IND-loaded NB	IND-loaded CB
Bead yield (%)	83 ± 1	81 ± 1	79 ± 1	75 ± 1
Bead diameter (mm)	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1
IND loading (mg/g of beads)	-	-	98 ± 4	90 ± 3

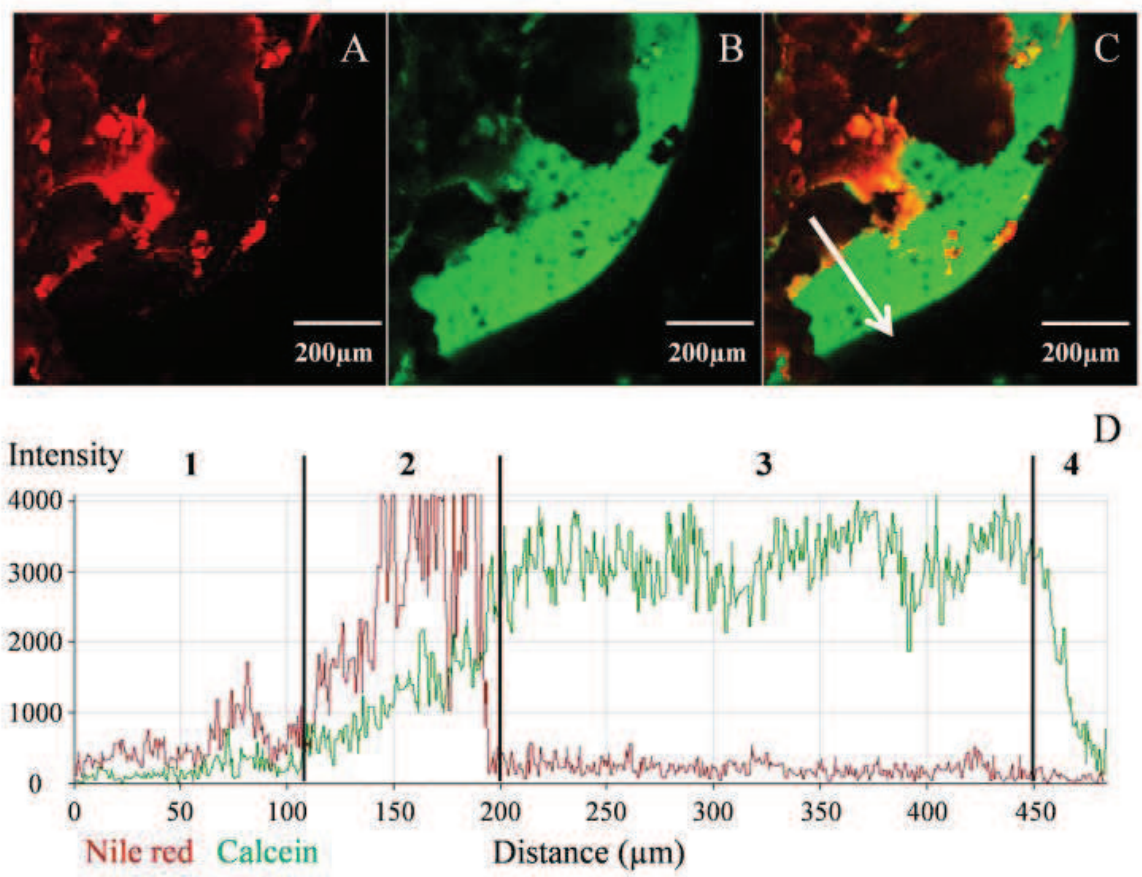


Figure 2. Confocal microscopy micrographs (scale bar = 200 µm) of a fresh frozen Nile red/calcein-loaded CB. Nile red (hydrophobic red probe) is localised inside the beads (A). Calcein (hydrophilic green probe) is distributed at the periphery of the bead (B). Superposition of both micrographs (C). Calcein forms a layer around the bead estimated from the micrograph at 100 to 250 µm. A graph representing the fluorescence distribution (D) determined for a section of the CB as indicated by the orientation of the bar (C) was segmented into four parts: (1) matrix of α-CD unlabeled with calcein for the formation of the core of NB (black), (2) oily droplets of the core of NB labeled with Nile red (red) (3) coat of α-CD labeled with calcein (green), (4) outside the CB (black). Part 3 shows that there is no colocalisation between Nile red and calcein dots. A zoomed 3D reconstitution (a volume rendering) was performed using IMARIS software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) on a cut CB (see supplementary data).

3. 2. Behaviour of Nile red-loaded CB and NB in SGIF

After 55 minutes in SGF, both CB and NB showed a decrease of 20% of their initial diameter. However, CB led to a very slight reduction of their number (3% versus 18% for NB) (Fig. 3). In SIF, the diameter and the proportion of residual CB and NB decreased more over time (Fig. 3) but to a lesser extent in FaSSIF than in FeSSIF. Although the loss of diameter remained quite similar for NB and CB, CB were more resistant. All CB had disintegrated at time 85 min in FeSSIF and 360 min in FaSSIF (Fig. 3A) and at 70 min and 180 min in the same media for NB (Fig. 3B).

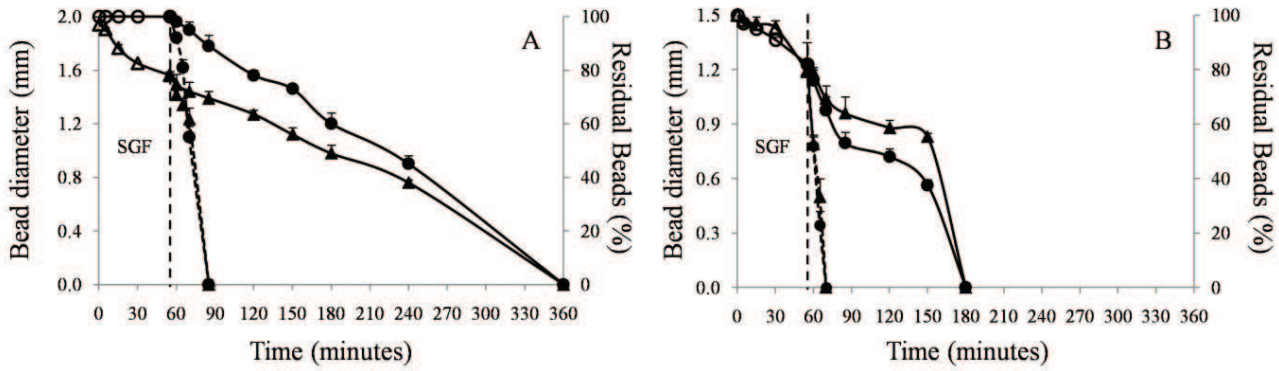


Figure 3. Diameter (triangle) and proportion (circle) of intact Nile red-loaded CB (A) and Nile red-loaded NB (B) remaining after incubation in different media at 37°C: CB were incubated 55 minutes in SGF (Δ, ○) before the addition of SIF (▲, ●) corresponding to pre-concentrated FaSSIF (solid lines) or FeSSIF (dotted lines). *Figure 3B is adapted from [20].

3. 3. Study of Indomethacin dissolution in SGIF

No differences in the percentage of IND dissolved were observed between EM and NB whatever the medium (Fig. 4). In SGF, up to 30 minutes, the dissolution of IND was lower from CB, compared to the two other formulations (Fig. 4). However, at 55 minutes, no difference was observed (24-30% of IND dissolved). Thereafter, in both FaSSIF and FeSSIF, lower amounts of IND were dissolved from the CB up to 360 minutes, comparatively to EM and NB. For all the formulations, higher and faster dissolution profiles were seen in FeSSIF compared to FaSSIF (Fig. 4) but it was much less pronounced for CB (Fig. 4).

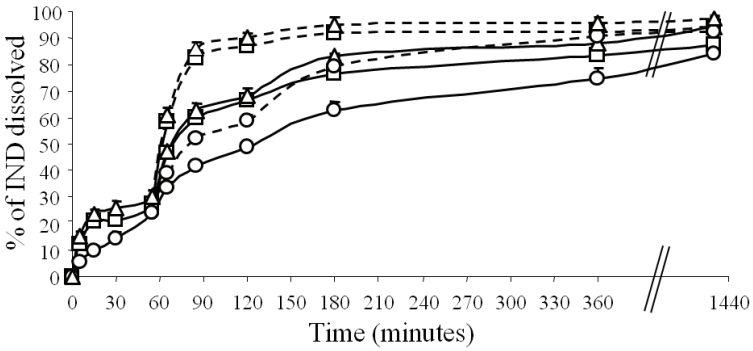


Figure 4. IND dissolved (%) from EM (Δ), NB (□) and CB (○); Formulations were incubated 55 minutes in SGF before the addition of pre-concentrated FaSSIF (solid lines) and pre-concentrated FeSSIF (dotted lines).

3. 4. *In vivo* Pharmacokinetic study in rats

In both rat models studied, the lipid-based formulations improved relative bioavailability values (F_{rel}) by a factor of 1.5, 1.8 and from 1.2 to 2 with EM, NB and CB respectively compared to Indocid® (Table 2). The four formulations were compared in fasted and fed rats for each pharmacokinetic parameter and p values calculated by ANOVA test are < 0.001 in all cases. A food effect on the plasma concentration-time curves of IND was observed for all formulations tested (Fig. 5). The values of Cp_{max} and $AUC_{0\rightarrow\infty}$ increased while those of T_{max} were reduced in fed rats for all formulations (p values < 0.01) (Table 2). Compared to beads (Fig. 5C and 5D), the values of Cp_{max} were higher and T_{max} lower with EM (Fig. 5B) in both fasted and fed rats (p values < 0.05) (Table 2). A constant plasma level of IND was observed for a longer period of time with CB (Fig. 5D) than with NB (Fig 5C), T_{max} was delayed and Cp_{max} was lowered. However, the $AUC_{0\rightarrow\infty}$ values of CB were not statistically different from those of NB (Fig. 5C and 5D) (Table 2). Finally, the MRT value of IND was increased with beads versus EM (p values < 0.05) (Table 2). This was more pronounced with CB in fed rats (Table 2). A difference in the plasma concentration of IND appeared between NB and CB, from 40 minutes in fasted rats and 20 minutes in the fed ones (Fig. 5E and 5F). In both media, differences between EM and NB were seen from 60 minutes (Fig. 5E and 5F).

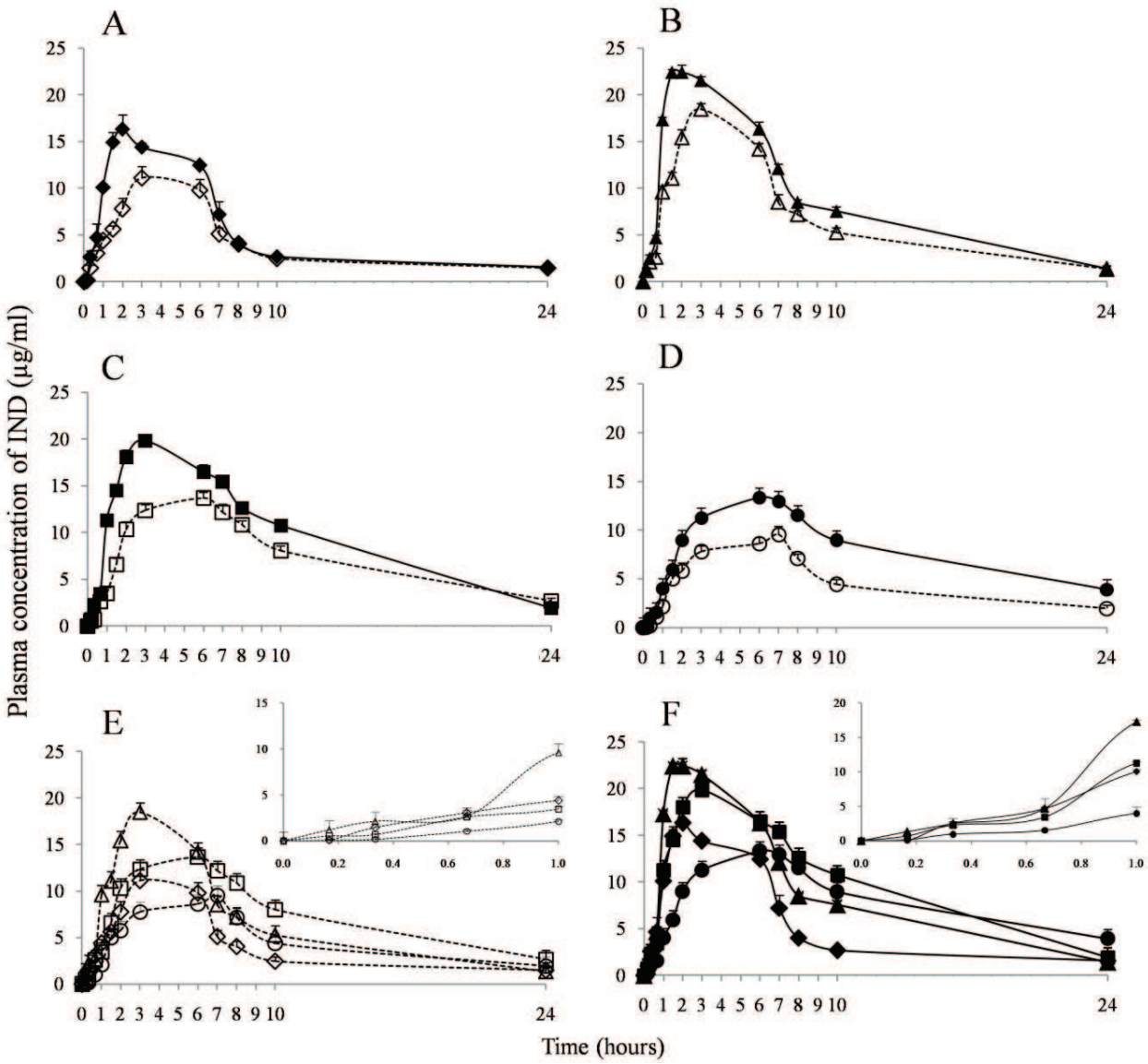


Figure 5. Plasma concentration time profiles for IND in male Wistar rats, following an oral dose of various formulations, equivalent to 5 mg/kg IND in fasted (dotted lines) and fed (solid lines) rats: Indocid® (A), EM (B), NB (C) and CB (D). Superposition of Plasma concentration time profiles following the administration of Indocid® (◊), EM (Δ), NB (□) and CB (○) at 24 hours. Expansions of the first 1 hour in fasted (E) and fed (F) rats are presented in inserts. Data points and error bars represent means ± SD.

Table 2. Mean plasma pharmacokinetic parameters following an oral dose of various formulations, equivalent to 5 mg/kg IND in fasted and fed rats : Indocid®, EM, NB and CB: Cp_{max}, T_{max}, $AUC_{0\rightarrow\infty}$, MRT and F_{rel}.

		Indocid®	EM	NB	CB
Cp_{max}	Fasted	11.1±1.1	18.5±0.6	13.8±0.4	9.6±0.3
(µg/ml)	Fed	16.7±1.2	22.7±0.5	19.8±0.6	13.6±0.7
T_{max}	Fasted	3.0±0.0	3.0±0.0	5.5±1.2	7.0±0.0
(hours)	Fed	1.8±0.3	1.8±0.3	3.0±0.0	6.3±0.5
$AUC_{0\rightarrow\infty}$	Fasted	113.9±8.3	170.7±9.0	208.4±19.8	134.4±12.4
(µg.h/ml)	Fed	142.6±5.4	220.2±8.5	250.9±12.4	283.0±94.0
MRT	Fasted	12.4±1.5	8.7±0.8	12.8±2.0	13.9±1.7
(hours)	Fed	10.2±0.9	8.0±0.5	9.4±1.2	19.1±7.2
F_{rel} (%)	Fasted	100	150	183	118
	Fed	100	154	176	198

4. Discussion

The purpose of this study was first to coat NB with α-CD to increase their resistance in biological media and secondly to assess how the same formulation can modify the release of a drug depending on the system used.

As previously observed, the preparation of drug-loaded beads either from an oily solution (isotretinoin [27] and adapalene [29]) or from an oily suspension (adapalene [29] and progesterone [20]) increases the time required to achieve a monodisperse population of particles. The drugs may interfere in interactions essential to bead formation between CD and the triglycerides at the oil/water interface [19] and thus, delaying their formation.

We demonstrate that CB are obtained simply by adding an optimal amount (0.8g) of α-CD to preformed NB. The washing step before α-CD incorporation allows the removal of the residual amount of oil in the dispersion medium and avoids interaction between α-CD molecules and the rest of triglycerides that could decrease the quantity of α-CD available to form the coat. The increase of the diameter of beads is due to the association of α-CD on the surface of NB. Two further days of agitation of unwashed NB without the addition of α-CD has no effect on their diameter (data not shown). This is because no more material is available to be associated with the beads and thus their formation would be stopped [19]. The mass of the NB increases of 8.4% which corresponds to 76% of α-CD fixation. Confocal microscopy confirms that a layer of α-CD is formed at the periphery of the bead which thickness is consistent with the increase of the size of the beads. Thus, a CB consists of a core (NB) of partially crystalline matrix of α-CD containing micro-compartments of oil [19] surrounded by a layer of α-CD. The crystalline structure of the NB was previously attributed to the organisation of α-CD molecules as a result of their interaction with the triglycerides of the soybean oil. NB crystalline organisation is different from that of the α-CD hydrate crystal [30]. Indeed, the first interplanar distance of 16Å [19] corresponds to the height of α-CD dimers and suggests α-CD organisation as a channel structure [31-32]. The coating of α-CD possibly results from the crystallisation of these molecules from the surface of the NB. When the amount of α-CD added is greater than 0.8 g, the crystallisation was prevented or delayed. In this case, most of the α-CD remains in solution and is removed after the final washing step. This may explain the decrease in the yield of the beads.

The coating of beads by α-CD molecules clearly improves their resistance both *in vitro* and *in vivo* and slows the release of IND. However, a small fraction of CB in a sample of 100 is more fragile in the first minutes following their incubation in SGF (3% disintegration). This effect was more pronounced with NB (18%). After freeze-drying, the porosity of a few beads may be more significant, making them more sensitive to fragmentation in SGF. The total dissolution of the

layer of α-CD is estimated to occur in around 55 minutes which corresponds to the period of incubation in SGF. In fact, at this time, the diameter of Nile-red-loaded CB (1.6 mm) is almost equal to the initial of NB (1.5 mm). IND-loaded CB release 2× less IND than NB until 30 minutes in SGF. While the layer of α-CD is not completely dissolved, it behaves as a barrier to drug release in the early time of incubation and protects the inner core of the beads. However, the coating of α-CD does not completely prevent the release of IND. A part of the amount of IND released may result from the fragmentation of a few CB in SGF. Moreover, the thickness of the coat is not perfectly uniform because NB is pyramidal rather than spherical in shape [19-20] and it contains a few isolated spots of oil. Even if NB and CB undergo a comparable erosion profile in SGIF, the larger initial diameter of CB makes them more resistant in these media. Thus, the times required for the fragmentation of CB versus NB are 1.6× and 1.2-1.4× longer in FaSSIF and FeSSIF respectively. Interestingly, the disintegration of NB and CB occurs from a critical threshold diameter of around 0.75 mm. For a given incubation time, as the matrix of CB is less eroded, it is less rapidly affected by the surfactant properties of Na-TC involved in the extraction of the oily droplets, the fragmentation of the beads and the release of IND from oil [20]. For this reason, the percentage of IND dissolved in FeSSIF and the plasma concentration of IND in fed rats are lower than with NB. Thanks to the protective effect α-CD layer, CB act as a sustained release form as shown by pharmacokinetic parameters. T_{max} and MRT values are increased while Cp_{max} is reduced compared to NB.

In contrast to *in vitro*, where no differences were observed between the EM and the NB, *in vivo*, a fast release of IND is observed with the EM as previously reported with other dry EM prepared with sugar [16-17, 33] or hydrophilic polymers [34-35]. The reduction of the T_{max} value can be attributed to the very rapid disintegration in biological media of the α-CD matrix which is less organised than in beads [20-21]. Although the size and the shape of the oily globules of the EM were not homogeneous [19] once released, they offer a large surface area suitable for a rapid absorption of IND. While dry EM described in the literature are efficient for improving the bioavailability of lipophilic drugs [13-14, 16, 36-37], their formulation and manufacturing require the use of surface-active agents, heating and strong stirring [13, 16-17, 37]. This is not the case for dry EM formulated with oil and α-CD [20-21]. The bioavailability of IND was higher in fed rats that in fasted ones whatever the formulation (Indocid® and lipid-based systems). Lipid digestion products induce secretion of pancreatic and biliary fluids which alter the luminal environment of the small intestine [38]. Bile salts decrease the partition coefficient of drugs in intestinal media [39-41] while pancreatic lipases participate to lipid digestion [42] and

contribute to the release of drugs from oil [43]. Thus, the resulting mixed micelles probably increase the amount of IND available for absorption.

All the formulations based on α-CD and soybean oil increase the relative bioavailabilities of IND compared to Indocid®. This confirms the data reported previously by Trichard et al. [27] from isotretinoin-loaded beads. These results may be explained by the original structure of these systems (microdroplets of oil dispersed in a hydrophilic matrix) and their behaviour in SGIF (dissolution of the matrix and release of the oily droplets conferring a high surface area essential in the efficient intestinal absorption). The enhanced bioavailability of IND may also result from an intestinal lymphatic absorption as reported for other lipid-based systems [44-45].

5. Conclusions

This study emphasizes that α-CD and soybean-oil-based formulations are of great interest for the oral administration of poorly-soluble drugs and are able to increase oral bioavailability of a model drug in rats. With the same initial formulation, three different systems can be formed using simple and soft manufacturing conditions. As the behaviour of EM, NB and CB is not the same in biological media, a fast, intermediate or long release of the loaded drug can be achieved.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pharsight Corporation (Sunnyvale, CA, USA) for allowing our university to benefit from the Academic Licensing Program.

ABBREVIATIONS

$AUC_{0\rightarrow\infty}$: Area Under the concentration-time Curve over a period of 0 to ∞

$AUMC_{0\text{-}\infty}$: Area Under the first Moment Curve over a period of 0 to ∞

CB : Coated Beads

CD : Cyclodextrin

Cp_{max} : maximum observed plasma concentration

EM : emulsion

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

IND : Indomethacin

MRT : Mean Residence Time

Na-TC : sodium taurocholate

NB : naked beads

SGF : Simulated Gastric Fluid

SGIF : Simulated Gastro-Intestinal Fluids

T_{max} : Time of maximum observed plasma concentration

REFERENCES

[1] T.R. Kommuru, B. Gurley, M.A. Khan, I.K. Reddy, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment, Int. J. Pharm., 212 (2001) 233-246.

[2] A. Dahan, A. Hoffman, Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs, J. Control. Release., 129 (2008) 1-10.

[3] J.M. Miller, A. Beig, R.A. Carr, G.K. Webster, A. Dahan, The solubility-permeability interplay when using cosolvents for solubilization: revising the way we use solubility-enabling formulations., Mol. Pharm., 9 (3) (2012) 581-590.

[4] C.J.H. Porter, C.W. Pouton, J.F. Cuine, W.N. Charman, Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems, Adv. Drug Deliv. Rev., 60 (2008) 673-691.

[5] M.L. Shively, Characterization of Oil-in-Water Emulsions Prepared from Solid-State Emulsions - Effect of Matrix and Oil Phase, Pharm. Res., 10 (1993) 1153-1156.

[6] K. Kohli, S. Chopra, D. Dhar, S. Arora, R.K. Khar, Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability, Drug. Discov. Today., 15 (2010) 958-965.

[7] S.A. Charman, W.N. Charman, M.C. Rogge, T.D. Wilson, F.J. Dutko, C.W. Pouton, Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound, Pharm. Res., 9 (1992) 87-93.

[8] M. Muchow, P. Maincent, R.H. Muller, Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery, Drug. Dev. Ind. Pharm., 34 (2008) 1394-1405.

[9] R.H. Muller, K. Mader, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm., 50 (2000) 161-177.

[10] L. Hu, X. Tang, F. Cui, Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, J. Pharm. Pharmacol., 56 (2004) 1527-1535.

[11] V. Venkateswarlu, K. Manjunath, J.S. Reddy, Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, Method. Find. Exp. Clin., 27 (2005) 127-144.

[12] H. Harde, M. Das, S. Jain, Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle, Expert. Opin. Drug. Deliv., 8 (2011) 1407-1424.

[13] I.S. Ahmed, M.H. Aboul-Einien, In vitro and in vivo evaluation of a fast-disintegrating lyophilized dry emulsion tablet containing griseofulvin, Eur. J. Pharm. Sci., 32 (2007) 58-68.

[14] Z. Ge, X.X. Zhang, L. Gan, Y. Gan, Redispersible, dry emulsion of lovastatin protects against intestinal metabolism and improves bioavailability, Acta. Pharmacol. Sin., 29 (2008) 990-997.

[15] J. Zhang, Z. Zheng, Y. Gao, Y. Zhang, Spray-dried oil-in-water emulsion to improve the intestinal absorption and oral bioavailability of ZLR-8, a nitric oxide-releasing derivative of diclofenac, J. Pharm. Pharmacol., 63 (2011) 1531-1538.

[16] D.J. Jang, E.J. Jeong, H.M. Lee, B.C. Kim, S.J. Lim, C.K. Kim, Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion, Eur. J. Pharm. Sci., 28 (2006) 405-411.

[17] G. Dollo, P. Le Corre, A. Guerin, F. Chevanne, J.L. Burgot, R. Leverge, Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, Eur. J. Pharm. Sci., 19 (2003) 273-280.

[18] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm. Res., 12 (1995) 413-420.

[19] A. Bochot, L. Trichard, G. Le Bas, H. Alphandary, J.L. Grossiord, D. Duchene, E. Fattal, alpha-Cyclodextrin/oil beads: an innovative self-assembling system, Int. J. Pharm., 339 (2007) 121-129.

[20] M. Hamoudi, E. Fattal, C. Gueutin, V. Nicolas, A. Bochot, Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: In vitro studies in simulated gastro-intestinal fluids, Int. J. Pharm., 416 (2011) 507-514.

[21] L. Trichard, P. Chaminade, J.L. Grossiord, G. Le Bas, N. Huang, D. Durand, E. Fattal, A. Bochot, Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties J. Drug. Del. Sci. Tech., 21 (2011) 189-194.

[22] K. Shimada, K. Kawano, J. Ishii, T. Nakamura, Structure of Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Triglyceride at Vegetable Oil-Water Interface, Journal of Food Science, 57 (1992) 655-656.

[23] K. Shimada, Y. Ohe, T. Ohguni, K. Kawano, J. Ishii, T. Nakamura, Emulsifying Properties of Alpha-Cyclodextrins, Beta-Cyclodextrins and Gamma-Cyclodextrins, J. Jpn. Soc. Food. Sci., 38 (1991) 16-20.

[24] L. Szente, J. Szejtli, J. Szeman, L. Kato, Fatty-Acid Cyclodextrin Complexes - Properties and Applications, J. Inclus. Phenom. Mol., 16 (1993) 339-354.

[25] S.C. Yu, A. Bochot, M. Cheron, M. Seiller, J.L. Grossiord, G. Le Bas, D. Duchene, Design and evaluation of an original o/w/o multiple emulsion containing natural cyclodextrins as the emulsifier, Stp. Pharma. Sci., 9 (1999) 273-277.

[26] S.C. Yu, A. Bochot, G. Le Bas, M. Cheron, J.L. Grossiord, M. Seiller, D. Duchene, Characteristics of o/w emulsions containing lipophilic molecules with cyclodextrins as emulsifiers, Stp. Pharma. Sci., 11 (2001) 385-391.

[27] L. Trichard, E. Fattal, M. Besnard, A. Bochot, Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs, J. Control. Release., 122 (2007) 47-53.

[28] J. Sato, T. Amizuka, Y. Niida, M. Umetsu, K. Ito, Simple, rapid and sensitive method for the determination of indomethacin in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, J. Chromatogr. B., 692 (1997) 241-244.

[29] L. Trichard, M.B. Delgado-Charro, R.H. Guy, E. Fattal, A. Bochot, Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug, Pharm. Res., 25 (2008) 435-440.

[30] W. Saenger, T. Steiner, Cyclodextrin Inclusion Complexes: Host-Guest Interactions and Hydrogen-Bonding Networks, Acta. Crystallogr. A., 54 (1998) 798-805

[31] M. Noltemeyer, W. Saenger, Structural chemistry of linear α-cyclodextrin-polyiodide complexes. X-ray crystal structures of $(\alpha\text{-cyclodextrin})_2$. LiI_3. I_2. $8H_2O$ and $(\alpha\text{-cyclodextrin})_2$. $Cd_{0.5}$. I_5. $27H_2O$. Models for the blue amylose–iodine complex., J. Am. Chem. Soc., 102 (1980) 2710-2722.

[32] L. Trichard, E. Fattal, G. Le Bas, D. Duchene, J.L. Grossiord, A. Bochot, Formulation and characterisation of beads prepared from natural cyclodextrins and vegetable, mineral or synthetic oils, Int. J. Pharm., 354 (2008) 88-94.

[33] K.L. Christensen, G.P. Pedersen, H.G. Kristensen, Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying, Int. J. Pharm., 212 (2001) 187-194.

[34] K.L. Christensen, G.P. Pedersen, H.G. Kristensen, Technical optimisation of redispersible dry emulsions, Int. J. Pharm., 212 (2001) 195-202.

[35] T. Hansen, P. Holm, M. Rohde, K. Schultz, In vivo evaluation of tablets and capsules containing spray-dried o/w-emulsions for oral delivery of poorly soluble drugs, Int. J. Pharm., 293 (2005) 203-211.

[36] Y.M. Yin, F.D. Cui, J.S. Kim, M.K. Choi, B.C. Choi, S.J. Chung, C.K. Shim, D.D. Kim, Preparation, characterization and in vitro intestinal absorption of a dry emulsion formulation containing atorvastatin calcium, Drug. Deliv., 16 (2009) 30-36.

[37] I.S. Ahmed, M.H. Aboul-Einien, O.H. Mohamed, S.F. Farid, Relative bioavailability of griseofulvin lyophilized dry emulsion tablet vs. immediate release tablet: a single-dose, randomized, open-label, six-period, crossover study in healthy adult volunteers in the fasted and fed states, Eur. J. Pharm. Sci., 35 (2008) 219-225.

[38] G.A. Kossena, W.N. Charman, B.J. Boyd, D.E. Dunstan, C.J. Porter, Probing drug solubilization patterns in the gastrointestinal tract after administration of lipid-based delivery systems: a phase diagram approach, J. Pharm. Sci., 93 (2004) 332-348.
[39] J.H. de Smidt, J.C. Offringa, D.J. Crommelin, Dissolution rate of griseofulvin in bile salt solutions, J. Pharm. Sci., 80 (1991) 399-401.
[40] J. Horsky, J. Pitha, Hydroxypropyl cyclodextrins: potential synergism with carcinogens, J. Pharm. Sci., 85 (1996) 96-100.
[41] J.M. Miller, A. Beig, B.J. Krieg, R.A. Carr, T.B. Borchardt, G.E. Amidon, G.L. Amidon, A. Dahan, The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation, Mol. Pharm., 8 (2011) 1848-1856.
[42] R. Witzleb, A. Mullertz, V.R. Kanikanti, H.J. Hamann, P. Kleinebudde, Dissolution of solid lipid extrudates in biorelevant media, Int. J. Pharm., 422 (2012) 116-124.
[43] B.J. Boyd, S.M. Khoo, D.V. Whittaker, G. Davey, C.J. Porter, A lipid-based liquid crystalline matrix that provides sustained release and enhanced oral bioavailability for a model poorly water soluble drug in rats, Int. J. Pharm., 340 (2007) 52-60.
[44] C.M. O'Driscoll, B.T. Griffin, Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility-the potential impact of lipid-based formulations, Adv. Drug. Deliv. Rev., 60 (2008) 617-624.
[45] C.M. O'Driscoll, Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery, Eur. J. Pharm. Sci., 15 (2002) 405-415.

Chapitre 3: annexe

1. Introduction

Dans le chapitre 3, nous avons montré qu'il était possible de moduler la libération de l'IND en fonction du système formé (émulsion, billes nues ou coquées). Une étude supplémentaire *in vitro* réalisée avec la forme commerciale d'IND, l'Indocid®, est présentée dans cette annexe. Les profils de dissolution de l'IND dans les milieux digestifs simulés, à partir de l'Indocid®, ont été comparés à ceux obtenus avec l'émulsion sèche (ES) présentés dans le chapitre 3.

2. Matériel et méthodes

2.1.Matériel

L'émulsion a été préparée et lyophilisée selon le mode opératoire précédemment décrit (chapitre 3).

L'Indocid® provient du laboratoire Uriach (Espagne) et se présente sous forme de gélules dosées à 25 mg d'indométacine. Le contenu de la gélule est composé: d'IND (PA), de lactose anhydre, de stéarate de magnésium, de silice colloïdale anhydre et de lécithine liquide concentrée.

2.2. Etude du passage en solution de l'IND dans les milieux digestifs simulés

Les études de passage en solution *in vitro* ont été réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre 3. 100 mg d'Indocid® correspondant à 10 mg d'indométacine ont été introduits dans les bols de dissolution. Ces essais ont été réalisés dans des conditions sink, après une incubation de 55 minutes dans le milieu gastrique à pH 6,5 puis ajout des milieux intestinaux pré-concentrés, eux mêmes à pH 6,5: le milieu intestinal contrôle sans lipides ni sels biliaires (contrôle SIF), le milieu FaSSIF et le milieu FeSSIF. La composition de tous ces milieux est détaillée dans le chapitre 2.

3. Résultats

Les résultats *in vitro* (Figure 1) montrent que dans le milieu gastrique il n'y a pas de différence entre l'Indocid® et l'ES. 27 à 30% d'IND sont libérés au temps 55 minutes (Figure 1). En revanche, lors de l'introduction des milieux digestifs simulés pré-concentrés, des différences plus ou moins marquées sont observées en fonction du temps et du milieu d'incubation. Les pourcentages d'IND passée en solution sont plus importants avec l'ES qu'avec l'Indocid®. Ces différences sont plus marquées dans le milieu contrôle SIF dépourvu de lipides et de sel biliaire (Figure 1A) comparativement à celles observées dans ceux qui en contiennent (Figures 1B et 1C). Dans le FeSSIF, l'écart entre les deux formulations n'est pratiquement plus marqué dès les 180 minutes d'incubation, avec apparition d'un plateau (Figure 1C). Au temps 24 heures, il n'est

plus possible d'apprécier de différence entre l'Indocid® et l'ES, quel que soit le milieu (Figure 1).

L'ajout des milieux FaSSIF et FeSSIF qui contiennent du taurocholate de sodium augmente le passage en solution de l'IND pour les deux formulations, avec un effet plus marqué dans le FeSSIF (5 fois plus riche en sel biliaire), comparativement au milieu intestinal contrôle SIF (Figure 1).

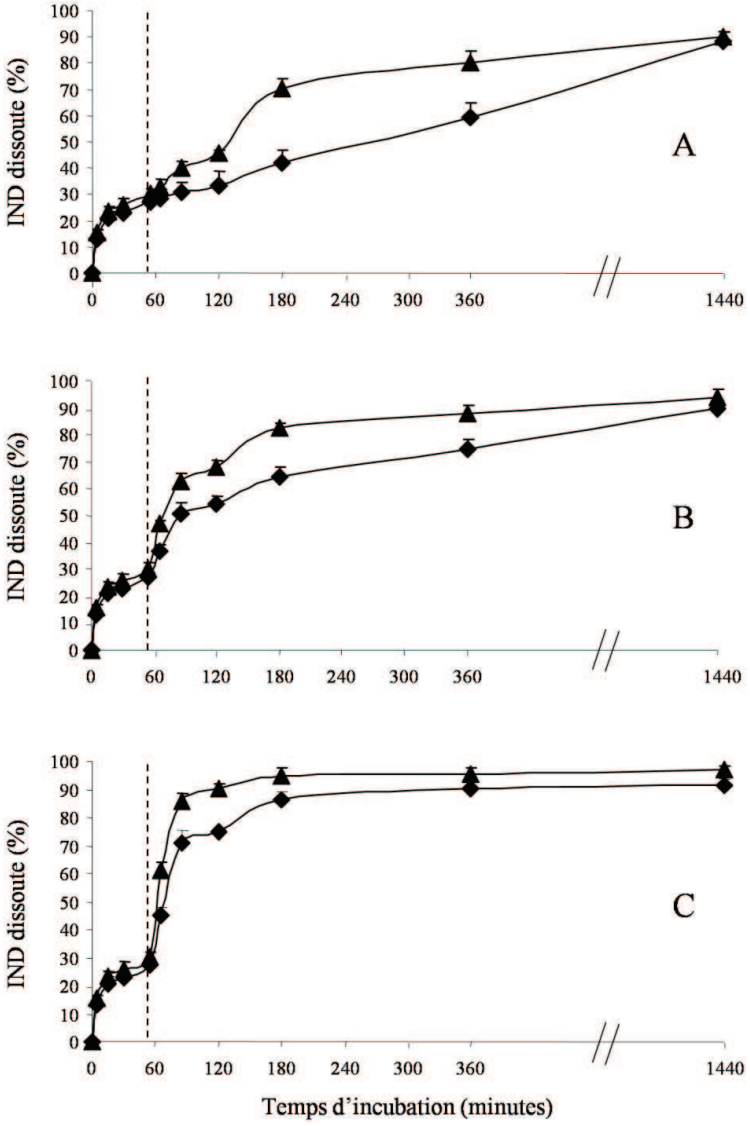


Figure 1. Cinétiques de passage en solution de l'IND à partir du contenu d'une gélule d'Indocid® (♦) et de l'ES (▲) dans les milieux digestifs simulés.

Ces deux formulations ont été incubées 55 minutes dans le milieu gastrique pH 6,5 puis dans les milieux : intestinal contrôle SIF (A), FaSSIF (B) et FeSSIF (C).

L'amélioration de la libération du PA, observée avec l'ES qui est une formulation lipidique, peut être expliquée par le fait que l'ES sous forme lyophilisée soit très riche en huile *(Bochot et al., 2007, Trichard et al., 2011)*, ce qui permet d'avoir de l'IND déjà en solution dans l'huile (3,1 ± 0,4 mg/ml dans l'huile de soja) même si l'ES est préparée à partir d'une suspension huileuse (115 mg/ml). De plus, dans les milieux digestifs, la dissolution rapide de l'α-CD libère les gouttelettes lipidiques contenant l'IND, ce qui permet une grande surface d'échange avec les milieux digestifs, notamment les sels biliaires, et accélère ainsi le passage en solution de l'IND.

4. Conclusion

Cette étude complémentaire a montré l'intérêt de la forme ES, comparativement à celle commerciale, l'Indocid®, pour améliorer la libération *in vitro* de l'IND.

Abréviations

CD : cyclodextrine

Contrôle SIF : Contrôle Simulated Intestinal Fluid

ES : émulsion sèche

IND : indométacine

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

Références

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J. L., Duchene, D. and Fattal, E. 2007. alpha-Cyclodextrin/oil beads: an innovative self-assembling system. *Int J Pharm,* 339, 121-129.

Trichard, L., Chaminade, P., Grossiord, J. L., Le Bas, G., Huang, N., Durand, D., Fattal, E. and Bochot, A. 2011. Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties *J Drug Del Sci Tech,* 21(2), 189-194.

Chapitre 4

Influence du mode de séchage sur les propriétés des billes, la libération de la molécule encapsulée et la stabilité des billes pendant leur conservation

Etude soumise à publication

Les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 ont montré que les billes nues lyophilisées étaient sensibles à l'action des sels biliaires présents dans les milieux digestifs simulés. Dans le chapitre 3, ces billes nues ont été entourées d'une coque externe d'α-CD dans le but d'augmenter leur résistance et par conséquent de prolonger la libération des molécules actives encapsulées. Dans le présent chapitre, le séchage à l'étuve des billes nues a été étudié. L'indométacine a été choisie comme molécule modèle de classe II. Des lots de billes nues, séchées à l'étuve, certaines non chargées et d'autres encapsulant du Rouge Nil ou de l'indométacine, ont été préparés puis caractérisés. Dans une première partie, la stabilité de ces billes nues, séchées, marquées au Rouge Nil, ainsi que le passage en solution de l'indométacine encapsulée, ont été évalués *in vitro* selon les mêmes méthodes que celles décrites dans les chapitres 2 et 3. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les billes nues lyophilisées, d'indométacine, rapportés dans le chapitre 3, afin de mettre en évidence le rôle du mode de séchage sur le comportement des billes dans les milieux digestifs simulés. Dans une seconde partie, il nous est aussi apparu nécessaire d'effectuer une étude approfondie de la stabilité des billes non chargées au cours du temps (séchées à l'étuve et lyophilisées) dans différentes conditions de stockage: en flacon fermé pendant 1 an à 25°C ou 6 mois à 40°C et en flacon ouvert pendant 1 an à 60% HR/25°C ou 6 mois à 75% HR/40°C. Cette étude a été menée en collaboration avec le Docteur Johanna Saunier (Equipe Matériaux et Santé EA 401, UFR de Pharmacie, Université Paris Sud 11). La stabilité des billes a été suivie de façon macroscopique (aspect, coloration des billes) ainsi que par les techniques d'analyse thermogravimétrique, de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et par détermination des indices d'acide et de peroxyde de l'huile extraite des billes.

Beads made of alpha-cyclodextrin and soybean oil: the drying method influences bead properties and drug release

M. C. Hamoudi[1], J. Saunier[2], C. Gueutin[1], E. Fattal[1], A. Bochot[1*]

[1]Univ Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Physico-chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

[2]Univ Paris-Sud, EA 401, Matériaux et Santé, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: amelie.bochot@u-psud.fr

Tel: 33146835579

Fax: 33146835946

Keywords: Beads; Cyclodextrins; Oil; Drying, Indomethacin, Release, Storage; Stability study.

Abstract

Freeze-dried beads made of α-cyclodextrin and soybean oil were reported previously as an efficient system for the oral delivery of lipophilic drugs. In the present study, oven-drying was evaluated as another method for drying beads. Oven-drying was optimised and the properties of the resulting beads were assessed. The behaviour of oven-dried beads and the release of indomethacin from these beads were evaluated *in vitro* in simulated gastrointestinal fluids and compared to those of FDB. The stability of freeze-dried and oven-dried unloaded beads stored at 25°C for 12 months and at 40°C for 6 months in closed and open vials was also studied by different techniques.

An oven-drying time of 6 hours at 25°C was chosen as optimal conditions. Oven-dried beads exhibited a sticky texture making them difficult to handle. They were harder, less fragile and smaller than the freeze-dried ones. The characteristics of oven-dried beads make them more resistant *in vitro* even in media containing bile salt. The rate of indomethacin release from oven-dried beads was much slower than that from the freeze-dried ones. Whatever the drying method, beads must be stored at room temperature protected from humidity. However, no products of oil degradation were detected with both kinds of beads.

This work clearly emphasised that the drying method of the beads had a strong influence on their properties, behaviour in simulated gastrointestinal fluids and drug release.

Keywords: Beads; Cyclodextrins; Oil; Drying, Indomethacin, Release, Storage; Stability study.

1. Introduction

In previous studies, we developed new lipid-based formulations based on cyclodextrins (CD) and oil [1-5]. Continuous external shaking of a mixture of an aqueous solution of α-CD and soybean oil for a few days results in well defined particles (1.6 ± 0.2 mm) in suspension in an aqueous medium with a yield of more than 80% [1]. The structure of the beads is constituted by a partially crystalline matrix of α-CD molecules surrounding micro-domains of oil [1]. Freeze-drying advantageously transforms the beads into dry particles in which the oil content reaches 80%wt and α-CD 20%wt [1]. Freeze-drying also facilitates ease of handling and use for oral administration [4,6]. Indeed, freeze-dried beads (FDB) are relevant to the oral administration of lipophilic molecules such as isotretinoin [4] and progesterone [6]. The release of drugs from FDB resulted from the erosion of their hydrophilic matrix by dissolution and its partition equilibrium between oily micro-droplets and the aqueous phase [6]. Previously, we demonstrated that bile salts greatly reduced the stability of FDB and increased the amount of drugs dissolved in simulated gastrointestinal fluids (SGIF) [6]. Freeze-drying is known to be a long and costly technique. For this reason, another drying process was investigated in the present study. Oven-drying is a simple, fast and reliable method and uses a fixed temperature. However, it has been widely reported that drying procedures may significantly affect structural and functional properties of some particulate drug delivery systems prepared from hydrophilic polymers and may modify drug release [7-15].

The aim of this study was first to optimise the conditions used to oven-dry the beads. Then, the properties of oven-dried beads (ODB) were assessed. Their behaviour and the release of indomethacin from the beads were evaluated *in vitro* in SGIF and compared to those of FDB. In a second part of this work, we studied the stability of freeze-dried and oven-dried unloaded beads stored at 25°C for 12 months and at 40°C for 6 months in closed and open vials according to International Conference on Harmonization recommendations [16].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Alpha-cyclodextrin (α-CD) (CAVAMAX® W6 Pharma) and refined soybean oil (Cropure®) were purchased from Wacker-Chimie (Lyon, France) and Croda (Trappes, France), respectively. Nile red, pepsin, indomethacin (IND), sodium chloride, sodium taurocholate (Na-TC), phenolphtalein, sodium thiosulfate, starch, potassium iodide, potassium hydroxide (KOH) and 37% hydrochloric acid were supplied from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Lecithin EPC was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sodium dihydrogen

phosphate was purchased from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). All the organic solvents used: methanol, tetrahydrofuran, acetonitrile, chloroforme, ether, ethanol and acetic acid, were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) and were of analytical grade.

2.2. Preparation of unloaded beads

Unloaded beads were prepared as described by Bochot *et al* [1] by adding 5.8 ml of soybean oil to 20 ml of Milli Q water containing 1.62 g of α-CD. The preparation was continuously shaken at 200 rpm in a gyratory shaker at 28°C for 3 days. They were subsequently washed by removing the dispersion medium with a pipette and replacing it by water which was then withdrawn.

2.3. Drying and characterisation of unloaded beads

2.3.1. Drying

Unloaded beads were either freeze-dried (FDB) for 48 h (Christ LDC-1 alpha1-4 freeze-dryer, Bioblock Scientific) as described previously [1] or oven-dried (ODB) in an air convection type oven thermostated at 25°C under atmospheric pressure. The time of drying in the oven was optimised. Portions of around 2 grams of undried washed beads were spread on petri dishes and placed in the oven. Each sample portion of beads was characterised at different times: 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 and 24 h.

2.3.2. Characterisation

The residual moisture (RM) after freeze-drying and oven-drying of beads at the different times was measured for 10 minutes at 150°C using an infrared analytical balance (Mettler AT 261 Delta Range).

The diameter of beads was measured on a sample of 50 ODB using an optical microscope (Leitz Diaplan microscope, Leica Microsystèmes, France) equipped with a Coolsnap ES camera (Roper Scientific). For each bead, two diameters were measured and an average of the two was calculated for more accuracy. Experiments were made in triplicate (n=3).

2.4. Preparation and characterisation of Nile red and indomethacin (IND)-loaded beads

2.4.1. Preparation

Nile red-loaded beads were prepared as described in a previous study [6] and washed following the above section procedure (section 2.2). The beads were then oven-dried at 25°C for 6 h.

IND-loaded beads were prepared as described in section 2.2 except that IND was dispersed in soybean oil (140 mg/ml). Half of the beads were oven-dried at 25°C for 6 h; the other half were freeze-dried for 48 h.

2.4.2. Characterisation

The diameter of loaded beads was determined on a sample of 50 beads as described in section 2.3.2.

Separation and quantification of IND were carried out by HPLC. Chromatographic separations were performed on a C18 Interchim® (modulo-cart QK Uptisphere 3 HDO 3 µm, 150 mm x 2.1 mm, Montluçons, France). The system was equipped with a mobile phase delivery pump (binary HPLC pump, Waters 515, Milford, USA), an auto sampler (Waters model 717 plus, Milford, USA), an on-line degasser, a column oven set at room temperature and a tunable absorbance UV detector (Waters model 486, Milford, USA). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and Milli Q water (70/30; v/v) acidified at pH 3.5 with acetic acid. The injection volume was set at 10 µl, the flow rate was 0.2 ml/minute and the absorbance measurement was performed at $\lambda = 265$ nm. The IND peak was identified on the chromatograms at a retention time of 6 minutes. Calibration curves were drawn up for IND from 0.25 to 100 µg/ml in the mobile phase.

IND was extracted from the beads by the following method: beads were weighed precisely (50 mg) and 5 ml of tetrahydrofuran were added to destroy the bead structure, followed by an equal volume of methanol (5 ml). The whole was then mixed at room temperature. 500 µl of the resulting solution were diluted (1/20) with the mobile phase and the drug content quantified by HPLC. For each batch of beads, the extraction was performed on two replicate samples. IND loading was calculated using the following equation:

$$\text{IND loading (mg of IND/g of beads)} = \frac{\text{amount of IND within beads}}{\text{weight of beads}}$$

2.5. Stability of OD Nile red-loaded beads in simulated gastro-intestinal fluids

The stability of OD Nile red-loaded beads in SGIF was determined using the apparatus 2 of the European Pharmacopeia (rotating paddle apparatus) as previously described [6]. One hundred ODB were introduced into 200 ml of SGF (simulated gastric fluid). After 55 minutes, 200 ml of pre-concentrated simulated intestinal fluid free of Na-TC and lecithin (pre-concentrated control SIF), pre-concentrated FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) and pre-concentrated

FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid) were added. The initially pre-concentrated media were thus diluted two-fold to yield the correct concentration. To facilitate the understanding of the results, we use the terms: control SIF, FaSSIF and FeSSIF for the SGF/ pre-concentrated control SIF, SGF/ pre-concentrated FaSSIF and SGF/ pre-concentrated FeSSIF mixtures (50/ 50; v/ v) respectively. Details of the composition of the simulated gastro-intestinal fluids used in this study were described previously [6]. Beads were collected at different time intervals : 5, 15, 30 and 55 minutes in SGF; 60, 70, 85, 120, 150, 180, 240, 360 and 1440 minutes in control SIF; 60, 70, 85, 120, 150, 180 and 240 minutes in FaSSIF and 60, 65, 70, 85 and 120 minutes in FeSSIF. One hundred OD Nile red-loaded beads were used for each time and each medium. All the experiments were carried out in triplicate. The proportion of residual OD Nile red-loaded beads and the determination of their percentage of remaining volume were performed as previously reported for FD Nile red-loaded beads [6].

2.6. Study of IND dissolution in SGIF

IND is a weakly acidic (pKa of 4.5) and poorly soluble drug with a very low solubility at pH 1.2 ($S_{IND\ in\ SGF\ pH1.2}$ = 3.66 ± 0.12 µg/ml). As a result of drug solubility limitations at pH 1.2, *in vitro* studies of IND release in SGIF were performed in SGF pH 6.5 ($S_{IND\ in\ SGF\ pH6.5}$ = 302 ± 21 µg/ml), FaSSIF ($S_{IND\ in\ FaSSIF\ pH6.5}$ = 684 ± 34 µg/ml) and FeSSIF ($S_{IND\ in\ FeSSIF\ pH6.5}$ = 2410 ± 114 µg/ml). *In vitro* dissolution studies of IND were performed in sink conditions in the SGIF, using the protocol reported in section 2.6 on the FD and OD IND-loaded beads. A sample portion of each formulation corresponding to 10 mg of IND was introduced into 200 ml of SGF pH 6.5, at 37°C, under stirring at a speed of 55 rpm. We verified previously that bead stability is not affected by pH. After 55 minutes, 200 ml of pre-concentrated control SIF, FaSSIF or FeSSIF were added. For each formulation, two samples of 1.5 ml were withdrawn at different times of incubation over 24 h and were immediately filtered through Millex-HV 0.45 µm filters. An equal volume of fresh SGIF at 37°C was then added to maintain a constant volume. All experiments were run in triplicate. The IND was assayed directly in the filtered samples, by HPLC (section 2.4.2).

2.7. Stability of FD and OD unloaded beads stored in different conditions

2.7.1. Storage conditions

The storage conditions (long-term and accelerated) of FD and OD unloaded beads are presented in Table 1. 0.5g of beads were placed either in a closed or an open vial in oven chambers with continuous and accurate maintenance and control over humidity and temperature.

Table 1. Storage conditions of FDB and ODB.

Conditions	Temperature (°C)	*RH (%)	Months
vial closed			
Long term	25 ± 2	-	1, 3, 6 and 12
Accelerated	40 ± 2	-	1, 2, 3 and 6
vial open			
Long term	25 ± 2	60 ± 5	1, 3, 6 and 12
Accelerated	40 ± 2	75 ± 5	1, 2, 3 and 6

*RH (relative humidity)

2.7.2. Macroscopic observation of beads

The macroscopic appearance of FDB and ODB during long-term and accelerated storage studies was observed at each time described in Table 1 in both closed and open vials. Special attention was paid to the color and the texture of the beads.

2.7.3. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric measurements were performed with a Perkin-Elmer TGA Q500 apparatus. Samples of beads were heated in a dynamic nitrogen atmosphere from 20 to 600°C at the rate of 20°C/minute. TGA was performed before storage and at the different times of the study (Table 1). The percentage of residual moisture (RM) of FDB and ODB in the different conditions of storage was expressed as mean ± standard deviation (n=3).

2.7.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The spectrometer apparatus was a Perkin Elmer Spectrum 2000 using the Attenuated Total Reflection (ATR) mode with a diamond crystal (Golden Gate-Specac). Each spectrum was taken with an accumulation of 8 scans in the range from 4000 to 550 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} for each sample. Data were analysed using the Spectrum IR software. This analysis was performed before storage and at the different times of the study (Table 1). All samples were measured in triplicate.

2.7.5. Acid and peroxide values

Acid and peroxide values were determined on oil extracted from beads recovered at each time (Table 1). For this, a sample of beads was weighed and introduced in 10 ml of chloroform and 1 ml of water. The whole was mixed to destroy the beads mechanically and dissociate lipids/α-CD complexes. A volume of approximately 7 ml of chloroform solution was removed and placed in a previously weighed conical flask. The solvent was evaporated under vacuum at room temperature. The residual oil was weighed and dissolved in 5 ml of a mixture of diethylether/ethanol (50/50, v/v). Fatty acid titration was performed with an ethanolic potassium hydroxide (KOH) solution (0.01 N) using phenolphthalein as indicator. The equivalent volume was recorded when the pink colour persisted for at least 5 minutes. Acid values (mg of KOH/g of oil) were expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Since linoleic acid is the major fatty acid in soybean oil [3], it was chosen as a reference to estimate the free fatty acids released after hydrolysis. The percentage (x %, w/w) of free fatty acids was calculated taking into account its molecular weight (280g/mol) and the acid value using the following equation:

$$\text{Free fatty acids (\%)} = \frac{(\text{Acid value x } 280)}{0.0561} \text{x}100$$

With:

280 = molecular weight of linoleic acid (g/mol)

$$0.0561 = \frac{\text{molecular weight of KOH (g/mol)}}{10^3}$$

Ten ml of a mixture of 2 volumes of chloroform and 3 volumes of glacial acetic acid were introduced into a flask that was shaken to dissolve the oil. 0.5 ml of a saturated potassium iodide solution was then added and after 1 minute of shaking, 10 ml of water were introduced to stop the reaction. The titration was performed with 0.01 M sodium thiosulfate solution which was poured slowly with continuous vigorous shaking, until the yellow colouring almost disappeared. 1 ml of starch solution was then added and the titration continued with vigorous shaking, until total disappearance of the colouring (n_1 ml of 0.01 M sodium thiosulfate). A blank test was carried out under the same conditions (n_2 ml of 0.01 M sodium thiosulfate). The volume of 0.01 M sodium thiosulfate solution used in the blank titration should not exceed 0.1 ml. Peroxide values (mEq O_2/kg) were expressed as mean ± standard deviation (n=3).

3. Results

3.1. Determination of the optimal conditions for oven-drying the beads

An air convection type oven was used at atmospheric pressure to dry the beads. The temperature of 25°C was chosen to limit the release of oil present in high amount (80% w/w) in the beads [1]. The time of drying was defined by tracking the residual moisture content (Figure 1). While the moisture content of undried beads was 70% [1], a constant value of 1.1 ± 0.3% was reached after 6 h of oven-drying (Figure 1) as obtained for FDB (Table 2). The initial diameter of the undried beads (1.70 ± 0.10 mm) decreased rapidly during the first hour of drying and then more slowly, until reaching a constant value of 1.30 mm after 6 h (Figure 1). A drying time of 6 h at 25°C was therefore chosen for the further studies.

Table 2. Determination of the residual moisture of beads (RM%), the percentage of free fatty acids and peroxide value of soybean oil extracted from FDB and ODB stored 12 months at 60% RH/ 25°C or 6 months at 75% RH/ 40°C in open vials (n=3).

	RM* (%)		Free fatty acids (%; w/w)		Peroxide value (mEq of O_2/kg)	
	FDB	ODB	FDB	ODB	FDB	ODB
Time 0	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.4 ±0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
60% RH/ 25°C / 12 months	16.0 ± 1.0	11.0 ± 1.0	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1
75% RH/ 40°C / 6 months	18.1 ± 1.2	14.6 ± 1.7	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	4.8 ± 0.1

*RM: residual moisture

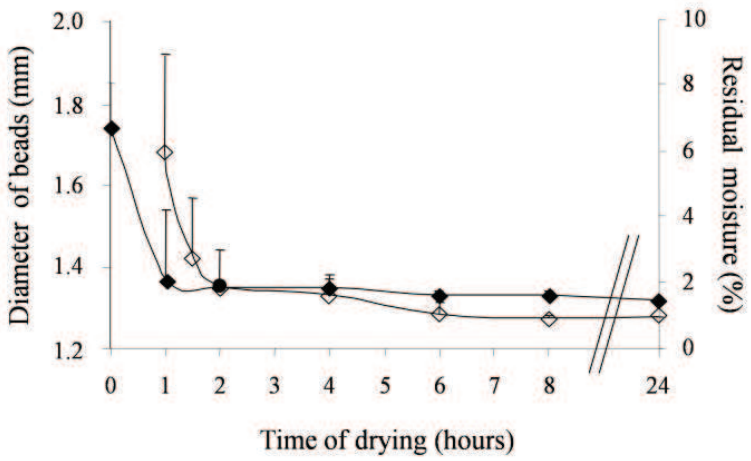


Figure 1. Evaluation of the mean diameter (♦) and the percentages of residual moisture (◊) of beads as a function of the time of drying in an oven thermostated at 25°C.

3.2. Characteristics of unloaded beads according to the drying procedure

The drying method had no effect on the pyramidal shape of the beads (Figure 2) but modify their texture, hardness and size. Compared to FDB, ODB were translucent (Figure 2), harder and less fragile. They also exhibited a sticky texture, tended to aggregate (Figure 2) and their diameter was reduced by 13% [6].

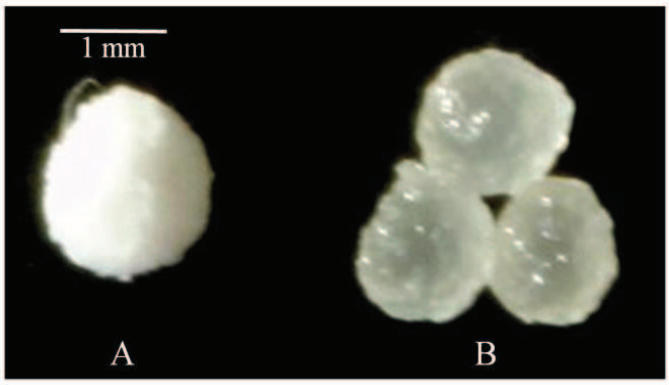


Figure 2. Photographs of FDB (A) and ODB (B).

3.3. Behaviour of OD Nile red-loaded beads in simulated gastro-intestinal fluids

After 55 minutes in SGF, the diameter of OD Nile red-loaded beads was unchanged (1.30 mm) while that of FD Nile red-loaded ones decreased (1.19 mm versus 1.60 mm before incubation). Ninety % of the ODB initially introduced in SGF were recovered compared to 82% [6] for FDB.

At this time, the volumes of the residual ODB were 92% of their initial volume and only 50% for FDB [6]. Whatever the medium introduced into the SGF (control SIF, FaSSIF and FeSSIF), the times to reduce by half the number and the volume of the residual ODB were always longer than those necessary for FDB (Table 3). The total disintegration of ODB occurred later than for FDB (Table 3) in FaSSIF and FeSSIF. However, the stability of ODB and FDB was greater in control SIF than in FaSSIF and FeSSIF.

Table 3. Times required to reach 50% and 0% of the initial number and 50% of the initial volume of OD and FD* Nile red-loaded beads. ODB were incubated 55 minutes in SGF before addition of control SIF, FaSSIF and FeSSIF.

		Number of residual beads		Diameter of residual beads	Volume of residual beads
		50%	0%	50%	50%
Control SIF	ODB	240 to 360 min	1440 min	960 to1440 min	240 to 360 min
	FDB	*180 min*	*1440 min*	*960 min*	*55 min*
FaSSIF	ODB	150 to 180 min	240 min	180 to240 min	85 to 120 min
	FDB	*85 to 120 min*	*180 min*	*150 min*	*55 min*
FeSSIF	ODB	70 to 85 min	120 min	85 to120 min	60 min
	FDB	*60 min*	*70 min*	*60 min*	*55 min*

*values in *italics* are adapted from [6].

3.4. Study of the IND dissolution in SGIF

The study of the dissolution of IND in SGIF was performed on FD (1.70 mm) and OD (1.40 mm) IND-loaded beads. IND loading was 98 mg IND/g of dried beads. In all media, the rate of IND release from FDB (Figure 3A) was much faster than that from the ODB (Figure 3B). Only 7% of IND was dissolved from ODB after 55 minutes in SGF (Figure 3B) against 27% with FDB (Figure 3A). With both formulations, dissolution was more rapid and the total dissolution was greater in FeSSIF compared to FaSSIF while it was slower and less extensive in control SIF (Figure 3). However, with ODB, 60% of IND was dissolved in FeSSIF at 24 h while almost 100% was reached after 180 min with FDB.

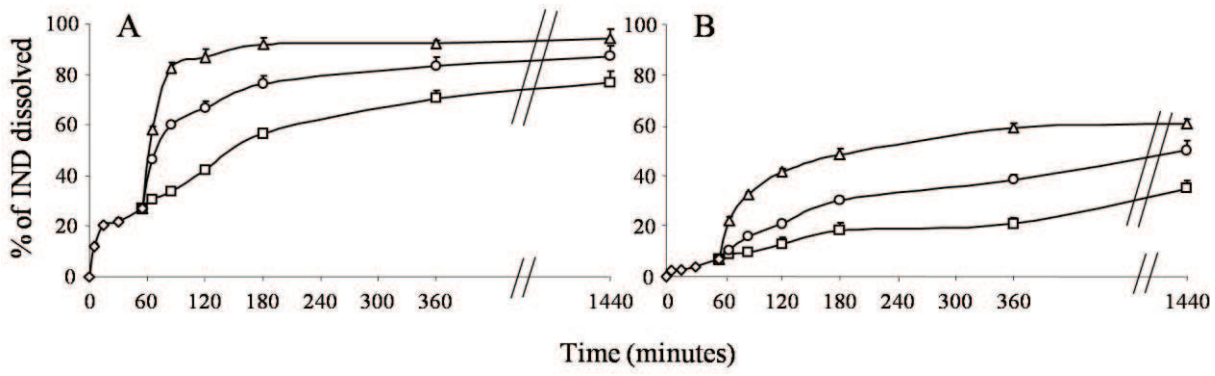


Figure 3. IND dissolved (%) from FDB (A) and ODB (B). Formulations were incubated 55 minutes in SGF (◊) before addition of control SIF (□), FaSSIF (○) and FeSSIF (Δ).

3.5. Stability of FD and OD unloaded beads stored in different conditions

At the end of the stability study, no rancid odour was detected in any of the samples. However, a yellow coloration was observed on beads stored in open vials (Figure 4). Whatever the storage conditions, FDB were less coloured than ODB. A more pronounced effect was seen on ODB kept at 75% RH/40°C (Figure 4). It was still possible to handle FDB stored in closed vials, while those kept in open vials tended to agglomerate. ODB (closed and open vials) showed an even greater tendancy to agglomerate, and were greasy to the touch (Figure 4).

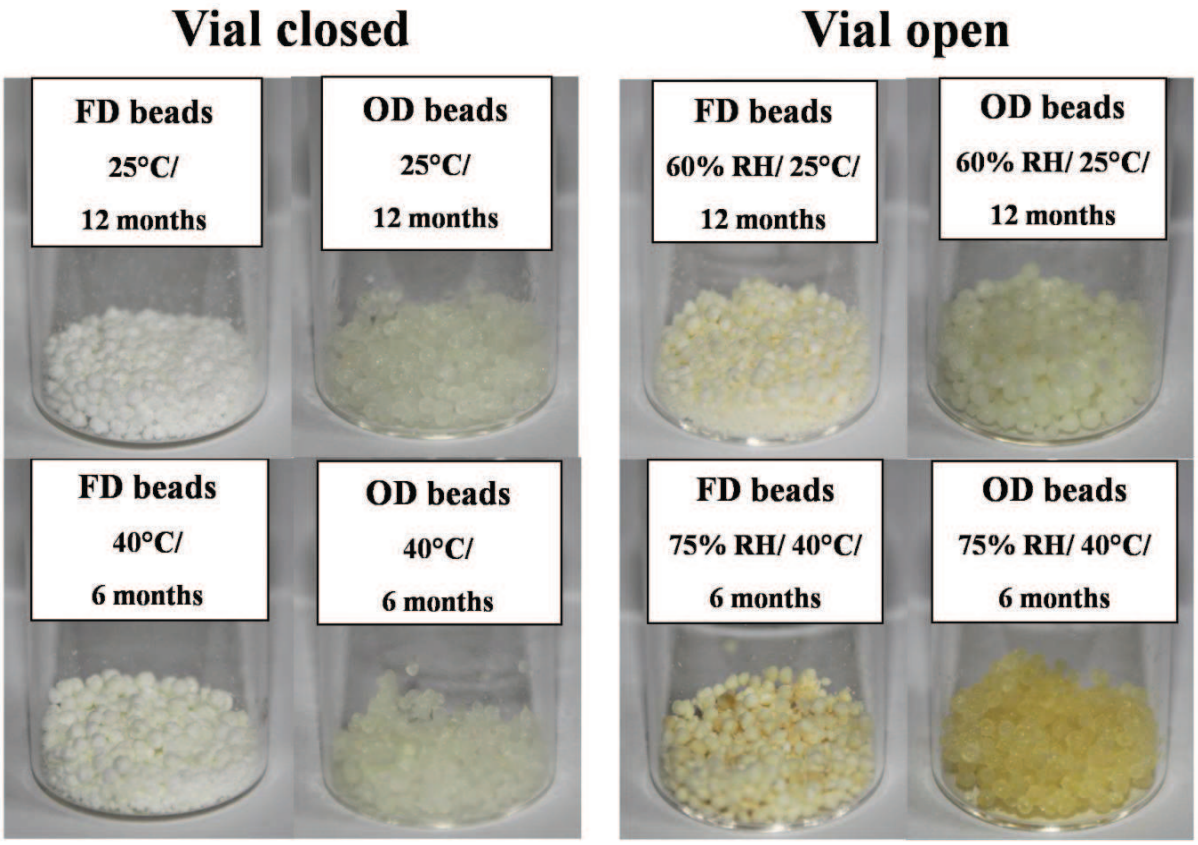


Figure 4. Photographs of FDB and ODB after storage for 12 months at 25°C and 6 months at 40°C in vials closed and open.

Thermogravimetric analysis was first used to quantify the amount of water absorbed by beads (residual moisture of beads (RM %)) when they were stored in open vials (Table 2). FDB absorbed more water (14 to 18%) than ODB (11 to 14.6%) (Table 2). Oil was extracted from beads in order to verify whether or not it had been altered by water uptake. Degradation products were sought by TGA and FT-IR and free fatty acid and peroxide levels were measured. No degradation product was detected by TGA and FT-IR. All the samples exhibited thermograms and spectra comparable to those of the controls presented in Figures 5C and 5D. Thermogram in Figure 5A (solid lines) showed the dehydration of α-CD molecules between 30 and 110°C and their degradation between 280 and 400°C. Figure 5A (dotted lines) demonstrated that soybean oil is degraded between 300 and 500°C.

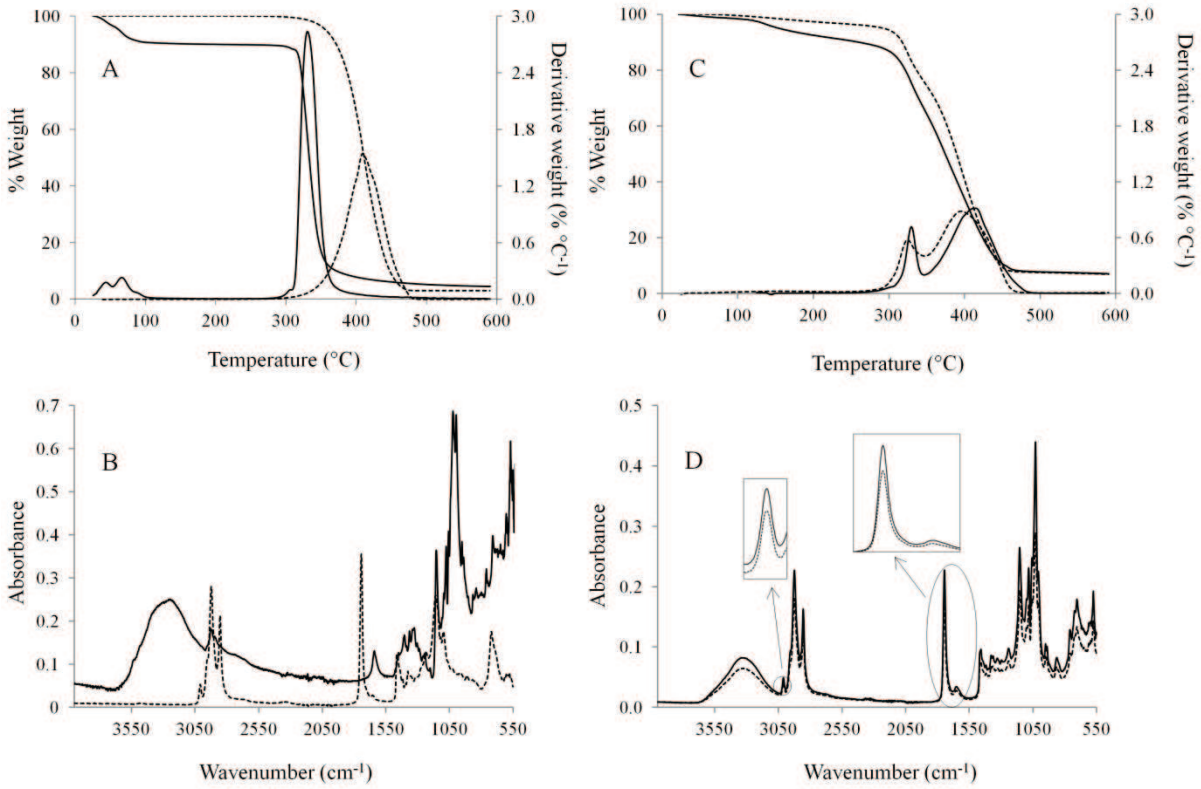


Figure 5: Thermograms (A and C) obtained by TGA showing the weight loss of the sample expressed as a percentage of the original sample weight and the first derivative of percent weight loss with respect to temperature. FT-IR spectra (B and D) of the samples from 4000 to 550 cm^{-1}. Figures (A) and (B) represent thermograms and FT-IR spectra obtained with α-CD (solid lines) and soybean oil (dotted lines) used to prepare the beads. Figures (C) and (D) represent thermograms and FT-IR spectra obtained with FDB (solid lines) and ODB (dotted lines) stored for 6 months at 75% RH/40°C.

In open (Table 2) and closed vials (Table 4), only a very minor hydrolysis of the triglycerides (<1%) of soybean oil extracted from FDB and ODB occurred while a moderate increase of the peroxide values was noted, especially with the ODB compared to the FDB (Table 4).

Table 4. Determination of the percentage of free fatty acids and peroxide value of soybean oil extracted from FDB and ODB stored for 12 months at 25°C or 6 months at 40°C in closed vials (n=3).

	Free fatty acids (%; w/w)		Peroxide value (mEq of O_2/kg)	
	FDB	ODB	FDB	ODB
Time 0	0.4 ±0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
25°C /12 months	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2
40°C /6 months)	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	4.2 ± 0.2

Discussion

The aim of this work was to study the influence of the drying method on the bead characteristics, IND release and stability both in SGIF and during the storage. Compared to freeze-drying, oven-drying offers a faster drying kinetics (8-fold shorter) leading to energy saving with low operative costs.

In this study, we demonstrated that the stability of beads and the % of IND dissolved in SGIF are strongly related to the drying procedure. Indeed, although ODB are initially smaller, they are more resistant in SGIF and release more slowly IND than from FDB. These findings could be explained by the properties of ODB. Oven-drying allows the solid material to shrink by capillary pressure because of the high surface tension of water. The shrinking process leads to densification [10,12,15,17-18]. It may explain why the size of ODB decreased during the drying and why they are harder, denser and less porous than FDB as previously reported for chitosan-lysine beads (*Kumari et al* [13]). Beads are constituted by oily droplets dispersed in a partially crystalline matrix of α-CD molecules [1]. The densification of the hydrophilic matrix during the oven-drying may also cause the exudation of the oil located close to the surface of the beads giving them a sticky texture. By contrast, during freeze-drying, the direct evaporation of the expanded ice without passing through the liquid state [10,15,17-18] significantly reduces the shrinkage of the beads to produce particles with almost unchanged diameter [1] (1.6 mm instead of 1.7 mm). Moreover, freeze-drying increases the porosity of dried formulations [13,19-22]. In a previous study, we showed that FDB undergo a hydration step in contact with SGF followed by a progressive dissolution of α-CD molecules from the surface [6]. The erosion of FDB induces the release of micro-droplets of oil containing the drug which is then released from the oil according to its partition coefficient value in the SGIF [6]. The presence of a thin layer of oil at the surface of ODB makes them more

hydrophobic and probably reduces their affinity for water. Thus, the penetration of SGF into the hydrophilic matrix of the beads is delayed explaining why the diameter of ODB remains unchanged in this medium and the percentage of IND released is only 7%. The lower porosity of ODB compared to that of FDB may also participate to slow the penetration of SGIF into the beads followed by their erosion and IND release. The oven-drying clearly increases the resistance of the beads in SGIF even in media (FaSSIF and FeSSIF) containing Na-Tc. For a given time of incubation, as the matrix of ODB is less eroded, it is less rapidly affected by the surfactant properties of Na-Tc involved in the extraction of the oily droplets, the fragmentation of the beads and the release of IND from oil [6]. In addition, even when all the ODB are fragmented (24h) the percentage of IND dissolved does not exceed 60% in FeSSIF. This is due to non-degraded fragments of beads that still act as reservoirs of IND as long as their α-CD matrix is not totally dissolved. Compared to FDB, ODB behave as a sustained drug delivery system.

The second aim of this work was to evaluate the impact of different conditions of storage on the stability and the properties of ODB and FDB. The changes in colour and in texture observed when all the beads are exposed to humidity is related to the uptake of water by α-CD, which are hydrophilic molecules. The higher porosity of FDB makes them more sensitive to humidity than ODB. The exudation of oily droplets to the surface of the ODB may partly explain their more pronounced yellow coloration and the difficulty to separate and handle them compared to FDB stored in the same conditions. However, with both FDB and ODB, no products of oil degradation were detected by FT-IR, nor by TGA. FT-IR spectroscopy studies reported in the literature showed that it was possible to follow the degradation caused by autoxidation of oils using this technique [23-25]. The spectrum of a non-degraded oil is composed of various bands including bands corresponding to CH stretching absorption between 3050 and 2800 cm^{-1} (cis C=CH, CH_2, CH_3 and CH_2/CH_3 stretching bands) and a carbonyl absorption of the triglyceride ester linkage (COOR) at 1744 cm^{-1}. After oil degradation, it is possible to highlight the formation of free fatty acids characterised by a stretching band of carbonyl function (C = O) around 1710 cm^{-1} [24-25]. Moreover, the disappearance of the cis C = C is well known after lipid oxidation under mild conditions [25]. The analysis of old FDB (stored 10 years) by FT-IR spectroscopy, highlights the degradation of their oil. The spectrum showed the total disappearance of CH stretching absorption band at 3009 cm^{-1} and changes in the absorption band corresponding to the carbonyl of the triglyceride ester linkage one including the appearance of a new band at 1710 cm^{-1} and other carbonyl bands between 1740 and 1710 cm^{-1}. This degradation is neither observed with FDB nor with ODB stored for 6 months at 75% RH/40°C which is consistent with the low

percentages of free fatty acids measured (< 1%). A preliminary study showed that the sensitivity of the TGA technique was not sufficient to detect percentages of free fatty acids < 2.5% and once this detection threshold exceeded, a shoulder in the derivative of percent weight loss curve that corresponds to a degradation product appears. Moreover, the comparison of thermograms in Figures 5A and 5C shows that the loss of water from α-CD molecules occurs between 30 and 110 °C while this loss is delayed after 100°C with both FDB and ODB. Peaks observed between 30 and 110 °C on the derivative curve of α-CD molecules correspond to their dehydration which could be summurised as follows referring to Berbenni *et al* : (i) surface water (around 1%), (ii) water molecules bonded interstitially to the α-CD (around 6.5%) and (iii) water molecules held in the α-CD cavity (around 2.8%) [26].

The percentages of free fatty acids and peroxide values remain close to or lower than those recommended for refined oils by the Food and Agriculture Organisation: acid value of 0.6 mg KOH/g which corresponds to 0.3% of free fatty acids and peroxide value of 10 mEq of O_2/kg [27-28].

Conclusion

This study emphasizes that the drying method of the beads has a strong effect on their properties (bead diameter, texture, porosity) but also on their behaviour in SGIF and on drug release. Compare to freeze-drying, oven-drying decreases the rate of drying and increases the resistance of the beads in SGIF. The main limitation of this technique is that it causes an exudation of the oil at the surface of the beads making them difficult to handle. The drying method is a useful tool for modulation of drug release from the beads. Oven-drying results in slow and sustained drug release compared to freeze-drying. Whatever the drying method, beads must be stored at room temperature and protected from humidity.

ABBREVIATIONS

CD : cyclodextrin

FAO : Food and Agriculture Organisation

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FDB : freeze-dried bead

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

FT-IR : Fourier transform infrared spectroscopy

IND : Indomethacin

Na-TC : sodium taurocholate

ODB : oven-dried bead

RH : relative humidity

RM : residual moisture

SGF : Simulated Gastric Fluid

SGIF : Simulated Gastro-Intestinal Fluids

SIF : Simulated Intestinal Fluids

TGA : Thermogravimetric Analysis

REFERENCES

1. Bochot A, Trichard L, Le Bas G, Alphandary H, Grossiord JL, Duchene D, Fattal E. Alpha-Cyclodextrin/oil beads: an innovative self-assembling system. Int J Pharm 2007;339(1-2):121-129.
2. Trichard L, Fattal E, Le Bas G, Duchene D, Grossiord JL, Bochot A. Formulation and characterisation of beads prepared from natural cyclodextrins and vegetable, mineral or synthetic oils. Int J Pharm 2008;354(1-2):88-94.
3. Trichard L, Chaminade P, Grossiord JL, Le Bas G, Huang N, Durand D, Fattal E, Bochot A. Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties. J Drug Del Sci Tech 2011;21(2):189-194.
4. Trichard L, Fattal E, Besnard M, Bochot A. Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. J Control Release 2007;122(1):47-53.
5. Trichard L, Delgado-Charro MB, Guy RH, Fattal E, Bochot A. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. Pharm Res 2008;25(2):435-440.
6. Hamoudi M, Fattal E, Gueutin C, Nicolas V, Bochot A. Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: in vitro studies in simulated gastro-intestinal fluids. Int J Pharm 2011;416(2):507-514.
7. Dyer AM, Khan KA, Aulton ME. Effect of the drying method on the mechanical and drug-release properties of pellets prepared by extrusion-spheronisation. Drug Dev Ind Pharm 1994;20:3045-3068.
8. Kedzierewicz F, Lombry C, Rios R, Hoffman M, Maincent P. Effect of the formulation on the in-vitro release of propranolol from gellan beads. Int J Pharm 1999;178(1):129-136.
9. Habib YS, Augsburger LL, Shangraw RF. Production of inert cushioning beads: effect of excipients on the physicomechanical properties of freeze-dried beads containing microcrystalline cellulose produced by extrusion-spheronization. Int J Pharm 2002;233(1-2):67-83.
10. Gomez-Carracedo A, Souto C, Martinez-Pacheco R, Concheiro A, Gomez-Amoza JL. Microstructural and drug release properties of oven-dried and of slowly or fast frozen freeze-dried MCC-Carbopol pellets. Eur J Pharm Biopharm 2007;67(1):236-245.
11. Auriemma G, Del Gaudio P, Barba AA, d'Amore M, Aquino RP. A combined technique based on prilling and microwave assisted treatments for the production of ketoprofen controlled release dosage forms. Int J Pharm 2011;415(1-2):196-205.
12. Kleinebudde P. Shrinking and swelling properties of pellets containing microcrystalline cellulose and low substituted hydroxypropylcellulose. II: Swelling properties. Int J Pharm 1994;109:221-227.
13. Kumari K, Kundu PP. Effect of drying processes and curing time of chitosan-lysine semi-IPN beads on chlorpheniramine maleate delivery. J Microencapsul 2009;26(1):54-62.
14. Lutchman D, Dangor CM, Perumal D. Formulation of rate-modulating pellets for the release of ibuprofen: an extrusion-spheronization process. J Microencapsul 2005;22(6):643-659.
15. Gomez-Carracedo A, Souto C, Marti Nez-Pacheco R, Concheiro A, Gomez-Amoza JL. Incidence of drying on microstructure and drug release profiles from tablets of MCC-lactose-Carbopol and MCC-dicalcium phosphate-Carbopol pellets. Eur J Pharm Biopharm 2008;69(2):675-685.
16. Grimm W. Extension of the International Conference on Harmonization Tripartite Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products to countries of climatic zones III and IV. Drug Dev Ind Pharm 1998;24(4):313-325.
17. Bashaiwoldu AB, Podczeck F, Newton JM. A study on the effect of drying techniques on the mechanical properties of pellets and compacted pellets. Eur J Pharm Sci 2004;21(2-3):119-129.
18. Song B, Rough SL, Wilson DI. Effects of drying technique on extrusion-spheronisation granules and tablet properties. Int J Pharm 2007;332(1-2):38-44.
19. Patel VR, Amiji MM. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. Pharm Res 1996;13(4):588-593.
20. Balaxi M, Nikolakakis I, Malamataris S. Preparation of porous microcrystalline cellulose pellets by freeze-drying: effects of wetting liquid and initial freezing conditions. J Pharm Sci 2010;99(4):2104-2113.
21. Grinberg O, Binderman I, Bahar H, Zilberman M. Highly porous bioresorbable scaffolds with controlled release of bioactive agents for tissue-regeneration applications. Acta Biomater 2010;6(4):1278-1287.
22. Balaxi M, Nikolakakis I, Kachrimanis K, Malamataris S. Combined effects of wetting, drying, and microcrystalline cellulose type on the mechanical strength and disintegration of pellets. J Pharm Sci 2009;98(2):676-689.
23. Lanser AC, List GR, Holloway RK, Mounts TL. FTIR estimation of free fatty acid content in crude oils extracted from damaged soybeans. J Am Oil Chem Soc 1991;68:448-449.
24. Ismail AA, Van de Voort FR, Emo G, Sedman J. Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy. J Am Oil Chem Soc 1993;70:335-341.
25. Van de Voort FR, Ismail AA, Sedman J, Emo G. Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. J Am Oil Chem Soc 1994;71:243-253.
26. Berbenni V, Marini A, Bruni G. Thermogravimetric study of the dehydration process of α-cyclodextrin: comparison between conventional and high-resolution TGA. Thermochim Acta 1998;322:137-151.

27. FAO (food ans agriculture organization) Corporate Document Repository. Report of the Sixteenth Session of the Codex Committee on Fats and Oils. Appendix II: Draft Standard for Named Vegetable Oils (At Step 8 of the Procedure). Available at: http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X1736E/x1736e0a.htm#bm10.2. Accessed on 22 february 2012.
28. Karleskind A. Manuel Des Corps Gras. Paris: Lavoisier Tec and Doc.1992:2 vol 1-1579.

Chapitre 4: annexe

1. Introduction

Dans le chapitre 4, nous avons vu que le mode de séchage avait une influence sur les caractéristiques ainsi que la stabilité des billes. Le séchage des billes à l'étuve a permis d'améliorer leur stabilité *in vitro* dans les milieux digestifs simulés et de ralentir ainsi la libération de l'IND encapsulée. Cette caractéristique serait intéressante pour la formulation de PA gastro-sensibles ou gastro-irritants par exemple. En revanche, les billes séchées exsudent de l'huile, ce qui leur confère un toucher gras et une tendance à rester collées les unes aux autres. Afin de pallier cet inconvénient, nous avons coqué les billes nues selon la méthode utilisée et décrite dans le chapitre 3, avant de les sécher à l'étuve (6h à 25°C). La présence d'une couche hydrophile d'α-cyclodextrine à leur surface, pourrait à la fois améliorer leur texture et faciliter leur manipulation, mais aussi augmenter encore davantage leur stabilité dans les fluides digestifs comme cela a été montré dans le chapitre 3.

Une étude de stabilité sur des billes coquées séchées (BCS), marquées au Rouge Nil, est présentée dans cette annexe et les résultats sont comparés à ceux obtenus avec les billes nues séchées (BNS) dans les mêmes conditions (chapitre 4).

2. Matériel et méthodes

Des billes coquées marquées au Rouge Nil ont été préparées et séchées à l'étuve selon les modes opératoires décrits dans les chapitres 3 et 4 respectivement. Une étude de stabilité *in vitro* de ces billes a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans les chapitres 2, 3 et 4. Les billes ont été incubées 55 minutes dans le milieu gastrique avant l'ajout des milieux intestinaux pré-concentrés: contrôle SIF sans lipides ni sels biliaires et FeSSIF.

3. Résultats et discussion

3.1. Effet de l'ajout d'une coque d'α-CD sur les caractéristiques des billes

Le séchage à l'étuve de billes coquées non chargées en PA, dans les conditions optimales décrites dans le chapitre 4, a permis d'obtenir des billes avec un diamètre plus important (1,5 mm) que celui des BNS (1,3 mm) et proche de celui des billes nues lyophilisées (BNL) (1,6 mm). Les BCS exsudent moins d'huile, sont moins collantes, plus faciles à manipuler et leur aspect translucide est moins marqué, comparativement à celui des billes nues décrites dans le chapitre 4 (Figure 1).

Cette augmentation de taille couplée à une amélioration des propriétés macroscopiques des BCS confirme bien l'association de molécules d'α-CD à la surface des billes, tel que cela a été décrit dans le chapitre 3.

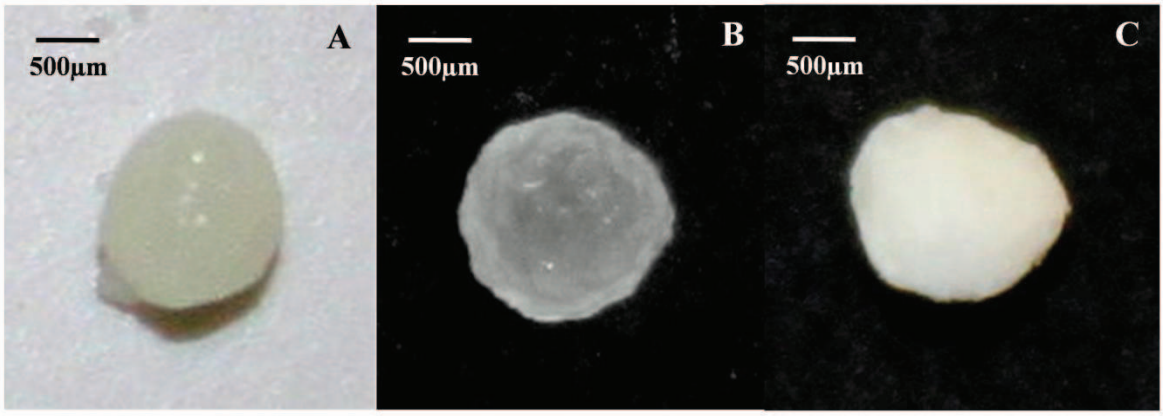


Figure 1. Photographies d'une BNS (A), d'une BCS (B) et d'une BNL (C).

3.2. Effet de la coque d'α-CD couplée au séchage, sur le comportement des billes dans les milieux digestifs simulés

Après un séjour de 55 minutes dans le milieu gastrique, pour un même faible pourcentage d'érosion des billes (2-3%), 100% des BCS sont récupérées alors que les BNS présentent une diminution de 12% de leur nombre initial (Figure 2).

Avec les deux types de billes, l'effet du taurocholate de sodium sur leur stabilité apparaît clairement dès les premières minutes suivant l'ajout du FeSSIF pré-concentré. En effet, le nombre de billes et leur diamètre sont nettement réduits dans ce milieu (Figures 2C et 2D), comparativement aux résultats obtenus dans le milieu contrôle sans lipides ni sels biliaires (Figures 2A et 2B), avec un effet plus marqué sur les BNS par rapport aux BCS (Figure 2). En effet, la présence de la coque permet de protéger les billes plus longuement (4 heures de plus comparativement aux BNS) et plus efficacement de l'action du taurocholate de sodium (Figures 2C et 2D).

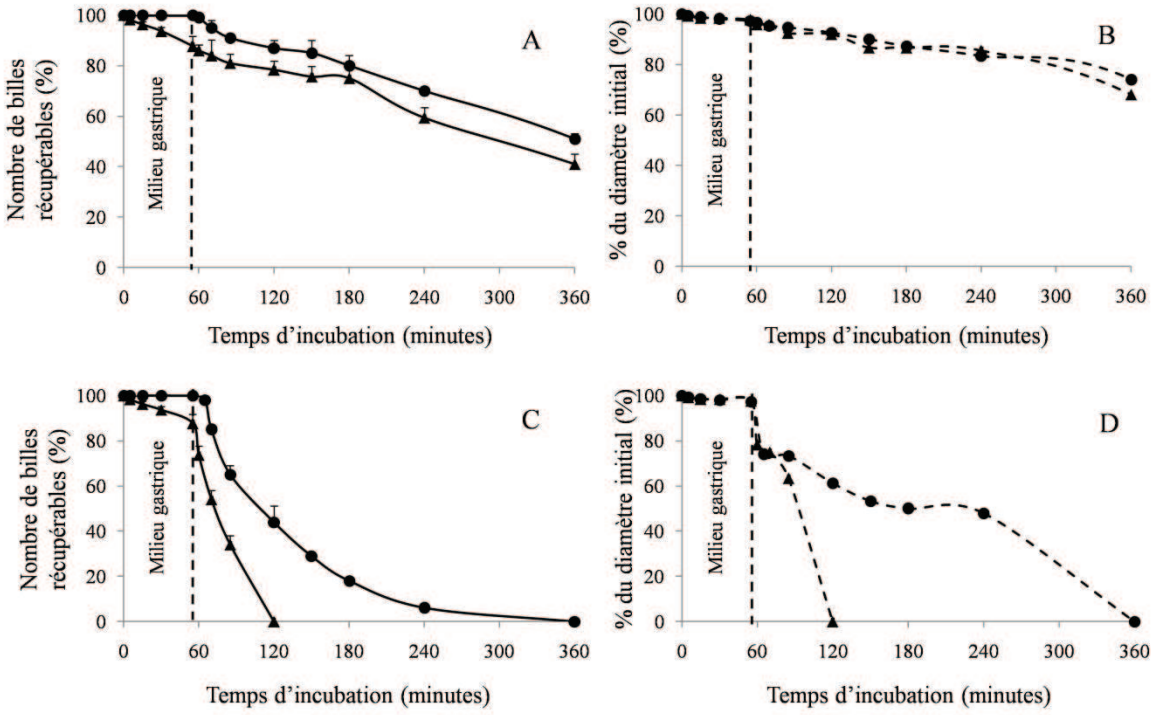


Figure 2. Nombre (traits pleins) et pourcentage du diamètre initial (pointillés) des billes marquées au Rouge Nil récupérées, en fonction du temps d'incubation: 55 minutes dans le milieu gastrique seul puis ajout des milieux intestinaux pré-concentrés: le milieu contrôle SIF sans lipides ni sels biliaires (A et B) et le milieu FeSSIF (C et D): comparaison des BNS (▲) avec les BCS (●). Le séchage des billes est effectué à l'étuve à 25°C pendant 6 heures.

Conclusion

Cette étude montre que l'ajout d'une coque d'α-CD autour de billes qui sont ensuite séchées à l'étuve, diminue l'aspect gras et collant des BNS, observé dans le chapitre 4, tout en augmentant leur résistance dans les milieux digestifs.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Chaque article publié ou soumis ayant déjà fait l'objet d'une discussion propre des résultats obtenus, nous ne discuterons ici que les points qui ne l'ont pas été précédemment, en considérant l'ensemble des principaux résultats.

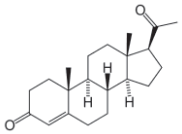
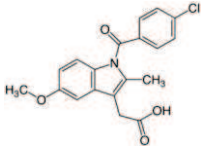
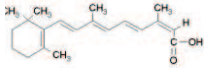
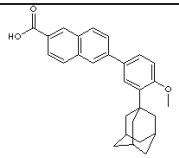
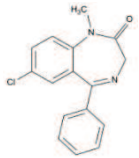
L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer *in vitro* et *in vivo* le potentiel et le comportement de billes d'α-CD et d'huile de soja, pour l'administration par voie orale de molécules actives peu solubles dans l'eau.

Dans un premier temps, nous avons souhaité savoir si le procédé d'encapsulation mis en œuvre lors de la fabrication des billes nues était applicable à des PA autres que les rétinoïdes et le diazépam qui sont des molécules actives à faibles doses. Pour cela, nous avons sélectionné des molécules modèles, actives à fortes doses (progestérone (PG) et indométacine (IND)). Dans un second temps, une coque d'α-CD a été formée autour des billes nues et une technique de séchage, autre que la lyophilisation, a été évaluée (séchage à l'étuve). L'objectif des deux stratégies mises en œuvre visait à modifier le comportement des billes par voie orale afin de disposer d'un système galénique modulable en fonction de l'objectif recherché, en termes de stabilité et de libération dans les milieux digestifs. L'impact de ces deux évolutions sur les caractéristiques, le comportement des billes ainsi que sur la libération d'un PA encapsulé sera comparé et discuté.

1. Potentialités des billes nues pour l'encapsulation de PA peu solubles dans l'eau (Chapitre 1)

A la suite des travaux de thèse de Laury TRICHARD *(Trichard, 2007)*, nous avons pu encapsuler dans les billes, la PG et l'IND, molécules modèles de classe II selon la classification biopharmaceutique *(ElShaer et al., 2011, Miller et al., 2011)*. La PG a été choisie pour sa solubilité dans l'huile de soja, supérieure à celle des rétinoïdes (Tableau 1). De plus, elle est simple à quantifier. L'IND est un dérivé d'indole méthylé de la classe des acides arylalcanoïques (pKa = 4,5), sensible aux variations de pH et un anti-inflammatoire non stéroïdien. La solubilité de l'IND dans l'huile de soja est environ 6 fois plus faible que celle de la PG (Tableau 1). PG et IND sont généralement utilisées à des doses unitaires respectivement de 100 et 200 mg et de 25 et 75 mg *(Thériaque)*. Les caractéristiques des billes nues lyophilisées (BNL) chargées en PG ou IND, ont été comparées à celles des billes d'isotrétinoïne *(Trichard, 2007, Trichard et al., 2007)*, d'adapalène *(Trichard, 2007, Trichard et al., 2008)* et de diazépam *(Oudinet, 2005-2006)* étudiées précédemment par Trichard et Oudinet (Tableau 1).

Tableau 1: Principales caractéristiques des billes nues lyophilisées chargées en progestérone (*Chapitre 1*), indométacine (*chapitre 3)*, isotrétinoïne *(Trichard, 2007, Trichard et al., 2007)*, adapalène *(Trichard, 2007, Trichard et al., 2008)* et diazépam *(Oudinet, 2005-2006)* et caractéristiques physico-chimiques de ces molécules.

	progestérone		indométacine	isotrétinoïne	adapalène		diazépam	
								
Solubilité dans l'huile de soja (mg/ml)	18		3	4	0,086		12	
Solubilité dans l'eau (mg/ml)	$8\ 10^{-3}$		$0{,}9\ 10^{-3}$ *(DrugBank)*	$5\ 10^{-3}$ *(DrugBank)*	$4\ 10^{-6}$ *(DrugBank)*		0,05 *(DrugBank)*	
log P $_{(octanol/eau)}$	4		3,4 *(DrugBank)*	4,2 *(DrugBank)*	8,6 *(DrugBank)*		2,9 *(DrugBank)*	
[PA] dans l'huile de soja (mg/ml)	15 (solution)	140 (suspension)	140 (suspension)	4 (solution)	0,086 (solution)	4,3 (suspension)	6 (solution)	60 (suspension)
Temps de fabrication (jours)	4	10	9	7	7	7	7	7
Rendement de fabrication (%)	80 ± 3	65 ± 5	79 ± 1	88 ± 2	87 ± 2	90 ± 4	87 ± 3	74 ± 5
Diamètre des billes (mm)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Rendement d'encapsulation du PA (%)	86 ± 3	63 ± 2	69 ± 5	86 ± 4	98 ± 1	96 ± 4	87 ± 4	56 ± 2
Teneur en PA (mg/g de billes lyophilisées)	13 ± 1	90 ± 14	98 ± 4	3,4 ± 0,2	0,080 ± 0,003	3,4 ± 0,2	5 ± 1	38 ±2

Tout comme l'isotrétinoïne *(Munoz Botella et al., 1996)*, la PG *(Uekama et al., 1982)* et l'IND *(Wulff and Alden, 1999)* ne forment pas de complexes d'inclusion avec l'α-CD (pas de données à notre connaissance concernant l'adapalène et le diazépam dans la littérature). L'absence de formation de complexe d'inclusion entre le PA ou toute autre molécule exogène et l'α-CD est une condition nécessaire à la formation des billes. En effet, il est indispensable d'éviter une compétition entre le PA et les triglycérides (TG) de l'huile pour la cavité de l'α-CD, afin de ne pas bloquer la formation des billes, comme cela a été montré lorsque de l'acide oléique *(Trichard et al., 2011)* ou du camphre (résultats non publiés) sont ajoutés à l'huile de soja. Ces deux molécules forment des complexes avec l'α-CD *(Szente et al., 1993, Yu et al., 2001)*. Ce pré-requis constitue une limite dans la sélection des PA pouvant être encapsulés dans les billes. Cependant, cela n'exclut qu'un faible nombre de molécules puisque peu d'entre elles sont capables de s'inclure dans la cavité de l'α-CD, même de façon partielle, de par sa petite taille (4,7-5,3 Å).

Le temps nécessaire pour obtenir des billes chargées en PA bien calibrées en taille (estimation visuelle) est plus long (Tableau 1), comparativement à celui des billes non chargées qui est de 2,5 à 3 jours. La présence du PA dans l'huile pourrait ralentir l'étape de cristallisation des molécules d'α-CD, à l'origine de la formation de la matrice des billes *(Bochot et al., 2007)* et donc du grossissement de ces dernières. Ce ralentissement semble d'autant plus marqué que la concentration en PA dans l'huile est importante. Il serait intéressant de mesurer la viscosité des huiles en présence de PA, en fonction de la concentration de ce dernier, afin de voir si ce paramètre participe ou non à l'augmentation du temps de fabrication des billes (Tableau 1).

Seules les BN d'isotrétinoïne et d'adapalène voient leur diamètre s'accroître de façon significative comparativement aux BN non chargées (1,6 mm). La polarité d'une huile a une influence directe sur sa tension interfaciale avec l'eau *(El-Mahrab-Robert et al., 2008)*. Plus elle est faible, plus la tension interfaciale est élevée *(El-Mahrab-Robert et al., 2008)*. Il a été montré que la valeur de la tension interfaciale de l'huile utilisée pour formuler les billes avait une influence sur leur taille *(Trichard et al., 2011)* . En effet, des BN non chargées en PA et préparées avec de l'huile de soja ($\gamma_{huile\text{-}eau}$ = 19,3 mN/m) sont plus grosses que celles formulées avec de l'huile de germes de blé ($\gamma_{huile\text{-}eau}$ = 26,5 mN/m) ou d'amande douce ($\gamma_{huile\text{-}eau}$ = 27,7 mN/m) *(Trichard et al., 2011)*. Lors de la formation des billes, une première phase d'émulsification se produit, au cours de laquelle les molécules d'α-CD et les TG forment des complexes d'inclusion partiels autour des gouttelettes d'huile *(Bochot et al., 2007)* (Figure 1). Dans un second temps, les molécules d'α-CD cristallisent en colonne à partir de l'interface pour générer la matrice des billes *(Bochot et al., 2007)*. Une augmentation de la polarité de l'huile (due notamment à la présence d'acides gras libres à

l'état de traces) rend l'émulsification moins efficace *(Trichard et al., 2011)*. La quantité de molécules d'α-CD alors consommée pour stabiliser l'émulsion est moins importante et par conséquent un plus grand nombre de celles-ci est disponible pour la formation et la croissance cristalline de la matrice; ce qui explique l'augmentation de diamètre observée *(Trichard et al., 2011)*. Les caractéristiques physico-chimiques de l'adapalène et de l'isotrétinoïne (Tableau 1) ne permettent pas d'expliquer l'augmentation du diamètre des billes par une augmentation de la polarité de l'huile. Ces molécules pourraient alors agir sur les interactions TG/α-CD à l'interface huile/eau, ce qui ne serait pas le cas des autres composés étudiés.

L'état du PA dans l'huile (dissous ou dispersé) n'a pas d'effet sur le diamètre des BN mais peut avoir une influence sur leur temps d'obtention (cas de la PG) et les rendements de fabrication et d'encapsulation (cas de la PG et du diazépam) (Tableau 1). Contrairement aux billes préparées à partir de solutions ou de suspensions huileuses faiblement dosées en PA, pour lesquelles les rendements de fabrication et d'encapsulation sont importants, celles préparées avec des suspensions huileuses fortement concentrées (PG, IND et diazépam), voient leurs rendements d'encapsulation et de fabrication diminuer (Tableau 1). Il est néanmoins intéressant de noter que les teneurs de ces PA dans les billes sont 10 à 1000 fois plus importantes que celles atteintes avec les rétinoïdes (Tableau 1). Aussi, une teneur de 212 mg de PG/g de BN lyophilisées a été atteinte lorsque les billes ont été préparées à partir d'une suspension de PG à 300 mg/ml (chapitre 1).

Comparativement à d'autres systèmes lipidiques décrits dans la littérature (Tableau 2), les billes permettent d'obtenir des teneurs nettement plus importantes en PA sans avoir recours à l'addition de tensio-actifs dans la formulation.

Tableau 2: Facteurs d'augmentation de la teneur en PA avec les billes d'α-CD et d'huile de soja comparativement à d'autres systèmes lipidiques décrits dans la littérature.

PA	Système	Facteur d'augmentation de la teneur en PA Billes/Système
Progestérone	Minigranules de cellulose microcristalline à base de systèmes auto-émulsionnants *(Abdalla et al., 2008)*	16
	Particules lipidiques nano-structurées (NLC) *(Yuan et al., 2007)*	2 à 9
Indométacine	Microcapsules hybrides de lipides (60-70%) et de silice *(Simovic et al., 2010)*	1,5 à 167 selon la composition des microcapsules
	Particules lipidiques nano-structurées (NLC) *(Castelli et al., 2005)*	9
Isotrétinoïne	Nanoparticules lipidiques solides (NLS) *(Liu et al., 2007)*	6
	Liposomes *(Ioele et al., 2005)*	3,5
Diazépam	Nanoparticules lipidiques solides (NLS) *(Abdelbary and Fahmy, 2009)*	1,5
	Minigranules de cellulose microcristalline à base de systèmes auto-émulsionnants *(Abdalla and Mader, 2007)*	7,5

Ces résultats montrent donc qu'il est possible d'encapsuler des PA actifs à fortes doses et de moduler leur teneur dans les billes, en modifiant simplement leur concentration dans la phase huileuse de départ. Des teneurs élevées, compatibles avec une utilisation thérapeutique ont été atteintes, même si l'augmentation du temps de fabrication est un inconvénient. Rappelons que le procédé de fabrication utilisé ne requiert pas de chauffage élevé (température de 28°C), de solvants organiques, ni de module de dispersion interne et peut être appliqué à des molécules fragiles comme l'isotrétinoïne *(Trichard et al., 2007)*.

2. Etude comparative du comportement des billes marquées au Rouge Nil et de celles encapsulant de l'IND dans les milieux digestifs simulés (Chapitres 2, 3 et 4).

Laury Trichard a montré au cours de sa thèse que les billes amélioraient d'un facteur 2 la biodisponibilité de l'isotrétinoïne, comparativement au contenu (huile de soja) d'une capsule molle commerciale, après une administration par voie orale chez le rat *(Trichard et al., 2007)*. Les travaux que nous avons présentés dans cette thèse permettent d'apporter des éléments nouveaux, quant au comportement des billes dans des milieux digestifs simulés mais aussi *in vivo,* en termes de stabilité et de mécanisme de libération, à partir des billes, de la molécule modèle encapsulée.

2.1. Procédés de fabrication des différentes formulations lipidiques étudiées

Il semble important de revenir très brièvement sur les modes d'obtention ainsi que sur les caractéristiques des différentes formulations lipidiques (émulsions et billes) préparées au cours de ces travaux de thèse (Figure 1). Le dépôt de l'huile à la surface de la solution d'α-CD entraîne la formation d'un film. La première étape indispensable à l'obtention des billes est la formation de complexes d'inclusion partiels entre les CD et les TG de l'huile (Figure 1). L'agitation orbitale externe permet, par un effet de cisaillement, de casser l'interface stabilisée par les complexes d'inclusion et donc de former, dès 1 heure d'agitation, une émulsion de type huile dans eau (H/E) *(Bochot et al., 2007, Trichard, 2007)*. La forme et la taille des globules huileux sont irrégulières (Figure 1). Une augmentation visible de la viscosité de l'émulsion au cours de l'agitation est observée. Les premières billes peuvent être visualisées en microscopie optique au bout de seulement quelques heures d'agitation dans un milieu turbide. Puis, au cours du temps, la taille des billes augmente et celles-ci sont finalement obtenues après 2,5 jours dans un milieu quasi limpide *(Bochot et al., 2007, Trichard, 2007)* (Figure 1). L'émulsion ainsi que les BN présentent une organisation cristalline (Figure 1) *(Bochot et al., 2007)* qui résulte de la cristallisation des molécules d'α-CD en colonne à partir de l'interface huile/eau. Un nouvel ajout d'α-CD après le lavage des BN et une agitation de 2 jours supplémentaires permet d'obtenir des BC, suite à la formation d'une couche d'α-CD autour des BN. Les émulsions stabilisées sont lyophilisées (ES) et les billes (BN et BC) peuvent être séchées par lyophilisation (48 heures) ou par un séchage à l'étuve (6 heures à 25°C). On parlera alors de billes lyophilisées (BL) ou bien de billes séchées à l'étuve (BS) (Figure 1). Les caractéristiques de ces systèmes sont résumées dans la Figure 1.

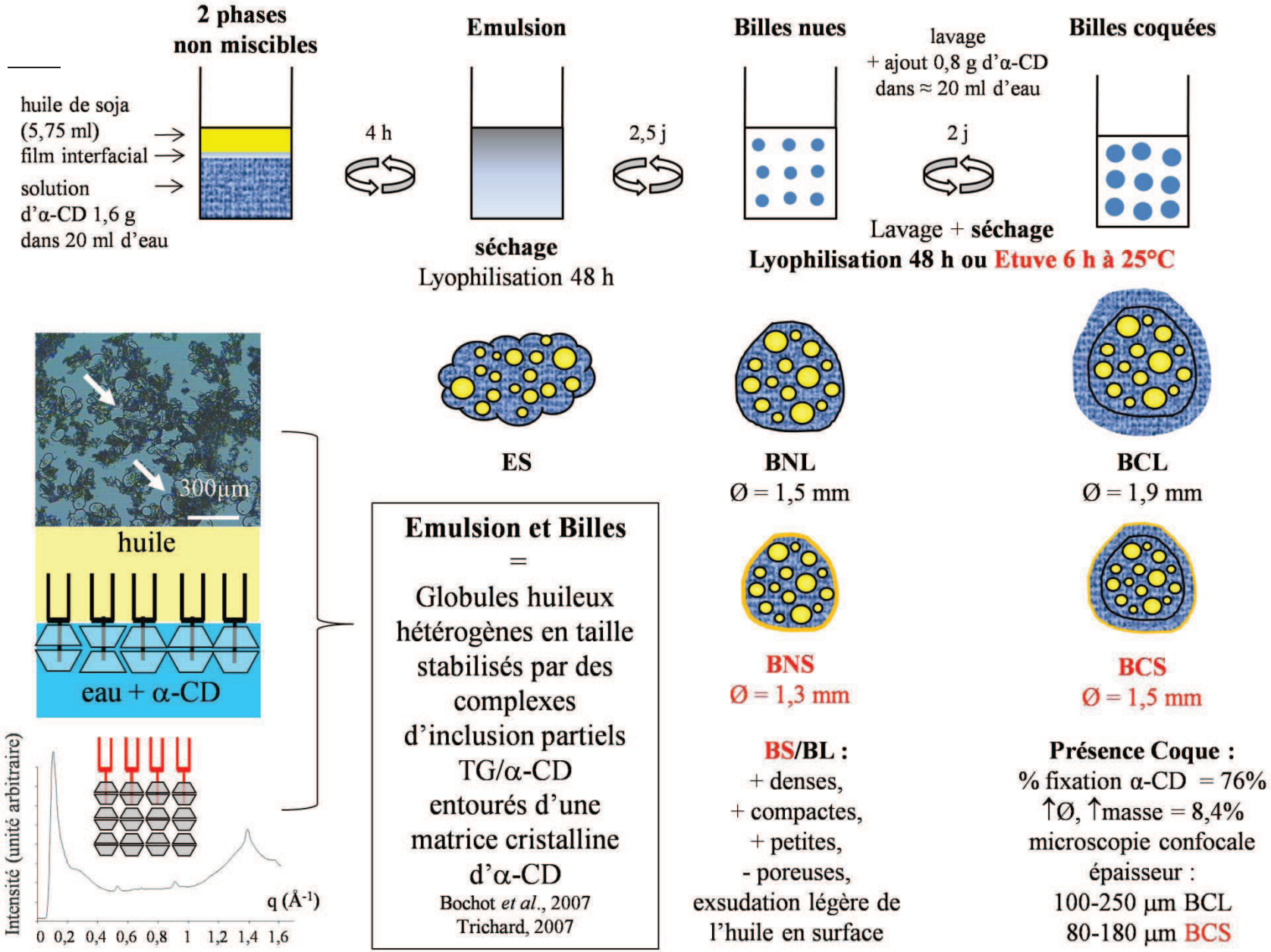


Figure 1. Représentation schématique des différents procédés de fabrication des formulations lipidiques obtenues à partir d'une même composition qualitative (mélange d'une solution aqueuse d'α-CD et d'huile de soja) et quantitative de départ : ES, BNL, BCL, BNS et BCS. Effet de la présence de la coque d'α-CD ainsi que du mode de séchage (lyophilisation ou séchage à l'étuve) sur les caractéristiques des billes marquées au Rouge Nil.

2.2. Justification de la méthodologie suivie au cours de l'étude de stabilité *in vitro*

L'étude portant sur la stabilité des billes (BNL, BCL, BNS et BCS) a été réalisée sur des billes marquées au Rouge Nil (marqueur lipophile) de façon à les suivre plus facilement. La stabilité a été suivie par le dénombrement manuel et la mesure à l'aide d'un microscope optique du diamètre des billes récupérables. Un échantillon de 100 billes a été utilisé pour chaque expérience. Cette méthodologie présente l'intérêt d'être facile à mettre œuvre. En effet, les BN ayant un diamètre initial de 1,5 mm, il est facile de les dénombrer.

Trois paramètres ont permis d'évaluer la stabilité des billes:

- le nombre de billes récupérables (en considérant qu'il ne reste plus de billes dans le milieu quand il ne nous est plus possible de les compter ou de les récupérer),

- les quatre types de billes étudiées (BNL, BCL, BNS et BCS) n'ayant pas le même diamètre initial (Figure 1), il nous a semblé nécessaire, pour les comparer, d'estimer leur érosion en pourcentage relatif de leur diamètre initial.

$$\text{Diamètre initial des billes (\%)} = \left[1 - \frac{\text{diamètre initial des billes - diamètre des billes au temps t}}{\text{diamètre initial des billes}}\right] \times 100$$

- le volume total des billes récupérables qui intègre à la fois la diminution du diamètre et le nombre de billes.

$$\text{Volume total des billes récupérables (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{rayon initial des billes - rayon des billes au temps t}}{\text{rayon initial des billes}}\right)\right]^3 \times \text{\% du nombre de billes récupérables}$$

2.3. Justification du choix des milieux digestifs simulés utilisés pour les études de stabilité et de dissolution/libération

Après une incubation de 55 minutes dans le milieu gastrique, trois milieux intestinaux dont la composition a été détaillée dans le chapitre 2 ont été utilisés, aussi bien pour les études du devenir des billes marquées au Rouge Nil que pour celles de dissolution/libération de l'IND. Le premier est un milieu contrôle de composition simple sans lipides ni sels biliaires (Contrôle SIF), choisi comme référence afin de s'affranchir de l'effet de ces derniers et de pouvoir comprendre et comparer les comportements des différentes formulations. Les deux autres milieux contenant des sels biliaires (SB), ont été choisis pour simuler un état à jeun (FaSSIF) et nourri (FeSSIF)

avant de passer aux études *in vivo*. En effet, les billes étant un système lipidique très riche en huile (80%) *(Bochot et al., 2007)* et l'objectif principal de ce travail étant d'évaluer leur potentiel pour une administration par voie orale, il nous a semblé pertinent d'étudier l'impact de la présence de SB dans les milieux, sur le délitement des billes et le passage en solution de l'IND. Les SB, de par leurs propriétés tensioactives, sont connus pour leur affinité pour les lipides dont ils permettent l'émulsification. Nous pouvons citer à titre d'exemple le cas des liposomes administrés par voie orale, qui sont déstabilisés, entre autres, par l'action des SB *(Rowland and Woodley, 1980)*; c'est la raison pour laquelle, *in vitro,* leur stabilité est généralement étudiée dans des milieux qui en contiennent *(Carafa et al., 2006, Parmentier et al., 2011)*. L'utilisation de SB a été rapportée lors d'études de libération de PA à partir d'autres formes lipidiques comme les systèmes auto-nano-émulsionnants (SNEDDS) *(Nielsen et al., 2007)* et les nano-capsules lipidiques *(Roger et al., 2009, Roger et al., 2011)* car ils permettent d'augmenter leur solubilité dans les milieux digestifs *(de Smidt et al., 1991, Hammad and Muller, 1998, Persson et al., 2005, Maestrelli et al., 2011)*. Ceci nous montre la nécessité d'une étude en présence de ces sels. Dans le cadre de notre travail, nous avons représenté les SB par du taurocholate de sodium (Tc-Na) à une concentration de 3 mM pour l'état à jeun (FaSSIF) et 15 mM pour l'état nourri (FeSSIF) après dilution au demi des milieux pré-concentrés. Des lipases pancréatiques peuvent être ajoutées dans les milieux *(Jantratid et al., 2008)* afin d'évaluer l'influence de la lipolyse sur la libération de PA encapsulés, à partir de formulations lipidiques comme les microcapsules hybrides à base de lipides et de silice *(Simovic et al., 2010)*, les nanoparticules lipidiques solides *(Muller et al., 1996, Olbrich et al., 2002)*, les particules lipidiques nano-structurées (NLC) *(Roger et al., 2009)* et les extrudats lipidiques solides *(Witzleb et al., 2012)*. Ces enzymes digèrent les lipides, permettant ainsi la libération des acides gras en positions 1 et 3 *(Bottino et al., 1967, Morley and Kuksis, 1972)*. La lipolyse est plus ou moins rapide selon la nature des lipides constituant les formes lipidiques ainsi que la nature et la quantité des tensioactifs ajoutés pour leur formulation, ce qui permet de moduler la libération du PA *(Olbrich and Muller, 1999, Witzleb et al., 2012)*. En effet, les lipides liquides par exemple, sont dégradés plus rapidement par les lipases pancréatiques que ceux solides *(Zangenberg et al., 2001, Christensen et al., 2004, Ljusberg-Wahren et al., 2005)*. De plus, ces enzymes ont plus d'affinité pour les glycérides d'acides gras à chaînes moyennes et dégradent plus lentement ceux constitués d'acides gras à longues chaînes *(Deckelbaum et al., 1990, Tsuzuki et al., 2002, Christensen et al., 2004)*.

En outre, la lipolyse, surtout si elle est rapide, peut entraîner la précipitation d'un PA, initialement solubilisé dans les globules huileux des émulsions obtenues après émulsification *in vivo* des systèmes auto-émulsionnants, limitant ainsi son passage en solution et son absorption *(Vandamme et al., 2007)*.

Li *et al* ont montré qu'il était possible de retarder la digestion des globules huileux d'une émulsion en les recouvrant d'une couche de pectine ou d'alginate *(Li et al., 2010)*. Dans nos études, l'effet des lipases pancréatiques n'a pas été étudié car nous avons pensé que la structure des billes rendrait difficile l'accès de la lipase aux gouttelettes huileuses dispersées dans la matrice d'α-CD. L'enzyme n'agirait donc que sur l'huile libérée à partir des billes ou de leurs fragments après délitement. De plus, l'huile de soja utilisée pour la formulation des billes est composée essentiellement de triglycérides à longues chaînes (C18) (> 98%). Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas jugé utile, dans un premier temps, de prendre en compte l'influence des enzymes dans les études réalisées *in vitro.* Toutefois, celles-ci devront être complétées ultérieurement pour évaluer l'influence des lipases pancréatiques sur la libération du PA dans un système tel que celui des billes.

2.4. Comportement des billes dans les milieux digestifs simulés

Les études de stabilité *in vitro* des BNL, dans les milieux digestifs simulés, nous ont permis de proposer un mécanisme de libération de la molécule encapsulée (chapitre 2), en plusieurs étapes résumées dans la Figure 2:

1. Hydratation des billes
2. Dissolution progressive de la matrice d'α-CD (érosion de surface, préservation de la forme de la bille)
3. Libération des globules huileux contenant le PA/libération du PA dissous dans l'huile par un phénomène de partage
4. Fragmentation des billes fragilisées/dissolution des fragments/libération du PA dissous dans l'huile par un phénomène de partage
5. Libération totale de l'huile/libération du PA dissous dans l'huile par un phénomène de partage

Ce comportement est le même quel que soit le type de billes (BN/BC, BL/BS) (Chapitres 3 et 4). En revanche, ces étapes sont plus ou moins marquées selon la nature des billes et du milieu (présence ou non et quantité de SB). En effet, il est souvent difficile de distinguer les étapes 2 et 3 qui ont lieu simultanément dans le cas des BN. En revanche, ces deux étapes sont distinctes avec les BC.

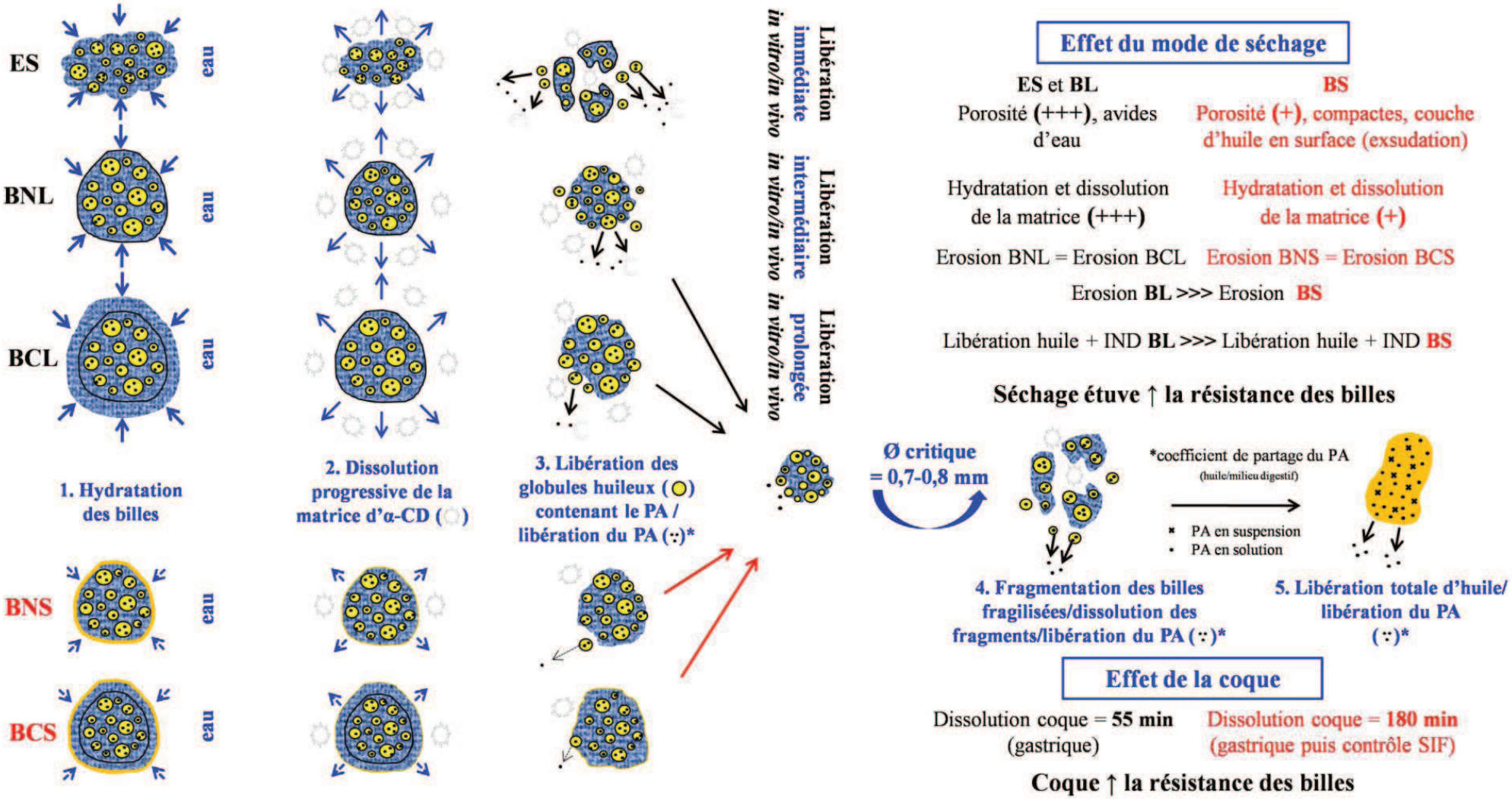


Figure 2. Comportements des formulations lipidiques dans le milieu gastrique puis contrôle SIF: mécanisme proposé pour expliquer la libération du PA encapsulé à partir des ES et des billes (BNL, BCL, BNS et BCS): influence de la coque d'α-CD et du mode de séchage.

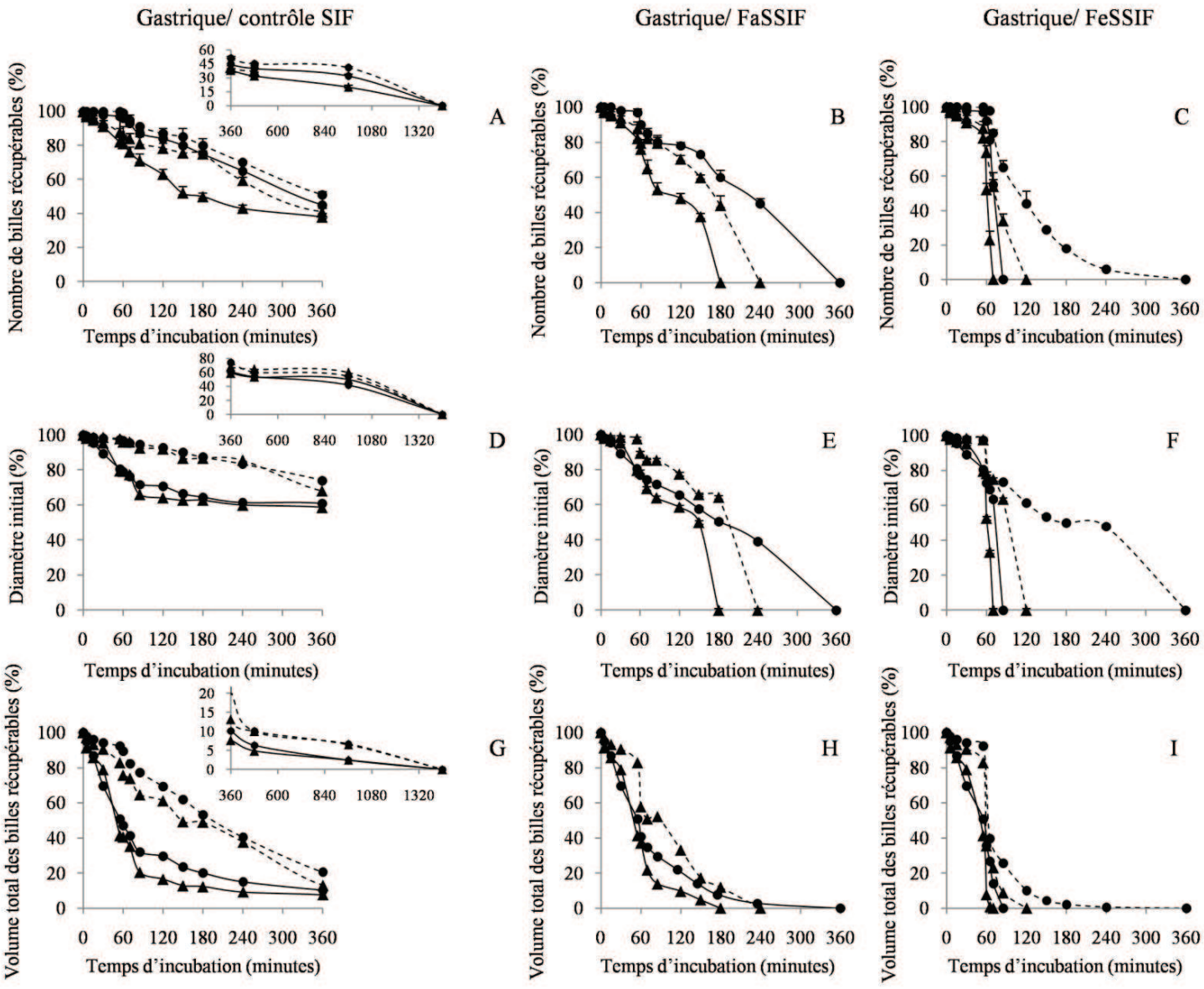


Figure 3. Pourcentages du nombre (A, B et C), du diamètre initial (D, E et F) et du volume total (G, H, I) des billes récupérables marquées au Rouge Nil en fonction du temps d'incubation: 55 minutes dans le milieu gastrique seul puis ajout des milieux intestinaux pré-concentrés: le milieu contrôle SIF (A, D et G) avec des inserts de 360 à 1440 minutes, le milieu FaSSIF (B, E et H) et le milieu FeSSIF (C, F et I): comparaison des billes nues (▲) avec les billes coquées (●) lyophilisées (trait plein) ou séchées à l'étuve à 25°C pendant 6 heures (trait pointillé).

L'impact de la coque d'α-CD et/ou du mode de séchage, sur la stabilité des billes marquées au Rouge Nil (Figure 3) ainsi que sur la libération de l'IND (Figure 4) est synthétisé dans la Figure 2. Ces éléments seront développés brièvement ci-dessous.

2.4.1. Incubation des billes dans le milieu gastrique puis contrôle SIF

Après une incubation de 55 minutes dans le milieu gastrique puis ajout du milieu contrôle SIF, on note une diminution du nombre de billes récupérables (Figure 3A), une réduction de leur diamètre initial (Figure 3D) (érosion en surface sans modification de la forme des billes) et donc de leur volume total (Figure 3G) et cela avec tous les types de billes.

Quel que soit le type de billes (BNL, BNS, BCL et BCS), leur fragmentation totale se produit lorsqu'un diamètre critique de 0,7-0,8 mm est atteint (Figure 2). Le diamètre critique correspond au plus petit diamètre mesurable, à partir duquel il n'est plus possible de dénombrer de billes. Dans le milieu contrôle SIF, toutes les billes sont délitées au temps 24 heures (Figure 3). Ces fragments de billes jouent le rôle de mini-réservoirs qui poursuivent la libération du PA à partir des gouttelettes d'huile. Il peut être noté que toutes les billes d'un même échantillon (100 billes) ne semblent pas avoir la même résistance car dès les premières minutes d'incubation dans le milieu gastrique, un petit nombre d'entre elles, notamment les BNL, se fragmentent (Figure 3A et Tableau 3). Cet effet est plus marqué à 55 minutes où l'érosion ne peut pas expliquer à elle seule la disparition d'un nombre plus important de BNL, comparativement aux autres types de billes. De plus, cette disparition précoce ne peut pas être non plus imputée à des billes dont le diamètre serait plus petit dans le lot initial (distribution de taille étroite). La manipulation des BNL pourrait en avoir fragilisé certaines. La fragmentation précoce des billes les plus fragiles participerait également à la libération de l'IND à partir des BNL (Figure 3A et Tableau 3) comme le montrent les pourcentages de 12 et 27% d'IND dissoute après une incubation de 5 et 55 minutes respectivement dans le milieu gastrique.

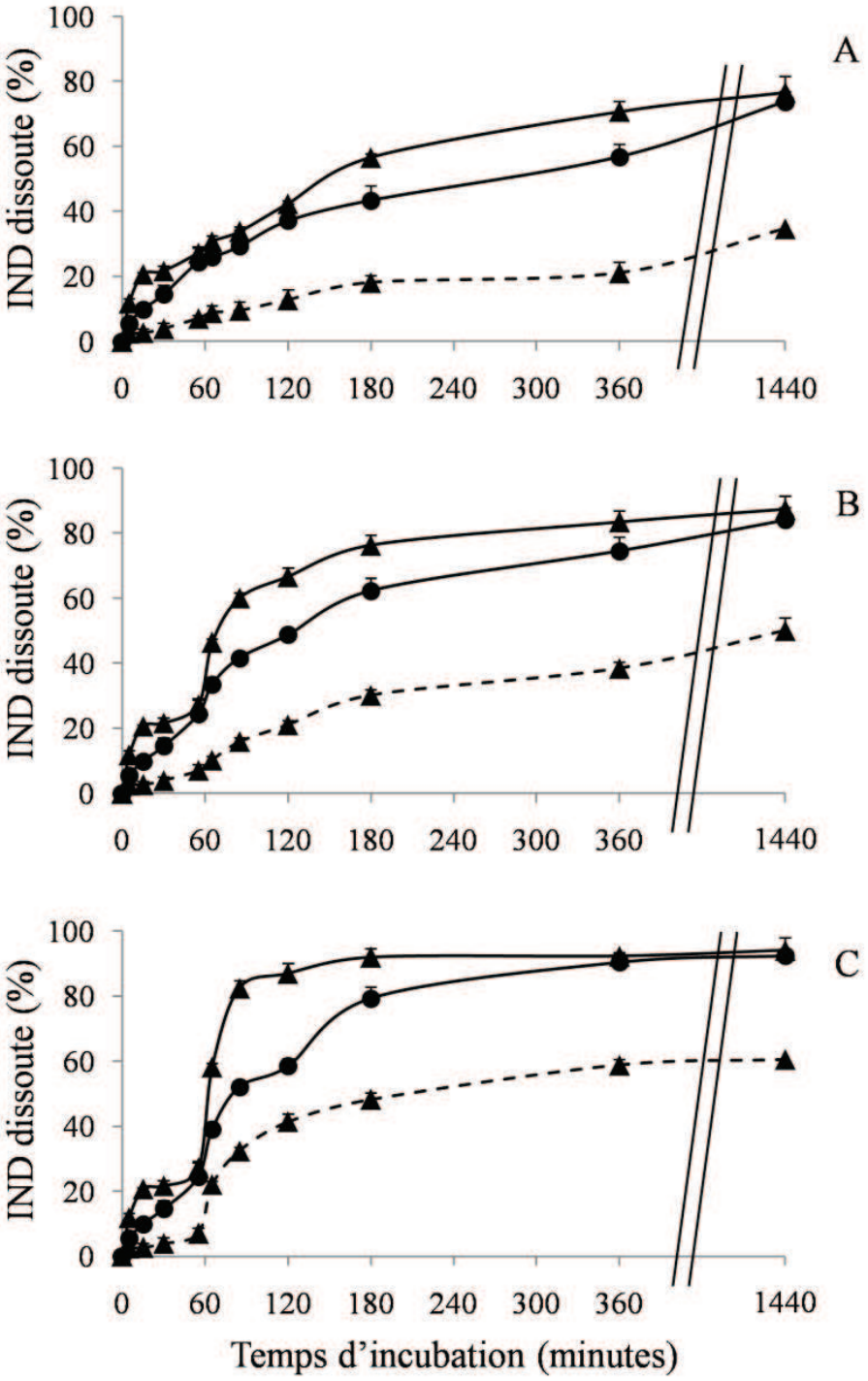


Figure 4. Pourcentages d'IND dissoute à partir des BNL (▲, trait plein), des BNS (▲, trait pointillé) et BCL (●, trait plein) après une incubation de 55 minutes dans le milieu gastrique puis ajout des milieux intestinaux: (A) contrôle SIF, (B) FaSSIF et (C) FeSSIF.

Tableau 3: Effet du séchage à l'étuve et de la coque d'α-CD, sur le pourcentage du nombre de billes récupérables et celui de l'IND passée en solution aux temps 5 et 55 minutes d'incubation dans le milieu gastrique.

Temps d'incubation dans SGF (min)	BNL		BNS		BCL		BCS	
	5	55	5	55	5	55	5	55
% de billes fragmentées	3	18	1	10	0	3	0	0
% d'IND dissoute	12	27	2	7	5	24	Non testées	

Le séchage à l'étuve (BS) (Figure 2) augmente la résistance des billes coquées ou non (Figures 3A et 3G), ralentit leur érosion (Figure 3D) ainsi que la libération de l'IND (Figure 4A). Comparativement à la lyophilisation qui augmente la porosité des billes et leur confère une forte avidité pour l'eau, le séchage à l'étuve ralentit de façon importante la phase d'hydratation des billes puis la dissolution de la matrice d'α-CD (sous la forme de billes puis après fragmentation de celles-ci). En effet, les BS sont moins poreuses, plus compactes et recouvertes en surface d'une fine couche d'huile (Figures 1 et 2) qui freine l'entrée de l'eau dans la matrice.

La présence de la coque d'α-CD autour des billes ne ralentit pas leur érosion (Figure 3D) mais diffère leur fragmentation dans le temps. A titre d'exemple, la réduction de moitié du nombre des billes récupérables (50%) est obtenue deux fois plus lentement avec les BCL, comparativement aux BNL (360 versus 180 minutes) (Figure 3A). Cet effet lié à la coque est plus net et plus marqué avec les BL (BNL versus BCL) qu'avec les BS (BNS versus BCS) (Figures 3A et 3G). En effet, le temps nécessaire pour obtenir 50% des BNS se situe entre 240 et 360 minutes comparativement à 360 minutes avec les BCS (Figure 3A).

Le temps nécessaire à la dissolution de la coque d'α-CD est trois fois plus long avec les BS comparativement aux BL (180 minutes versus 55 minutes) (Figure 2). Par ailleurs, les BCL libèrent légèrement moins d'IND que les BNL, surtout dans les premiers temps dans le milieu gastrique (deux fois moins au temps 5 minutes, Tableau 3) et entre 180 et 360 minutes dans le contrôle SIF (Figure 3A).

La stratégie du séchage à l'étuve améliore la stabilité des billes et ralentit la libération de l'IND de façon plus nette et plus marquée que celle de la coque d'α-CD (Figures 3G et 4A).

L'association des deux procédés (séchage à l'étuve + coque d'α-CD) renforce légèrement l'effet du séchage à l'étuve seul (BNS versus BCS) et de façon plus importante celui de la coque (BCL versus BCS) (Figure 3G).

2.4.2. Incubation des billes dans le milieu gastrique puis FaSSIF/FeSSIF (effet des sels biliaires)

L'influence de la présence du Tc-Na en quantité plus ou moins importante dans les milieux digestifs simulés apparaît clairement, dès les premières minutes qui suivent l'ajout du FaSSIF (Figures 3B, 3E, 3H) et du FeSSIF (Figures 3C, 3F, 3I). En effet, quelle que soit la nature des billes, il est observé une diminution de leur nombre, de leur diamètre initial et volume total, comparativement à ceux obtenus dans le contrôle SIF. Cet effet est d'autant plus marqué après l'ajout du FeSSIF dont la concentration en Tc-Na est cinq fois plus importante que celle présente dans le FaSSIF. De même, l'étude des cinétiques de passage en solution de l'IND à partir des billes montre que les pourcentages d'IND dissoute sont fortement augmentés dans le FeSSIF (Figure 4C) et un peu moins dans le FaSSIF (Figure 4B), comparativement aux valeurs obtenues dans le contrôle SIF (Figure 4A). Ceci est dû à une augmentation de la solubilité et à une diminution du coefficient de partage de l'IND entre l'huile de soja et le FeSSIF, comparativement aux valeurs obtenues dans les milieux FaSSIF et contrôle SIF.

Le Tc-Na interagit à plusieurs niveaux avec les billes, dont la teneur en huile est élevée. En effet, bien que le mécanisme de délitement des billes, résumé dans la Figure 2, reste le même quel que soit le milieu d'incubation, le Tc-Na, de par ses propriétés d'agent de surface, favorise l'extraction des microgouttelettes huileuses piégées dans la matrice, puis leur micellisation ainsi que le passage en solution de l'IND encore retenue dans l'huile (étape 3). La valeur du diamètre critique (fragmentation de toutes les billes) reste la même quelle que soit la composition du milieu d'incubation (0,7-0,8 mm). En revanche, la fragmentation totale des billes apparaît plus rapidement dans le FaSSIF et de façon encore plus précoce dans le FeSSIF comparativement au milieu contrôle SIF, comme en témoignent la diminution brutale du nombre de billes récupérables et l'augmentation rapide des pourcentages d'IND dissoute (surtout avec les BL) dans le FeSSIF (Figures 3C et 4C). Dans ce milieu, il est difficile de faire la distinction entre les étapes 2, 3 et 4 décrites plus haut.

Le Tableau 4 présente les effets du séchage à l'étuve et de la présence de la coque d'α-CD, exprimés en gain de temps, sur la fragmentation totale des billes dans le milieu FeSSIF.

Tableau 4: Effet du séchage à l'étuve et de la coque d'α-CD, exprimés en gain de temps, sur la fragmentation totale des billes dans le milieu FeSSIF.

Effet du séchage à l'étuve		Effet de la coque d'α-CD		Effet du séchage + coque d'α-CD
BN (BNL/BNS)	BC (BCL/BCS)	BL (BNL/BCL)	BS (BNS/BCS)	BNL/BCS
50 min	275 min	15 min	240 min	290 min

Le changement du mode de séchage à lui seul permet d'accroître la stabilité des billes et son impact est 5,5 fois plus prononcé avec les BC comparativement aux BN (Tableau 4). La présence de la coque d'α-CD améliore également la stabilité des billes mais son effet est 16 fois plus important avec les BCS qu'avec les BCL (Tableau 4). Le couplage des deux stratégies (coque d'α-CD et séchage à l'étuve) qui agissent en synergie, accentue l'effet de protection et d'augmentation de la résistance des billes dans le milieu FeSSIF (Tableau 4).
La présence de la coque autour des BN permet de jouer un rôle de barrière et de protéger plus longtemps le cœur contenant les globules huileux, de l'action des SB. La pénétration des SB dans la matrice des BS est ralentie, du fait qu'elles soient plus compactes et plus dures que les BL.

3. Intérêt des billes et corrélation *in vitro/in vivo*

L'étude du comportement des billes dans les milieux simulés nous permet d'expliquer plus en détails les résultats *in vivo* obtenus précédemment par Trichard *et al* *(Trichard et al., 2007)*. En effet, les pourcentages de PG passée en solution dans les milieux digestifs simulés *in vitro* sont deux fois plus importants, au temps 24 h, à partir des billes, comparativement au contenu d'une capsule molle commerciale à base d'huile végétale (chapitre 2). Ce résultat est en bonne corrélation avec l'amélioration de la biodisponibilité de l'isotrétinoïne, obtenue *in vivo* chez le rat, avec les billes, comparativement à la forme capsule molle *(Trichard et al., 2007)*. Les différences entre ces deux formulations lipidiques peuvent expliquer ce résultat. Les billes sont un système multi-particulaire, présentant deux niveaux de division: des particules de 1,6 mm (PG) à 2 mm (isotrétinoïne et adapalène) de diamètre dans lesquelles les micro-domaines huileux contenant le PA sont dispersés dans une matrice d'α-CD. Cette structure permet d'augmenter la

surface d'échange entre les billes et le milieu digestif, puis avec les globules huileux qui ont été libérés, alors que le contenu d'une capsule molle forme un agglomérat qui flotte à leur surface, même en présence de SB.

Les billes peuvent être comparées aux microcapsules poreuses hybrides, à base de lipides et de silice, décrites par Simovic *et al* *(Simovic et al., 2009, Simovic et al., 2010)*. Une fois séchées, ces microcapsules ont une teneur en huile légèrement plus faible (60-70%) que celles des billes, présentent une matrice interne poreuse et une taille qui varie selon le mode d'obtention (de 1 à 5 µm par atomisation et de 20 à 50 µm par coacervation). La biodisponibilité par voie orale de l'IND encapsulée dans ce système administré par gavage à des rats, est améliorée, comparativement à celle obtenue avec une suspension aqueuse ou une émulsion de type H/E d'IND *(Simovic et al., 2010)*.

Dans le chapitre 3 et son annexe, les résultats obtenus *in vitro* avec les formulations lipidiques (ES, BNL et BCL) d'IND et la référence commerciale non lipidique Indocid® vont dans le même sens et ont été confortés par les études *in vivo* chez le rat. Dans le cas de notre étude, le choix de milieux simples, simulant les fluides digestifs, permet d'observer des différences, retrouvées *in vivo,* entre ces formulations. L'effet des SB a bien été confirmé *in vivo*. L'amélioration de la biodisponibilité de l'IND formulée dans les systèmes lipidiques à base d'α-CD et d'huile de soja (ES et billes), comparativement à l'Indocid®, peut également être reliée à la formulation elle-même. Nous avons vu également l'influence du type de système (ES, BN ou BC) sur la modulation de la libération de l'IND *in vivo*.

Comparativement aux systèmes lipidiques décrits précédemment dans les travaux antérieurs et qui ont montré une amélioration de la biodisponibilité par voie orale de PA faiblement solubles dans l'eau, les billes sont obtenues selon un procédé de fabrication simple et se forment spontanément sous l'action d'une simple agitation orbitale externe. Contrairement aux autres systèmes lipidiques émulsionnés, leur fabrication s'effectue en absence de tensio-actifs et de co-tensio-actifs et ne nécessite pas l'emploi de co-solvants.

4. Effet de l'alimentation sur les formulations lipidiques

Après une administration par voie orale, les PA sont absorbés suite à une cascade complexe d'interactions entre ces molécules actives, leur forme galénique et les constituants du tractus gastro-intestinal (TGI). Selon le cas, l'alimentation peut atténuer (effet négatif), renforcer (effet positif) ou n'avoir aucun effet sur les PA co-administrés. Certains médicaments sont bien absorbés mais ont un effet irritant au niveau gastro-intestinal. Il est donc préconisé de les prendre avec un repas pour améliorer leur tolérance (cas des anti-inflammatoires non stéroïdiens).

Lors de notre étude *in vivo* et comparativement aux valeurs obtenues chez le rat à jeun, une augmentation des valeurs de C_{max} et d'$AUC_{0\rightarrow\infty}$ avec un T_{max} raccourci, a été observée. Ochiai *et al* ont montré la même tendance après l'administration d'une émulsion de Coenzyme Q10 chez le rat nourri *(Ochiai et al., 2007)*. Les molécules de classe II sont connues pour leur biodisponibilité faible et variable, due essentiellement à une dissolution insuffisante et une solubilité limitée dans les fluides du TGI *(Amidon et al., 1995, Yu et al., 2002)*. En revanche, à l'exemple de l'IND, des augmentations de biodisponibilité de ces molécules ont été observées lorsqu'elles ont été administrées avec un repas, surtout si celui-ci est riche en matière grasse *(Khalafalla et al., 1981, Ogunbona et al., 1985, Milton et al., 1989, Charman et al., 1993, Rolan et al., 1994, Amidon et al., 1995, Crevoisier et al., 1997, Porter et al., 2004, Sim et al., 2005, Ahmed et al., 2008, Lal et al., 2010, Sato et al., 2011)*. Cet effet positif de l'alimentation peut être expliqué par des améliorations de solubilité de ces PA faiblement solubles dans l'eau *(Hofmann, 1963, Badley et al., 1969, Crevoisier et al., 1997)* ainsi que par des modifications physiologiques au niveau du TGI, comme par exemple une stimulation de la sécrétion biliaire et aussi par l'augmentation du débit sanguin splanchnique *(Charman et al., 1997, Fleisher et al., 1999, FDA, 2002, Schmidt and Dalhoff, 2002, Wu and Benet, 2005, Sugano et al., 2010)*. En effet, *in vivo*, la digestion des TG à chaînes longues (C18) de l'huile de soja par les lipases pancréatiques, permettrait de former des acides gras à chaînes longues et des mono-glycérides qui s'intercalent dans les micelles mixtes composées de sels biliaires et de phospholipides, assurant ainsi la formation d'un milieu intestinal avec un fort pouvoir solubilisant *(Carey et al., 1983, Staggers et al., 1990, Crevoisier et al., 1997)*. De plus, les lipides digérés peuvent augmenter l'absorption des PA lipophiles grâce à la formation de chylomicrons qui passent dans le système lymphatique avant de rejoindre la circulation générale *(Traber et al., 1988)*.

Pour toutes ces raisons, il serait judicieux de préconiser la prise des ES et des billes avec un petit déjeuner ou un repas riche en graisses (une tartine beurrée par exemple) afin d'optimiser l'action thérapeutique.

Abréviations

α-CD : α-cyclodextrine

BCL : bille coquée lyophilisée

BCS : bille coquée séchée à l'étuve

BNL : bille nue lyophilisée

BNS : bille nue séchée à l'étuve

Contrôle SIF : Contrôle Simulated Intestinal Fluid

ES : émulsion sèche

FaSSIF : Fasted State Simulated Intestinal Fluid

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

IND : indométacine

PA : Principes actifs

PG : progestérone

SB : sels biliaires

Tc-Na : taurocholate de sodium

TG : triglycérides

TGI : tractus gastro-intestinal

Références

Abdalla, A., Klein, S. and Mader, K. 2008. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. *Eur J Pharm Sci,* 35, 457-464.

Abdalla, A. and Mader, K. 2007. Preparation and characterization of a self-emulsifying pellet formulation. *Eur J Pharm Biopharm,* 66, 220-226.

Abdelbary, G. and Fahmy, R. H. 2009. Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: design and characterization. *AAPS Pharm Sci Tech,* 10, 211-219.

Ahmed, I. S., Aboul-Einien, M. H., Mohamed, O. H. and Farid, S. F. 2008. Relative bioavailability of griseofulvin lyophilized dry emulsion tablet vs. immediate release tablet: a single-dose, randomized, open-label, six-period, crossover study in healthy adult volunteers in the fasted and fed states. *Eur J Pharm Sci,* 35, 219-225.

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharm Res,* 12, 413-420.

Badley, B. W., Murphy, G. M. and Bouchier, I. A. 1969. Intraluminal bile-salt deficiency in the pathogenesis of steatorrhoea. *Lancet,* 2, 400-402.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J. L., Duchene, D. and Fattal, E. 2007. alpha-Cyclodextrin/oil beads: An innovative self-assembling system. *Int J Pharm,* 339, 121-129.

Bottino, N. R., Vandenburg, G. A. and Reiser, R. 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids,* 2, 489-493.

Carafa, M., Marianecci, C., Annibaldi, V., Di Stefano, A., Sozio, P. and Santucci, E. 2006. Novel O-palmitoylscleroglucan-coated liposomes as drug carriers: Development, characterization and interaction with leuprolide. *Int J Pharm,* 325, 155-162.

Carey, M. C., Small, D. M. and Bliss, C. M. 1983. Lipid digestion and absorption. *Annu Rev Physiol,* 45, 651-677.

Castelli, F., Puglia, C., Sarpietro, M. G., Rizza, L. and Bonina, F. 2005. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm,* 304, 231-238.

Charman, W. N., Porter, C. J., Mithani, S. and Dressman, J. B. 1997. Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *J Pharm Sci,* 86, 269-282.

Charman, W. N., Rogge, M. C., Boddy, A. W. and Berger, B. M. 1993. Effect of food and a monoglyceride emulsion formulation on danazol bioavailability. *J Clin Pharmacol,* 33, 381-386.

Christensen, J. O., Schultz, K., Mollgaard, B., Kristensen, H. G. and Mullertz, A. 2004. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. *Eur J Pharm Sci,* 23, 287-296.

Crevoisier, C., Handschin, J., Barre, J., Roumenov, D. and Kleinbloesem, C. 1997. Food increases the bioavailability of mefloquine. *Eur J Clin Pharmacol,* 53, 135-139.

De Smidt, J. H., Offringa, J. C. and Crommelin, D. J. 1991. Dissolution rate of griseofulvin in bile salt solutions. *J Pharm Sci,* 80, 399-401.

Deckelbaum, R. J., Hamilton, J. A., Moser, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Butbul, E., Carpentier, Y. A., Gutman, A. and Olivecrona, T. 1990. Medium-chain versus long-chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry,* 29, 1136-1142.

Drugbank http://www.drugbank.ca/drugs/DB00210.

Drugbank http://www.drugbank.ca/drugs/DB00328.

Drugbank http://www.drugbank.ca/drugs/DB00829.

Drugbank http://www.drugbank.ca/drugs/DB00982.

El-Mahrab-Robert, M., Rosilio, V., Bolzinger, M. A., Chaminade, P. and Grossiord, J. L. 2008. Assessment of oil polarity: comparison of evaluation methods. *Int J Pharm,* 348, 89-94.

Elshaer, A., Khan, S., Perumal, D., Hanson, P. and Mohammed, A. R. 2011. Use of Amino Acids as Counterions Improves the Solubility of the BCS II Model Drug, Indomethacin. *Curr Drug Deliv,* 8, 363-372.

Fleisher, D., Li, C., Zhou, Y., Pao, L. H. and Karim, A. 1999. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet,* 36, 233-254.

Hammad, M. A. and Muller, B. W. 1998. Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles. *Eur J Pharm Biopharm,* 46, 361-367.

Hofmann, A. F. 1963. The Function of Bile Salts in Fat Absorption. The Solvent Properties of Dilute Micellar Solutions of Conjugated Bile Salts. *Biochem J,* 89, 57-68.

Ioele, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G. and Ragno, G. 2005. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *Int J Pharm,* 293, 251-260.

Jantratid, E., Janssen, N., Reppas, C. and Dressman, J. B. 2008. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res,* 25, 1663-1676.

Khalafalla, N., Elgholmy, Z. A. and Khalil, S. A. 1981. Influence of high fat diet on GI absorption of griseofulvin tablets in man. *Pharmazie,* 36, 692-693.

Lal, R., Sukbuntherng, J., Luo, W., Huff, F. J., Zou, J. and Cundy, K. C. 2010. The effect of food with varying fat content on the clinical pharmacokinetics of gabapentin after oral administration of gabapentin enacarbil. *Int J Clin Pharmacol Ther,* 48, 120-128.

Li, Y., Hu, M., Xiao, H., Du, Y., Decker, E. A. and Mcclements, D. J. 2010. Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multi-component biopolymer coatings. *Eur J Pharm Biopharm,* 76, 38-47.

Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H. and Yang, X. 2007. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm,* 328, 191-195.

Ljusberg-Wahren, H., Seier Nielsen, F., Brogard, M., Troedsson, E. and Mullertz, A. 2005. Enzymatic characterization of lipid-based drug delivery systems. *Int J Pharm,* 298, 328-332.

Maestrelli, F., Cirri, M., Mennini, N., Zerrouk, N. and Mura, P. 2011. Improvement of oxaprozin solubility and permeability by the combined use of cyclodextrin, chitosan, and bile components. *Eur J Pharm Biopharm,* 78, 385-393.

Miller, J. M., Beig, A., Krieg, B. J., Carr, R. A., Borchardt, T. B., Amidon, G. E., Amidon, G. L. and Dahan, A. 2011. The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol Pharm,* 8, 1848-1856.

Milton, K. A., Edwards, G., Ward, S. A., Orme, M. L. and Breckenridge, A. M. 1989. Pharmacokinetics of halofantrine in man: effects of food and dose size. *Br J Clin Pharmacol,* 28, 71-77.

Morley, N. and Kuksis, A. 1972. Positional specificity of lipoprotein lipase. *J Biol Chem,* 247, 6389-93.

Muller, R. H., Maassen, S., Weyhers, H. and Mehnert, W. 1996. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target,* 4, 161-170.

Munoz Botella, S., Martin, M. A., Del Castillo, B., Menendez, J. C., Vazquez, L. and Lerner, D. A. 1996. Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of a retinal-beta-cyclodextrin complex. *J Pharm Biomed Anal,* 14, 909-915.

Nielsen, F. S., Gibault, E., Ljusberg-Wahren, H., Arleth, L., Pedersen, J. S. and Mullertz, A. 2007. Characterization of prototype self-nanoemulsifying formulations of lipophilic compounds. *J Pharm Sci,* 96, 876-892.

Ochiai, A., Itagaki, S., Kurokawa, T., Kobayashi, M., Hirano, T. and Iseki, K. 2007. Improvement in intestinal coenzyme Q10 absorption by food intake. *Yakugaku Zasshi,* 127, 1251-1254.

Ogunbona, F. A., Smith, I. F. and Olawoye, O. S. 1985. Fat contents of meals and bioavailability of griseofulvin in man. *J Pharm Pharmacol,* 37, 283-284.

Olbrich, C., Kayser, O. and Muller, R. H. 2002. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)--effect of surfactants, storage time and crystallinity. *Int J Pharm,* 237, 119-128.

Olbrich, C. and Muller, R. H. 1999. Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int J Pharm,* 180, 31-39.

Oudinet, C. 2005-2006. Caractérisations physico-chimiques et biopharmaceutiques d'une nouvelle forme galénique à base de cyclodextrines et d'huile pour l'administration d'un principe actif modèle par voie orale. *Master recherche : Pharmacotechnie et Biopharmacie, Université Paris-Sud 11*.

Parmentier, J., Becker, M. M., Heintz, U. and Fricker, G. 2011. Stability of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. *Int J Pharm,* 405, 210-217.

Persson, E. M., Gustafsson, A. S., Carlsson, A. S., Nilsson, R. G., Knutson, L., Forsell, P., Hanisch, G., Lennernas, H. and Abrahamsson, B. 2005. The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharm Res,* 22, 2141-2151.

Porter, C. J., Kaukonen, A. M., Boyd, B. J., Edwards, G. A. and Charman, W. N. 2004. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium-chain lipid-based microemulsion formulation. *Pharm Res,* 21, 1405-1412.

Roger, E., Lagarce, F. and Benoit, J. P. 2009. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm,* 379, 260-265.

Roger, E., Lagarce, F. and Benoit, J. P. 2011. Development and characterization of a novel lipid nanocapsule formulation of Sn38 for oral administration. *Eur J Pharm Biopharm,* 79, 181-188.

Rolan, P. E., Mercer, A. J., Weatherley, B. C., Holdich, T., Meire, H., Peck, R. W., Ridout, G. and Posner, J. 1994. Examination of Some Factors Responsible for a Food-Induced Increase in Absorption of Atovaquone. *Br J Clin Pharmacol,* 37, 13-20.

Rowland, R. N. and Woodley, J. F. 1980. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta,* 620, 400-409.

Sato, Y., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Noda, T., Mizuno, S., Sugawara, M. and Iseki, K. 2011. Pharmacokinetic properties of lutein emulsion after oral administration to rats and effect of food intake on plasma concentration of lutein. *Biopharm Drug Dispos,* 32, 151-158.

Schmidt, L. E. and Dalhoff, K. 2002. Food-drug interactions. *Drugs,* 62, 1481-1502.

Sim, I. K., Davis, T. M. and Ilett, K. F. 2005. Effects of a high-fat meal on the relative oral bioavailability of piperaquine. *Antimicrob Agents Chemother,* 49, 2407-2411.

Simovic, S., Heard, P., Hui, H., Song, Y., Peddie, F., Davey, A. K., Lewis, A., Rades, T. and Prestidge, C. A. 2009. Dry hybrid lipid-silica microcapsules engineered from submicron lipid droplets and nanoparticles as a novel delivery system for poorly soluble drugs. *Mol Pharm,* 6, 861-872.

Simovic, S., Hui, H., Song, Y. M., Davey, A. K., Rades, T. and Prestidge, C. A. 2010. An oral delivery system for indomethicin engineered from cationic lipid emulsions and silica nanoparticles. *J Control Release,* 143, 367-373.

Staggers, J. E., Hernell, O., Stafford, R. J. and Carey, M. C. 1990. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 1. Phase behavior and aggregation states of model lipid systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings. *Biochemistry,* 29, 2028-2040.

Sugano, K., Kataoka, M., Mathews Cda, C. and Yamashita, S. 2010. Prediction of food effect by bile micelles on oral drug absorption considering free fraction in intestinal fluid. *Eur J Pharm Sci,* 40, 118-124.

Szente, L., Szejtli, J., Szeman, J. and Kato, L. 1993. Fatty-acid cyclodextrin complexes - properties and applications. *J. Inclus. Phenom. Mol.,* 16, 339-354.

Thériaque *disponible au* http://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_simple.php.

Traber, M. G., Ingold, K. U., Burton, G. W. and Kayden, H. J. 1988. Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R-alpha-tocopherol in human lipoproteins. *Lipids,* 23, 791-797.

Trichard, L. 2007. Billes à base de cyclodextrines et d'huile : étude du mécanisme de formation et évaluation du potentiel en formulation et en thérapeutique. Pharm: Paris-Sud 11. p 1-203

Trichard, L., Chaminade, P., Grossiord, J. L., Le Bas, G., Huang, N., Durand, D., Fattal, E. and Bochot, A. 2011. Beads made of alpha-cyclodextrin and vegetable oils: oil composition and physicochemical properties influence bead feasibility and properties *J Drug Del Sci Tech,* 21(2), 189-194.

Trichard, L., Delgado-Charro, M. B., Guy, R. H., Fattal, E. and Bochot, A. 2008. Novel beads made of alpha-cyclodextrin and oil for topical delivery of a lipophilic drug. *Pharm Res,* 25, 435-440.

Trichard, L., Fattal, E., Besnard, M. and Bochot, A. 2007. Alpha-cyclodextrin/oil beads as a new carrier for improving the oral bioavailability of lipophilic drugs. *J Control Release,* 122, 47-53.

Tsuzuki, W., Ue, A., Nagao, A. and Akasaka, K. 2002. Fluorimetric analysis of lipase hydrolysis of intermediate- and long-chain glycerides. *Analyst,* 127, 669-673.

Uekama, K., Fujinaga, T., Hirayama, F., Otagiri, M. and Yamasaki, M. 1982. Inclusion complexations of steroid hormones with cyclodextrins in water and in solid phase. *Int J Pharm,* 10, 1-15.

Vandamme, T. F., Poncelet, D. and Subra-Paternault, P. 2007. Microencapsulation: des sciences aux technologies Paris: TEC and DOC. Lavoisier.

Witzleb, R., Mullertz, A., Kanikanti, V. R., Hamann, H. J. and Kleinebudde, P. 2012. Dissolution of solid lipid extrudates in biorelevant media. *Int J Pharm,* 422, 116-124.

Wu, C. Y. and Benet, L. Z. 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res,* 22, 11-23.

Wulff, M. and Alden, M. 1999. Solid state studies of drug-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000 prepared by a new method. *Eur J Pharm Sci,* 8, 269-281.

Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., Shah, V. P., Lesko, L. J., Chen, M. L., Lee, V. H. and Hussain, A. S. 2002. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res,* 19, 921-925.

Yu, S. C., Bochot, A., Le Bas, G., Chéron, M., Grossiord, J. L., Seiller, M. and Duchêne, D. 2001. Characteristics of O/W emulsions containing model lipophilic molecules with cyclodextrins as emulsifiers. *STP Pharma Sciences,* 11, 129-136.

Yuan, H., Wang, L. L., Du, Y. Z., You, J., Hu, F. Q. and Zeng, S. 2007. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. *Colloids Surf B Biointerfaces,* 60, 174-179.

Zangenberg, N. H., Mullertz, A., Kristensen, H. G. and Hovgaard, L. 2001. A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *Eur J Pharm Sci,* 14, 115-122.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont apporté des éléments significatifs permettant de conclure à l'intérêt des billes à base d'α-CD et d'huile de soja, pour l'administration orale de PA peu solubles dans l'eau.

Nous avons montré qu'il était possible d'encapsuler des molécules actives (la progestérone et l'indométacine) autres que les rétinoïdes et le diazépam, avec une teneur élevée et un rendement de fabrication satisfaisant. Toutefois, la présence de PA augmente le temps de formation des billes.

L'étude du comportement des billes nues lyophilisées, en termes de stabilité et de libération dans des milieux digestifs simulés, a permis de proposer un mécanisme de libération de la molécule encapsulée, à partir des billes. Après une phase d'hydratation, la matrice hydrophile d'α-CD se dissout progressivement, conduisant à une érosion de la surface des billes et à la libération de gouttelettes d'huile contenant le PA. La fraction dissoute du PA dans l'huile est alors libérée par un phénomène de partage dans les milieux digestifs simulés ou *in vivo*. Les sels biliaires accélèrent à la fois la libération du PA et la quantité dissoute, en fragilisant les billes et en réduisant la valeur du coefficient de partage du PA entre l'huile et le milieu digestif.

Les billes nues utilisées jusqu'à présent ont été modifiées par la création d'une coque d'α-CD à leur surface, de 100 à 250 μm d'épaisseur. Le procédé mis en œuvre est simple puisqu'il consiste uniquement à rajouter de l'α-CD en solution à des billes nues lavées et à agiter la préparation pendant 2 journées supplémentaires. La formation de la coque nécessite d'utiliser une quantité optimale d' α-CD. Les billes coquées se sont avérées être plus résistantes que les billes nues, notamment vis-à-vis de l'action des sels biliaires. La présence de la coque a permis de prolonger la libération de la molécule encapsulée, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo.*

De façon originale, il a été montré qu'une même formulation de départ (qualitative et quantitative) pouvait conduire à trois systèmes galéniques différents (émulsion sèche, billes nues, billes coquées après un nouvel ajout d'α-CD sur les billes nues), en fonction du temps d'agitation. Il est donc possible de moduler la libération d'un même PA sans changer les constituants de la formulation mais en jouant sur l'organisation du système. Chez le rat, l'émulsion sèche se comporte comme une forme à libération immédiate, les billes coquées comme une forme à libération prolongée et les billes nues comme une forme à libération

intermédiaire. Dans tous les cas, la biodisponibilité orale de l'indométacine a été améliorée par rapport à celle de la forme commerciale Indocid®.

Enfin, la libération du PA encapsulé peut également être modulée en changeant le mode de séchage des billes. En modifiant les propriétés des billes, le séchage à l'étuve accroît leur résistance dans les milieux digestifs simulés et prolonge la libération de la molécule encapsulée par rapport à des billes lyophilisées. Toutefois, les études de stabilité des billes lyophilisées et de celles séchées à l'étuve, ont révélé que la lyophilisation est la technique de conservation la plus appropriée, sous réserve que les billes soient conditionnées dans des flacons fermés, étanches et à l'abri de l'humidité. En effet, le séchage à l'étuve induit une légère exsudation de l'huile à la surface des billes qui rend leur manipulation difficilement envisageable à grande échelle.

De nombreuses perspectives de recherche peuvent être proposées à la suite de cette thèse. En effet, plusieurs études complémentaires permettant de conforter et d'affiner certaines hypothèses et d'approfondir certains aspects peuvent être envisagées.

En premier lieu, il semble nécessaire d'optimiser la formulation des billes nues séchées à l'étuve dans le but d'éliminer l'exsudation de l'huile. Les proportions (m/m) d'huile de soja, d'eau et d'α-CD pour la préparation des billes sont respectivement de 19,6%, 74,4% et 6%. Il est néanmoins possible de fabriquer des billes en faisant varier les proportions huile/eau/α-CD dans les domaines 12-24/70-82/3-6% (m/m) respectivement *(Bochot et al., 2007)*. Il serait donc envisageable de réduire la quantité d'huile de départ. Pour valider cette approche il faudrait vérifier au préalable que le rendement de fabrication des billes et que la teneur en PA ne soient pas trop diminués. Si cette éventualité venait à être confirmée, et uniquement dans ce cas, il serait alors intéressant de préparer des billes d'IND, coquées et séchées à l'étuve, afin de compléter l'étude de passage en solution de l'IND dans les milieux digestifs simulés et d'évaluer, *in vitro,* l'effet de la coque, combiné à celui du séchage à l'étuve. Le potentiel des billes séchées à l'étuve (nues et coquées), pour l'administration de PA, pourrait alors également être étudié *in vivo* chez le rat.

Pour étayer les hypothèses reliant l'effet du mode de séchage sur les propriétés des billes nues lyophilisées et celles séchées à l'étuve, il nous paraît intéressant d'étudier leurs microstructures en effectuant des mesures de porosité et de surfaces spécifiques des deux types de billes par différentes techniques telles que la méthode BET (Brunauer- Emmett- Teller), la

pycnométrie à hélium ou encore la porosimétrie par intrusion de mercure. La surface des billes séchées à l'étuve pourrait également être observée par microscopie électronique à balayage afin de la comparer à celle des billes lyophilisées, étudiée précédemment *(Bochot et al., 2007)*. Les propriétés mécaniques de ces deux types de billes pourraient également être étudiées par des techniques comme la micro-indentation. Le principe de l'essai consiste à appliquer une charge à l'aide d'un indenteur de géométrie connue, sur une bille (lyophilisée ou séchée) et une courbe d'indentation, représentant la force appliquée en fonction du déplacement mesuré, permet d'en déduire les propriétés mécaniques.

Les émulsions sèches à base d'α-CD et d'huile présentent l'avantage de ne pas utiliser de tensio-actifs, ni d'opérations de chauffage ou de sonication comme c'est généralement le cas avec les émulsions classiques *(Dollo et al., 2003, Jang et al., 2006, Ahmed and Aboul-Einien, 2007)*. Ces émulsions peuvent être formulées à partir d'huiles de nature variée (végétale, minérale ou synthétique) et d'autres CD que l'α-CD peuvent être employées, comme la γ-CD avec les huiles de silicone *(Trichard et al., 2008)*. Les émulsions se forment pour des ratios huile/CD/eau plus larges et un temps de fabrication plus court (quelques heures contre plusieurs jours) que ceux nécessaires à la formation des billes *(Trichard et al., 2008)*. Enfin, il n'y a pas de perte de PA puisque les émulsions sont lyophilisées directement dans le flacon qui a servi à leur fabrication, sans passer par une étape de lavage. Pour tous ces intérêts et compte tenu des résultats intéressants obtenus avec les émulsions sèches d'indométacine *in vivo*, il nous paraît intéressant de les caractériser davantage et d'optimiser leur formulation.
L'influence des proportions relatives huile/CD/eau sur les propriétés et le comportement des émulsions sèches *in vitro* et *in vivo* pourrait être évaluée car au cours de nos travaux, seules les quantités optimales qui permettent d'obtenir les billes ont été testées. Le suivi de l'aspect des globules par microscopie optique, à différents temps d'agitation, est une méthodologie simple et facile à réaliser, permettant d'observer la taille, la forme et l'homogénéité des globules. Sur l'émulsion reconstituée, une évaluation d'un certain nombre de paramètres est indispensable, notamment le temps et les conditions nécessaires à la reconstitution et surtout la forme et la taille des globules huileux, comparés à ceux obtenus avec l'émulsion avant lyophilisation.

Des billes de pectine ont été développées dans l'équipe par le Professeur Elias Fattal, afin de libérer spécifiquement des PA au niveau du côlon. En effet, ce polymère naturel est dégradé par les enzymes de la flore colique, ce qui permet une libération ciblée des molécules encapsulées à ce niveau. Seules des molécules hydrophiles peuvent être encapsulées dans les

billes de pectine. Il serait donc intéressant d'enrober les billes d'α-CD et d'huile d'une couche de pectine par la méthode de gélification ionique afin de permettre la délivrance colique de molécules faiblement solubles dans l'eau. Des essais *in vivo* chez le rat permettraient de valider cette nouvelle approche.

Pour la suite des travaux, il serait également envisageable d'encapsuler dans les billes une molécule modèle appartenant à la classe IV (peu soluble et faiblement perméable) de la classification biopharmaceutique *(Amidon et al., 1995)*. Les complexes partiels formés entre les triglycérides de l'huile et l'α-CD à l'interface huile/eau ont des propriétés tensio-actives. Après délitement des billes dans les milieux digestifs, les complexes d'inclusion mais aussi des molécules d'α-CD sous forme libre pourraient interagir avec les constituants de l'épithélium digestif et améliorer l'absorption de molécules de classe IV. Le potentiel des complexes et de l'α-CD libre en tant que promoteurs d'absorption, pourrait être étudié par l'évaluation des modifications de flux de PA traversant un segment d'intestin de rat, en utilisant le modèle *ex vivo* de la chambre de Ussing. Une étude *in vivo chez* le rat pourrait aussi être réalisée pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Abréviations

CD: cyclodextrine

ES: émulsion sèche

PA: principe actif

Références

Ahmed, I. S. and Aboul-Einien, M. H. 2007. In vitro and in vivo evaluation of a fast-disintegrating lyophilized dry emulsion tablet containing griseofulvin. *Eur J Pharm Sci,* 32, 58-68.

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification - the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharm Res,* 12, 413-420.

Bochot, A., Trichard, L., Le Bas, G., Alphandary, H., Grossiord, J. L., Duchene, D. and Fattal, E. 2007. alpha-Cyclodextrin/oil beads: An innovative self-assembling system. *Int J Pharm,* 339, 121-129.

Dollo, G., Le Corre, P., Guerin, A., Chevanne, F., Burgot, J. L. and Leverge, R. 2003. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Sci,* 19, 273-80.

Jang, D. J., Jeong, E. J., Lee, H. M., Kim, B. C., Lim, S. J. and Kim, C. K. 2006. Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. *Eur J Pharm Sci,* 28, 405-11.

Trichard, L., Fattal, E., Le Bas, G., Duchene, D., Grossiord, J. L. and Bochot, A. 2008. Formulation and characterisation of beads prepared from natural cyclodextrins and vegetable, mineral or synthetic oils. *Int J Pharm,* 354, 88-94.