



HAL
open science

Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée : étude pharmacotechnique, devenir in situ et efficacité

Audrey Ladj-Minost

► **To cite this version:**

Audrey Ladj-Minost. Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée : étude pharmacotechnique, devenir in situ et efficacité. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10165 . tel-00943382

HAL Id: tel-00943382

<https://theses.hal.science/tel-00943382>

Submitted on 7 Feb 2014

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.

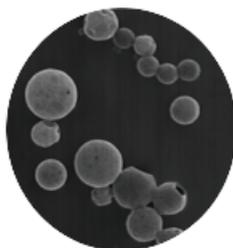
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Cette thèse de Doctorat intitulée

**RÉPULSIFS D'ARTHROPODES À DURÉE D'ACTION PROLONGÉE
POUR L'INDUSTRIE VÉTÉRINAIRE :
ÉTUDE PHARMACOTECHNIQUE, DEVENIR *IN SITU* & EFFICACITÉ**



présentée par **Audrey Ladj-Minost**

le **04 Octobre 2012**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mr. Hatem Fessi	Professeur	Directeur de thèse
Mme. Marie Alexandrine Bolzinger	Maitre de Conférences	Co-encadrant
M. Abdelhamid Elaïssari	Directeur de Recherche	Co-encadrant
M. Jean Delaveau	Ingénieur R&D Merial	Examineur
M. Franck Boury	Professeur	Rapporteur
M. Serge Stoll	Professeur	Rapporteur
M. Frédéric Marion-Poll	Professeur	Examineur

en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Chimie , Spécialité Physico-Chimie & Pharmacotechnie

N° d'ordre : 165-2012

Année 2012

THÈSE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 04 Octobre 2012

par

Mme LADJ-MINOST Audrey

RÉPULSIFS D'ARTHROPODES À DURÉE D'ACTION PROLONGÉE POUR
L'INDUSTRIE VÉTÉRINAIRE : ÉTUDE PHARMACOTECHNIQUE,
DEVENIR *IN SITU* ET EFFICACITÉ

Directeur de thèse : Pr. Hatem Fessi

JURY

M. Hatem Fessi	Professeur	Directeur de thèse
Mme Marie Alexandrine Bolzinger,	Maitre de Conférences	Co-encadrant
M. Abdelhamid Elaïssari	Directeur de Recherche	Co-encadrant
M. Jean Delaveau	Ingénieur R&D Merial	Examineur
M. Franck Boury	Professeur	Rapporteur
M. Serge Stoll	Professeur	Rapporteur
M. Frédéric Marion-Poll	Professeur	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Administrateur provisoire : M. le Professeur G.
KIRKORIAN

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.
VINCIGUERRA.

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Observatoire de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. R. BERNARD

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-
DESCHAMPS

Thèse industrielle, collaboration entre le LAGEP et Merial

Laboratoire d'Automatique et du GENie des Procédés (LAGEP)



Université de Lyon,
Domaine universitaire de la Doua,
CPE, Batiment G, 2^{ème} étage
43 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex - France

Merial SAS

254 Rue Marcel Mérieux
69007 Lyon - France



Remerciements



*« Chacun dans sa vie fait des rencontres qui guideront
ses choix professionnels et influenceront le reste de son existence ... »*

Je remercie mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Hatem Fessi, de m'avoir accueillie au sein du LAGEP pour la réalisation des travaux de thèse. Je tiens à adresser mes profonds remerciements à Jean Delaveau, correspondant Merial, pour m'avoir permis de faire avancer ce projet de recherche, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Mes sincères remerciements à Monsieur Le Professeur Frédéric Marion-Poll (Institut National de Recherche Agronomique, Paris), pour avoir répondu favorablement à la participation à mon jury de thèse. Merci de nous avoir éclairés dans le domaine de la physiologie des insectes, bien loin du domaine de la physico-chimie...

Je remercie Messieurs les Professeurs Franck Boury et Serge Stoll qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Les travaux de recherche réalisés durant ces dernières années n'auraient pas été possibles sans le support scientifique de certaines personnes. Marie Alexandrine Bolzinger et Hamid Elaïssari ont fait preuve d'un encadrement actif et motivant durant cette période de thèse. Je vous remercie pour la confiance, l'accompagnement, l'aide et le soutien dont j'ai pu bénéficier durant tout ce temps. Chacun dans son domaine a su apporter des conseils précieux qui ont porté leurs fruits.

Merci à toutes ces personnes si chères au LAGEP, Nadia Chapel pour sa gentillesse, sa réactivité et son soutien. Merci à Jean Pierre Valour, notre Mac Gyver, pour sa bonne humeur, sa disponibilité et ses riches compétences dans tant de domaines! Merci également à Jocelyne Pelletier pour son soutien, sa patience et son partage de connaissance rendu si accessible.

Tant de personnes ont participé à l'avancement de ce projet, je les remercie profondément d'avoir rendu accessible leurs domaines de compétences : Roland Allemand pour les expérimentations sur drosophiles ; Agnès Piednoir pour les analyse en AFM ; Loic Vanel pour les études d'adhésion ; Christian Jallut pour ses enseignements, idées et conseils dans un domaine « quelque peu obscure » que constitue la thermodynamique ; Yves Chevalier ; Francois Puel... Et tous ceux que j'aurais oubliés de citer.

Merci à l'équipe de Merial : Emilie Arthaud, Catherine Ollagnier, Matthias Pollmeier... qui m'ont donné un avant-gout de l'expérimentation animale en participant aux tests sur beagles.

Un grand MERCI à toutes ses personnes d'exception qui ont partagé mon quotidien, aux personnes qui sont toujours au LAGEP et qui y sont passées. Parmi ces personnes je remercie particulièrement Miloux, Samounet, Abirounette, Stefinou, Gégé, Audrey, Seb, Nassim, Delf, Faïzou, Basilou, Zaouaoui et tant d'autres qui me pardonneront de les avoir oublié... pour tous ces échanges aussi bien au laboratoire qu'en salle conviviale ! Merci pour cette bonne humeur quotidienne, cette gentillesse, ces fous rires et toutes ces bonnes choses que vous m'avez apporté! « La plus perdue de toutes les journées est celle où l'on n'a pas ri ». Merci à Claudia Mora-Huertas, Naveed Ahmed, Ahmed Bitar, Mohamed-Aissa... d'avoir participé à ce bon vivre au laboratoire ! Thank you Mahbubor Rahman for the english discussions, there is very few persons that let a so pronounced absence in the lab as yours.

Je remercie ma famille qui m'a entouré pendant toutes ces années, en comprenant plus ou moins ce que je faisais (plus moins que plus...), et tout particulièrement Rachid Ladj, mon mari, pour son soutien, son aide quotidienne, nos longues discussions et débats scientifiques au laboratoire comme à la maison!

A ma fille Mélyna, ma plus belle formulation...

TITRE



Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée :
Étude Pharmacotechnique, Devenir *in situ* et Efficacité.

RÉSUMÉ

Les répulsifs sont des molécules naturelles ou synthétiques dont le but est d'empêcher l'approche des arthropodes afin de prévenir la transmission de maladies vectorisées. Un exemple type est celui de la transmission de *Leishmania infantum* responsable de la Leishmaniose canine, qui est contractée après la piqûre d'un chien par un phlébotome. Divers répulsifs d'arthropodes sont commercialisés pour une application topique, ils ont tous une durée d'action courte, imposant des applications répétées de formulations basiques de type solution.

La formulation de molécules actives à propriétés répulsives incorporées dans des systèmes nanoparticulaires et présentant une action prolongée dans le temps a été retenue. Les nanoparticules sont des vecteurs colloïdaux intéressants dans le domaine de la technologie pharmaceutique vu leur capacité à former des complexes avec des molécules hydrophobes, telles que la plupart des molécules répulsives (DEET, Picaridin[®], IR3535[®]...). Le ciblage, la protection contre la dégradation et le contrôle de la libération sont les avantages principaux apportés par les nanoparticules contenant une matière active.

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (taille et potentiel zêta) permettant leur stockage dans les couches supérieures de la peau et une accroche le long des fibres pileuses ont été déterminées. Ainsi des nanoparticules cationiques de 200 nm de diamètre ont été formulées. Cette formulation originale inspirée du procédé de nanoprécipitation a permis l'obtention en une seule étape de suspensions concentrées en matière active (concentration supérieure à 10%) et sans ajout d'agents stabilisants. Une corrélation entre les profils de libération et l'efficacité sur insecte modèle (la drosophile) a été vérifiée. De ce fait, le pourcentage en polymère régule la libération de la molécule active encapsulée. Une efficacité répulsive de formulations nanoparticulaires supérieure à 15 jours a été validée expérimentalement. La transposition d'échelle du procédé de nanoprécipitation permet d'envisager un développement industriel pour la formulation d'un répulsif d'arthropode innovant à longue durée d'action.

MOTS CLÉS

Répulsif d'arthropode, espèce canine, maladie vectorielle, nanoparticule polymérique, nanoprécipitation, industrialisation.

TITLE



Arthropod repellent having a long lasting effect:

Pharmacotechnic investigation, *In situ* fate and Effectiveness

ABSTRACT

The repellents are natural or synthetic molecules whose aim is to prevent the approach of arthropods to avoid transmission of vector-borne diseases. A typical example is the transmission of *Leishmania infantum* responsible for canine Leishmaniasis, which is contracted after a sandfly bite on a dog. The arthropod repellents marketed for topical application have all a short action duration, requiring repeated applications of basic formulations (solution).

The formulation of active molecules having repellent properties, incorporated into nanoparticle systems and having a prolonged action in time was selected. Nanoparticles are colloidal carriers interesting in the pharmaceutical technology field due to their ability to form complexes with hydrophobic molecules, such as repellent molecules (DEET, Picaridin[®], IR3535[®]...). Targeting, protection against degradation and control of the release are the main advantages provided by the nanoparticles containing an active ingredient.

The nanoparticle physicochemical characteristics (size and zeta potential) permitting their storage in the upper dog skin layers and along the hairs were determined. For that reason cationic nanoparticles of 200 nm in diameter were formulated. This original formulation inspired from the nanoprecipitation process has allowed us to obtain one single step concentrated suspensions (above 10% of active molecules in the final product) and without stabilizer addition. A correlation between the release profiles and the effectiveness of model insect (*Drosophila*) has been verified. Therefore the percentage of polymer regulates the release of encapsulated active molecules. Repellent efficacy of nanoparticulate formulation greater than 15 days has been validated experimentally. The scale transposition of the nanoprecipitation process makes conceivable an industrial development for the formulation of an innovative arthropod repellent having a long lasting effect.

Keywords

Arthropod repellent, canine species, vector-borne diseases, polymeric nanoparticle, nanoprecipitation, industrialization

Liste des abréviations



AcOEt	Acétate d'Ethyle	
AFSSET	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail	
BB	Benzoate de Benzyle	
CD	CycloDextrine	
DEET	N,N Diéthyle <i>m</i> Toluamide	
DEPA	N,N-DiEthyl PhenylAcetamide	
DLS	Dynamic Light Scattering	
DMP	DiMethyl Phtalate	
DMSO	DiMéthylSulfOxide	
DQEL	Diffusion Quasi Elastique de la Lumière	
EE	Efficacité d'Encapsulation	
EtOH	Ethanol	
ERS100	Eudragit [®] RS100	
EV	Enthalpie de Vaporisation	kJ/mol
HCl	Chlorure d'Hydrogène	
HPbCD	HydroxyPropyl beta CycloDextrine	
HPS	Hematoxyline Phloxine Safran	
Log P	coefficient de partition octane/eau	SU
MA	Matière Active	
MEB	Microscopie Electronique à Balayage	
MeOH	Méthanol	
MET	Microscopie Electronique à Transmission	
MMA	MethAcrylate de Méthyle	
mV	Millivolts	
NaOH	Hydroxyde de sodium	
nm	nanomètres	
NP	NanoParticule	
OBP	Olfactory Binding Protein	
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé	
ORN	Olfactive Neuron Receptor	
PA	Principe Actif	

PCL	Poly- ϵ -CaproLactone	
PdI	Polydispersity Index	SU
Pica	Picaridine	
PLA	Acide PolyLactide	
PLGA	Acide PolyLactide- <i>co</i> -Glycolide	
PLX	Poloxamère	
PV	Pression de Vapeur	Torr ; mmHg
PVA	alcool polyvinylique	
PZ	potentiel zêta	mV
QESD	quasi emulsion solvent diffusion method	
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship	
R	Résistivité	
S	solubilité dans l'eau à 25°C	
SNC	Système Nerveux Central	
SU	Sans Unité	
TEWL	Trans Epidermal Water Loss (perte en eau transépidermique)	$\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$
TMFF	Température Minimale de Formation de Film	°C
T80	Tween 80 (polysorbate 80)	
WHO	World Health Organization	
Z-average	Taille moyenne de particules	nm
% Pol/part	Pourcentage en polymère par particule	
α CD	alpha cyclodextrine	
β CD	beta cyclodextrine	
γ CD	gamma cyclodextrine	
ζ	potentiel zêta	mV

Liste des Figures & Tableaux



Chapitre I

- Figure I.1: Cycle de transmission des maladies infectieuses et action d'un répulsif.
- Figure I.2: Structure chimique de molécules répulsives d'arthropodes couramment utilisées avant la 2nde guerre mondiale. A : DMP ; B : Indalone[®]; C : Rutgers 612[®].
- Figure I.3 : Classification phylogénétique des arthropodes.
- Figure I.4 : Cycle de vie du parasite *Leishmania* transmis par un phlébotome femelle entraînant la leishmaniose.
- Figure I.5 : (A) Représentation des organes olfactifs chez la drosophile ; (B et C) Images obtenues par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des organes olfactifs d'une drosophile.
- Figure I.6 : Représentation du système olfactif de la drosophile.
- Figure I.7 : Mécanisme d'action du DEET.
- Figure I.8 : Avantages de l'ajout de porteurs d'ingrédients actifs dans une formulation pharmaceutique.
- Figure I.9 : Représentation de la structure chimique des cyclodextrines natives et caractéristiques dimensionnelles.
- Figure I.10 : Comparaison de la dégradation de molécules actives encapsulées dans une gouttelette d'huile (système émulsion) et dans un système particulaire.
- Figure I.11 : Représentation des morphologies de systèmes nanoparticulaires (capsule et sphères).
- Figure I.12 : Répartition de l'impact économique global anticipé des nanotechnologies en 2010 selon l'AFSSET.
- Figure I.13 : Procédé d'émulsification diffusion de solvants.
- Figure I.14: Procédé d'émulsification diffusion de solvant en scale-up. A : Système d'agitation.
- Figure I.15: Etapes de formulation de nanoparticules par le procédé de nanoprécipitation
- Figure I.16 : Unité pilote du procédé de nanoprécipitation utilisant un « mélangeur en T ».
- Figure I.17 : Schéma d'un contacteur membranaire
- Figure I.18 : Diagramme d'énergie potentielle en fonction de la distance interparticulaire.
- Figure I.19 : Formation d'un film de nanoparticules à partir d'une suspension colloïdale.
- Tableau I.1: Liste d'huiles essentielles à propriétés répulsives et leur composition chimique principale.
- Tableau I.2: Structures chimiques de composés naturels à intérêt répulsif.
- Tableau I.3: Molécules naturelles à activité répulsive décrite comme comparable au DEET et leur origine
- Tableau I.4: Caractéristiques physico-chimiques de molécules répulsives de synthèse.
- Tableau I.5 : Formulations du DEET par complexation à des porteurs colloïdaux.
- Tableau I.6 : Caractéristiques des cyclodextrines natives.
- Tableau I.7 : Description de suspensions nanoparticulaires à base d'Eudragit[®].

Chapitre II

- Figure II.1 : Représentation du procédé de polymérisation en émulsion (étape 1 et 2).
- Figure II.2 : Principe de visualisation de la surface des nanoparticules par microscopie électronique à balayage
- Figure II.3 : Représentation du principe de la microscopie confocale
- Figure II.4 : Représentation de l'équipement d'analyse du potentiel d'écoulement. A: solution électrolytique [NaCl]= 1 mmol/L, pH=6,5; B: Pistons pour mener le flux de solution électrolytique; C: électrode d'Ag/AgCl; D: cellule cylindrique contenant les poils canins.
- Figure II.5 : Structure chimique du MMA (A), du Polyfluor®394 (B) et du V50 (C).
- Figure II.6 : Aspect histologique après coloration HPS et coupe au microtome de la peau canine. 1 : couche cornée ; 2 : épiderme viable ; 3 : derme.
- Figure II.7 : Image de microscopie confocale de peau canine après reconstruction 3D (A) et à une profondeur de 100µm (B).
- Figure II.8 : Observation par MEB de la surface de peau canine.
- Figure II.9 : Représentation de la structure de la peau et de ses annexes avec les poils en surface présentant un potentiel zêta de surface négatif.
- Figure II.10: Variation du potentiel zêta de poils canins en fonction du temps de contact dans une solution d'électrolyte standard (pH = 6,5 ; [NaCl] = 1mM ; T = 25 °C).
- Figure II.11: Effet du pH sur le potentiel zêta du poil canine.
- Figure II.12 : Evolution de la taille de particule, de leur potentiel zêta (valeur numérique) et du taux de conversion en fonction du pourcentage en amorceur de réaction, après 6 heures de réaction. Le diamètre hydrodynamique a été obtenu par DLS (confirmés par les observations MEB).
- Figure II.13 : Evolution de la taille de particules et de leur potentiel zêta (valeur numérique) en fonction du pourcentage en monomère (MMA) dans le milieu réactionnel, après 6 heures de réaction. Le diamètre hydrodynamique a été obtenu par DLS, confirmé par les observations MEB.
- Figure II.14 : Images obtenues par spectromicroscopie des latex avec à droite les images de la fluorescence.
- Figure II.15 : Etude de la taille des particules et leur potentiel zêta en fonction du pourcentage en PVA dans la phase aqueuse.
- Figure II.16 : Images obtenues par MEB des 4 lots de particules de latex finaux.
- Figure II.17 : Images superposées obtenues par microscopie confocale à partir de peau canine traitées avec des nanoparticules cationiques de 100 nm.
- Figure II.18 : Images superposées obtenues par microscopie confocale à partir de peau canine traitées avec des nanoparticules cationiques de 200 nm.
- Figure II.19 : Images de la peau à différentes profondeur de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 200nm.
- Figure II.20 : Images de la peau à différentes profondeur de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 400nm.
- Figure II.21 : Images de la peau à différentes profondeur de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 600 nm.

- Figure II.22 : Images obtenues par microscopie à fluorescence après coloration spécifique.
- Figure II.23 : Etude du potentiel zêta en fonction du pH des latex de PMMA (cationique, 200 nm).
- Figure II.24 : Suivi du potentiel zêta en fonction de la quantité en nanoparticules (PMMA NP) et en fonction du temps sur poils de chien.
- Figure II.25 : Représentation du potentiel zêta en fonction de la concentration en latex cationique de 200 nm dans une solution d'électrolyte standard.
-
- Tableau II.1 : Caractérisation physique (taille et potentiel zêta) des latex synthétisés par copolymérisation du MMA et du Polyfluor[®]394. Etude du pourcentage en marqueur fluorescent.
- Tableau II.2 : Composition et caractérisation physique des lots de latex optimisés. Concentration en V50 fixé à 2,5 [%massique MMA] ; Concentration en Polyfluor[®]394 fixée à [1%massique MMA].
- Tableau II.3 : Caractéristiques de poils canins ayant subi une étape d'adsorption à des doses de nanoparticules différentes

Chapitre III

- Figure III.1 : Représentation du principe d'analyse microscopique par AFM.
- Figure III.2 : Profils d'évaporation de molécules répulsives d'arthropodes.
- Figure III.3 : Evolution de la taille moyenne des nanoparticules en suspension et de l'indice de polydispersité en fonction du pourcentage en benzoate de benzyle par nanoparticule.
- Figure III.4 : Potentiel zêta en fonction du pourcentage en Tween[®] 80 dans la phase aqueuse.
- Figure III.5 : Représentation schématique de la double couche électrique des surfaces de nanoparticules d'Eudragit[®] RS100 formulées sans Tween[®] 80 (A) et avec (B).
- Figure III.6 : Distribution granulométrique obtenue par DLS de la formulation de référence. Distribution de taille exprimée en intensité de lumière diffusée.
- Figure III.7 : Images MEB d'un dépôt de suspension nanoparticulaire de la formulation de référence.
- Figure III.8 : Images MET d'un dépôt de suspension nanoparticulaire de la formulation de référence.
- Figure III.9 : Evolution de la solubilité du benzoate de benzyle dans des mélanges eau/éthanol en fonction du pourcentage en éthanol (% massique) à 25°C (n = 3).
- Figure III.10 : Procédé de nanoprécipitation couramment décrit dans la littérature.
- Figure III.11 : Evolution de la taille et de la distribution de taille des particules mesuré par DLS en fonction du pourcentage en benzoate de benzyle par nanoparticule.
- Figure III.12 : Images MEB d'un dépôt d'une suspension nanoparticulaire contenant 33%massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.
- Figure III.13 : Images MEB d'un dépôt d'une suspension nanoparticulaire contenant 66%massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.
- Figure III.14 : Images MET de trois lots de nanoparticules contenant 66, 50 et 33% massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.
- Figure III.15 : Distributions granulométriques obtenues par DLS de trois formulations variant pour leur rapport phase organique : phase aqueuse.
- Figure III.16 : Evolution de la taille et de la distribution de taille des nanoparticules en fonction du pourcentage en éthanol dans la phase continue.
- Figure III.17 : Comparaison des distributions de tailles en fonction du pourcentage en éthanol dans la phase continue.
- Figure III.18 : Effet du pH de la phase continue sur la taille moyenne des nanoparticules présentant une distribution de taille monomodale (A) et sur leur potentiel zêta (B) (n = 3).
- Figure III.19 : Représentation schématique de la déprotonation des fonctions amines avec l'augmentation du pH.
- Figure III.20: Images obtenues par MEB de la formulation de référence après 3 ans de stockage en vieillissement accéléré.
- Figure III.21 : Images topographiques obtenues par AFM de nanoparticules de la suspension de référence 24 heures après dépôt sur une lame de microscopie.

Figure III.22 : Images 3D de particules de la formulation de référence. (A) image d'une particule individuelle, (B) image de l'ensemble d'une zone analysée.

Figure III.23 : Image obtenue par AFM après 7 jours de dépôt sur lame de verre.

Figure III.24 : Superposition des courbes de taille d'une nanoparticule obtenue par AFM à t_0 (24heures après dépôt) et $t_{7\text{jours}}$.

Figure III.25 : Evolution de la taille des particules en fonction de la quantité de polymère par nanoparticule.

Figure III.26 : Images obtenues par MET de trois lots de particules chargées en Picaridin[®].

Figure III.27 : Images obtenues par MEB de trois lots de particules se différenciant par leur pourcentage en polymère par particule.

Figure III.28 : Image obtenue par MEB d'une formulation contenant 50 %en polymère par nanoparticule. Visualisation de la formation d'un film de nanoparticules.

Figure III.29 : Images obtenues par MEB d'une formulation nanoparticulaire de DEET (formulation intermédiaire, 10%Eudragit[®]RS100, 10%DEET).

Tableau III.1 : Caractéristiques des suspensions nanoparticulaires répondant aux critères du cahier des charges.

Tableau III.2 : Caractéristiques des polymères biodégradables utilisés dans l'étude préliminaire. M : Masse molaire ; Tf : température de fusion mesurée par DSC (Differential Scanning Calorimetry).

Tableau III.3 : Caractéristiques physico-chimiques de molécules actives d'intérêt formulées.

Tableau III.4 : Formulations du benzoate de benzyle par nanoprécipitation dans une matrice polymérique de PLD. % BB/NP : teneur en benzoate de benzyle par nanoparticules. Sol : Solution aqueuse de PVA 4-88.

Tableau III.5 : Données de formulation et d'analyse d'une suspension nanoparticulaire monomodale à base d'Eudragit[®]RS100.

Tableau III.6 : Caractéristiques de formulation et données analytiques de nanoparticules d'Eudragit[®]RS100 obtenues par nanoprécipitation.

Tableau III.7 : Effet de la nature du solvant sur les caractéristiques finales des nanoparticules.

Tableau III.8 : Etude de la teneur en benzoate de benzyle des nanoparticules à base d'Eudragit[®]RS100 (%BB/NP) ; n=3. Valeurs des composants exprimés en pourcentage massique.

Tableau III.9 : Influence du rapport phase organique : phase aqueuse (PO : PA) sur la taille et le potentiel zêta de particules. NA = analyse Non Applicable.

Tableau III.10 : Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules chargées en benzoate de benzyle en fonction du pH. n=3.

Tableau III.11 : Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules chargées en benzoate de benzyle en fonction de la force ionique (n = 3).

Tableau III.12 : Caractéristiques de formulation et résultats d'analyse de suspensions nanoparticulaires pour l'encapsulation de la Picaridin[®]. %pol/part : pourcentage en polymère par nanoparticule.

Tableau III.13 : Caractéristiques de formulation et résultats d'analyse de suspensions nanoparticulaires pour l'encapsulation du DEET. %pol/part : pourcentage en polymère par nanoparticule.

Chapitre IV

- Figure IV.1: Variation du potentiel zêta de surface en fonction du temps et de la quantité de nanoparticules introduites dans la solution électrolytique. *: addition de NP dans la solution électrolytique.
- Figure IV.2: Variation du potentiel zêta en fonction de la concentration en nanoparticules dans la solution électrolytique.
- Figure IV.3: Observation MMEB de fibres pileuses après adsorption de nanoparticules, le potentiel zêta de la surface de la fibre est stable et égale à +25mV.
- Figure IV.4 : Matériel expérimental utilisé pour l'élaboration de profils de libération.
- Figure IV.5 : Profils de libération du benzoate de benzyle sur poils canins en fonction du type de formulation.
- Figure IV.6 : Profils de libération du benzoate de benzyle sur support cellulosique en fonction du type de formulation.
- Figure IV.7 : Profils de libération du benzoate de benzyle depuis des nanoparticules déposées sur poils canins et sur papier filtre.
- Figure IV.8 : Image MEB d'un poil canin traité par la suspension nanoparticulaire
- Figure IV.9 : Cellule de diffuse statique (cellule de Franz, A) ; Représentation schématique des compartiments de la peau (B) ; Image obtenues après HPS d'un fragment de peau canine (C).
- Figure IV.10 : Appareillage de mesure du TEWL.
- Figure IV.11 : Observation macroscopique (A) et microscopique (B) de la peau canine au cours du traitement de séparation des couches.
- Figure IV.12 : Profils de pénétration cutanée du benzoate de benzyle depuis une solution et depuis une suspension nanoparticulaire. LR: Liquide Récepteur; D: Derme; EV: Epiderme Viable; SC: *Stratum corneum*; SS: Surface de la Peau.
- Figure IV.13 : Localisation des 5 sites d'étude sur beagles. 1 : nuque ; 2 : milieu du dos ; 3 : zone lombaire ; 4 : côté droit du thorax ; 5 : côté gauche du thorax.
- Figure IV.14 : Variation de la densité de fibres pileuses en fonction de la zone de prélèvement.
- Figure IV.15: Benzoate de benzyle dosé sur 5 beagles en fonction de la zone de prélèvement et du temps. Représentation de la moyenne des résultats obtenus sur 5 beagles.
- Figure IV.16 : Observation d'une fibre pileuse prélevée sur un beagle une heure après l'application de la suspension nanoparticulaire
- Figure IV.17 : Observation d'une fibre pileuse prélevée sur un beagle 15 jours après l'application de la suspension nanoparticulaire
- Figure IV.18 : Dosage du benzoate de benzyle résiduel sur poil de chien et sur la peau en fonction du temps pour le site 2 (milieu du dos).
- Tableau IV.1 : Composants de la formulation de référence (BB-NP) utilisé dans l'étude de la libération et de pénétration cutanée.
- Tableau IV.2 : Formulations utilisé dans l'étude des interactions de surface nanoparticules/poils.
- Tableau IV.3 : Caractéristiques la libération du benzoate de benzyle (BB) depuis la suspension nanoparticulaire de référence et la solution éthanolique. ML : Modèle de libération.

Tableau IV.4 : Résultats analytiques obtenus pour le dosage du benzoate de benzyle dans les différents compartiments de la peau. QT : quantité totale dosée. (Données exprimées en $\mu\text{gBB}/\text{cm}^2$) ; ET : Erreur Type.

Tableau IV.5 : Données essentielles obtenues pour l'étude de pénétration cutanée du benzoate de benzyle libre et encapsulé. Rapport SP/SC = BB en surface de la peau / BB dans le SC.

Tableau IV.6 : Données analytiques du suivi de la perte du benzoate de benzyle formulé sous forme nanoparticulaire et appliqué sur beagles. Données exprimées en % de la quantité initiale appliquée ($t_{1\text{heure}}$).

Chapitre V

- Figure V.1 : Matériel expérimental utilisé pour l'élaboration de profils de libération et pour l'évaluation de l'efficacité répulsive.
- Figure V.2 : (A) Photos MEB des organes olfactifs de la drosophile. (B) Représentation schématique d'une sensille olfactive, ORN : Olfactive Receptor Neuron ; SNC : Système Nerveux Central.
- Figure V.3 : Schéma du dispositif expérimental pour l'évaluation de l'efficacité. (A) : formulation de matière active à propriété répulsive ; (B) : solution sans matière active.
- Figure V.4 : Support développé au laboratoire.
- Figure V.5 : Montage d'un dispositif expérimental pour le test d'efficacité sur drosophiles.
- Figure V.6 : Introduction des produits testés (A) et des drosophiles anesthésiées (B).
- Figure V.7 : Boîtes expérimentales à t_0 .
- Figure V.8 : Boîtes expérimentales à $t_{24\text{heures}}$.
- Figure V.9 : Echelle des valeurs des indices de répulsion et leurs significations.
- Figure V.10 : Evolution de l'indice de répulsion immédiat en fonction de la dose appliquée.
- Figure V.11 : Evolution de l'indice de répulsion immédiat en fonction de la dose appliquée. (A) benzoate de benzyle ; (B) Picaridin[®].
- Figure V.12 : Structures chimiques de l'Eudragit[®] RS100, du DEET et de la Picaridin[®].
- Figure V.13 (A) : Etude sur une solution de benzoate de benzyle. Mise en parallèle des profils de libération et des résultats d'efficacité répulsive sur drosophile en fonction du temps (BB solution).
- Figure V.13 (B) : Étude d'une dispersion de benzoate de benzyle. Mise en parallèle des profils de libération et des résultats d'efficacité répulsive sur drosophile en fonction du temps (BB-NP).
- Figure V.14 : Profils de libération sur 21 jours de la Picaridin[®] en fonction du pourcentage en polymère par nanoparticule.
- Figure V.15 : Profils de libération de la Picaridin[®] depuis 3 suspensions nanoparticulaires en fonction de la racine carré du temps.
- Figure V.16 : Profils de libération de la Picaridin[®] en fonction du pourcentage en polymères par nanoparticules, représentation de $t_{2\text{jours}}$ à $t_{21\text{jours}}$.
- Figure V.17 : Indice de répulsion en fonction du temps et du type de fabrication. Comparaison de trois formulations nanoparticulaires et d'une solution éthanolique, 10% massique de Picaridin[®].
- Tableau V.1 : Caractéristiques physicochimiques des dispersions nanoparticulaires utilisées.
- Tableau V.2 : Caractéristiques des tests d'efficacité réalisés sur le benzoate de benzyle et la Picaridin en solution éthanolique.
- Tableau V.3 : Valeurs caractéristiques d'efficacité immédiate obtenues pour le benzoate de benzyle et la Picaridin[®] depuis une solution.
- Tableau V.4 : Valeurs caractéristiques d'efficacité répulsive des formulations de Picaridin[®]. IR_{50} : dose nécessaire pour observer un indice de répulsion de 0,5 ; t_{IR50} : temps nécessaire pour obtenir un indice de répulsion de 0,5.

Table des matières



Introduction générale	1
<u>Chapitre I - Étude bibliographique</u>	7
Partie 1 - Les répulsifs d'arthropodes : historique, mode d'action et formulation	9
Introduction, historique	11
I. Les insectes, classification et répulsion.	13
I.1. Généralités	13
I.2. Exemples de pathogènes vectorisés au chien	14
I.3. L'olfaction chez l'insecte	15
II. Les agents répulsifs d'origine naturelle	19
III. Les agents répulsifs d'origine synthétique	22
IV. Augmentation de la durée d'activité	26
IV.1. Complexes d'inclusion avec les cyclodextrines	27
IV.2. Les liposomes	28
IV.3. Les émulsions	29
IV.4. Les nanoparticules	30
Conclusion	33
Partie 2 – Les nanoparticules, leur formulation et leur devenir	35
Introduction	37
I. Les nanoparticules, généralités	38
I.1. Les nanoparticules lipidiques	38
I.2. Les nanoparticules polymériques	39
II. Procédés de formulation par déplacement de solvant	41
II.1. L'émulsification-diffusion de solvant	41
II.2. La nanoprécipitation	43
II.3. Le procédé membranaire	45
III. Devenir des particules après fabrication	47
III.1. Stabilité colloïdale	47
III.2. Mécanisme de formation d'un film de nanoparticules	50
III.3. Cinétique de diffusion de matières actives volatiles dans l'air	51
Conclusion	54

Chapitre II – Etude préliminaire sur nanoparticules modèles, Synthèse, Caractérisation & Interactions

Introduction.....	61
I. La polymérisation en émulsion.....	62
II. Matériels & Méthodes	65
II.1. L'analyse de taille de particule par diffusion quasi élastique de la lumière. . .	65
II.2. Le potentiel zêta de nanoparticules en suspension	66
II.3. Outils de microscopie	67
II.4. Etude électrocinétique sur poil canins.....	71
II.5. Méthode de fabrication des latex.....	73
III. Caractérisation des supports biologiques	75
III.1. La peau	75
III.2. Les fibres pileuses.....	76
IV. Synthèse de particules modèles, les latex	81
IV.1. Concentration en amorceur et en monomère.....	81
IV.2. Ajout d'un marqueur fluorescent.....	84
IV.3. Réduction des tailles par ajout d'un agent stabilisant	85
IV.5. Fabrication des suspensions de nanoparticules modèles finales	86
V. Visualisation de la distribution des particules dans la peau canine	88
VI. Etude de l'adsorption sur le poil canin	94
Conclusion	98

Chapitre III - Formulation de suspensions nanoparticulaires

Introduction	103
I. Matériels & Méthodes	103
I.1. Matières premières	107
I.2. Méthode de fabrication	107
I.3. Méthode de caractérisation	107
I.4. Méthode de quantification.....	110
I.5. Vitesse d'évaporation des matières actives	111

II.	Résultats & Discussions	112
II.1.	Choix d'une matière active modèle	112
II.2.	Nanoparticules biodégradables contenant du benzoate de benzyle	113
II.3.	Formulation de nanoparticules polymériques cationiques	116
II.4.	Etude paramétrique de formulations de nanoparticules d'Eudragit®RS100 chargées en benzoate de benzyle	121
II.5.	Suivi de stabilité colloïdale	131
II.6.	Visualisation des phénomènes d'affaissement par AFM	135
III.	Application de la méthodologie à d'autres matières actives à propriétés répulsives ..	138
III.1.	Formulation de la Picaridin®	138
III.2.	Le DEET	143
	Conclusion	145

Chapitre IV – Bioadhésion & Interactions avec la cible 147

	Introduction	149
I.	Formulations et caractérisations physico-chimiques	153
II.	Interactions des nanoparticules avec les poils canins <i>in vitro</i>	154
II.1.	Matériels & Méthodes	154
II.2.	Résultats & Discussions	155
III.	Libération <i>in vitro</i>	158
III.1.	Matériels & Méthodes	158
III.1.a.	Étude de la libération <i>in vitro</i> sur poils canins	158
III.1.b.	Étude de la libération <i>in vitro</i> sur papiers-filtres	158
III.2.	Résultats & Discussions	160
III.2.a.	Profils de libération du benzoate de benzyle sur poils canins	160
III.2.b.	Profils de libération sur support cellulosique	161
III.2.c.	Comparaison des résultats de libération du benzoate de benzyle ...	162
IV.	Étude de la pénétration cutanée	164
IV.1.	Matériels & Méthodes	165
IV.2.	Résultats & Discussions	171
V.	Étude de la libération <i>in vivo</i> sur beagles	174
IV.1.	Matériels & Méthodes	174
IV.2.	Résultats & Discussions	176
	Conclusion	180

Chapitre V – Libération & Efficacité 183

Introduction	185
I. Matériels & Méthodes	187
I.1. Formulation et caractérisation physico-chimique	187
I.2. Support de la formulation	187
I.3. Étude de l'efficacité sur drosophiles	189
II. Résultats & Discussions	195
II.1. Efficacité répulsive des composants de la formulation	195
II.1.a. Molécules actives en solution éthanolique	195
II.1.b. Nanoparticules blanches	198
II.2. Étude de la durée d'action	198
II.2.a. Nanoparticules chargées en benzoate de benzyle	199
II.2.b. Nanoparticules chargées en Picaridin®	201
Conclusion	208

Discussion Générale 209

Conclusions & Perspectives 219

Annexe 1 : Nanoparticles *via* Nanoprecipitation 225
Recent Patent on Drug Delivery and Formulation (2012 ; Vol 6 ; 250 – 258).

Annexe 2 : Long-acting nanoencapsulated arthropod repellent formulations 243
and methods of use thereof. US 61/590,395.

Annexe 3 : Étude préliminaire de séparation des couches de la peau. 297
Application à des fragments de peau canine.

Annexe 4 : PR&D 0224401 – A study to determine the haircoat distribution 311
of a single topical treatment with BBnanop spray in dogs.

Annexe 5 : A study to assess the cosmetic aspect of a single topical 349

Références Bibliographiques 357





Introduction Générale



« Moustique : plus dangereux que n'importe quelle bête féroce » Gustave Flaubert



Une multitude d'arthropodes, incluant les arachnides, les myriapodes ou encore les insectes, joue un rôle essentiel et central dans les opérations de l'écosystème [Wayland, 1991]. Les arthropodes ont une influence sur leur environnement à travers des schémas d'acquisition de ressources et de leur redistribution. Cette influence est tantôt bénéfique (relation symbiotique), par exemple, lors de la pollinisation régie par le transport de semences d'une fleur à un autre point de floraison, tantôt néfaste, c'est le cas des insectes dont le mode de vie parasitaire assure leur survie (piqûre pour les repas sanguins par exemple).

Lorsque ces arthropodes mordent, piquent ou défèquent sur les mammifères, ils altèrent la santé et le bien-être de leur proie, ils produisent des effets locaux ou systémiques et peuvent potentiellement transmettre des maladies. Certains arthropodes sont à la pointe de la vectorisation d'agents pathogènes (*e.g.* bactéries, virus, protozoaires), y compris ceux qui peuvent causer des maladies mortelles comme le paludisme [Otranto, 2009]. Cette maladie cause encore de nos jours la mort de plus de 600000 êtres humains par année, et ceci par une simple piqûre de moustique. Le responsable de la transmission est l'Anophèle femelle, vecteur du protozoaire Plasmodium. Un exemple de maladie couramment contractée en pleine nature est celui de la maladie de Lyme, transmise par des tiques (Oxididés). Cette maladie atteint les espèces canines, les félins, les équidés, les bovins et l'Homme, entraînant douleurs articulaires et état fébrile. Chez les espèces canines la Leishmaniose est une maladie grave, transmise par un Phlébotome. Cette maladie parasitaire endogène reste une source de mortalité importante dans le sud d'Europe pour l'espèce canine. Le chien est d'autant plus touché par ce type de maladies vectorisées de par son exposition au milieu naturel. A une moindre échelle, certains arthropodes causent des nuisances pouvant affecter le comportement de beaucoup de mammifères. Par exemple, le comportement des chevaux à la promenade peut être très dangereux si leur sang devient le repas de nombreux taons ou moustiques.

L'utilisation de pesticides a toujours été nécessaire pour la protection des habitations, des cultures, des animaux et de l'espèce humaine. Les insecticides ont été un moyen de protection largement utilisé depuis de nombreuses décennies. Les industries pharmaceutiques et vétérinaires consacrées à la santé et le confort de l'être humain et des animaux ont produit diverses familles d'insecticides garantissant une protection contre les arthropodes avec une durée d'activité pouvant dépasser un mois [Pollmeier, 2004]. Ces « tueurs d'arthropodes » ont présenté des phénomènes de résistance de leurs cibles [Alyokhin, 2008] ainsi que des phénomènes d'écotoxicité et de toxicité pour les individus en contact avec les molécules

actives insecticide [Gubler, 1998]. L'écosystème s'en trouve perturbé car les produits insecticides altèrent son fonctionnement naturel, en tuant des centaines de milliers d'arthropodes entrant dans la chaîne de reproduction de nombreuses espèces végétales. Par conséquent, les insecticides n'ont pas seulement une action protectrice des animaux, ils peuvent aussi présenter une action destructrice de la flore. De plus les insecticides ont pour vocation l'élimination de l'insecte sans éviter le contact, et donc potentiellement la transmission de pathogènes.

La recherche s'est penchée depuis quelques dizaines d'années sur une alternative pour la prévention de maladies vectorisées en développant des insectifuges communément appelés répulsifs en tant qu'option plus sûre pour l'écosystème car ils possèdent une toxicité moindre. L'approche de l'insecte et le contact sont ainsi évités. Cette stratégie de prévention est applicable aussi bien à des troupeaux de vaches qu'à des élevages de chevaux ou de volailles et aux animaux de compagnie [Debboun, 2007]. Ces produits répulsifs agissent en interférant avec les récepteurs olfactifs de l'insecte entraînant une déviation de leur approche [Duane, 2006].

Ces produits répulsifs d'arthropodes sont pour la plupart des formulations simples (solutions hydroalcoolique ou micellaire) à usage topique. La majorité des produits commerciaux ont une durée d'action courte, imposant une application répétée à des intervalles de temps convenablement définis. Le traitement par voie topique est le plus commode en termes de surface d'application et de facilité d'usage, cependant il contribue à la perte accélérée des produits appliqués par élimination rapide *via* une simple friction. La cinétique d'action de produits répulsifs a été modélisée selon une courbe exponentielle, avec un effet immédiat puissant dû à l'évaporation d'une forte quantité de molécules actives. Une décroissance rapide de l'efficacité en quelques heures est la conséquence d'une quantité trop faible de molécules actives pour induire le phénomène de répulsion. Un système galénique convenablement élaboré permettrait d'augmenter la durée d'action de produits répulsifs simples.

Les notions de protection de molécules actives, de libération contrôlée et de ciblage sont apparues il y a quelques décennies et ont fait l'objet de nombreuses recherches dans des domaines variés. Le développement de formes particulières encapsulant des molécules actives a vu des applications dans l'industrie pétrochimique, agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique. Parmi les formes susceptibles de contrôler la libération d'une molécule active, les vecteurs polymériques ont fait l'objet de nombreux développements. L'industrie

pharmaceutique a développé de nombreux produits appelés « préparation à action prolongée », utilisant des systèmes particuliers colloïdaux dans lesquelles il est possible d'introduire des substances actives. Elles sont sous forme de systèmes réservoirs, avec une morphologie variable : dans le cas de systèmes matriciels ce sont des sphères, dans le cas de système cœur-écorce ce sont des capsules contenant une substance hydrophobe. Ces préparations colloïdales possèdent des caractéristiques physico-chimiques permettant la protection ainsi que la libération contrôlée et ciblée d'une substance active.

Les caractéristiques physico-chimiques des particules découlent du type d'application des produits finaux souhaité. Dans le cas de l'élaboration d'un produit vaporisable destiné à la voie topique, les nanoparticules ont démontré de nombreux avantages [Sakamoto, 2010]. Leurs présences en surface (sur la peau et le long des fibres pileuse) ainsi que leur stockage dans les différents compartiments de la peau sont régis principalement par la taille et la charge de surface des objets colloïdaux formés [Lademann, 2007]. Leur taille caractéristique offre une capacité de stockage dans les couches supérieures de la peau et dans les annexes cutanés (*e.g.* follicules pileux). La nature solide de ces particules garanti la protection des molécules actives encapsulées contre la dégradation lors du passage des complexes formés sur et dans l'organisme (*e.g.* annexes cutanés). Par ailleurs les nanoparticules ont démontré une stabilité colloïdale supérieure en raison de leur petite taille. Les nanoparticules ont la capacité d'incorporer des molécules actives hydrophiles ou hydrophobes dans des matrices polymériques de nature très variable [Moinard-Checot, 2006]. Cette variabilité de la matrice encapsulant permet la modulation du comportement biologique de ces vecteurs (adhésion, dégradation, compatibilité, reconnaissance) et la libération contrôlée de la molécule encapsulée. Par ailleurs, les caractéristiques physiques des nanoparticules (taille, structure, porosité, charge de surface) sont contrôlables. Le panel de procédé de préparation des nanoparticules décrit dans la littérature est très large, les nanoparticules sont obtenues par synthèse de polymères ou par formulation depuis des polymères préformés

L'objectif de nos travaux de recherche a donc été la recherche et le développement de nouvelles formes galéniques de répulsifs présentant une durée d'action prolongée en utilisant des molécules actives reconnues pour leur propriété répulsive vis-à-vis des d'un grand nombre arthropodes. Le critère de durée de protection a été défini à plusieurs jours, la durée idéale de protection étant d'un mois (critère défini par le partenaire industriel).

Le **premier chapitre** de ce manuscrit décrit l'état d'avancement dans le domaine des répulsifs d'arthropodes, en discutant particulièrement de la classe des insectes. Les formulations

originales sur le marché des répulsifs ainsi que leurs procédés d'obtention sont décrits, avec une attention particulière portée aux possibilités d'applications à l'échelle industrielle. Les vecteurs de molécules actives capables de réguler la libération de la molécule encapsulée sont présentés de manière non exhaustive, en portant notre attention sur les nanoparticules. Nous décrivons également les phénomènes physico-chimiques subis par les systèmes particuliers après leur fabrication. Les travaux expérimentaux sont ensuite exposés depuis la formulation jusqu'à la validation du concept étudié durant ces travaux de recherche. Le **Chapitre II** rapporte l'étude de pénétration de particules modèles sur des fragments de peau, permettant de discriminer la taille et le potentiel zêta caractéristique des nanoparticules pour une inclusion dans les follicules pileux et dans la couche cornée, afin d'envisager un effet réservoir de la peau. Les interactions de ces particules modèles avec les fibres pileuses sont également étudiées. Le **Chapitre III** décrit l'étude de la formulation des nanoparticules finales chargées en molécules actives à propriétés répulsives. Nous présentons ensuite le **Chapitre IV** détaillant l'étude des interactions entre les nanoparticules chargées en molécules actives, leur bioadhésion avec leur support d'application en conditions réelles : les poils et la peau de chien. Enfin l'étude de la libération de la molécule active corrélée à l'évaluation de l'efficacité sont présentées dans le **Chapitre V**. Nous poursuivons ce manuscrit de thèse par une **discussion générale** des résultats obtenus. Enfin les **Conclusions** des travaux de thèse réalisés sont rapportées avant de clore ce manuscrit avec les **Perspectives** de recherche concernant la formulation de répulsifs d'arthropodes a durée d'action prolongée pour l'industrie vétérinaire.



Chapitre I

Etude bibliographique



« L'imagination est plus importante que le savoir » Albert Einstein

Partie 1 - Les répulsifs :

Historique, Mode d'action & Formulation

Partie 2 - Les nanoparticules : Formulation et Devenir





Chapitre I - Partie I



Les répulsifs : Historique, Mode d'action & Formulation



Introduction, historique	11
I. Les insectes, classification et répulsion	13
I.1. Généralités	13
I.2. Exemples de pathogènes vectorisés au chien	14
I.3. L'olfaction chez l'insecte	15
II. Les agents répulsifs d'origine naturelle	19
III. Les agents répulsifs d'origine synthétique	22
IV. Augmentation de la durée d'activité	26
IV.1. Complexes d'inclusion avec les cyclodextrines	27
IV.2. Les liposomes	28
IV.3. Les émulsions	29
IV.4. Les nanoparticules	30
Conclusion	33

Introduction, historique

Les répulsifs sont des préparations chimiques ou naturelles visant à repousser les insectes et par conséquent empêcher l'attaque d'hôtes (Homme et animaux). Le produit répulsif repousse l'insecte de sa cible par une altération de la conduite de repérage de l'hôte, aboutissant à une déviation du vol, l'éloignant de sa cible potentielle. Ces produits offrent la possibilité de contrôler la vectorisation de pathogène par les arthropodes, qui sont des sources de maladies infectieuses. La transmission de pathogène est un phénomène complexe qui fait intervenir un vecteur, l'agent pathogène et un hôte (Figure I.1).

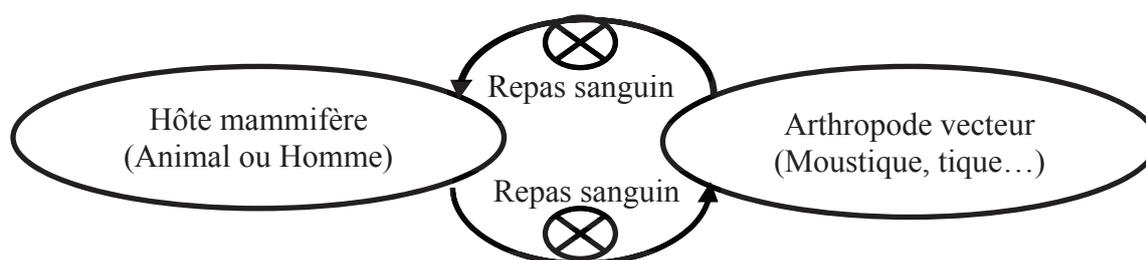


Figure I.1: Cycle de transmission des maladies infectieuses et action d'un répulsif. ⊗ chemin infectieux bloqué par le répulsif

Déjà au temps de l'Antiquité, les agents répulsifs étaient formulés avec différentes huiles végétales, des sciures, des déchets organiques [Ware, 1978], pour la protection de l'Homme, des animaux, des récoltes et des habitations [Kaliyaperumal, 2009]. Avant la Seconde Guerre mondiale, seuls quatre ingrédients répulsifs d'arthropodes sont utilisés pour une protection individuelle: l'huile essentielle de citronnelle, le phtalate de diméthyle (DMP) découvert en 1929, le *n*-butyl mesityl oxide oxalate (Indalone[®]) remarqué en 1937 et le 2-éthyl hexane-1,3-diol (Rutgers 612[®]) rendu disponible en 1939.

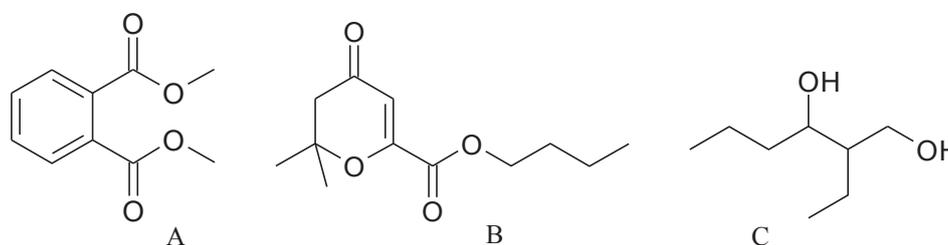


Figure I.2: Structure chimique de molécules répulsives d'arthropodes couramment utilisées avant la 2^{de} guerre mondiale. A : DMP ; B : Indalone[®]; C : Rutgers 612[®].

Les produits répulsifs d'arthropodes sont actuellement disponibles commercialement sous différentes formes : des crèmes, des lotions, des aérosols, des atomiseurs ou des gels...

Des alternatives à la prévention des piqûres ou morsures cutanées par voie topique ont été présentées depuis un certain nombre de décennies. L'ingestion d'ail a fait l'objet de débats pour son activité répulsive potentielle. L'allicine présente dans l'ail rendrait la peau désagréable aux moustiques [Amonkar, 1970]. Stjernberg et Berglund [Stjernberg, 2000] ont affirmé que l'ingestion de 1,2g d'ail par jour fournirait une protection significative contre les morsures de tiques ; cette théorie a été contestée par Ranstam [Ranstam, 2001]. Des agents répulsifs d'insectes basés sur l'émission d'ondes sonores (ultrasons) ont été développés. Ces appareils électroniques se sont avérés n'avoir aucun effet anti-moustiques.

Par conséquent, la méthode la plus ancienne consistant à traiter individuellement par voie cutanée s'est avérée être la plus concluante. Les répulsifs ainsi appliqués créent une sorte d'atmosphère protectrice autour de la zone traitée, la répulsion est la conséquence des interactions entre les molécules répulsives et les récepteurs olfactifs de l'insecte lorsqu'il est à proximité de l'hôte [Garson, 1968].

Nous parlerons dans ce chapitre des arthropodes et de leur classification phylogénétique en évoquant un exemple d'intérêt pour l'industrie vétérinaire, la leishmaniose. Nous discuterons des modes d'action des répulsifs sur le système sensoriel des insectes. Ensuite, nous listerons les molécules répulsives d'intérêt, dans un premier temps d'origine naturelle puis d'origine synthétique. Nous parlerons, tout au long de ce chapitre, des formulations innovantes d'agents répulsifs.

I. Les insectes, classification et répulsion

I.1. Généralités

Les arthropodes sont vecteurs de nombreuses pathologies transmissibles aux Humains aussi bien qu'aux espèces animales : le paludisme (couramment appelé malaria), la maladie de Lyme, la leishmaniose... Les arthropodes constituent une grande famille d'invertébrés caractérisés par un squelette externe chitineux, un corps divisé en anneaux et des membres articulés formés de segments mobiles. Les arthropodes hématophages relâchent les agents infectieux lors de leurs repas sanguins.

Nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les diptères, qui constituent un ordre de la classe des insectes ptérogènes (ailes). La Figure I.3 présente la classification phylogénétique non exhaustive du groupe des arthropodes.

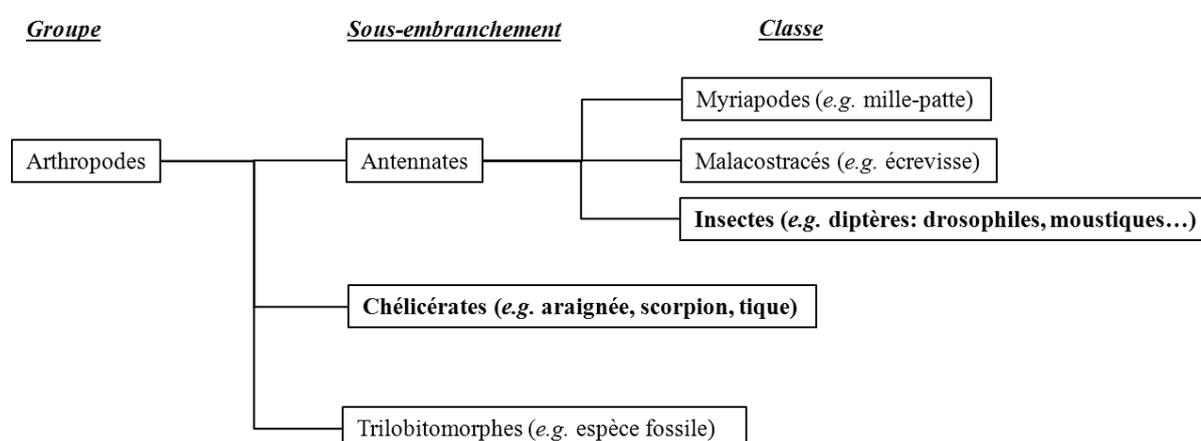


Figure I.3 : Classification phylogénétique des arthropodes

Les diptères rassemblent les nématocères (cousins, moustiques/*anophèles*, simulies), les brachycères (mouches, taons) et les aphaniptères (puces). Dans le cadre de la prévention des maladies vectorisées par des insectes, nous parlerons plus précisément de la famille des moustiques. Etant donné que notre approche est vétérinaire et en particulier orientée pour le traitement des espèces canines, nous parlerons également des de l'ordre des acariens. Les moustiques sont les vecteurs principaux de pathogènes : paludisme, arboviroses, filariose lymphatique. 2000 à 3000 espèces dans le monde ont été répertoriées (*Culex*, *Aedes*, *Anophèle*...).

Nous décrivons dans cette partie l'exemple de la leishmaniose, une zoonose parasitaire transmise par un phlébotome femelle, ainsi que l'exemple de la borréliose de Lyme,

contractée après un contact prolongé avec une Tique. Ces deux maladies sont fréquemment rencontrées chez l'espèce canine.

I.2. Exemples de pathogènes vectorisés au chien

La leishmaniose est endémique dans 88 pays du monde [OMS, 2007]. Les phlébotomes responsables de la leishmaniose sont des petits diptères hématophages se déplaçant en silence, particulièrement actifs au crépuscule et la nuit. Le parasite responsable de cette maladie est le protozoaire *Leishmania infantum*. Quand un insecte infecté pique un chien, une petite lésion appelée "chancre" apparaît, généralement sur une oreille ou sur le museau. Le parasite envahit ensuite les cellules du chien et altère son système immunitaire. Le chemin de l'infection pour l'Homme est semblable à celui du chien, il est présenté en Figure I.4.

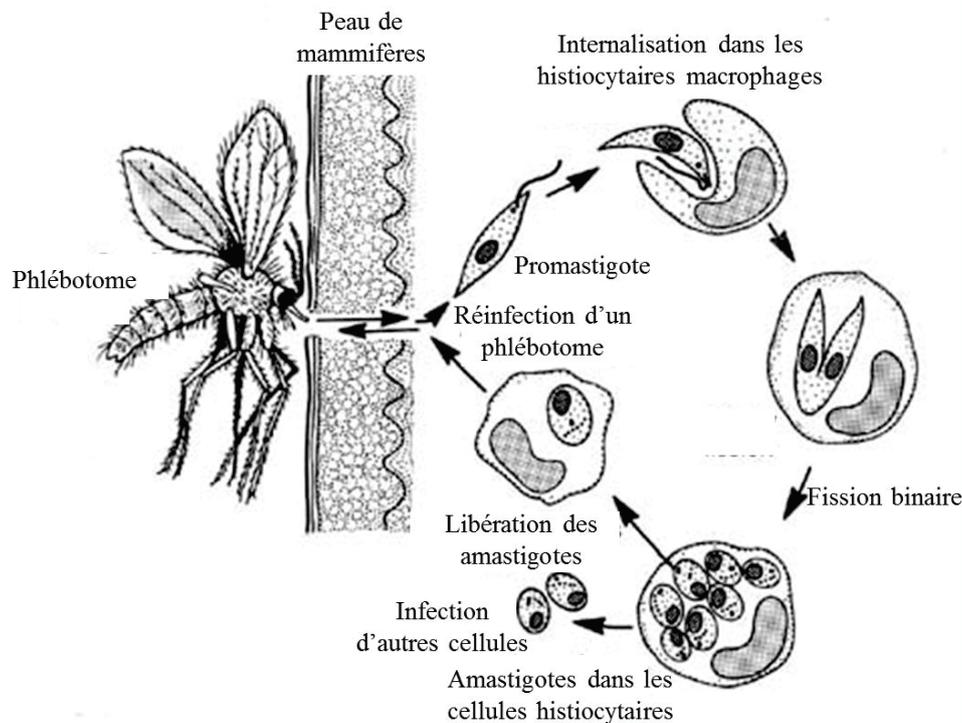


Figure I.4 : Cycle de vie du parasite *Leishmania infantum* transmis par un phlébotome femelle entraînant la leishmaniose [Gardiner, 1988].

La leishmaniose est transmise par la piqûre d'une femelle phlébotome infestée. Les protozoaires sont injectés par les trompes de l'insecte durant le repas sanguin. Les agents infectieux injectés sont phagocytés par des macrophages et d'autres types de cellules mononucléées phagocytaires. Ils se multiplient dans les cellules par simple division puis ils infectent d'autres cellules mononucléées phagocytaires. Les phlébotomes sont ensuite

recontaminés par l'ingestion de cellules sanguines infectées lors de leur repas. Ce cycle se poursuit tant que l'usage d'un répulsif n'empêche pas l'approche du Phlébotome.

L'ordre des acariens, dont la tique est particulièrement nuisible, doit également être pris en considération. La tique *Ixodes* est une tique dure qui alterne les phases libres et les phases fixées. Durant la phase parasite, elles sont fixées sur l'hôte vertébré pour se nourrir de son sang pendant 2 à 10 jours. Durant les phases libres, elles attendent sur des végétaux le passage d'un hôte. Elles sont les vecteurs de maladies virales telle que l'encéphalite, des maladies bactériennes telle que la borréliose de Lyme qui touche aussi bien les espèces animales que l'Homme.

Au travers de ces deux exemples de maladies vectorisées par les arthropodes, nous comprenons donc l'intérêt d'empêcher l'approche de l'insecte, l'élimination de ce dernier n'étant pas nécessaire.

I.3. L'olfaction chez l'insecte

Des aversions innées (répulsion) sont inscrites dans le patrimoine génétique de tout individu, de l'Homme à l'espèce la plus primaire. Certaines molécules chimiques ont la capacité de déclencher une aversion innée qui empêche l'alimentation. Ces produits chimiques sont détectés par le système chimio sensoriel (olfaction ou goût), au travers de récepteurs sensoriels.

Les phénomènes de perception des odeurs ont été caractérisés en pratique au travers de divers exemples d'application. Cependant, aucune théorie n'a été développée de par la complexité des phénomènes biochimiques qui entrent en jeu. Etant donné que nous parlons de produits à propriétés répulsives agissant par conséquent à distance, nous considérons le sens de l'olfaction au centre de l'activité répulsive. Les organes olfactifs chez la plupart des insectes sont les antennes et les palpes maxillaires. Ces organes permettent la perception des produits chimiques à distance de la source, à des seuils très faibles. D'une part il se produit des phénomènes d'orientation attractive pour l'alimentation et les interactions sociales, d'autre part, l'orientation répulsive est le résultat de la détection de phéromones d'alarmes et d'odeurs désagréables.

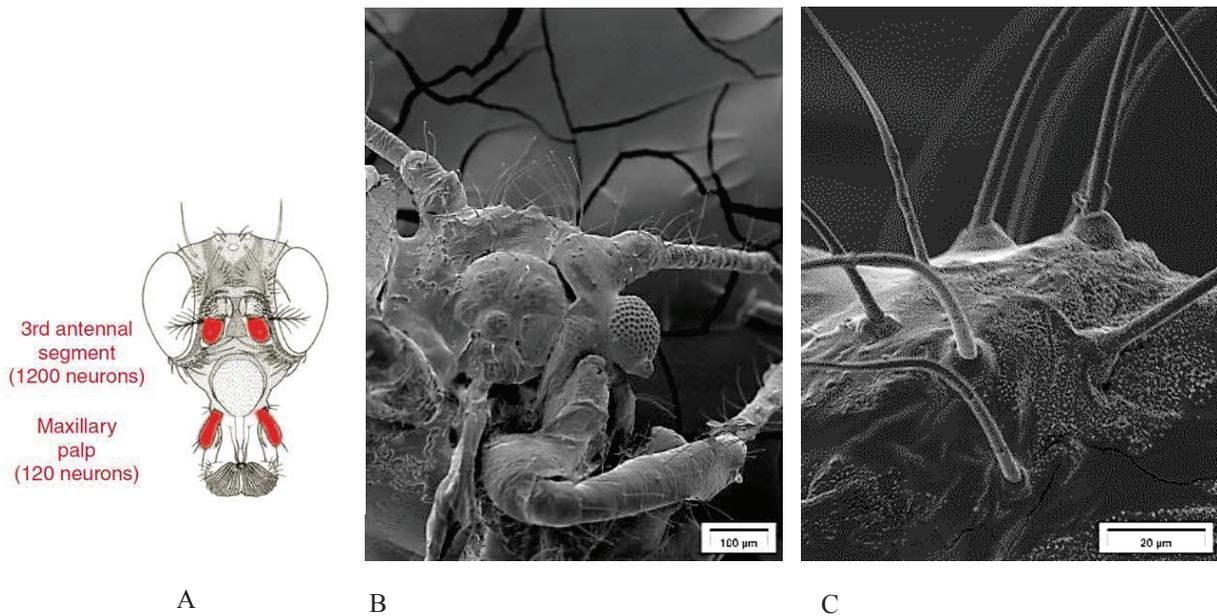


Figure I.5. : (A) Représentation des organes olfactifs chez la drosophile [Jefferis, 2005] ; (B et C) Images obtenues par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des organes olfactifs d'une drosophile.

Le système olfactif chez la drosophile est géré par environ 1500 neurones olfactifs organisés en glomérules autour d'un centre nerveux sensoriel formant le chémothype. Afin de comprendre les phénomènes d'aversion, des méthodologies d'études autour des récepteurs olfactifs (olfactive receptors, OR) ont été développées. Les plus couramment décrites sont l'électroantennographie et l'approche comportementale.

Les molécules chimiques constituent des odeurs capables d'atteindre et de stimuler les récepteurs olfactifs, déclenchant ainsi des sensations olfactives. Ces stimuli sont à la base d'activités vitales et sociales d'un animal (orientation, recherche de nourriture ou de partenaire, interactions sociales). Lorsqu'une molécule odorante atteint un récepteur olfactif, les processus associés à l'olfaction sont observables. Ces récepteurs olfactifs chez l'insecte sont situés à l'intérieur de cavités ou à l'intérieur de poils sensoriels spécialisés au niveau de l'antenne, appelés les sensilles olfactives. C'est à ce niveau que se situe la première interface entre le milieu extérieur et le système nerveux de l'organisme. Les sensilles sont des poils sensoriels creux, ce sont des évaginations cuticulaires présentant des micropores dans leur paroi. A l'intérieur, des neurones récepteurs sensoriels baignent dans une hémolymphe réceptrice à composition caractéristique.

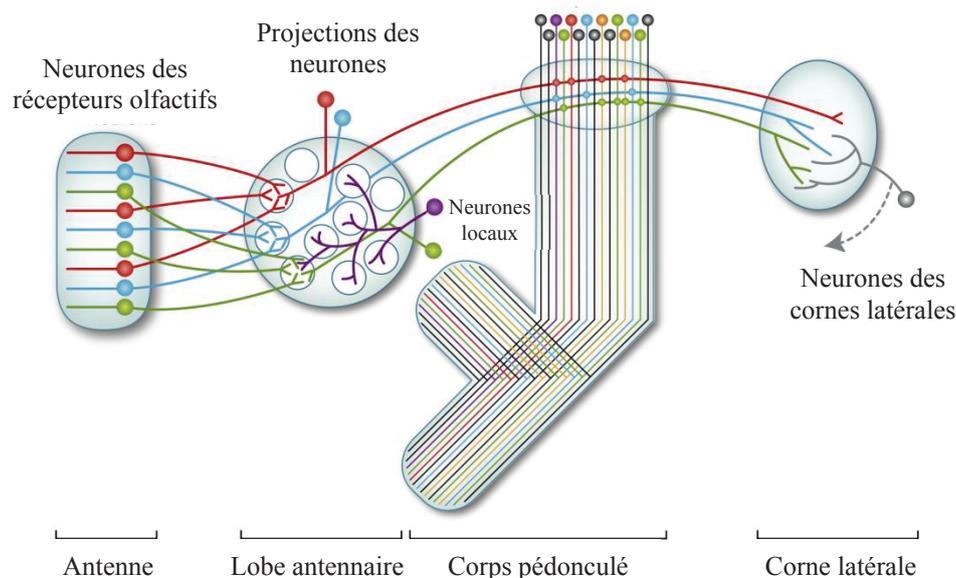


Figure I.6 : Représentation du système olfactif de la drosophile [Cachero, 2008].

Les substances volatiles présentes dans l'air sont adsorbées au niveau des sensilles et y pénètrent à travers des micropores. Des microtubules les conduisent au niveau de la surface membranaire des neurones récepteurs, ou, si les microtubules sont absents, elles peuvent s'unir à des protéines olfactives de liaison (en anglais "olfactory binding proteins", OBP) présentes dans l'hémolymphe réceptrice qui vont les transporter jusqu'aux récepteurs membranaires. Les protéines olfactives de liaison de molécules odorantes sont présentes dans l'hémolymphe à haute concentration. Ces protéines peuvent solubiliser des molécules odorantes hydrophobes dans la lymphe sensille aqueuse, pour ainsi présenter ces ligands odorants au récepteur [Hekmat-Scafe, 1997]. Un potentiel récepteur est déclenché par la complexation des OBP avec les molécules olfactives. Selon l'ampleur du phénomène de complexation, un potentiel d'action peut être déclenché à son tour. L'information olfactive est ainsi traduite et acheminée vers le cerveau *via* le nerf antennaire. Au niveau du cerveau, l'information olfactive est d'abord traitée par une structure de nature glomérulaire et paire (une par antenne) appelée lobe antennaire. Cette structure, par son anatomie et sa fonction, est analogue au bulbe olfactif des vertébrés.

Ainsi pour toute odeur, un phénomène physique a lieu. Dans le groupe des molécules dites « répulsives », les phénomènes d'aversion ne sont pas si simples. Davis [Davis, 1985] avait proposé cinq modes d'action potentiels des répulsifs : l'inhibition d'un signal attractif, l'inversion de la perception du signal attractif en un message irritant, l'activation d'un récepteur qui pourrait perturber ou entraîner une réponse comportementale inappropriée, l'activation d'un autre récepteur et enfin l'activation de différents récepteurs provoquant

simultanément la perte du signal spécifique lié à la localisation de l'hôte. Néanmoins, jusqu'à présent, les mécanismes d'action des répulsifs n'ont pas été clairement établis. L'efficacité du répulsif serait liée à la capacité des composés volatils à former une barrière de vapeur [Garson, 1968]. Prenons l'exemple du DEET (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide ; CAS : 134-62-3), qui est la molécule synthétique de référence dans le domaine des répulsifs d'insectes. En 2006, plus de 50 ans après sa découverte, la question du mode d'action du DEET a été résolue [Ditzen, 2008]. Au lieu d'avoir un effet répulsif à proprement dit, il agirait sur les récepteurs de composés attractifs en entrant en compétition avec ces derniers, c'est en cela que cette molécule est un agoniste. L'information attractive ne serait pas acheminée jusqu'au système olfactif central. Le DEET agirait en masquant les odeurs attractives, principalement l'acide lactique, l'oxyde de carbone [Knox, 1972], le oct-1-én-3-ol [Dekker, 2005]. Les molécules à propriétés répulsives seraient des « neutraliseur d'odeur » qui embrouilleraient les insectes en « inactivant juste assez de récepteurs pour perturber le moustique, voire le rendre insensible aux odeurs qu'il devrait trouver attractives » selon l'équipe de Vosshall [Pellegrino, 2011]. Le principal récepteur olfactif d'acides aminés de *Culex quinquefasciatus* a été identifié et caractérisé [Xia, 2006]. La compréhension du mécanisme de reconnaissance du moustique fait désormais l'objet d'études électrophysiologiques pour identifier des gènes régulateurs du comportement du moustique dans sa reconnaissance de l'hôte [Holt, 2002]. Sur ces bases, le mécanisme d'action du DEET a pu être établi. Ce dernier bloquerait la reconnaissance de l'acide lactique et de l'oct-1-én-3-ol par le co-récepteur olfactif OR83b comme représenté en Figure I.7.

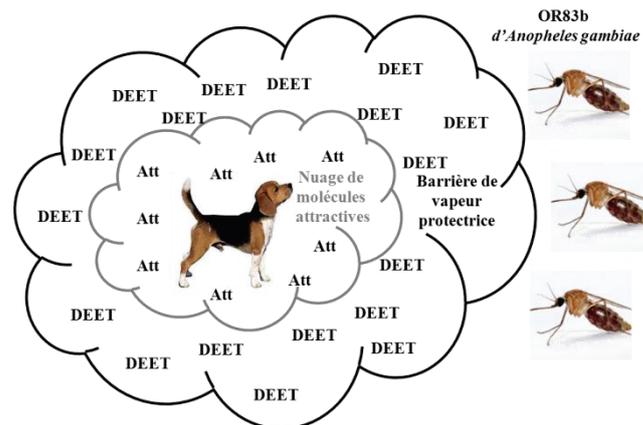


Figure I.7 : Mécanisme d'action du DEET. Att : molécules attractives.

Une multitude d'autres molécules répulsives ont été étudiées, formulées et comparées, qu'elles soient d'origine naturelle ou synthétique. Les plus pertinentes sont présentées dans ce chapitre.

II. Les agents répulsifs d'origine naturelle

Les composés phytochimiques dérivés de ressources végétales peuvent jouer les rôles de larvicides, de régulateurs de croissance des insectes, de répulsifs ou d'attractifs d'arthropodes [Blaney, 1986]. Une grande variété de plantes a dans son patrimoine génétique la possibilité d'exprimer des substances antiparasitaires, ceci en tant que moyen de défense pour éviter l'infestation. Les substances sécrétées (terpènes, phénols, glucosides cyanogènes, alcaloïdes...) sont à l'origine des huiles essentielles aromatiques. Les terpènes sont une alternative intéressante pour la recherche pharmacologique de répulsifs d'arthropodes, avec un avantage organoleptique apporté par leur odeur agréable.

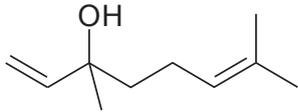
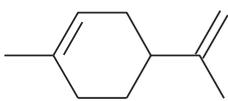
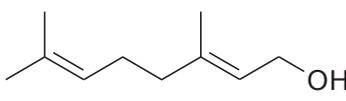
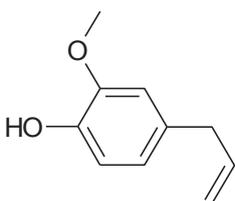
La littérature décrit un certain nombre de plantes sécrétant des molécules actives à propriétés répulsives [Cosimi, 2009], la plupart d'entre elles possèdent du limonène, du linalol, de l'eugénol et/ou du géraniol, comme décrit dans le Tableau I.1.

Tableau I.1: Liste d'huiles essentielles à propriétés répulsives et leur composition chimique principale. 1°CCM : Composé chimique majoritaire; 2° CCM : Composé chimique secondaire; 3° CCM : Composé chimique ternaire.

Plantes	1° CCM	2° CCM	3° CCM
Bergamote	Limonène	Acétate de linalyl	Linalol
Camphre	Cinéol	Limonène	Pinène
Citronnelle	Citronellol	Géraniol	Limonène
Fenouille	Anéthol	Limonène	Pinène
Cannelle	Eugénol	Cinnamic aldehyde	Benzoate de benzyle
Eucalyptus	Eugénol	Caryophyllène	Isocaryophyllène
Géranium	Citronellol	Géraniol	Pinène
Lime	Pinène	Mycène	Limonène
Palmarosa	Mycène	Linalol	Géraniol
Sauge	Linalol	Caryophyllène	Géraniol
Lavande	Acétate de linalyl	Linalol	Lavandulol
Sauge	Linalol	Caryophyllène	Géraniol

Les structures chimiques de ces molécules sont proches, dans la plupart des cas ce sont des hydrocarbones possédant une fonction alcool, ester ou éther. Les structures chimiques de ces molécules sont rassemblées dans le Tableau I.2.

Tableau I.2: Structures chimiques de composés naturels à intérêt répulsif

Linalol	Limonène	Géraniol	Eugénol
			

Les données quantitatives sur la proportion des constituants des mélanges complexes semblent indiquer que l'effet répulsif et/ou insecticide est relié aux composés majoritaires et que le spectre d'action peut varier selon les espèces. Par exemple, les huiles essentielles de citronnelle extraites de *Cymbopogon (Poaceae)* sont couramment utilisées contre *Aedes aegypti* (vecteur de la dengue) [Mendonça, 2005], *Anopheles stephensi* et *Culex quinquefasciatus* (vecteurs de vers parasites entraînant la filariose) [Tiagy, 1998] tandis que celles extraites de *Cymbopogon citratus* n'ont démontré une protection significative (5 heures) que pour *Culex quinquefasciatus* dans les conditions de laboratoire [Pushpanatha, 2006].

L'intérêt de ce type de molécules sur les phénomènes de répulsion contre un moustique nuisible, *Aedes aegypti* a été prouvé par Choochote et son équipe [Choochote, 2007]. En 2008, Guillij a évalué en condition de laboratoire l'activité répulsive de formulations à base d'huiles essentielles contre *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* et *Culex annulirostris* (vecteur de *Flavivirus* entraînant des encéphalites de Murray Valley) [Gillij, 2008]. Il existe une variabilité notable entre les plantes et les espèces cibles, démontrant ainsi que les répulsifs naturels d'arthropodes ont des spectres d'activité souvent limités et dépendants de leur concentration [Maguranyi, 2009]. Des centaines d'huiles essentielles en tant que tel, ainsi que leurs composants pris de manière individuel, ont démontré leur pouvoir répulsif pour des durées de quelques heures [Park, 2005 - Trongtokit, 2005]. Des composés phytochimiques autres que les terpènes et terpenoïdes ont démontré une efficacité comparable au DEET, sans l'aspect toxicité, les plus probants sont décrits dans le Tableau I.3.

Tableau I.3: Molécules naturelles à activité répulsive décrite comme comparable au DEET et leur origine

Plante	Molécule active répulsive	Références
Cataire	Nepetalactone	[Glenn, 1996 – Verma, 2009 - Nestorović, 2010]
Eucalyptus	<i>p</i> -menthane3-8-diol	[Caroll, 2006]
Chrysanthème	Pyrethrin	[Anadón, 2009]

Les pyréthrinés présentent une activité répulsive voire insecticide. En 1954, des recherches sur la répulsion de *Culex pipiens fatigans* (vecteur de vers parasites responsable de la filariose de Bancroft) ont démontré un effet répulsif concurrentiel dans les hautes dilutions allant jusqu'à 0,48% [Paulini, 1954]. La structure chimique des pyréthrinés est la base d'une variété d'insecticides et de répulsifs de synthèse appelés les pyréthroïdes tels que la perméthrine (CAS : 52645-53-1), la bifenthrine, la cyperméthrine [Machida, 2008]. Ces pyréthroïdes présentent une efficacité supérieure aux pyréthrinés naturels, accompagnée d'une toxicité moindre pour les mammifères. Les pyréthrinés et les pyréthroïdes sont largement utilisés en médecine vétérinaire [Anadón, 2009], en protection de culture et dans le domaine domestique. Des pyréthrinés et dérivés ont été formulés sous forme de shampoing, colliers antiparasitaires, solutions, aérosols pour des applications vétérinaires (chiens, chats, chevaux) avec des pourcentages en ingrédients actifs inférieurs à 6%.

Le benzoate de benzyle (CAS : 120-51-4) est un ingrédient actif d'abord trouvé dans certaines plantes. Son activité insectifuge a été prouvée mais a été peu développée à cause de son spectre d'action restreint. Un avantage majeur du benzoate de benzyle est son activité forte contre les Tiques [Hadani, 1977].

Les répulsifs cutanés d'origine synthétique restent les plus développés à l'échelle industrielle tandis que les produits naturels, pourtant mieux acceptés, n'ont pas encore trouvé leur positionnement pour un développement à grande échelle. Cette tendance est due à des coûts de production plus importants pour des produits issus de sources naturelles. Par ailleurs le spectre d'activité est restreint dans le cas de produits d'origine naturelle.

III. Les agents répulsifs d'origine synthétique

De nouveaux produits répulsifs d'arthropodes à base de molécules synthétiques ont été développés en tant qu'alternative aux désavantages des produits naturels (principalement leur courte durée de protection et leur spectre d'activité limité) [Fradin, 1998].

La Seconde Guerre mondiale a été un catalyseur de la recherche dans le domaine des répulsifs. La faible efficacité en termes de spectre d'action et de durée d'activité des agents répulsifs d'arthropodes a conduit le gouvernement des Etats-Unis à évaluer plus de vingt-mille molécules potentiellement répulsives. En 1953, le N,N-diéthyl-*m*-toluamide (DEET) a été découvert avec des propriétés répulsives d'arthropodes supérieures en terme d'efficacité et de spectre d'action [Schoenig, 2001]. Depuis le DEET est toujours le répulsif de moustiques le plus largement utilisé dans le monde [Mogens, 2005]. Il s'est avéré être une arme de choix dans la lutte contre le paludisme comparé aux molécules précédemment décrites (principalement le DMP ou le Rugters[®] 612) [Schreck, 1977]. Le DEET a été découvert par l'armée américaine et utilisé pour la première fois au Vietnam pour protéger les soldats des attaques d'insectes piqueurs. Il a depuis prouvé son efficacité et a été formulé dans de nombreuses lotions répulsives d'insectes. Le DEET a été formulé dans des préparations commerciales depuis 1957 pour une application topique dans le monde entier (Insect Ecran[®] : 50% DEET, Mousticologne zone infestée[®] : 20% DEET + 15% 2-Ethyl-1,3-hexanediol, OFF[®] : 25% DEET). Johnson&Johnson, Walgreens, Sawyer, Dr Dog, Albertson, Cutter sont quelques industries ayant développé des produits répulsifs contenant du DEET. Malgré son efficacité et son innocuité pour la peau, le principal défaut du DEET est d'être un puissant solvant qui, en plus d'être très inflammable, s'attaque à de nombreuses matières plastiques, la mise en flacon pour commercialisation en est donc affectée.

Des relations quantitatives structure activité (QSAR, pour Quantitative Structure-Activity Relationship) ont été définies en fonction de la pression de vapeur (VP), de la lipophilie (LogP), et la longueur moléculaire (ML) sur des amides analogues au DEET [Katritzki, 2006]. Pris seuls, ces paramètres ne peuvent pas être corrélés à la durée de protection, mais une corrélation entre le temps de protection et les trois paramètres physiques cités a présenté des résultats très satisfaisants. La formule suivante a ainsi été vérifiée pour des analogues au DEET [Suryanarayana, 1991]:

$$PT = a \log P + b \log VP + cML + d \quad \text{Equation. I.1}$$

où a, b, c et d sont des constantes.

Il apparaît donc que des caractéristiques chimiques des molécules telles que leur tension de vapeur, leur lipophilie et sa longueur moléculaire sont des critères influençant la réponse physiologique de l'insecte.

Des analogues structurels au DEET ont été synthétisés, testés et des corrélations entre l'efficacité répulsive et des caractéristiques physicochimiques des molécules ont été développées. Le DEPA (N,N-diethyl phenyl acetamide) [Karunamoorthi, 2009], analogue structural du DEET n'a montré aucune différence statistique en terme de durée de protection. Aucun phénomène de résistance n'a été noté et sa toxicité est équivalente à celle du DEET [Klun, 2006].

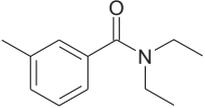
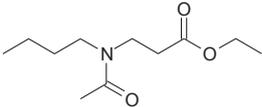
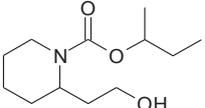
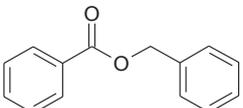
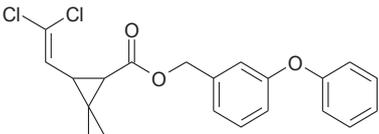
D'autres molécules répulsives ont été découvertes depuis. Les principales sont l'éthyl butylacetylaminopropionate (IR3535[®]; CAS : 52304-36-6) développé par Merck [Cilek, 2004] (Cinq sur Cinq 20%[®], Moustifluid[®], Hansaplast[®]) et la Picaridin[®] développée par Bayer (Insect Ecran spécial tropic[®], Bayrepel[®], Autan[®]). L'acide 2-(2-hydroxyéthyl)-1-méthylpropylester (Picaridin[®] appelé également Saltidin[®] ou KBR3023 ; CAS : 119515-38-7) est l'un des ingrédients actifs répulsifs les plus utilisés en Europe. C'est un dérivé de la pipéridine qui a été optimisé par modélisation mathématique, évalué avec des tests phénotypiques et formulé comme anti-moustique [EPA, 2005].

Il a été recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la meilleure protection contre le paludisme [Sangha, 2010]. Selon l'OMS la Picaridin[®] démontre d'excellentes propriétés répulsives comparables, et souvent supérieures à celles du DEET standard, contre de nombreuses espèces d'arthropodes [Cosantini, 2004 – Antwi, 2008]. La Picaridin[®] est utilisée dans des produits commerciaux avec un pourcentage en matière active pouvant aller jusqu'à 25% en France. Contrairement au DEET, la Picaridin[®] n'a pas montré de propriété solvant de plastiques. Par ailleurs, des études d'acceptabilité de deux formulations de répulsifs appliquées à base de DEET et de Picaridin[®] ont été menées. La formulation à base de Picaridin[®] a présenté de bien meilleurs résultats d'acceptabilité, ce qui fait de cette molécule un candidat de qualité pour le développement d'une nouvelle formulation répulsive d'insecte [Frances, 2002].

Les caractéristiques physicochimiques des molécules répulsives permettent la bonne compréhension des phénomènes d'évaporation et ainsi la durée d'activité variable, ainsi que les possibilités de formulation.

Le Tableau I.4 regroupe des caractéristiques physico-chimiques d'intérêt pour la formulation de produits répulsifs.

Tableau I.4: Caractéristiques physico-chimiques de molécules répulsives de synthèse. S : Solubilité dans l'eau à 25°C.

Molécule	Structure chimique	LogP	Densité [g/cm ³]	S [g/L]	PV [Torr]	EV [kJ/mol]
DEET		2,419±0,2	0,985	7,5	1,35.10 ⁻³	54,00
IR3535 [®]		1,782±0,3	0,987	14	4,56.10 ⁻⁴	55,60
Picaridin [®]		1.819±0,6	1,041	4,1	1,18.10 ⁻⁵	66,46
Benzoate de benzyle		3,811±0,2	1,128	0,079	2,50.10 ⁻⁴	56,61
Perméthrine		7,636±04	1,293	3,8.10 ⁻⁵	74,1.10 ⁻⁹	72,76

L'enthalpie de vaporisation et la tension de vapeur apparaissent comme des critères d'intérêt. Ces deux valeurs traduisent l'énergie nécessaire pour le passage de l'état liquide à l'état vapeur. Ainsi, plus cette enthalpie de vaporisation est élevée, plus le phénomène de vaporisation sera limité. C'est le cas pour la perméthrine, qui est appelée répulsif de contact [Young, 1998].

Des nouvelles formulations répulsives ont été élaborées dans le but d'étendre la durée d'action de la molécule active. Le temps de protection de formulations à base de p-menthane diol et de DEET a été évalué *in vivo*. Un temps de protection allant jusqu'à 7,75 heures a été démontré, ce temps étant fonction majoritairement du type de formulation [Trigg, 1996]. Salafsky *et al.* ont évalué la prolongation de la durée d'action du DEET au travers d'une formulation de liposomes. Le DEET associé à un liposome permet d'étendre la durée de protection de quelques heures pour la molécule libre à 48 heures [Salafsky, 1999]. Le DEET a également été formulé avec du glycérol en tant qu'adjuvant, et le pourcentage d'adjuvant dans la formulation a été corrélé à la durée de protection (5 heures pour les formulations sans glycérol et 11 heures pour des formulations contenant 10% de glycérol) [Runkel, 2003]. Des

crèmes ont été testées pour une application topique par Carroll *et al*, démontrant une protection prolongée [Carroll, 2008]. Des formulations sous forme d'objets colloïdaux ont été développées afin d'améliorer la durée de protection du DEET, les plus pertinentes sont rassemblées dans le Tableau I.5.

Tableau I.5 : Formulations du DEET par complexation à des porteurs colloïdaux.

Forme galénique	% DEET	Procédé de fabrication	Référence
Microparticules	15	Précipitation	[Kasting, 2008]
Microémulsion	10	Emulsification	[Qiu, 1998]
Nanoparticules lipidiques	10	Emulsification	[Iscan, 2005]

La recherche scientifique s'est également préoccupée de l'amélioration de répulsifs d'insectes dérivés de produits naturels, en particulier pour la famille de pyréthroïdes. La perméthrine a été synthétisée et formulée dans de nombreux produits répulsifs pour l'industrie vétérinaire [Tiawsirisup, 2007]. Elle a été largement utilisée dans la fabrication de textiles imprégnés [Faulde, 2008 – Deparis, 2004]. Des études de l'effet synergique de molécules répulsives de synthèse ont été menées, révélant l'absence d'amélioration de l'activité répulsive.

L'association de molécules actives au sein d'une même formulation permet l'élargissement du spectre d'action. D'autre part l'association de ces molécules à des porteurs permettrait d'augmenter la durée d'action.

IV. Augmentation de la durée d'activité

La problématique du spectre d'action est un challenge pour la synthèse organique de nouveaux composés. La durée d'activité est un paramètre clé propre au domaine de la galénique.

Les répulsifs d'arthropodes commerciaux sont principalement formulés sous forme de solution hydroalcoolique pour une application topique. Plusieurs phénomènes d'élimination de la formulation appliquée rentrent en compétition. Lors de l'application sur la peau, il se produit d'une part le phénomène de perméation cutanée des molécules actives, et d'autre part l'évaporation de la molécule active depuis son support jusqu'à l'air environnant. Une approche alternative aux méthodes traditionnelle consiste en l'association de molécules actives à un véhicule submicronique dissimulant et protégeant de la dégradation la matière active. La présence d'excipients apporte une barrière supplémentaire aux molécules actives avant leur sortie dans l'air environnant. Outre une prolongation d'activité remarquable des principes actifs incorporés, des formes pharmaceutiques comme les nanoparticules peuvent aussi répondre à des objectifs plus ambitieux tels que le ciblage des principes actifs. Les avantages apportés par les transporteurs d'ingrédients actifs sont présentés en Figure I.8.

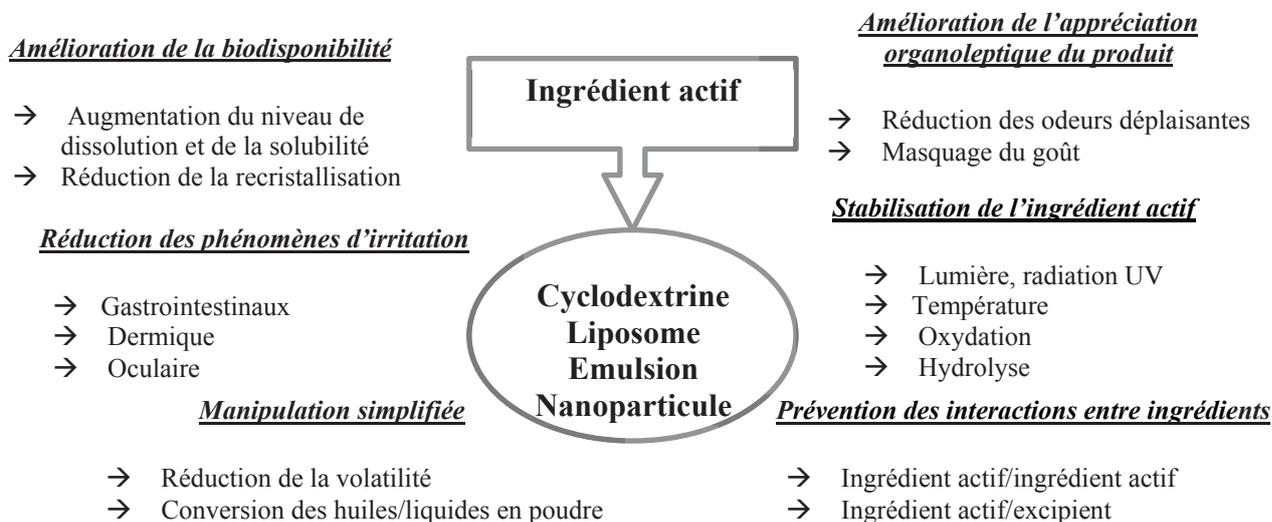


Figure I.8 : Avantages de l'ajout de porteurs d'ingrédients actifs dans une formulation pharmaceutique.

Divers systèmes contenant des principes actifs à propriété répulsive sont décrits dans la littérature, ce chapitre rassemble des nanoobjets envisageables pour notre thématique de recherche. Nous commencerons par définir les conditions d'études standards pour l'évaluation de l'efficacité des formulations ainsi que pour leur comparaison. La plupart des résultats des

tests biologiques décrits dans la littérature sont exprimés en indice (de 0 à 1) ou en pourcentage de répulsion. L'organisation Mondiale de la Santé a décrit une méthodologie standard d'évaluation [WHO, 1998 – Ansari, 1998 - Kapoor, 2003].

IV.1. Complexes d'inclusion avec les cyclodextrines

Couramment qualifiées d'écrins moléculaires, les cyclodextrines (CD) sont des macromolécules issues de l'hydrolyse de l'amidon. Leur structure chimique est présentée en Figure I.9.

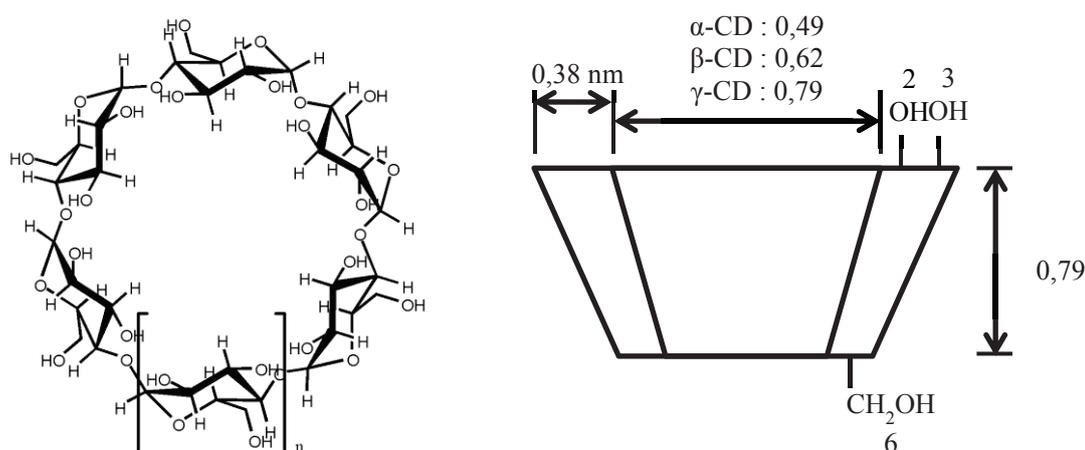


Figure I.9 : Représentation de la structure chimique des cyclodextrines natives et caractéristiques dimensionnelles.

Trois cyclodextrines natives sont largement décrites dans la littérature, il s'agit de l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, présentant 6, 7 et 8 unités D-glucopyranosyl comme présenté dans le Tableau I.6. Leur solubilité dans l'eau ainsi que les caractéristiques de la cavité hydrophobe est variable selon leur composition.

Tableau I.6 : Caractéristiques des cyclodextrines natives.

	α -CD	β -CD	δ -CD
Nombre d'unité glycosydique	6	7	8
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Volume de la cavité (Å³)	174	262	427
Solubilité dans l'eau (g/L)	145	18,5	230

La modification chimique des cyclodextrines reste au centre de travaux de recherche. La formulation des cyclodextrines présente de multiples avantages dans les domaines

pharmaceutiques, cosmétiques et vétérinaires, grâce à leur capacité à augmenter la solubilité, la stabilité et la biodisponibilité des molécules actives par libération différée [Duchêne, 1987]. Les molécules actives sont incluses dans la cavité hydrophobe des cyclodextrines exclusivement par des interactions hydrophobes. La taille de la cavité hydrophobe impose une taille minimale et maximale de molécules à inclure [Szjetli, 1998]. Les molécules répulsives d'arthropodes étant pour la plupart fortement hydrophobes et de taille convenable pour une complexation avec des cyclodextrines, elles sont des molécules candidates de choix à une encapsulation moléculaire [Whang, 2008]. Des systèmes de délivrance transdermiques basés sur des cyclodextrines ont prouvé que ces systèmes améliorent les propriétés physicochimiques des molécules actives incluses, avec une modification de la perméation cutanée [Lopez, 2000].

Des solutions de complexes d'inclusion générées par des cyclodextrines modifiées et du DEET [Ranaldo, 2006] ou encore au limonène [Hebeish, 2008] ont été formulées pour la fabrication de textiles imprégnés. Les résultats obtenus sur *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi* par des tests en cage ont démontré que l'inclusion du DEET dans des cyclodextrines destinés à l'imprégnation des textiles n'est pas une méthodologie envisageable pour une protection optimale de plusieurs jours [Romi, 2005] (tests réalisés suivant une méthodologie décrite par le WHO [WHO, 1981]). La raison principale est une diminution trop importante de l'évaporation de la matière active complexée, la quantité en phase gazeuse devient insuffisante pour garantir la répulsion des insectes.

IV.2. Les liposomes

Les liposomes, étudiés pour la première fois par Bangham en 1965, sont des structures fermées sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux [Bangham, 1965]. La taille de ces vésicules varie de 20 nm à plusieurs dizaines de μm . La (ou les) bicouche(s) lipidique(s) est (sont) composée(s) majoritairement de phospholipides. Les liposomes sont employés industriellement comme vecteur de substances cosmétiques [Strauss, 1989], dans le domaine de la thérapie génique ou encore comme support de vaccins [Vemuris, 1995]. L'association d'une cavité interne hydrophile et d'une membrane hydrophobe composée de bicouche(s) phospholipidique(s) rend possible l'encapsulation de matières actives hydrophiles et hydrophobes.

Des formulations de répulsifs d'arthropodes ont été élaborées à base de liposomes [Domb, 1993], ces formulations ont prouvé un effet de libération régulée et par conséquent la

possibilité d'étendre la durée de protection contre des nuisibles. Des liposomes chargés en DEET ont été développés par Sawyer (Ultra 30 Insect Repellent[®]), garantissant une durée de protection de douze heures par libération lente. Le développement des liposomes n'est cependant pas une piste privilégiée pour une application industrielle, dû à leur fragilité et leur capacité de chargement en matière active limitée. Par ailleurs leur cout de fabrication est élevé. La libération de la matière active encapsulée est très rapide (quelques heures) et ils ont une stabilité au stockage très limitée, non convenable dans le cas de développement de produits antiparasitaires. Dans le cas d'une application topique, lorsqu'il entre en contact avec la peau, le liposome est absorbé et permet d'atteindre des couches profondes de la peau.

IV.3. Les émulsions

Les émulsions sont des systèmes d'encapsulation dits "ouverts", composés de deux phases non miscibles. Ces systèmes sont très appropriés pour un grand nombre d'applications où la libération contrôlée et ciblée est nécessaire. Des ingrédients actifs tels que des molécules organiques ou inorganiques peuvent être incluses dans les gouttelettes d'émulsion pour des formulations pharmaceutiques ou cosmétiques. Toutes les applications sont liées à la physico-chimie et à la dynamique des gouttelettes: la taille des gouttelettes, leur charge de surface, la capacité de chargement, qui conditionnent la vitesse de libération des molécules formulées. La formulation d'une émulsion huile-dans-eau (H/E) nécessite la dispersion d'une phase organique dans une phase aqueuse par apport énergétique (système d'agitation, cisaillement), ou par autoémulsification en fonction de la composition de la formulation. Les systèmes autoémulsifiants ne nécessitent pas ou peu d'énergie, les composants de la formulation conditionnent la formation de gouttelettes de phase dispersée. Les émulsions sont thermodynamiquement instables, contrairement aux émulsions submicroniques (de taille de gouttelette inférieure à 1 μ m, appelées nanoémulsions). L'obtention de nanoémulsion nécessite un apport énergétique élevé par unité de surface. L'inconvénient majeur des nanoémulsions est la dégradation rapide de molécules actives en raison du contact direct avec la phase dispersante comme présenté en Figure I.10.

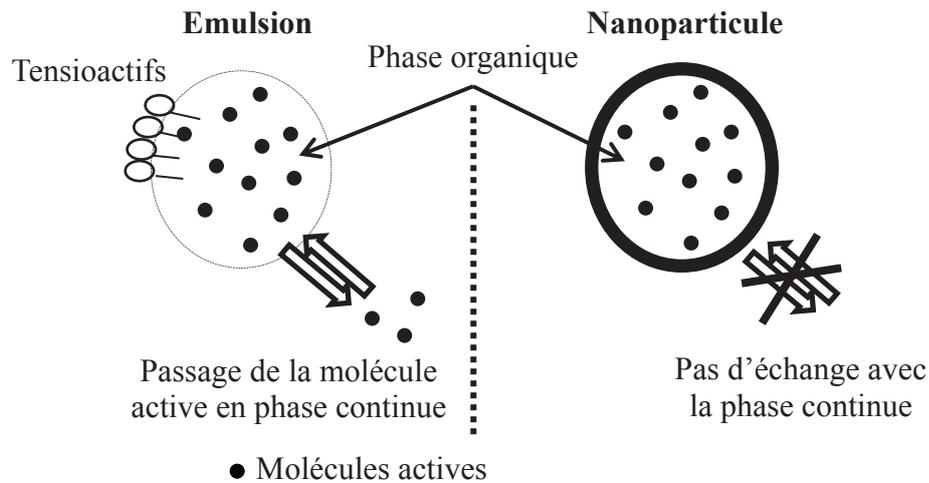


Figure I.10 : Comparaison de la dégradation de molécules actives encapsulées dans une gouttelette d'huile (système émulsion) et dans un système particulaire.

Des nanoémulsions de type huile dans eau ont été étudiées dans la thématique de la formulation de répulsifs d'insectes. Ainsi des huiles essentielles ont été formulées par homogénéisation à haute pression pour l'obtention de systèmes contenant jusqu'à 25% en ingrédient actif. Il a été prouvé qu'il était possible d'assurer une libération contrôlée de l'huile essentielle pour potentialiser sa durée d'action dans ce type de système [Sakulku, 2009 – Nuchuchua, 2009]. Cependant les durées d'activité rapportées ne dépassent par quelques heures.

IV.4. Les nanoparticules

La technologie nanoparticulaire offre de nombreux avantages, en particulier la solubilisation des ingrédients actifs hydrophobes, l'augmentation de la biodisponibilité, la protection de la molécule active contre les dégradations physiques, chimiques, biologiques pendant le stockage et leur utilisation. Ces particules de taille submicronique sont constituées d'une matrice solide capable de retenir les molécules actives par séquestration ou adsorption [Lockman, 2002]. Les matériaux enrobant utilisés sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique ou des lipides. Les nanoparticules ont été largement étudiées pour leur vaste spectre d'application grâce à leur capacité de vectorisation pour des applications parentérales, pulmonaires, dermiques. Les nanoparticules destinées à une utilisation dermique ont plusieurs avantages, essentiellement en comparaison avec les émulsions et les liposomes, qui sont des

objets fragiles. Les nanoparticules pénètrent dans les couches supérieures de la peau et ont la capacité d'être stockées dans les appendices dermiques (principalement les follicules pileux) [Lademann, 2007]. Cette pénétration dans les couches profondes élargit l'espace d'action de l'ingrédient actif et le protège contre l'élimination rapide par simple friction. L'effet occlusif provoqué par le dépôt de nanoparticules augmente l'effet réservoir de la couche cornée. Pour une application cutanée, la nature et la taille des nanoparticules conditionnent le parcours de l'ingrédient actif jusqu'au site cible (follicules pileux, couche cornée, derme) en améliorant la tolérance tissulaire. En outre, en modulant les propriétés de surface des nanoparticules, leur composition et le milieu dispersant, le modèle de libération de l'ingrédient actif et sa répartition peuvent être contrôlés.

Deux types de nanoparticules ont été différenciés :

- Les systèmes matriciels, les nanosphères : la particule est constituée d'un réseau polymérique ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve dispersée ou dissoute l'espèce que l'on souhaite encapsuler.

- Les systèmes réservoirs, les nanocapsules : la particule est constituée d'un cœur liquide (plus ou moins visqueux) ou solide contenant l'espèce encapsulée, entouré d'une écorce solide et continue de matériau enrobant.

Dans les deux types de systèmes, l'espèce encapsulée peut aussi être adsorbée à la surface de la matrice. La Figure I.11 décrit la structure schématique (matricielle ou réservoir) dans le cas des nanoparticules.

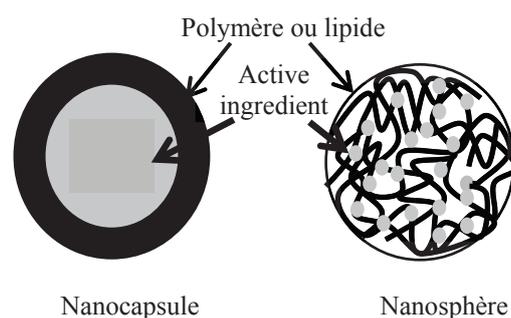


Figure I.11 : Représentation des morphologies de systèmes nanoparticulaires (capsule et sphères).

Cette morphologie est contrôlée par un choix judicieux du procédé de formulation, de la nature et du pourcentage des composants de la formulation.

La cinétique de libération des principes actifs encapsulés est un élément critique des formes particulières dispersées. En effet, ces formes doivent être capables de libérer, selon une

cinétique constante préalablement définie et de façon reproductible, le principe actif encapsulé. Dans ce type de mise au point, les principaux paramètres à prendre en compte sont la nature et les propriétés physicochimiques du polymère, le pourcentage de principe actif à incorporer qui sera d'autant plus important que la libération *in vivo* doit être longue. D'autres paramètres comme la solubilité aqueuse du principe actif ou le mode de préparation doivent évidemment être considérés. Outre le contrôle de la libération après traitement, la libération initiale d'une partie du principe actif encapsulé doit être maîtrisée. Si elle est rapide et importante elle est appelée effet « burst », et par conséquent une libération de matière active plus importante que nécessaire. Au contraire, un effet de latence peut être observé (« lat effect »), l'activité initiale ne sera pas suffisante.

Les nanoparticules sont très diversifiées de par la nature de l'agent piégeant la molécule active. Les lipides, les peptides et les polysaccharides y sont notamment utilisés comme vecteurs pour le transport ciblé de médicaments, récepteurs, agents chimiques en imagerie médicale ou encore acides nucléiques. Des microparticules contenant des huiles essentielles pour des applications sur textiles, (huile essentielle de citronnelle [Specos, 2010] ; huile essentielle de *Zanthoxylum limonella* [Maji, 2007]) ont prouvé leur intérêt en exposant un effet répulsif supérieur à 90 % durant trois semaines. Ce moyen de protection est très rentable pour l'Homme dans le cas de la fabrication d'équipements tels que les vestes, tentes, abris, cependant il n'est pas envisageable dans le cas de traitement d'espèce animal tel que le chien.

Conclusion

Les produits commerciaux standards sont des formulations vaporisables, très souvent des solutions hydroalcooliques permettant une protection de quelques heures. Cette courte durée d'action impose une prise répétée et par conséquent un risque d'effets secondaires accrus tel que des irritations dermiques. C'est particulièrement le cas pour des formulations de type solutions éthanolique car ce solvant est des promoteurs de pénétration cutanée [Stinesepher, 1998 – Smith, 1954].

La recherche pharmaceutique a été sollicitée pour le développement d'un produit de toxicité acceptable, sans odeur, possédant une volatilité suffisante pour assurer une protection immédiate, pouvant protéger les animaux de compagnie à des niveaux élevés d'activité pendant des périodes prolongées [Bissinger, 2010]. Des formulations de répulsifs d'arthropodes innovantes ont été élaborées et évaluées avec une intention particulière portée sur les huiles essentielles et le DEET, en tant que référence.

Comme nous l'avons décrit tout au long de ce chapitre, l'ajout de vecteurs colloïdaux dans des formulations de répulsifs d'arthropodes apporte une caractéristique de prolongation de la durée d'action par régulation des phénomènes de libération de la molécule active.

Un panel de véhicules de matières actives de taille submicronique a été développé depuis quelques décennies. Les systèmes nanoparticulaires capables d'incorporer en phase aqueuse des composés faiblement hydrosolubles sont de grand intérêt : elles favorisent la stabilité colloïdale et peuvent réguler la libération d'agents actifs et les protéger des dégradations physiques (friction sur la peau), chimiques (UV), enzymatiques. Elles favorisent également le stockage dans la peau (particulièrement dans les follicules pilosébacés). Les matières actives à propriétés répulsives ont pour la plupart un caractère hydrophobe (DEET, Picaridin[®], IR3535[®], huiles essentielles, Perméthrin...), ce sont donc des candidats de qualité pour l'encapsulation dans un système nanoparticulaire. Leur encapsulation permet d'une part de réduire le nombre d'applications et par conséquent les effets secondaires dus au traitement et d'autre part de garantir une protection longue durée de l'animal traité (avec une application possible à l'Homme ou au traitement de surfaces).

L'étude des procédés de fabrication transposable à l'échelle industrielle est nécessaire afin de transformer le concept de la technologie des nanoparticules dans une application réaliste et pratique de système de délivrance de molécules actives répulsives d'insectes. C'est pour cela que la partie suivante s'intéresse aux procédés d'obtention des nanoparticules pouvant être applicable à une échelle industrielle.



Chapitre I - Partie 2



Les nanoparticules : Formulation & Devenir



Introduction	37
I. Les nanoparticules, généralités	38
I.1. Les nanoparticules lipidiques	38
I.2. Les nanoparticules polymériques	39
II. Procédés de formulation par déplacement de solvant	41
II.1. L'émulsification-diffusion de solvant	41
II.2. La nanoprécipitation	43
II.3. Le procédé membranaire	45
III. Devenir des particules après fabrication	47
III.1. Stabilité colloïdale	47
III.2. Mécanisme de formation d'un film de nanoparticules	50
III.3. Cinétique de diffusion de matières actives volatiles dans l'air	51
Conclusion	54

Introduction

Le domaine des « nanotechnologie » est apparu dans les années 1980. Cette technologie à l'interface de la biologie, de la physique, et de la chimie, est la source de la recherche et du développement d'objets d'une dimension nanométrique. Des travaux sur des vecteurs de molécules actives dans la recherche et le développement pour le vivant (industrie pharmaceutique et cosmétique) ont été développés, avec au centre des thématiques de rechercher les nanoparticules. Les nanoparticules représentent un des champs de recherche les plus dynamiques actuellement dans le monde et s'imposent comme une priorité stratégique dans plusieurs pays industrialisés. Parmi les divers vecteurs de matières actives nanoparticulaires, les nanoparticules polymériques et les nanoparticules lipidiques fournissent des caractéristiques intéressantes en termes d'interaction *in vivo*. Les possibilités de modulation des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules permettent d'envisager une multitude d'application pour le ciblage, la protection et la libération prolongée de matières actives encapsulées.

Nous énonçons dans cette partie l'étendue et les limites des nanoparticules applicables à notre thématique de recherche. Les procédés de formulations de nanoparticules ainsi que des paramètres physico-chimiques rencontrés après leur fabrication sont présentés.

I. Les nanoparticules, généralités

Une évaluation récente chiffre le marché mondial potentiel à 2,6 billions de dollars américains en 2015 [Schnieder, 2007], l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET) prévoit également que le principal impact économique des nanotransporteurs se produira dans les secteurs des nanomatériaux, de l'électronique et de l'industrie pharmaceutique comme présenté en Figure I.12. La création de l'US Nanobusiness Alliance, de l'Europe Nanobusiness Association et de l'Asia-Pacific Nanotechnology Forum, dont le seul objectif est la commercialisation de nanoproduits, illustre bien à la fois l'importance accordée à ces marchés et la concurrence internationale dans le domaine.

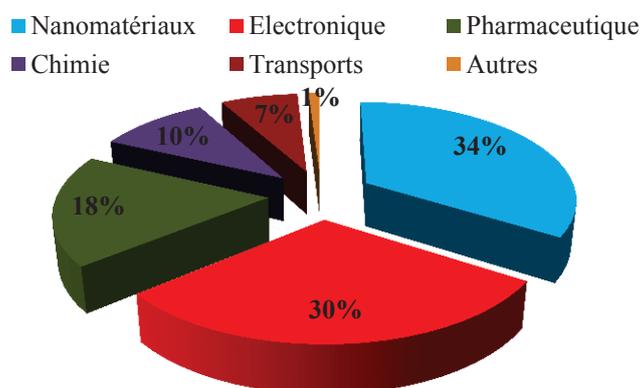


Figure I.12 : Répartition de l'impact économique global anticipé des nanotechnologies en 2010 selon l'AFSSET.

I.1. Les nanoparticules lipidiques

Les systèmes de libération de médicament à base de lipides ont été développés dans les années 1990, permettant une alternative aux liposomes, aux nanoparticules à base de polymères ou encore aux émulsions. Ces particules submicroniques ont été répertoriées selon 3 catégories, les nanoparticules lipidiques solides (Solid Lipidic Nanoparticles ; SLN[®]), les véhicules lipidiques nanostructurés (Nanostructured Lipidic Carrier ; NLC[®]) et les molécules actives conjuguées aux lipides (Lipidic Drug Conjugate ; LDC[®]). Les SLN[®] sont une première génération de la technologie des nanoparticules à base de lipides. Ce sont des nanosphères composées de lipides qui ont la particularité d'être solides à la température ambiante et à la température corporelle ($T_g > 65^\circ\text{C}$) [Müller, 2000]. Quelques limites de ce type de nanovecteur ont été décrites : une capacité de chargement relativement faible pour de nombreuses molécules actives et un relargage potentiel de la molécule active au cours du stockage. Les SLN[®] sont préparés à partir des lipides hautement purifiés qui mènent à une cristallisation en maille parfaite, avec peu, voire pas du tout, de partie amorphe. Pendant le stockage, les molécules lipidiques subissent un processus de faible énergie de réorganisation

conduisant à l'expulsion de la matière active présente entre les chaînes lipidiques. Par conséquent, plus la structure cristalline du lipide est parfaite; plus la molécule active est potentiellement expulsée. La capacité de chargement SLN[®] est relativement faible (de 5% à 25%), ce chargement est rendu possible par la solubilité de la matière active dans le mélange de lipides et de l'état polymorphe de la matrice lipidique. La taille moyenne des particules formées peut varier de 40 nm à 1 µm. Cette taille est conditionnée à la fois par la nature et les pourcentages des composés et le procédé de formulation.

Une seconde génération de vecteurs lipidiques a été mise au point par Müller *et al.* en 2000, ce sont les NLC[®]. La principale caractéristique des NLC[®] est une structure contrôlée de la matrice lipidique de la particule, la création d'une matrice aussi imparfaite que possible. Pour arriver à ce résultat, des lipides sous forme liquide (des huiles) sont mélangés au lipide solide ayant une structure 3D très différente. Les points de fusion de ces particules sont, par conséquent, diminués par rapport aux SLN[®] (T_g = 40°C). La capacité de chargement des NLC peut être augmentée de 95% par rapport aux SLN[®]. L'expulsion de l'ingrédient actif au cours du stockage est minimisée voire évitée. Les SLN[®] et les NLC[®] sont limités par la nature de l'agent actif à encapsuler, qui doit être hydrophobe pour prétendre à une capacité de chargement élevée.

Cette limitation a été contournée par le développement d'une troisième génération de nanovecteur lipidique, les LDC[®]. Le principe réside dans la modification du caractère hydrophile molécule active par conjugaison avec un composé lipidique par liaison covalente ou simplement par formation d'un sel avec un acide gras. Les suspensions de nanoparticules ont un point de fusion généralement comprise entre 50 et 100°C.

Nous nous sommes intéressés aux nanoparticules polymériques afin de prétendre à une capacité de chargement élevée et un pourcentage en matière active élevé dans le produit final. Effectivement, les répulsifs présents sur le marché ont un pourcentage supérieur à 10% en matière active, il est par conséquent nécessaire d'avoir la capacité de formuler des produits contenant au moins ce pourcentage.

I.2. Les nanoparticules polymériques

Les polymères actuellement utilisés pour leurs caractéristiques de biocompatibilité et de biodégradabilité sont la poly-ε-caprolactone, le poly-L-acide glycolique [Cheng, 1998], des polysaccharides, des macromolécules telles que l'albumine [Verrecchia, 1995], l'alginate, le chitosan ou même des gélatines. Des polymères issus de la synthèse ont été développés pour la régulation de la libération de médicaments tels que les Eudragit[®], qui sont des copolymères

dérivés d'esters de l'acide acrylique et méthacrylique, dont les propriétés physicochimiques sont déterminées par des groupes fonctionnels. Des nanoparticules à base d'Eudragit® ont été développées pour diverses applications, le Tableau I.7 rassemble les caractéristiques de fabrication de suspensions décrites dans la littérature. Les Eudragit®RS et RL sont des polymères couramment utilisés pour l'enrobage entérique de comprimés et pour la préparation de formes pharmaceutiques à libération contrôlée. Ce sont des co-polymères de type poly (acrylate d'éthyle, méthacrylate de méthyle-et-chlorotriméthylsilane ammonioethyl méthacrylate), contenant une quantité de groupement ammonium quaternaire de 5% et 10% pour les Eudragit®RS100 et RL100 respectivement. Les deux sont insolubles à pH physiologique et sont capables de gonfler dans ces conditions [Bodmeier, 1989] ce qui en fait de bons matériaux pour la dispersion de la matière active.

Tableau I.7 : Description de suspensions nanoparticulaires à base d'Eudragit. Taille : Taille des particules.

Voie d'administration	Type d'Eudragit	Procédé	%MA	Taille [nm]	Réf
Orale, anticancéreux	E100	Nanoprécipitation	5	120	[Tang, 2011]
Orale, traitement de l'hypertension	E100	Nanoprécipitation	<1	200	[Kalimuthu, 2009]
Traitement topique	RS/RL100	Nanoprécipitation	<1	60 : 160	[Bucolo, 2004] [Pignatello, 2002]
Muqueuse vaginale	S100	QESD	<1	211 : 331	[Kawashima, 1989] [Yoo, 2011]
Orale, Traitement de maladies auto immune	RS/RL100	Nanoprécipitation	<1	170 : 310	[Ubrich, 2005]

Les caractéristiques de surface des nanoparticules sont contrôlées par un choix judicieux du polymère utilisé. Une suspension nanoparticulaire est caractérisée par plusieurs paramètres physiques et chimiques dépendants des composants de la formulation et du procédé de fabrication : taille et distribution de taille, charge de surface, géométrie, porosité, type de membrane et épaisseur. Toutes ces caractéristiques conditionnent les cinétiques de libération de la matière active encapsulée. D'autre part, le ciblage est assuré par les caractéristiques de surface de la nanoparticule (adsorption de ligands spécifiques sur la surface des nanoparticules). Les Eudragit®RS et RL100 donnent accès à des potentiels zêtas des nanoparticules positifs, adéquat pour une adsorption sur des supports de charge opposée (fibres de kératine composants les poils canins).

II. Procédés de formulation par déplacement de solvant

La recherche scientifique a développé différentes méthodes de préparation des nanoparticules basées sur l'assemblage de molécules (ingrédients actifs) et de macromolécules (polymères), c'est dans ce cas que nous parlerons de procédé de formulation de nanoparticules, en opposition aux procédés de synthèse de polymères. Ce chapitre décrit les méthodes de fabrication de nanoparticules par déplacement de solvant utilisant des équipements basiques, une attention sera portée au procédé membranaire. Nous décrivons les procédés d'émulsification diffusion de solvant et de nanoprécipitation, ce dernier étant au centre de nos travaux expérimentaux de formulation. Leur avantage majeur est la possibilité d'étendre le procédé pour des fabrications à l'échelle industrielle afin d'obtenir des nanoparticules polymériques à caractéristiques physiques et chimiques contrôlées.

II.1. L'émulsification-diffusion de solvant

La méthode d'émulsification-diffusion de solvant est basée sur l'utilisation d'un solvant partiellement soluble dans l'eau (acétate d'éthyle, alcool benzylique, dichlorométhane...) [Quintanar-Guerrero, 1999]. La première étape de ce procédé est la saturation mutuelle du solvant et de l'eau dans le but d'assurer un équilibre thermodynamique entre les deux phases. Le polymère et l'ingrédient actif hydrophobe sont ensuite dissous dans le solvant saturé en eau et la solution résultante est émulsifiée dans la phase aqueuse avec des dispositifs d'émulsification fortement énergétiques (ultrasons, homogénéisation haute pression, homogénéisation haute vitesse). L'ajout de molécules permettant d'abaisser la tension de surface des gouttelettes est généralement attendue, d'autant plus si l'obtention de nanogouttelettes est nécessaire. L'émulsion directe (communément appelée émulsion huile dans eau, H/E) formée est ensuite transférée dans une phase aqueuse, induisant la diffusion du solvant depuis la gouttelette de phase organique vers la phase continue et par conséquent la formation d'une matrice dure, la nanoparticule.

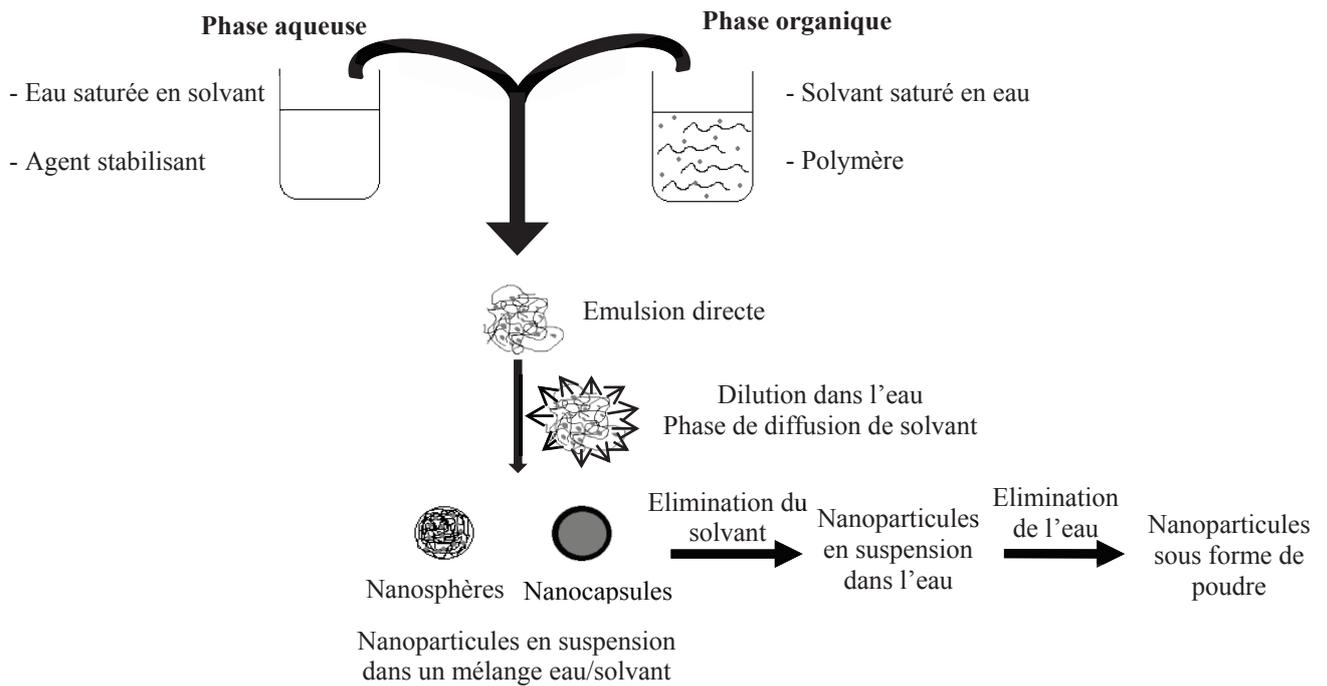


Figure I.13 : Procédé d'émulsification diffusion de solvants.

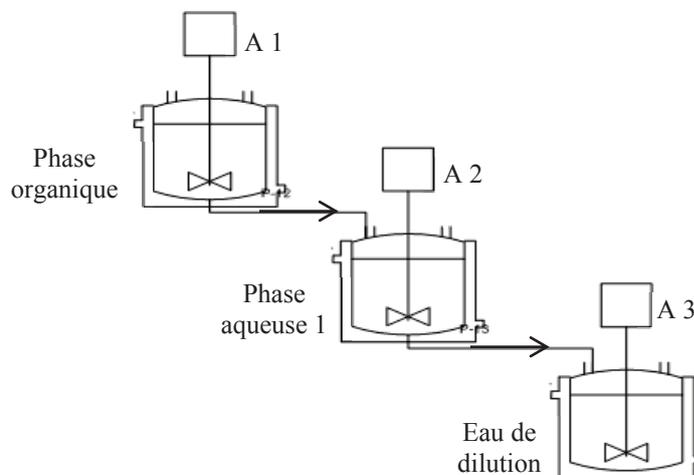


Figure I.14: Procédé d'émulsification diffusion de solvant en scale-up. A : Système d'agitation.

Cette méthode de fabrication de nanoparticules présente plusieurs avantages : les solvants utilisés sont acceptables pour le domaine pharmaceutique et l'efficacité d'encapsulation de molécules hydrophobes a été décrite comme étant concurrentielle. Des nanosphères et des nanocapsules sont réalisables selon les composants et leurs pourcentages. Par ailleurs dans le cas des nanocapsules, l'épaisseur de la coque polymérique est contrôlable en fonction de la concentration en polymère. La taille des nanoparticules obtenues par émulsification-diffusion

de solvant a été décrite comme étant fonction de la concentration en polymère, du ratio phase externe/phase interne, concentration en agent stabilisant. Il est important de noter que la taille des gouttelettes de l'émulsion formée est la même que la taille des particules finales. Par conséquent, la force de cisaillement impliquée dans l'étape d'émulsification conditionne la taille des nanogouttelettes, et donc la taille des nanoparticules finales. Cette méthode présente cependant des inconvénients : un grand volume d'eau est nécessaire pour l'étape de diffusion de solvant. De plus une molécule active partiellement soluble dans l'eau aura tendance à migrer depuis le milieu interne de la particule jusqu'à la phase continue durant la phase de diffusion. Le procédé d'émulsification évaporation de solvant est fortement comparable au procédé d'émulsification diffusion de solvant. La différence entre ces deux méthodes est la non utilisation d'une étape de dilution dans l'eau pour l'émulsification évaporation de solvant. Ainsi la suspension finale contient beaucoup moins d'eau mais la sortie de solvant depuis la gouttelette jusqu'à la phase continue est moins contrôlée, les efficacités d'encapsulation s'en trouvent amoindri.

II.2. La nanoprécipitation

Le procédé de nanoprécipitation a été au centre de nos travaux de recherche. La nanoprécipitation a été introduite par Fessi *et al.* [Fessi, 1989] pour la formation de nanoparticules. Ce procédé est basé sur la précipitation suivie de la solidification d'un polymère à l'interface solvant non solvant. Le flux de solvant, la diffusion et les tensions de surface à l'interface des phases organique et aqueuse génèrent des turbulences qui conduisent à la formation de nanogouttelettes de phase organique contenant le polymère. Etant donné que le solvant diffuse instantanément depuis les gouttelettes, le polymère précipite de manière instantanée sous forme de nanoparticules. Enfin, le solvant organique est évaporé généralement sous vide.

La phase aqueuse est composée d'eau purifiée et de molécules stabilisantes. La phase organique est composée d'un polymère et d'une matière active hydrophobe tous deux solubles. Le point clé de ce procédé de formulation est une miscibilité totale du solvant dans l'eau, ceci conduisant à la formation instantanée de nanoparticule par déposition interfaciale du polymère en un temps infime, de l'ordre de la milliseconde (cf. Figure I.15). La vitesse de nucléation dépend de la nature du polymère. Le contrôle des tailles de particules et de leur distribution granulométrique dépendent principalement de la nature du solvant utilisé, du pourcentage en agent stabilisant et du rapport polymère/matière active. Un état d'avancement

de la recherche sur les nanoparticules polymériques obtenues par nanoprécipitation a été publié (Annexe 1). Il regroupe les aspects théoriques et appliqués de la nanoprécipitation avec une attention particulière portée aux brevets.

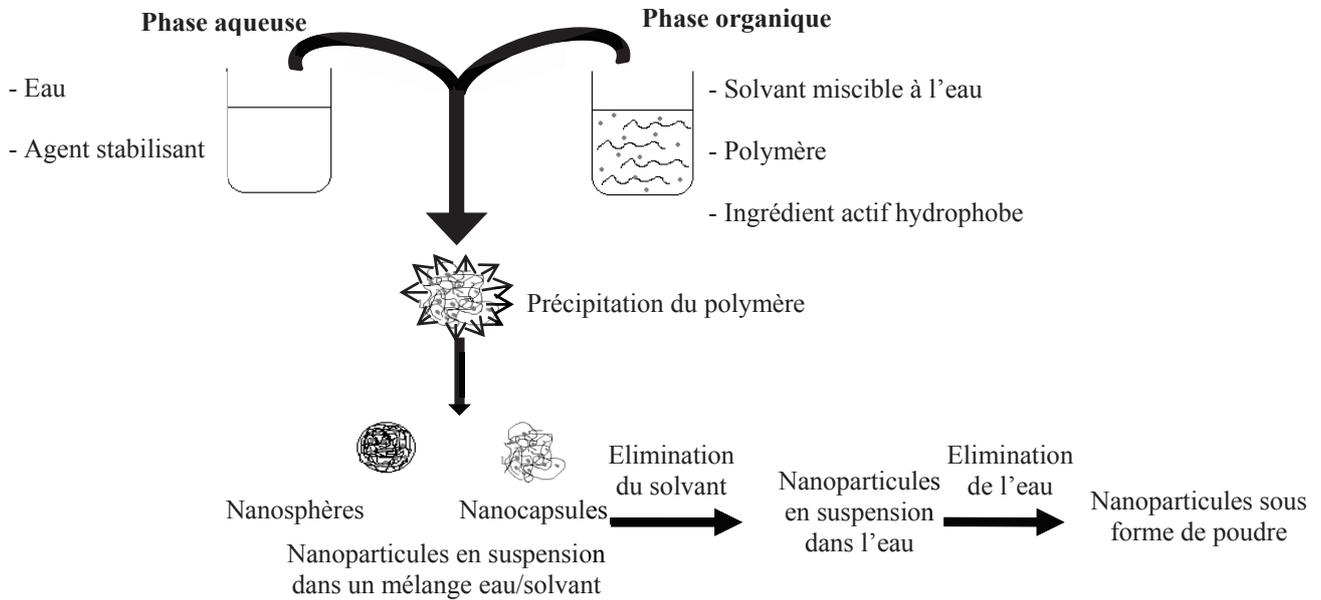


Figure I.15: Etapes de formulation de nanoparticules par le procédé de nanoprécipitation

La principale limite de cette technique est le contrôle des tailles de particules, exclusivement régie par les composants de la formulation. Des unités pilotes de nanoprécipitation ont été développées. Un mélangeur appelé « mélangeur en T » s'est avéré très efficace pour la formulation de nanosuspensions à l'échelle industrielle comme présenté en Figure I.16. Ce mélangeur est le lieu central où se produit la mise en contact des deux phases, diffusant l'une dans l'autre, formant de manière instantanée la suspension nanoparticulaire. La suspension est ensuite récupérée dans un réacteur central et maintenue sous agitation douce. Le solvant organique est ensuite éliminé et la suspension est concentrée par élimination d'eau dans le but d'obtenir une suspension contenant un pourcentage en particule souhaité.

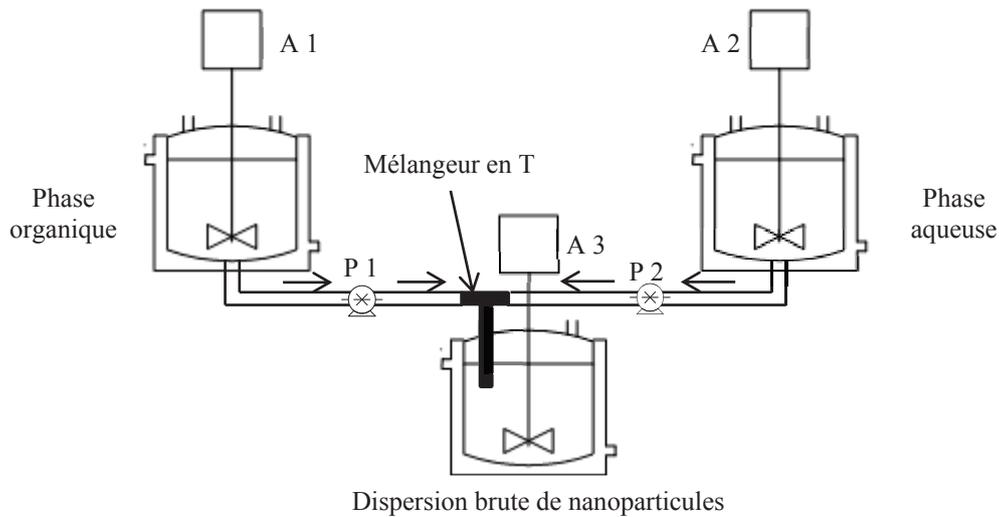


Figure I.16 : Unité pilote du procédé de nanoprécipitation utilisant un « mélangeur en T ».

L'avantage principal de cette méthode de fabrication de nanoparticules est une forte répétabilité et reproductibilité des caractéristiques des objets colloïdaux formulés, une distribution de taille maîtrisée et très étroite et une efficacité d'encapsulation quasi quantitative pour les molécules actives suffisamment hydrophobes.

II.3. Le procédé membranaire

Ce procédé de fabrication breveté en 2004 par Charcosset *et al.* [Charcosset, 2004] a été développée en tant que méthode de formation en continu de nanoparticules à base de lipides ou de polymères.

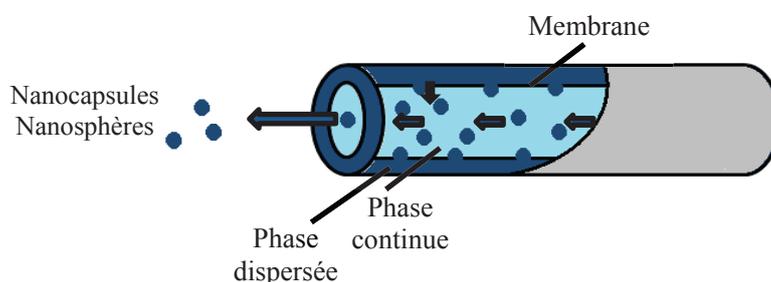


Figure I.17 : Schéma d'un contacteur membranaire

Le principe des contacteurs membranaires est basé sur le phénomène de flux croisés. La phase dispersée (contenant la matrice de la nanoparticule finale) est compressée au travers des pores de la membrane, ce qui conduit à la formation de petites gouttelettes (ou particules) par flux

croisés. La phase aqueuse circulant dans le module membranaire conduit les gouttelettes en formation à la sortie des pores. Les nanoparticules polymériques sont ainsi formées par un procédé continu par déplacement de solvant.

Ce procédé facilement transposable à l'échelle industrielle permet un contrôle des tailles de particules par un choix judicieux des paramètres de procédé. La pression transmembranaire nécessaire est relativement basse (environ 3 Bar). Des tests de formulation en grande quantité ont été menés, à titre indicatif il est possible de produire 1 litre de suspension en 5 minutes dans des conditions standards. Les paramètres de formulations à maîtriser principalement pour un contrôle des tailles de particules sont la concentration de la phase organique et la température de la phase aqueuse, particulièrement dans le cas de la formulation de nanoparticules lipidiques [Charcosset, 2006].

III. Devenir des particules après fabrication

III.1. Stabilité colloïdale

Les nanoparticules en suspension sont thermodynamiquement instables en raison de la tendance naturelle des particules à s'agréger pour minimiser l'énergie libre superficielle du système. La stabilité colloïdale est régie par différentes interactions qui agissent à plus ou moins longue distance. Deux types de stabilité se différencient, la stabilisation électrostatique provenant de groupement ioniques incorporés aux chaînes polymériques (co-monomère polaire ou ionique) ou de l'adsorption de macromolécules de type émulsifiants à la surface de la particule. La seconde est la stabilisation stérique apportée par la présence éventuelle de chaînes polymériques à l'interface de particules.

Les particules en suspension dans l'eau sont entourées individuellement d'une atmosphère ionique formée par les contre-ions et des co-ions des groupements de surface. Lorsque les particules se rapprochent, ces atmosphères se recouvrent, et la région de recouvrement a une pression osmotique supérieure à celle du reste de la solution aqueuse. Cette pression s'oppose au recouvrement et crée ainsi une répulsion entre les particules. La théorie classique de stabilité colloïdale est appelée DLVO du nom de ses auteurs : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek [Derjaguin, 1941 – Verwey, 1947]. La force répulsive des contre-ions joue un rôle majeur dans la stabilité des nanoparticules puisque sa portée est très grande. Dans le cas de particules chargées, le rayon d'interaction est beaucoup plus grand que dans le cas de particules non chargées. On ne peut négliger ces interactions à grande distance car le rayon d'interaction est plus grand que la distance moyenne entre deux particules. Cette longueur critique d'interaction collective appelée longueur de Debye s'exprime sous la forme :

$$l_D = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT}{2N_a e^2 I} \quad \text{Equation I.1}$$

avec :

- ε_0 : perméabilité du vide ;
- ε_r : perméabilité du milieu ;
- k : constante de Boltzmann ;
- T : température ;
- N_a : nombre d'Avogadro ;
- e : charge de l'électron ;
- I : force ionique.

La théorie DLVO suggère que la stabilité d'une particule dans une solution dépend des contributions concurrentes entre les forces attractives et répulsives entre les particules lorsqu'elles s'approchent les unes des autres du fait du mouvement brownien qu'elles subissent. Ainsi les forces attractives de type Van der Waals (V_A) sont opposées aux forces de répulsion électrostatique (V_R) [Derjaguin, 1934]. L'énergie potentielle totale V_T entre deux particules est donnée par l'Equation I.2 :

$$V_T = V_A + V_R \quad \text{Equation I.2}$$

V_A et V_R sont définis comme suit :

$$V_A = -\frac{A}{12\pi D^2} \quad \text{Equation I.3}$$

$$V_R = \frac{64 k_B T a n_0 \gamma^2}{K} e^{-kD} \quad \text{Equation I.4}$$

avec :

- A : constant d'Hamaker ;
- D : Distance interparticulaire ;
- k_B : constante de Boltzmann ;
- T : Température ;
- a : rayon des sphères ;
- n_0 : nombre d'ions loin de la surface ;
- γ : Energie de surface ;
- K : paramètre de Debye Hückel ($1/k$ représente l'épaisseur de la double couche et correspond à la portée des forces).

Le potentiel zêta joue un rôle prédominant dans la stabilité colloïdale des nanoparticules. Le profil d'énergie potentielle est représentable par la variation de l'énergie totale en fonction de la distance interparticulaire. Islam *et al.* [Ismaïl, 1995] décrivent le comportement d'une suspension nanoparticulaire en fonction de la distance moyenne entre les particules suivant 5 zones, représentées en Figure I.18 :

- Pour une distance interparticulaire relativement grande, ($D > 100\text{nm}$) les énergies de van der Waals et de la double couche électrique n'ont pas d'effet sur les particules (Zone A) ;
- Les deux potentiels V_A et V_R , augmentent lorsque les particules se rapprochent, avec une croissance plus lente pour le terme V_R que pour le terme V_A . Les forces attractives

prédominant légèrement, d'où l'existence d'un petit minimum secondaire pour une distance interparticulaire de quelques dizaines de nanomètres (Zone B) ;

- V_R a un effet de plus en plus fort sur les particules lorsque la distance interparticulaire diminue d'avantage (Zone C). A une distance interparticulaire d'environ 20 nm, une large barrière d'énergie empêche l'approche des particules à plus courte distance ;
- Lorsque la distance interparticulaire est inférieure à une certaine distance pour laquelle les forces attractives de van der Waals deviennent dominantes par rapport aux forces répulsives de la double couche ionique, la formation d'agrégats est générée de manière irréversible (Zone D). Un puit de potentiel plus ou moins profond est produit (minimum primaire) ;
- Pour une distance interparticulaire nulle, l'énergie potentielle est infinie car pour des distances interparticulaires très petites (en dessous du nanomètre), l'énergie de van der Waals est fortement répulsive (énergie de Born) (Zone E).

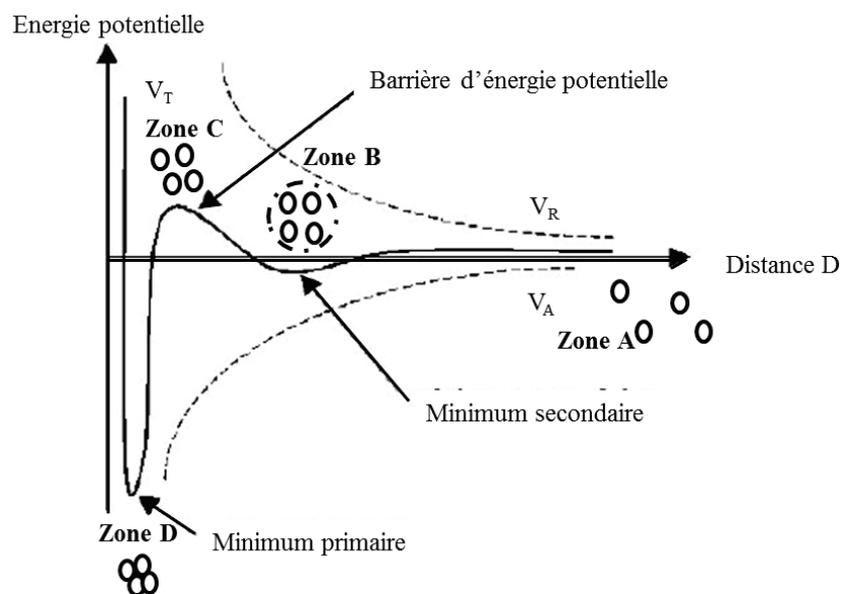


Figure I.18 : Diagramme de l'énergie potentielle d'interaction entre des particules en fonction de la distance interparticulaire.

Les forces attractives sont dues à la différence de polarisabilité électronique entre la phase dispersée et la phase dispersante. Les contrastes de polarisabilité se mesurent à l'aide de la constante d'Hamaker.

La théorie DLVO est un outil de qualité pour la compréhension de l'importance des forces de van der Waals et des répulsions électrostatiques, elle présente cependant quelques limitations. D'une part, les charges sont supposées constantes lors des interactions interparticulaires. Par ailleurs, il ne s'applique que dans le cas de nanoparticules sphériques à surface lisse. Cette

théorie n'est valable que dans le cas de double couche électrique fine et de distances interparticulaires supérieurs à 2 nm.

De manière plus générale, la stabilité colloïdale des nanoparticules est assurée par un équilibre entre les forces d'attraction de van der Waals, les interactions hydrophobes et d'hydratation, la pression osmotique des contre-ions et celle des groupes hydrophiles. La somme de ces composantes est appelée le potentiel d'interaction total.

L'observation de ces différentes forces, de même que les forces de proximité et les liaisons hydrogène, amène à la conclusion que la théorie DLVO repose sur des équations dont les domaines de validité sont spécifiques.

III.2. Mécanisme de formation d'un film de nanoparticules

Lors de l'application d'une suspension de nanoparticules sur un substrat, la phase continue composée majoritairement d'eau est sujette à l'évaporation et une fois sèche, les nanoparticules ont tendance à former un film continu. Ce phénomène conduisant à la formation d'un film se décrit suivant trois étapes successives : la concentration, la déformation des particules et la coalescence [Holl, 2006], comme représenté en Figure I.19.

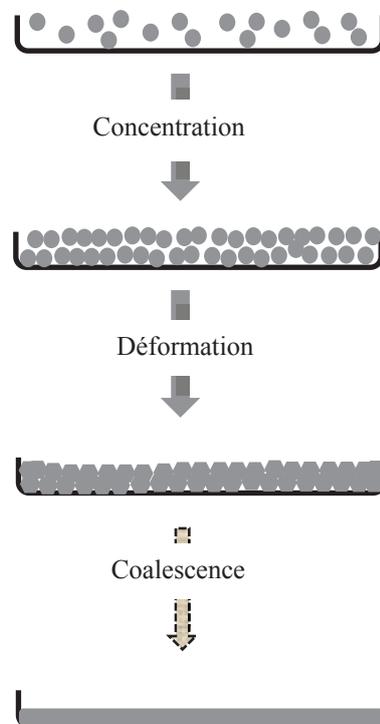


Figure I.19 : Formation d'un film de nanoparticules à partir d'une suspension colloïdale.

L'étape de concentration conduit à l'empilement des nanoparticules, conséquence de l'évaporation de l'eau. L'empilement compact ordonné est la conséquence de répulsion forte interparticulaire à faible distance. Une fois en contact, des forces de compression assurent l'assemblage des nanoparticules, conduisant à la déformation des particules sphériques en polyèdre dont l'empilement remplit l'espace disponible. Si les particules sont indéformables, de l'air se retrouve bloqué entre les nanoparticules, si au contraire elles sont déformables, un film continu se forme. Le module élastique des particules est alors le facteur déterminant de la formation d'un film de nanoparticule. La Température Minimale de Formation d'un Film (TMFF) peut alors être déterminée, proche de la température de transition vitreuse de la matrice polymérique de la particule. Vue de coupe, les particules dessinent une structure en nid d'abeilles. A ce stade, le film est transparent et sec et les particules sont toujours séparées par une interface nette [Eckersley, 1990]. Winnick *et al* ont apporté une définition similaire en distinguant le point de craquage (la température minimum à laquelle le latex devient continu et sans craquement) et la température minimum à laquelle la turbidité disparaît. Le point de transparence est alors à une température légèrement plus basse [Winnick, 1992]. Alors que le point de craquement indique la limite d'adhésion des particules entre elles, le point de transparence indique que la taille moyenne des vides est en dessous de la longueur d'onde de la lumière visible. La formation d'un film continu a lieu par coalescence des nanoparticules. Si les conditions de température et la structure des particules le permettent, des phénomènes de diffusion macromoléculaire d'une particule vers ses voisines à travers ses interfaces ont lieu. Les particules perdent leur individualité en même temps que les interfaces s'estompent. Au terme de ce processus, un film continu et homogène peut être obtenu.

III.3. Cinétique de diffusion de matières actives volatiles dans l'air

Le phénomène de diffusion est un mécanisme de transport de matière sous l'effet d'un gradient de concentration, depuis une zone concentrée vers une zone moins concentrées de matières actives volatiles.

La diffusion d'une matière active depuis un support jusqu'à l'air environnant est contrôlée par divers processus :

- La diffusion moléculaire à travers la couche de vapeur stagnante (juste au-dessus de la zone de dépôt) peut être déterminante sur la vitesse d'évaporation dans une géométrie donnée ;

- L'épaisseur de la couche stagnante est gouvernée par l'écoulement d'air au-dessus de l'échantillon ;
- L'évaporation d'une espèce volatile depuis un mélange de plusieurs composants liquides et solides peut générer un gradient de concentration. Ce gradient affecterait la vitesse d'évaporation par l'intermédiaire des transferts de masse.

La loi empirique de Fick décrit ce phénomène en énonçant que le flux de matière (J) est proportionnel au gradient de concentration par l'intermédiaire du coefficient de diffusivité (D^g). Le flux de matière à l'interface liquide/gaz est déterminé par le profil de concentration et s'écrit selon la première loi de Fick (Equation I.5) :

$$J = -D^g \frac{\delta c^g}{\delta x} \Big|_{x=0} \approx -D^g \frac{C^g - C^\infty}{\Lambda} \quad \text{Equation I.5}$$

- avec :
- D^g : coefficient de diffusivité ;
 - C^g : concentration à la surface de l'espèce volatile ;
 - C^∞ : concentration dans l'air ambiant de l'espèce volatile ;
 - x : distance à l'interface ;
 - Λ : épaisseur de la couche limite.

La théorie cinétique de la diffusion des gaz décrit le coefficient de diffusivité (D^g) sous la forme suivante :

$$D^g = \frac{2}{3\pi^{3/2}N} \sqrt{\frac{RT}{Md^4}} \quad \text{Equation I.6}$$

- avec :
- N : nombre de molécules par unité de volume ;
 - R : constante des gaz parfaits ($R=8,32$ SI) ;
 - T : température ;
 - M : masse moléculaire de la molécule ;
 - d : diamètre des molécules.

La cinétique de libération de molécules actives est supposée refléter des mécanismes de libération différents en fonction de la matrice support. Cinq modèles cinétiques prédominent dans le domaine de l'étude de la libération d'actif depuis une matrice polymérique.

L'équation d'ordre zéro décrit un système dans lequel la libération de la molécule active est indépendante de sa concentration [Najib, 1985];

$$Q_t = k_0 t \quad \text{Equation I.7}$$

L'équation de premier ordre décrit un système dans lequel la libération de la molécule active dépend de sa concentration [Desai, 1966];

$$\log Q_t = \log Q_0 - k_1 t \quad \text{Equation I.8}$$

Le modèle d'Higuchi décrit une libération par diffusion de la matière active depuis une matrice insoluble [Higuchi, 1963];

$$Q_t = k t^{1/2} \quad \text{Equation I.9}$$

D'autres modèles moins généralistes ont été développés, il s'agit de l'équation d'Hixson-Crowell [Hixon, 1931] et de Peppas [Peppas, 1985].

Hixson-Crowell :

$$Q_0^3 - Q_t^3 = k_{HC} t \quad \text{Equation I.10}$$

Peppas :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} t^n \quad \text{Equation I.11}$$

avec : - Q : quantité de molécule libérée à un temps t ;

- Q_0 : quantité initiale de matière active dans la formulation ;

K_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} sont les constantes de libération pour les modèles d'ordre zéro, de premier ordre, d'Hixson-Crowell et de Peppas respectivement.

Dans l'équation de Peppas, M_t est la quantité de matière active libérée à un temps t , M_∞ est la quantité libérée à un temps infini, n est le coefficient diffusionnel indiquant le mécanisme de libération. Seules les valeurs $n=0,5$ (libération contrôlée par phénomène de diffusion) et $n=1$ (libération contrôlée par des phénomènes de gonflement : appelé cas II) sont physiquement réalistes. D'autres valeurs de n indiquent des cinétiques de transport anormales [Ritger, 1987] (e.g. mécanismes combinés de diffusion à proprement dit et dû au gonflement). Dans le cas où $n = 0,5$, l'équation est la même que celle exposée dans le modèle d'Higuchi [Siepmann, 2000].

Conclusion

Les progrès récents dans la technologie pharmaceutique ont conduit à la conception de systèmes plus sophistiqués pour améliorer la distribution, la libération et le stockage d'ingrédients actifs. Un panel de véhicules de matières actives de tailles submicroniques a été développé depuis quelques décennies. La description et les exemples présentés dans cette partie montrent que les systèmes nanoparticulaires sont de grand intérêt, capables d'incorporer en phase aqueuse des composés faiblement hydrosolubles. Elles favorisent la stabilité colloïdale et peuvent réguler la libération d'agents actifs et les protéger des dégradations physiques (friction sur la peau), chimiques (UV), enzymatique, favoriser le stockage dans la peau (particulièrement dans les follicules pilosébacés). Le caractère hydrophobe de la plupart des molécules à propriétés répulsives d'insectes en fait des molécules candidates à l'encapsulation par introduction dans des objets colloïdaux. Leur encapsulation permet, d'une part de réduire le nombre d'applications et par conséquent les effets secondaires dus au traitement, et d'autre part de garantir une protection longue durée de l'animal traité.

L'étude des procédés de fabrication, transposable à l'échelle industrielle, est nécessaire afin de transformer le concept de la technologie des nanoparticules dans une application réaliste et pratique de système de délivrance de molécules actives répulsives d'insectes.

La méthode de fabrication de nanoparticules polymériques sélectionnée pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes (la plupart des molécules actives répulsives d'insectes) a été la formulation par déplacement de solvant, avec une attention particulière portée sur la nanoprécipitation. Le procédé de nanoprécipitation est une technique robuste d'intérêt pour l'élaboration rapide de suspensions nanoparticulaires (nanocapsules ou nanosphères), faiblement consommatrice d'énergie et parfaitement adapté à la production industrielle [Briançon, 1999].



Introduction

Partie Expérimentale



« C'est la théorie qui décide de ce que nous pouvons observer » Albert Einstein



Dans un contexte de développement d'une formulation innovante de produit répulsif, nos travaux de recherche se sont articulés autour des nanoparticules polymériques. Ces objets colloïdaux offrent la possibilité d'étendre la durée d'action de quelques heures (produits commerciaux) à plusieurs jours par la régulation et le contrôle de la libération de la matière active encapsulée. Ces nanoparticules ont la capacité de transporter la matière active dans les follicules pileux et dans le *stratum corneum*. L'absorption percutanée de la matière active est évitée, ainsi que l'élimination prématurée de la formulation (élimination par friction ou par simple rinçage de l'animal...).

Le cahier des charges imposé par l'application est le suivant :

- Le pourcentage massique en matière active encapsulée doit être d'au moins 10% pour être comparable aux formulations commerciales ;
- La formulation doit être conditionnée pour une application sur l'ensemble de la fourrure de l'animal en évitant les désagréments de l'inhalation ;
- La stabilité colloïdale doit être supérieure à un an ;
- Les nanoparticules doivent posséder des caractéristiques d'adhésion sur le poil et sur la peau canine ;
- Les formulations de nanoparticules chargées en matière active encapsulée doivent présenter un profil de libération contrôlé ;
- La libération immédiate de matière active doit être suffisante pour une protection immédiate optimale ;
- La matière active doit suivre un profil de libération d'une quantité suffisante par unité de temps pour garantir une protection optimale pendant plusieurs jours.

Les travaux de formulation de nanoparticules ont suivi comme ligne maitresse la faisabilité à un niveau industriel, autant pour la partie procédé que pour les coûts de fabrication.

La partie expérimentale de ce manuscrit est scindée en 4 chapitres décrivant les travaux de recherche menés.

Le **Chapitre II** concerne une étude des paramètres physico-chimiques des nanoparticules nécessaires pour leur stockage sur et dans la peau (follicules pileux et la couche cornée) et leur adhésion sur le poil. Pour ce faire nous avons réalisé la synthèse de particules modèles ayant des tailles variables. Leur distribution sur et dans la peau a été étudiée par microscopie optique confocale à balayage. Leur accroche sur le poil a été analysée par étude électrocinétique, donnant accès à l'évolution du potentiel zêta de la surface des fibres pileuse

en fonction de l'adsorption des nanoparticules. Une taille de particules et un potentiel zêta critique ont été déterminés pour garantir des interactions favorables entre les nanoparticules et les supports biologiques impliqués (poils canins et peau canine).

Nous avons par la suite formulé des nanoparticules polymériques à partir de polymères préformés, utilisant une méthode de déplacement de solvant. Cette méthode de formulation présente un intérêt particulier au niveau de la transposition du procédé à l'échelle industrielle. Le **Chapitre III** expose la méthodologie de recherche expérimentale pour la formulation de suspensions nanoparticulaires contenant des matières actives à propriété répulsive d'arthropodes. L'étude de la stabilité colloïdale en fonction du temps, de la température, du pH ou encore de la salinité sont discutés.

Une étude du devenir *in situ* des nanoparticules chargées en molécules actives est décrite dans le **Chapitre IV**. L'apport des nanoparticules en tant que vecteur des molécules actives est discuté, au travers des expérimentations *in vitro* et *in vivo*. L'aptitude des nanoparticules à atteindre la peau et le devenir de ces dernières sur et dans la peau sont discutés. L'immobilisation de ces nanoparticules sur les fibres pileuses a ensuite été examinée par des études électrocinétique.

Enfin l'étude en parallèle des profils de libération et de l'efficacité a représenté un point clé de nos travaux de recherche, constituant ainsi le **Chapitre V** de ce manuscrit. Des tests d'efficacité *in vivo* en condition de laboratoire ont été développés, validés et utilisés sur un insecte volant modèle, *Drosophila melanogaster* (la drosophile). L'activité et la durée d'action des formulations obtenues ont été examinées.



Chapitre II



Etude préliminaire sur Nanoparticules Modèles Synthèse, Caractérisation & Interaction

*« Chaque science, chaque étude a son jargon inintelligible qui semble n'être inventé que pour
en défendre les approches » Voltaire*



Introduction	61
I. La polymérisation en émulsion	62
II. Matériels & Méthodes	65
II.1. L'analyse de taille de particule par diffusion quasi élastique de la lumière ..	65
II.2. Le potentiel zêta de nanoparticules en suspension	66
II.3. Outils de microscopie	67
II.4. Etude électrocinétique sur poil canins	71
II.5. Méthode de fabrication des latex	73
III. Caractérisation des supports biologiques	75
III.1. La peau	75
III.2. Les fibres pileuses	76
IV. Synthèse de particules modèles, les latex	81
IV.1. Concentration en amorceur et en monomère	81
IV.2. Ajout d'un marqueur fluorescent	84
IV.3. Réduction des tailles par ajout d'un agent stabilisant	85
IV.5. Fabrication des suspensions de nanoparticules modèles finales	86
V. Visualisation de la distribution des particules dans la peau canine ..	88
VI. Etude de l'adsorption sur le poil canin	94
Conclusion	98

Introduction

Les matériaux polymériques sont des objets prometteurs au centre de la technologie de transport de matières actives. Nos travaux de recherche se sont orientés vers les nanoparticules polymériques en tant que régulateurs de la vaporisation des molécules actives à propriété répulsive, dans le but de garantir une durée d'activité longue et efficace. La formulation recherchée étant destinés à une application pileuse et cutanée sur l'animal, les interactions des nanoparticules avec la peau et la fourrure doivent être prises en considération. Les deux paramètres principaux des nanoparticules sont leur taille et leur charge de surface (exprimée par le potentiel zêta) pour un polymère judicieusement sélectionnée.

Dans ce chapitre, nous décrivons l'ensemble des études que nous avons mené afin de déterminer la taille optimale des nanoparticules favorisant un stockage optimale dans les follicules pilosébacés et dans la couche cornée (la partie la plus externe de la peau).

Pour ce faire, un travail de synthèse de particules par polymérisation en milieu dispersé a été conduit afin d'obtenir des lots de nanoparticules modèles de différentes tailles et de dispersion monomodale. Le procédé utilisé est la polymérisation en émulsion radicalaire. Ces nanoparticules ont été marquées par un co-monomère fluorescent permettant leur détection lors des observations. Une longueur d'onde de travail de 394 nm excite efficacement le Polyfluor[®]394 lié de manière covalente aux chaînes polymériques de la particule.

La première partie de ce chapitre présente l'influence des paramètres expérimentaux de fabrication des suspensions colloïdales sur la taille et la charge de surface des particules modèles communément appelés les latex.

Nous présentons ensuite les mécanismes d'interactions de ces particules de latex fluorescents avec la peau. Les résultats obtenus sont basés sur l'observation de peaux traitées avec des nanoparticules par microscopie confocale et par microscopie à fluorescence.

Une étude de l'adsorption de nanoparticules de latex à la surface des poils canins a ensuite été réalisée. Pour ce faire nous avons étudié les variations de charges de surface des poils en présence de nanoparticules.

I. La polymérisation en émulsion

Les nanoparticules de latex sont des objets colloïdaux en suspension aqueuse (généralement sphériques). Ils sont obtenus par voie de synthèse ionique ou radicalaire de monomères. Parmi ces voies de synthèse, la polymérisation en émulsion présente de nombreux avantages en tant que méthode de fabrication par voie chimique de nanoparticules pour le contrôle des caractéristiques physico-chimiques (cf. Figure II.1). Divers monomères de structure, réactivité, polarité et fonctionnalité chimique sont envisageables et l'architecture macromoléculaire des nanoparticules est contrôlable. Sa mise au point remonte aux années 1920 et 1930 en Allemagne et aux Etats-Unis [Daniel, 2006]. La polymérisation en émulsion met en jeu des monomères hydrophobes, un amorceur hydrosoluble, de l'eau et des agents de surface (des tensioactifs par exemple). La polymérisation en émulsion est un procédé de synthèse radicalaire qui présente plusieurs avantages : un rendement réactionnel satisfaisant, la possibilité de former des polymères de grandes masses moléculaires, la non utilisation de solvants organiques, la facilité de manipulation étant donné leur faible viscosité [Asua, 2004]. Enfin cette méthode permet de synthétiser des particules de tailles variées depuis la dizaine de nanomètres à plusieurs centaines de microns [Sugimoto, 2000 – Thickett, 2007]. Un autre aspect intéressant est la possibilité de synthétiser des nanoparticules sans utilisation d'agents stabilisants. Dans un tel système de polymérisation, les particules polymériques sont stabilisées par la charge apportée par l'amorceur de polymérisation ou par des co-monomères ioniques.

Il a été reconnu que la polymérisation en émulsion est un procédé hétérogène complexe impliquant le transport d'espèces chimiques (les monomères) d'une phase organique à une phase aqueuse. La modélisation et la compréhension totale des processus impliqués dans le procédé de synthèse de latex ont été depuis longtemps au centre de nombreux travaux de recherche. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour la nucléation et la croissance des particules lors de la polymérisation sans agents stabilisants. Le mécanisme basique de la polymérisation en émulsion a été postulé par Harkins en 1947 [Harkins, 1947]. Des théories impliquant la présence d'agents de surface ont été développées dans un premier temps par Medvedev [Medvedev, 1959].

De manière plus générale, la polymérisation en émulsion se divise en trois étapes [Sugimoto, 2000].

Etape 1 : Nucléation des particules : Les composants du milieu réactionnel, pour un système de polymérisation, sont de l'eau (phase continue), des monomères (un ou plusieurs types) et un amorceurs hydrosolubles, la présence d'agents de surface n'est pas toujours nécessaire. C'est pour cela que nous distinguerons la polymérisation en émulsion sans émulsifiants et avec émulsifiants. La production de radicaux commence par la décomposition de l'amorceur par voie thermique ou chimique ou suite à l'addition d'un activateur. Les oligomères générés s'associent par interaction hydrophobes, des particules se forment alors, dont le nombre et la taille vont en augmentant.

Etape 2 : Période stationnaire, croissance des particules : Le monomère diffuse au travers de la phase aqueuse vers les particules de polymère formées durant l'étape de nucléation. La polymérisation se déroule exclusivement dans les particules gonflées de monomères et à vitesse constante. Cette étape s'arrête avec la disparition des compartiments organiques et correspond à une conversion de l'ordre de 10 à 40%. Le monomère est principalement situé dans les particules, une faible quantité peut subsister dans la phase aqueuse en fonction de sa polarité et de sa solubilité.

Etape 3 : Fin de polymérisation : La polymérisation se poursuit dans les particules jusqu'à épuisement du monomère. Le nombre de particules étant constant et la quantité de monomère dans le milieu diminuant, la vitesse de croissance diminue. On peut cependant observer dans certains cas une augmentation brutale de la vitesse en raison de l'effet de gel causé par l'augmentation de la viscosité interne des particules qui entraîne un fort ralentissement de la terminaison des macroradicaux. Cette étape s'étale de 40 à 100% de conversion, la limite inférieure dépendant fortement de la solubilité du monomère dans son polymère [Pichot, 2006].

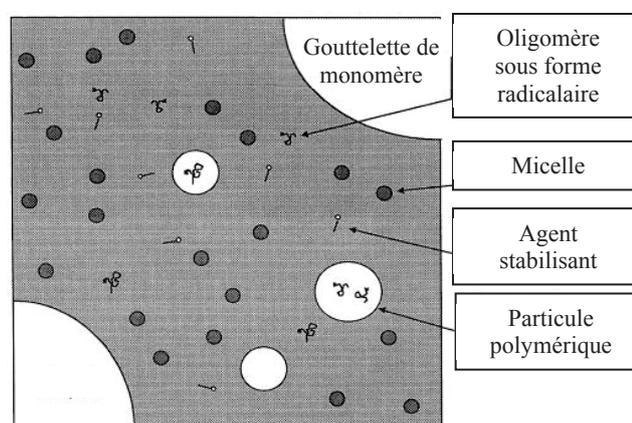


Figure II.1 : Représentation du procédé de polymérisation en émulsion (étape 1 et 2) [Gao, 2002].

Les paramètres de fabrication influençant les caractéristiques des nanoparticules sont principalement :

- La concentration en amorceur ;
- La température du milieu réactionnel ;
- La force ionique du milieu ;
- La présence d'un co-monomère hydrophile ;
- La présence d'un agent de surface.

Les systèmes classiques de polymérisation en émulsion utilisent des quantités variables d'agents de surface. La présence de ces molécules dans le système réactionnel permet principalement la réduction des tailles de particules [Zhang, 2004].

II. Matériels & Méthodes

II.1. L'analyse de taille de particule par diffusion quasi élastique de la lumière

Pour déterminer la taille d'objets nanométriques, deux outils ont été exploités durant les travaux de recherche : la mesure par diffusion quasi élastique de la lumière (DQEL) et la microscopie électronique.

La DQEL (appelée DLS pour Dynamic Light Scattering) mesure le diamètre moyen des particules en suspensions colloïdales grâce à un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, France). La DLS consiste à mesurer (et à analyser) les fluctuations d'intensité laser au cours du temps d'une solution colloïdale. Un coefficient de diffusion D est alors déterminé. Cette valeur mesurée est relié au rayon hydrodynamique R_h des particules par la relation de Stokes Einstein :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Equation II.1}$$

avec :

- D coefficient de diffusion ;
- R_h rayon hydrodynamique ;
- k_b constante de Boltzmann ;
- T Température ;
- η viscosité du milieu.

L'indice de polydispersité (PdI) est une donnée calculée par le logiciel Malvern qui donne une indication sur l'étalement de la distribution des tailles. Le PdI est défini comme le rapport de l'écart type sur le diamètre moyen. Pour des suspensions colloïdales présentant une taille moyenne de 200 nm, un PdI inférieur à 0,1 traduit une monodispersité de l'échantillon de particules; une suspension ayant un PdI compris entre 0,1 et 0,2 est considérée comme faiblement polydisperse, et les PdI > 0,2 traduisent une polydispersité importante (la mesure pas DLS n'étant pas considérée comme fiable dans ce dernier cas).

Procédure de mesure : Une quantité de suspension concentrée est déposée dans une cuve de mesure et une solution électrolytique de NaCl de concentration $[NaCl]=1mMolaire$ est ajoutée de manière à obtenir une suspension translucide. Les échantillons présentant des

impuretés (agrégats ou objets visibles à l'œil nu) n'ont pas été analysés. L'analyse s'est menée sous température contrôlée (25°C). Le rapport d'analyse final correspond à la moyenne de cinq mesures consécutives présentant des conditions d'analyse valides. Nous avons utilisé les valeurs suivantes : le Z-average correspondant à la taille moyenne mesurée de nanoparticules dans l'échantillon ; le PDI donnant une indication sur la dispersion des tailles de nanoparticules dans l'échantillon.

II.2. Le potentiel zêta de nanoparticules en suspension

Le potentiel zêta de particules en suspension caractérise leur charge de surface. Il ne correspond pas à la charge réelle de la surface de l'objet colloïdal mais à celle qu'il acquiert en solution, d'où l'utilisation impérative des mêmes conditions de mesure, particulièrement le pH et la salinité.

Lorsqu'elles sont en suspension, une double couche ionique se forme de manière individuelle autour des particules en solution par solvatation ; la couche la plus proche de la particule est composée d'ions de charge opposées à celle de la surface de la particule, elle est nommée couche de Stern (ou couche liée). Elle fait partie intégrante de la particule et attire à son tour des ions de charge opposée, qui composent la couche diffuse également appelée couche de Gouy. Lorsque la particule est mise en mouvement (mouvement Brownien ou induit par un champ électrique) il se forme un plan de glissement au niveau de la double couche de solvatation : la couche de Stern et une partie de la couche de Gouy restent liées à la particule et vont la suivre dans son mouvement alors que le reste de la couche diffuse reste immobile ou bouge avec du retard par rapport à la particule. C'est au niveau de ce plan de glissement que le potentiel zêta est mesuré.

Le potentiel zêta des nanoparticules en suspension a été déterminé par vélocimétrie laser Doppler. La suspension a été introduite dans une cuvette permettant le passage d'un champ électrique dans le liquide. En fonction de leur charge, les particules migrent entre les deux électrodes, provoquant une diffusion de la lumière laser proportionnelle à leur vitesse de migration (ou mobilité électrophorétique, UE). L'équation de Henry (Equation II.2) lie la valeur mesurée de la mobilité électrophorétique UE des nanoparticules à leur potentiel zêta.

$$UE = \frac{2 \varepsilon \zeta f(K\alpha)}{3\eta} \quad \text{Equation II.2}$$

- avec :
- UE mobilité électrophorétique ;
 - ε constant diélectrique du milieu de mise en suspension ;
 - ζ potentiel zêta ;
 - K constant de Debye-Hückel ;
 - $f(K\alpha)$ facteur correctif prenant en compte l'épaisseur de la double couche et le diamètre des particules (α) ;
 - η viscosité du milieu.

Le potentiel zêta représente le potentiel électrostatique des particules dans la solution. La valeur du potentiel zêta donne une indication de la stabilité potentielle du système colloïdal [Hunter, 1981]. Plus sa valeur est élevée, meilleure sera la stabilité colloïdale.

Procédure de mesure : L'équipement utilisé a été le même que pour la mesure des tailles de particules (Zetasizer NanoZS). La suspension nanoparticulaire a été diluée dans une solution électrolytique ($[NaCl] = 1 \text{ mM}$, $pH = 6,5 \pm 0,5$) puis introduite dans la cellule de mesure du potentiel zêta à température contrôlée ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Chaque analyse a été répétée cinq fois.

II.3. Outils de microscopie

II.3.a. La microscopie électronique

D'après les travaux de Broglie donnant la correspondance approchée entre la longueur d'onde, la masse et la vitesse associées à une particule, il est possible à l'aide d'un faisceau d'électron suffisamment accéléré, d'obtenir une image d'objets nanométriques avec une résolution inférieure au nanomètre [Doak, 1999]. La microscopie électronique s'est imposée comme un outil de référence pour l'observation d'objets de taille nanométrique, leur morphologie et leur aspect de surface.

i. Microscopie électronique à balayage

Le principe du balayage consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident, comme il l'est représenté dans la Figure II.2.

Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet. Les images sont obtenues à partir de l'émission d'électrons secondaires, ces électrons étant arrachés de la surface de l'échantillon par ionisation. Les électrons et les rayonnements électromagnétiques produits sont utilisés pour former des images ou pour effectuer des analyses physico-chimiques (analyse EDX). L'émission d'électrons rétrodiffusés donne accès à des images topographiques (contraste fonction du relief) ou des images cartographiques (contraste fonction du numéro atomique des atomes).

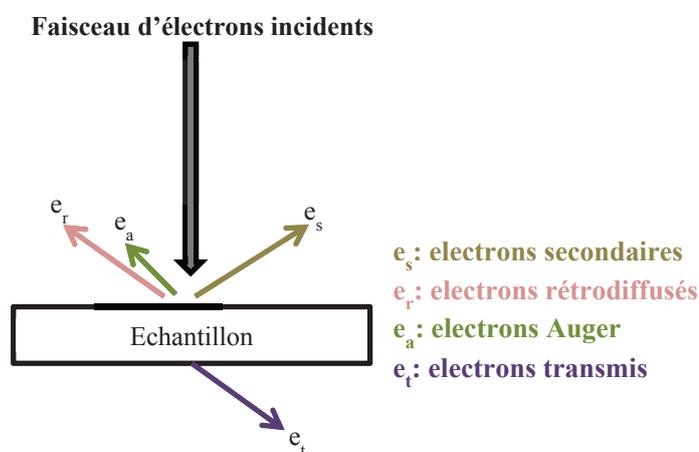


Figure II.2 : Principe de visualisation de la surface des nanoparticules par microscopie électronique à balayage

Un MEB Hitachi S800 FEG a été utilisé tout au long des travaux de thèse pour la visualisation de particules isolées, ainsi que ces particules appliquées sur des supports biologiques (peau et poils canins).

Procédure d'analyse : Une suspension diluée à 0,2mg/ml de particules est déposée sur un plot d'analyse. Ce support est conservé à l'abri de la poussière pendant 24 heures. L'échantillon subit ensuite une étape de métallisation en utilisant un métalliseur équipé d'une cathode or/palladium. Le plot est ensuite placé dans le microscope électronique et une acquisition d'images est réalisée en utilisant 20KeV en tant que tension de travail.

ii. La microscopie électronique à transmission

La microscopie à transmission (MET, TEM en anglais pour Transmission Electronic Microscopy) est basée sur le même principe d'envoi d'un faisceau incident, le détecteur se trouvant sous l'échantillon. Ainsi les électrons transmis permettent la création d'une image structurale des particules observées, la morphologie interne des nanoparticules est observable. Le microscope électronique à transmission est un MET JEM-1200EX (Japan Electron Optics Laboratory).

Procédure d'analyse : Une suspension diluée à 0,2mg/ml de particules est déposée à la surface de grille de cuivre recouverte d'un film de type formvar. Les nanoparticules ont ensuite été séchées à température ambiante puis introduites dans un portoir à l'abri de toute poussière. Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique à transmission Philips CM120, de 0,34 nm de résolution, opérant à 120 kV

II.3.b. La microscopie optique confocale à balayage laser

Les approches expérimentales pour étudier les mécanismes d'interactions de particules avec la peau comprennent des expériences de diffusion [Katahira, 1999 – Egbaria, 1991] des études de visualisation et utilisant la microscopie électronique [Rolland, 1993], la microscopie optique [Niemiec, 1997] et fluoromicrographie [Lasch, 1991 – de Jalon, 2001]. Un inconvénient de ces techniques est que le tissu doit être manipulé pour sa préparation ce qui peut modifier l'organisation lipidique de la peau ou peut donner lieu à une redistribution des nanoparticules.

La microscopie confocale est une méthode d'observation non invasive parfaitement établie pour l'obtention d'images de haute résolution pour les échantillons biologiques tels que la peau. Le principe de la microscopie confocale à balayage est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de très faible profondeur de champs (environ 600 nm) dans l'objet observé. Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par le fluorochrome et lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans. Grâce au diaphragme, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant des autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photo-multiplificateurs. Le signal reçu est ensuite converti en signal numérique contribuant à la création d'une image numérique virtuelle. La profondeur du plan focal est ensuite modifiée finement pour produire la séquence

de section (cf. Figure II.3). Une représentation tridimensionnelle de l'échantillon biologique est obtenue par empilement des coupes bidimensionnelles, se référant à des sections optiques dans des plans focaux (. La microscopie confocale nécessite l'utilisation de marqueurs fluorescents judicieusement choisis. Lors de nos travaux de recherche, nous avons marqué des nanoparticules avec le Polyfluor[®]394 par greffage sur chaîne polymérique de méthacrylate de méthyle. Le fluorochrome utilisé possède une longueur d'onde d'excitation $\lambda=394$ nm. L'utilisation de la microscopie confocale entraîne deux problèmes majeurs, le photoblanchiment et l'auto fluorescence des échantillons biologiques. Par conséquent les longueurs d'onde de travail ainsi que la durée de visualisation sont des paramètres à optimiser [Cullander, 1992]. Une visualisation de la peau non traitée a été réalisée afin de rendre compte de l'éventuelle autofluorescence.

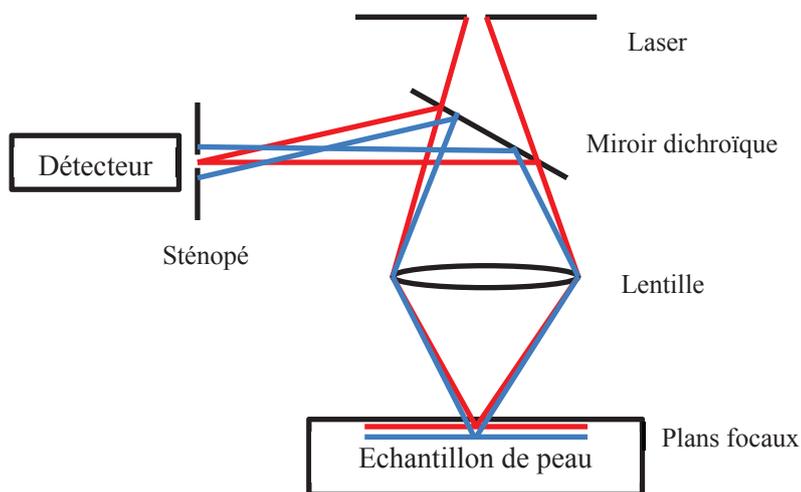


Figure II.3 : Représentation du principe de la microscopie confocale

Le microscope utilisé est un microscope confocal spectral Leica TCS-SP2 utilisant un objectif x20 et une ouverture de 0,70, de type HLX PL APO en interface air. La distance de travail est de 0,59 mm. La source d'excitation laser est une diode Laser Dichroïque de 405 nm. Les images de « coupes optiques » obtenues par le microscope confocal peuvent être transférées vers une station de travail pour une reconstruction d'objets en 3 dimensions par le logiciel AMIRA.

Procédure d'analyse : Des images en 2D à différentes profondeurs ont été acquises à partir de peaux traitées. Ces analyses ont été réalisées au Centre Commun de Quantimétrie (CCQ,

Lyon, France). La procédure d'observation est décrite en détail dans la partie V de ce Chapitre).

II.3.c. Microscopie plein champs

Le microscope utilisé est un Leica DM-RXA couplé à une caméra Sony couleur tri-CCD avec une résolution de 752x582 pixels en 8 bits. Le cube fluo est un filtre A dont le domaine d'excitation est l'UV. Le filtre à bande passante d'excitation travaille de 340 à 380 nm (miroir dichroïque : 400 nm ; Filtre d'arrêt à bande large : 425 nm).

II.4. Etude électrocinétique sur poil canins

La mesure du potentiel d'écoulement constitue une méthode intéressante pour la détermination du potentiel zêta de solides [Sbaï, 2004 – Szimczik, 2002 - Ribitsch, 1988 – Jacobasch, 1985]. Les mesures effectuées de façon transversale présentent l'avantage de renseigner sur l'état de charge des surfaces solides. Le potentiel d'écoulement peut ainsi être utilisé pour caractériser la surface des fibres et étudier l'influence des phénomènes d'adsorption de particules sur les propriétés de surface des fibres pileuses au cours de la mise en contact des fibres avec des nanoparticules dispersées.

La notion de potentiel d'écoulement est à introduire pour comprendre le mode d'analyse de charge de surface utilisé durant nos travaux expérimentaux. Considérons une fibre pileuse, naturellement chargée négativement. La double couche électrique à l'interface solide-liquide renferme un excès de charges positives. L'application d'un gradient de pression au travers de l'échantillon de travail va déplacer les charges présentes dans la partie diffuse de la double couche électrique, créant ainsi un courant d'écoulement (I_s). La différence de potentiel électrique résultant du déséquilibre de charges génère un courant de conduction (I_c) opposé au flux convectif des charges. Un état stationnaire traduit par l'égalité des courants électriques et de conduction est très vite atteint ($I = I_s + I_c = 0$). La différence de potentiel mesurable en entrée et en sortie de la cellule de mesure représente le potentiel d'écoulement. Le potentiel zêta est calculé selon l'équation de Smoluchowski classique, qui lie le potentiel d'écoulement mesuré au potentiel zêta [Smolushowski, 1921].

$$\zeta = \frac{dU}{dp} \frac{\eta}{\varepsilon_r \times \varepsilon_0} K \quad \text{Equation II.3}$$

- avec :
- ζ potentiel zêta (mV) ;
 - U potentiel d'écoulement (mV/bar) ;
 - dp différence de pression à travers l'échantillon ;
 - ε_r constante diélectrique relative ;
 - ε_0 permittivité du vide ;
 - η viscosité ;
 - K conductivité du milieu.

Un zétamètres Surpass (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) a été utilisé pour la détermination du potentiel zêta de poils canins. La cellule de mesure utilisée est de type cylindrique. Cette cellule de mesure est un tube en verre permettant l'entrée et la sortie de la solution électrolytique comme présenté en Figure II.4.

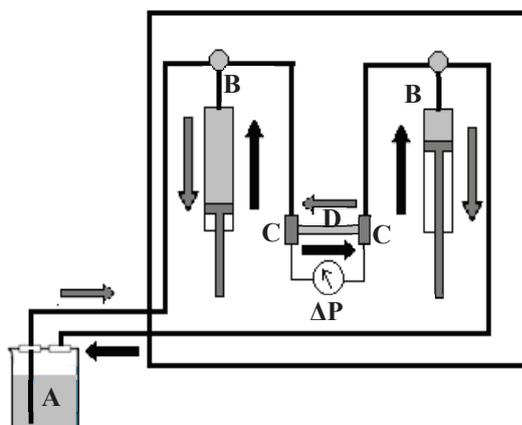


Figure II.4 : Représentation de l'équipement d'analyse du potentiel d'écoulement. A: solution électrolytique [NaCl]= 1 mmol/L, pH=6,5; B: Pistons pour mener le flux de solution électrolytique; C: électrode d'Ag/AgCl; D: cellule cylindrique contenant les poils canins.

Le potentiel d'écoulement mesuré sur des poils de Beagles a été obtenu sur des échantillons bruts (0,800g ±0,050g). Un échantillon de poils a été formé entre les deux électrodes perforées d'Ag/AgCl dans la cellule cylindrique. L'échantillon a été convenablement rincé avec la solution d'électrolyte et d'éventuelles bulles d'air ont été éliminées avant la première

mesure. Toutes les mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales : l'échantillon a été équilibré dans une solution d'électrolyte de support ($[\text{NaCl}] = 1 \text{ mmol/L}$), à $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

La caractérisation des poils bruts et l'étude du potentiel zêta en fonction du temps ont été réalisées dans les conditions standards (solution d'électrolyte $[\text{NaCl}] = 1 \text{ mmol/L}$ NaCl ; $\text{pH} = 6,5$; $T = 23 \pm 2^\circ\text{C}$). L'effet du pH de la solution électrolytique sur les poils canins a été étudié en variant les valeurs de pH, de $\text{pH} = 4$ à $\text{pH} = 10$. Les changements de pH ont été obtenus par addition de $0,1 \text{ mol/L}$ de HCl ou $0,1 \text{ mol/L}$ de NaOH.

II.5. Méthode de fabrication des latex

Le MéthAcrylate de Méthyle (MMA ; CAS : 80-62-6) est le monomère utilisé durant nos travaux de recherche. Il a été préalablement purifié par distillation avant son utilisation dans le but d'éliminer tout excipient de conservation. Le (1-Purene) méthacrylate de méthyle (Polyfluor[®]394 ; CAS : 86112-79-0) est le co-monomère fluorescent utilisé dans nos travaux permettant la détection des particules lors des observations par microscopie à fluorescence. Ce marquage permet la détection des particules finales à $\lambda = 394 \text{ nm}$. Le 2,2'-azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride (V50 ; CAS : 2997-92-4) est l'amorceur de la réaction de polymérisation. Les structures chimiques de ces composés sont représentées dans la Figure II.5. Le V50 confère une charge de surface positive de la particule finale. La phase continue est composée d'eau déionisée (Résistivité $R = 18 \text{ m}\Omega$). Un agent de surface a été utilisé pour l'obtention de tailles inférieures à 100 nm .

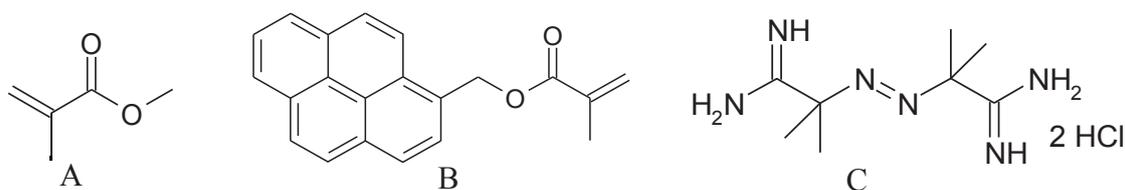


Figure II.5 : Structure chimique du MMA (A), du Polyfluor[®]394 (B) et du V50 (C).

Le V50 a permis de fonctionnaliser de façon ionique la surface des nanoparticules. La procédure de fabrication a été suivie de la même manière pour tous les lots de latex.

La phase organique (composée de MMA et de Polyfluor[®]394) a été ajoutée à la phase aqueuse, l'amorceur réactionnel a été enfin ajouté au milieu réactionnel. Le flacon réactionnel a ensuite été placé dans un bain d'eau chaude ($70 \text{ }^\circ\text{C}$) en agitation continue. Le système d'agitation est un dispositif développé par Jean Pierre Valour (Ingénierie de recherche

LAGEP) permettant une agitation rotationnelle équivalente pour tous les flacons, ceci permettant de standardiser les paramètres de procédé pour une série de fabrication (temps, température). Le temps de réaction a été fixé à 6 heures (temps réactionnel fixé par une étude préliminaire). Enfin, chaque préparation est filtrée sur fibre de verre dans le but d'éliminer les éventuels agrégats. Une variation des paramètres mesurés inférieure à 5% a été observée sur 3 lots de fabrication, garantissant une bonne répétabilité.

Les latex ont été caractérisés par la mesure de la taille moyenne des particules et de la distribution de taille (Z-average et PDI) par méthode de diffusion quasiélastique de la lumière. L'amplitude de la répulsion électrostatique a été traduite par la mesure du potentiel zêta. L'aspect de surface a été observé par microscopie électronique à balayage.

Le taux de solide [Ouzineb, 2005 – Zhang, 2007] a été déterminé par mesure du poids de la partie sèche de l'échantillon grâce à une balance thermique juste après fabrication. Le taux de conversion, correspondant au rendement réactionnel, a ainsi pu être calculé pour les suspensions obtenues avant filtration.

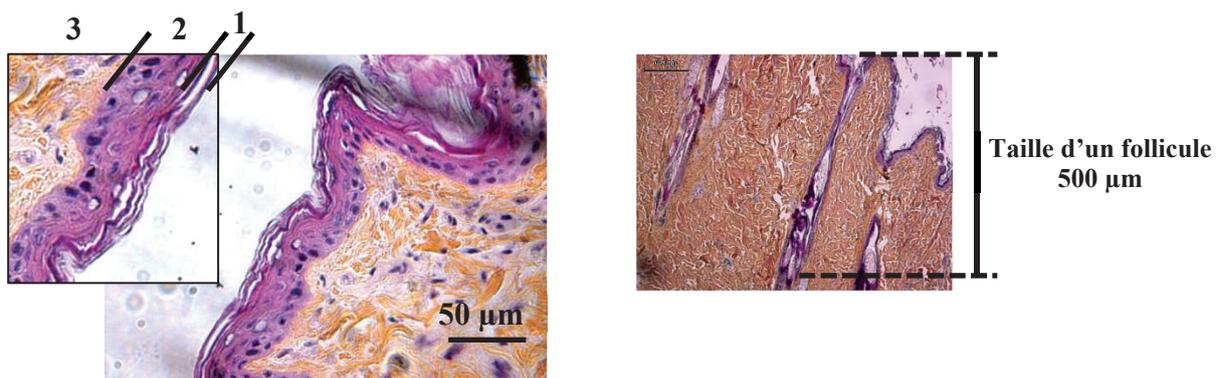
Les suspensions ont ensuite été purifiées par lavage en effectuant trois cycles consécutifs d'ultracentrifugation. Pour ce faire, les latex ont été dilués dans l'eau déionisée et ont été soumis à un cycle d'ultracentrifugation à 35000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot a été à nouveau dilué dans de l'eau déionisée propre. Cette étape a été répétée 3 fois. La fluorescence des nanoparticules a été vérifiée par microscopie.

Afin de moduler le diamètre des particules, nous avons réalisé diverses synthèses en modifiant le pourcentage en MMA, en Polyfluor[®] 394 et en incluant un agent stabilisant.

III. Caractérisation des supports biologiques

III.1. La peau

La peau est composée d'une couche superficielle de cellules mortes (la couche cornée, feuillets externes visibles en Figure II.6) qui recouvre une couche fine d'épiderme viable, puis le derme (de coloration jaune sur les images histologiques). La couche cornée est composée de cornéocytes et d'espaces intercellulaires. Dans le cas de la peau canine, les follicules pilosébacés sont extrêmement denses, ce qui en fait un espace de stockage privilégié. La préparation des fragments de peau avant leur visualisation a été réalisée au Laboratoire des Substituts Cutanés (CHU Lyon, France), avec la collaboration de Marie Rose Rovère et Odile Damour. Les observations de la peau canine ont été réalisées après marquage des tissus par HPS (Hématoxyline Phloxine Safran). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu, le derme apparaît en jaune orangé et la couche épidermique (épiderme viable et couche cornée) est colorée en rose.



Les images témoin, obtenues en microscopie confocale de peau non traité sont présentées en Figure II.7. La peau apparaît comme étant un système complexe de plis, de crêtes, de vallées et de plateaux. Lors d'une excitation à 394 nm, une faible autofluorescence (notamment due aux porphyrines endogènes) été observée.

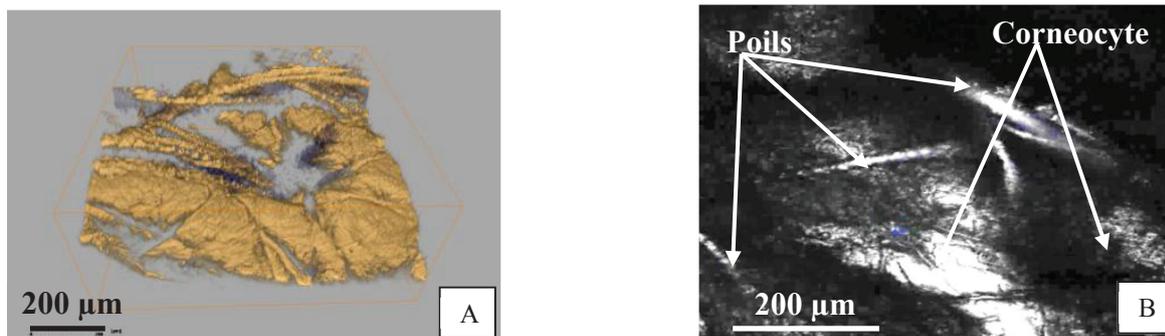


Figure II.7 : Image de microscopie confocale de peau canine après reconstruction 3D (A) et à une profondeur de 100µm (B).

Les sacs folliculaires sont trouvés à des profondeurs différentes, à partir de 30 µm jusqu'à 500 µm. De légères zones bleutées sont observables sur les images acquises par microscopie confocale, ces zones correspondent à l'autofluorescence de la peau pour la longueur d'onde de travail (394 nm) ; elles restent cependant d'intensité négligeable par rapport à l'intensité de fluorescence du chromophore utilisé.

La peau a été observée par microscopie électronique à balayage, une photographie de la surface est présentée en Figure II.8.

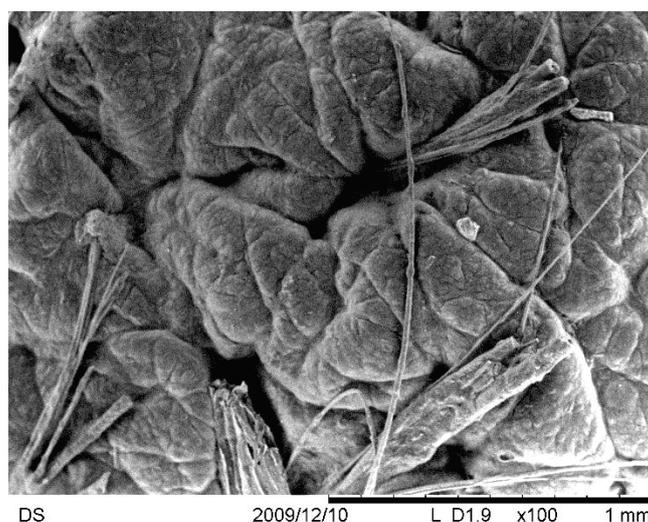


Figure II.8 : Observation par MEB de la surface de peau canine.

Ces observations confirment l'aspect irrégulier de la peau, et montrent que plusieurs fibres pileuses sortent d'un même follicule pileux. La taille de l'ouverture folliculaire a été estimée à 200 µm.

III.2. Les fibres pileuses

Le potentiel zêta de la surface des poils a été étudié, en tant que propriété d'interface entre un solide et le liquide environnant. Les poils présentent une charge de surface négative, mesurée sur un analyseur de potentiel zêta de surface solide (Zetamètre, Anton Paar). Les poils canins bruts ont été prélevés sur Beagles (Merial SAS, site de Saint Vulbas, France) et ont été utilisés sans lavages supplémentaires afin de conserver l'intégrité des caractéristiques du poil natif.

L'analyse du potentiel zêta réalisé sur 4 échantillons de poils canins a abouti à une mesure moyenne du potentiel zêta de $-30 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$ ($\text{pH} = 6,5$; $[\text{NaCl}] = 1 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Le potentiel zêta négatif des poils canins est principalement causé par la kératine, un composant de nature protéique présent sur toute fibre pileuse. La kératine est composée d'acides aminés, en particulier la cystine qui permet la formation de pont disulfure, jouant un rôle dans la cohésion des fibres capillaires. La Figure II.9 représente les fibres pileuses incluses dans les follicules pilosébacés, exhibant une charge négative sur leur surface.

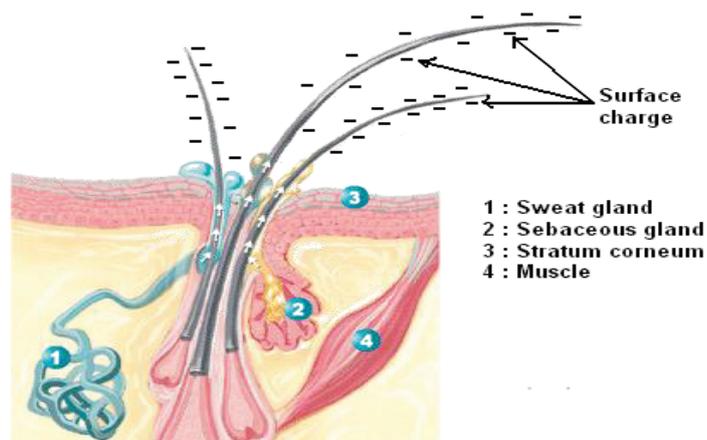


Figure II.9 : Représentation de la structure de la peau et de ses annexes avec les poils en surface présentant un potentiel zêta de surface négatif.

III.2.a. Phénomène de gonflement des fibres

Comme rapporté par Jacobasch [Jacobasch, 1984], le comportement de gonflement dans l'eau de fibres naturelles (dans notre cas les poils) détermine les propriétés électrocinétiques pour une phase liquide donnée. D'autre part, Kanamaru [Kanamaru, 1960] a rapporté que le potentiel zêta de n'importe quelle fibre décroît avec l'augmentation de la quantité d'eau absorbée. Il est important de noter que le potentiel zêta initial (ζ_0) est une valeur approximative. En effet, cette valeur est difficile à déterminer expérimentalement car la mesure du potentiel d'écoulement requiert une opération de rinçage avant la première mesure.

Il est supposé que le processus de gonflement élargi la surface intérieure des fibres. La variation du potentiel zêta peut être expliquée par l'adsorption d'eau qui provoque un décalage du plan de cisaillement de la double couche électrochimique. En raison de l'adsorption de molécules d'eau, le potentiel zêta décroît au cours du processus de gonflement et de ce fait, la valeur absolue du potentiel zêta est amplifiée.

Un quotient du potentiel zêta ζ_q a été calculé afin de juger la capacité à adsorber l'eau des poils canins, suivant l'Equation II.6.

$$\zeta_q = \left| \frac{(\zeta_0 - \zeta_\infty)}{\zeta_0} \right| \quad \text{Equation II.6}$$

Dans notre cas d'étude, $\zeta_q = 0,55$. Cette faible valeur traduit une faible capacité d'adsorption d'eau par les fibres étudiées [Bismarck, 2000].

Il a été reporté que la présence de partie cristalline le long d'une fibre naturelle conditionnent une faible quantité d'eau absorbée [EKA application note]. Les fibres pileuses sont constituées de kératine (macromolécule de nature protéique). La tige pileuse est un système à 2 phases : une phase cristalline et une phase amorphe. Les parties cristallines ne permettent pas l'inclusion de molécules d'eau dans un réseau hautement organisé, alors que les parties amorphes laissent un espace d'inclusion plus lâche, et par conséquent une zone d'inclusion de molécules d'eau plus grande. Dans le cas de fibres pileuses, la présence de phases cristalline empêche l'absorption de molécules d'eau et par conséquent une faible variation du potentiel zêta. La faible absorption d'eau est réalisée par interaction hydrophile dans ces parties amorphes.

III.2.b. Influence du pH

La dépendance au pH des poils canins a été étudiée dans les mêmes conditions expérimentales de pH = 4 à pH = 10. Les changements de pH ont été obtenus par addition de 0,1 mol/L de HCl ou 0,1 mol/L de NaOH à l'aide d'une unité de titration intégrée (cf. Figure II.11).

Les mesures ont débuté après 10 minutes de contact fibre/solution d'électrolyte standard afin de garantir que les variations observées sont dues à la variation de pH et non au phénomène de gonflement des fibres.

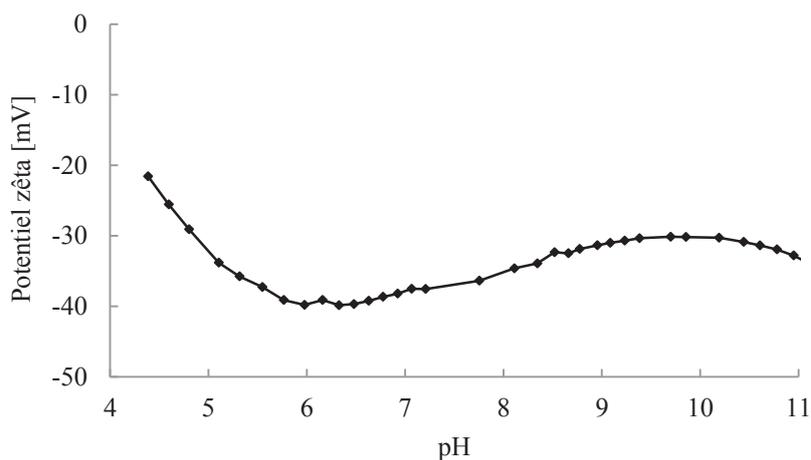


Figure II.11: Effet du pH sur le potentiel zêta du poil canin.

La quantité d'ions adsorbés sur la surface de la fibre révèle des différences de charges de surface faibles en fonction du pH. Le potentiel zêta évolue en fonction du pH avec une valeur $\zeta = -20$ mV pour un pH = 4 et $\zeta = -30$ mV en valeur minimale observée, pour un pH = 6,5. Le potentiel zêta minimal est influencé par la composition chimique des fibres et leur disponibilité pour l'interface fibre/électrolyte qui dépend de sa structure supramoléculaire. La valeur minimale du potentiel zêta est due à l'adsorption d'ions en compétition avec l'adsorption d'eau. Quelques anions peuvent être adsorbés sur les parties de surface hydrophiles et par conséquent une diminution du potentiel zêta est observée avec l'augmentation du pH [Kuehn, 1986]. Au-delà d'un pH = 6,5, les ions hydroxyle deviennent prédominants dans la solution électrolytique, leur effet sur les caractéristiques de surface est faible, ce qui se traduit par une faible modification du potentiel zêta de surface avec l'augmentation du pH.

IV. Synthèse de particules modèles, les latex

Un challenge de nos travaux de recherche a été la synthèse de particules modèles possédant des caractéristiques spécifiques :

- Les particules de latex doivent présenter une charge de surface positive afin d'envisager des interactions de surface forte entre les fibres pileuses et les particules ;
- Différentes tailles de particules doivent être obtenues (de 100 nm à 600 nm) afin de déterminer la taille de particule la plus appropriée pour un stockage dans les follicules pileux, afin de les protéger des éliminations rapides par simple frictions en surface de la peau ;
- Seule la taille des objets colloïdaux doit être comparée, c'est pour cela que la présence d'agents stabilisants n'est pas désirée, afin de ne pas biaiser les observations.

IV.1. Concentration en amorceur et en monomère

Les diamètres moyens des nanoparticules synthétisées sont présentés dans les Figures II.12 et II.13, pour des suspensions colloïdales de distribution de taille monomodale se différenciant par leur concentration en amorceur de polymérisation (V50, Figure II.12) et en monomère (MMA, Figure II.13) [Song, 2006 – Feng, 2009].

Ottewill *et al.* [Goodwin, 1979] ont montré qu'il était possible d'obtenir des particules de taille variable avec une distribution de taille resserrée en contrôlant les paramètres expérimentaux suivants : la température de polymérisation, la concentration en monomère et en amorceur de polymérisation, et la force ionique. L'influence de ces paramètres a été résumée dans une relation empirique, cette équation a été établie dans le cas de la polymérisation du styrène utilisant le V50. et en l'absence d'agents stabilisants.

$$\log D_{nm} = 0,384 \log \frac{I M^{1,099}}{A^{0,833}} + \frac{2563}{T} - 0,195 \quad \text{Equation II.7}$$

- avec
- D_{nm} Diamètre final ;
 - $[M]$ concentration en monomère ;
 - $[A]$ concentration en amorceur ;
 - I force ionique.

Pour l'étude de la concentration en amorceur de polymérisation, les quantités de MMA et de phase aqueuse ont été fixées à 2,5g et 50g respectivement, la quantité d'amorceur a été

étudiée depuis une valeur minimale de 0,5 [%MMA] à 5 [%MMA]. Tous les pourcentages mentionnés sont des pourcentages massiques.

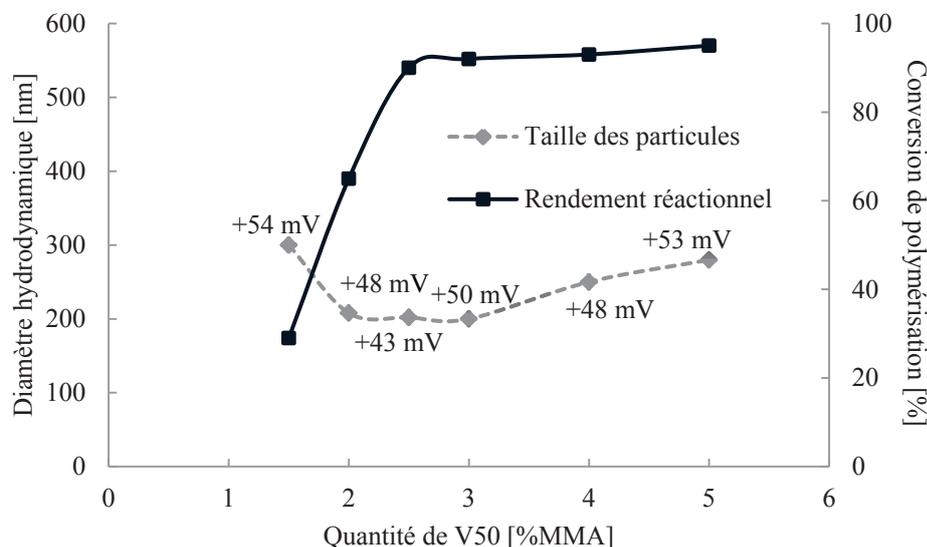


Figure II.12 : Evolution de la taille de particule (◆), de leur potentiel zêta (valeur numérique) et du taux de conversion (■) en fonction du pourcentage en amorceur de réaction, après 6 heures de réaction. Le diamètre hydrodynamique a été obtenu par DLS (confirmés par les observations MEB).

Une conversion de polymérisation de 95% \pm 3% a été obtenue en utilisant 2,5% d'amorceur par rapport au MMA. Les résultats expérimentaux sont explicables par le fait que l'amorceur produit deux effets opposés dans l'évolution des tailles de particules obtenues par polymérisation en émulsion :

- La concentration en V50 augmente le nombre de groupements cationiques conduisant à une stabilisation colloïdale précoce des particules primaires, et ainsi une diminution de la taille finale des particules de latex ;
- L'augmentation de la concentration en V50 induit une augmentation de la force ionique du milieu, conduisant ainsi à un phénomène d'agrégation des particules primaires, ce qui conduit une augmentation de taille.

Il semblerait que ce deuxième phénomène prédomine dans nos conditions expérimentales, conduisant à une augmentation de taille des particules proportionnelle à la quantité de V50 (passage de 202 nm à 280 nm pour 2,5 [%MMA] et 5 [%MMA] respectivement).

Dans le cas d'une quantité inférieure à 2,5 [%MMA] en V50, il semblerait que la quantité d'agents inhibiteurs soit prédominante par rapport à la quantité nécessaire de V50 permettant

la consommation de tout le monomère (présence d'oxygène dans l'eau, durée de demi-vie du V50 trop courte à 70°C...). Les chaînes d'oligoradicaux en formation interagissent pour former des particules immatures par diffusion du monomère. Si des agents inhibiteurs entrent dans le schéma réactionnel, la totalité du monomère n'a pas la possibilité d'interagir avec la particule en croissance. C'est pour cela qu'un rendement réactionnel faible peut être obtenu. Dans nos conditions de synthèse, 2,5 % de V50 par rapport au MMA aboutissent à une dispersion colloïdale présentant une distribution de taille resserrée avec une taille moyenne de 200 nm.

La variation de la concentration en monomère a été étudiée avec la concentration en amorceur déterminée dans la série expérimentale précédente. La taille des particules augmente proportionnellement avec la concentration en monomère comme il l'est présenté dans la Figure II.13. Les suspensions obtenues présentent une distribution de taille resserrée et monomodale.

Le potentiel zêta ne se trouve pas modifié par l'augmentation de la quantité de MMA dans le milieu réactionnel. Ceci est dû à une quantité d'amorceur constante par rapport à la quantité de monomère.

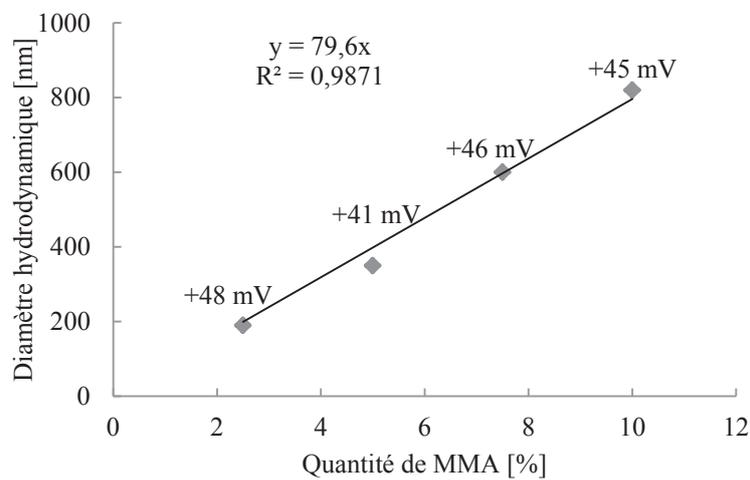


Figure II.13 : Evolution de la taille de particules et de leur potentiel zêta (valeur numérique) en fonction du pourcentage en monomère (MMA) dans le milieu réactionnel, après 6 heures de réaction. Le diamètre hydrodynamique a été obtenu par DLS, confirmé par les observations MEB.

L'équation empirique établie par Ottewill *et al.* (Equation II.7) permet d'expliquer la corrélation directe et linéaire entre la taille des particules et la quantité de monomère utilisé.

Pour un rapport constant monomère/amorceur, la force ionique du milieu réactionnel (I) augmente avec l'accroissement de ce rapport. Par conséquent la taille (exprimée par $\log D_{nm}$) augmente de façon linéaire.

Des fabrications de latex avec 1% et 0,5% MMA n'ont pas donné accès à des tailles plus petites. La synthèse de nanoparticules par polymérisation en émulsion sans agents stabilisants a conduit à l'obtention de dispersions colloïdale avec une limite inférieure de tailles de particules de 200 nm.

IV.2. Ajout d'un marqueur fluorescent

Dans le but d'étudier la pénétration cutanée des particules, un co-monomère (Polyfluor[®]394) a été utilisé dans la formulation en tant que co-monomère permettant le marquage des particules finales. Le pourcentage en Polyfluor[®]394 a été calculé en fonction de la quantité en monomère principal, il a été testé de 0 à 4 [%MMA] avec le milieu réactionnel donnant accès à une taille de nanoparticule dans la gamme des 200nm (2,5[%MMA] V50 ; 2,5%MMA ; 97,44%eau déionisée).

Tableau II.1 : Caractérisation physique (taille et potentiel zêta) des latex synthétisés par copolymérisation du MMA et du Polyfluor[®]394. Etude du pourcentage en marqueur fluorescent.

Polyfluor [®] 394 [%MMA]	Taille de particules [nm]	Potentiel zêta [mV]
0	193	+49
1	200	+41
2	195	+45
3	194	+48
4	192	+43

Des variations non significatives ont été observées sur la taille des particules et leur potentiel zêta (Tableau II.I) en fonction de la quantité de co-monomère intégrée. Nous avons choisi de travailler avec un pourcentage en co-monomère fluorescent de 1[%MMA]. Dans le but de prouver l'inclusion du monomère fluorescent dans les chaînes polymériques, et ainsi garantir la fluorescence des nanoparticules, des observations en spectromicroscopie ont été réalisées. Les images obtenues en microscopie par contraste interférentiel (Nomarski) ont été obtenues sans et avec un filtre permettant de confirmer le marquage homogène des particules (cf. Figure II.14).

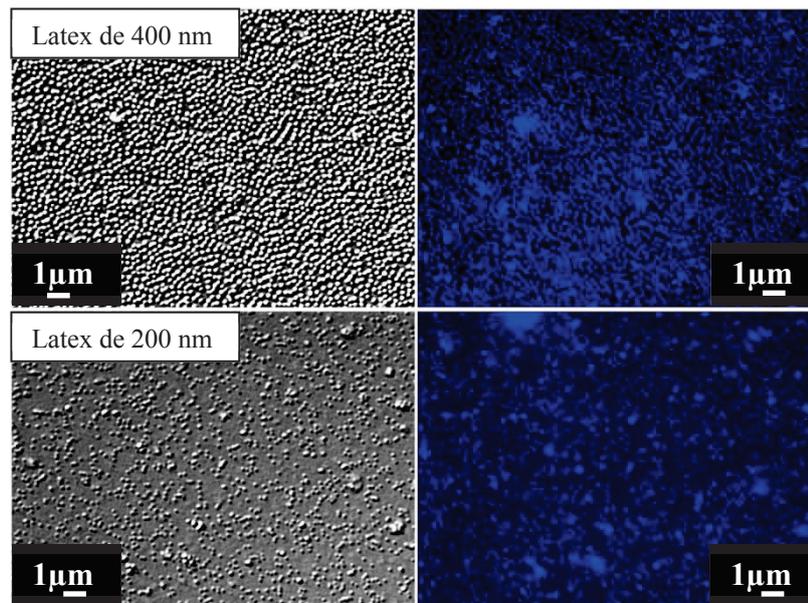


Figure II.14 : Images obtenues par spectromicroscopie des latex avec à droite les images de la fluorescence.

IV.3. Réduction des tailles par ajout d'un agent stabilisant

Dans le but d'avoir une gamme de taille la plus large que possible permettant une étude de pénétration cutanée complète, nous avons synthétisé des nanoparticules par polymérisation en émulsion avec un agent stabilisant pour l'obtention d'un lot de particules de 100 nm.

Le polyalcool vinylique (PVA, Mowiol[®] 4-88 ; CAS : 9002-89-5) a été utilisé en tant qu'agent stabilisant non chargé, permettant de ne pas perturber la charge apportée par l'amorceur de polymérisation [Sood, 2010]. Le pourcentage en PVA a été étudié, les résultats d'analyse physico-chimique (taille et potentiel zêta) sont présentés en Figure II.15.

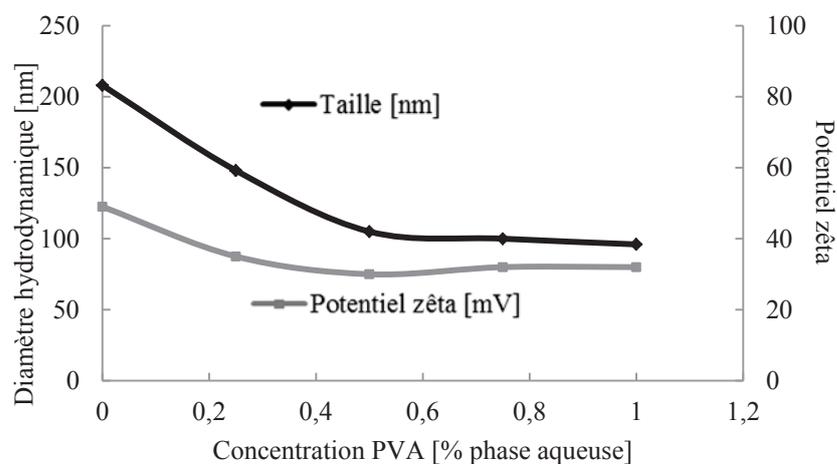


Figure II.15 : Etude de la taille des particules et leur potentiel zêta en fonction du pourcentage en PVA dans la phase aqueuse.

Les résultats obtenus ont montré une décroissance de la taille des particules avec l'ajout du PVA. Son utilisation permet de renforcer la stabilité colloïdale des particules primaires lors de l'étape de nucléation. L'augmentation de la quantité de PVA dans le milieu réactionnel de polymérisation a conduit à une diminution de la taille, avec un passage de 200 nm à 100 nm.

Le PVA n'a pas d'effet drastique sur le potentiel zêta mesuré à $\text{pH} = 6,5$. Ceci est probablement dû à une stabilité par déplétion induite par le PVA. Ce dernier ne serait pas adsorbé en surface de la particule et par conséquent les charges de surface (induites par le V50) ne s'en trouveraient pas modifiées.

Nous avons choisi de travailler à un pourcentage minimal en PVA (0,25%) permettant l'obtention d'une dispersion colloïdale monomodale avec une taille de particules de 100 nm.

IV.5. Fabrication des suspensions de nanoparticules modèles finales

Le Tableau II.2 rassemble les données expérimentales nécessaires pour la fabrication des suspensions nanoparticulaires utilisées pour les expérimentations de pénétration cutanée. Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées en termes de taille, de dispersion de taille et de potentiel zêta.

Tableau II.2 : Composition et caractérisation physique des lots de latex optimisés. Concentration en V50 fixé à 2,5 [%massique MMA] ; Concentration en Polyfluor[®]394 fixée à [1%massique MMA].

		Exp A	Exp B	Exp C	Exp D
MMA	[%]	2,5	2,5	5	8
Présence de PVA		Oui	Non	Non	Non
Taille de particules par DLS	[nm]	97	183	NV	NV
PdI	SU	0,019	0,009	-	-
Potentiel zêta	[mV]	+18	+50	+47	+45
Taille de particules par MEB	[nm]	100	200	400	600

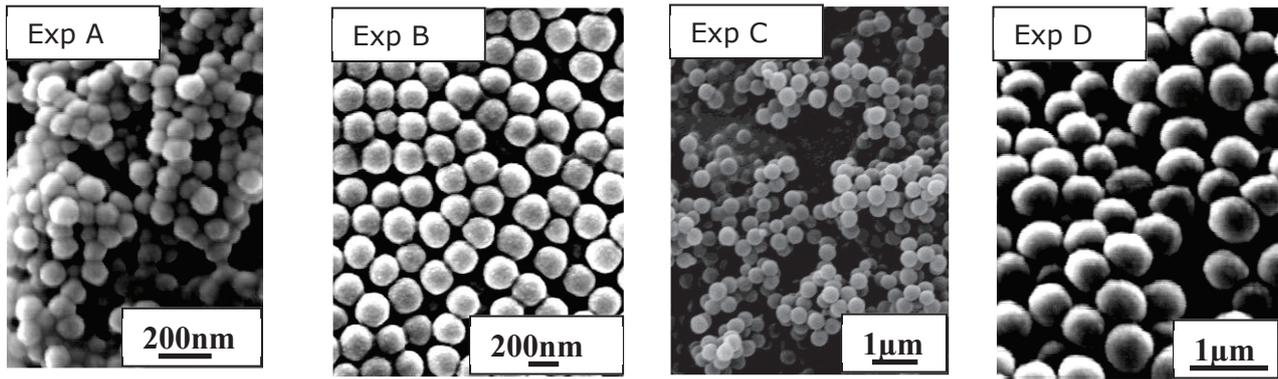


Figure II.16 : Images obtenues par MEB des 4 lots de particules de latex finaux.

La synthèse de nanoparticules modèles fluorescentes de taille et de potentiel zêta contrôlés a été menée avec succès par le procédé de polymérisation en émulsion en une étape réactionnelle. Des suspensions monodisperses sans tensioactif adsorbé sur leur surface ont été obtenues dans le cas de particules de taille supérieure à 100 nm (Exp B, C et D) [Eshuis, 1991 – Sood, 2004]. Une suspension nanoparticulaire monomodale présentant une taille de 100 nm a été obtenue avec l'ajout de PVA en tant qu'agent stabilisant.

V. Visualisation de la distribution des particules dans la peau canine

La pénétration des nanoparticules dans la peau et dans ses appendices a été reportée dans la littérature, ces interactions sont dépendantes du type de vecteurs étudiés, et dans le cas des nanoparticules, cette pénétration dans la peau est fonction de la taille des particules [Alvarez Roman, 2004 – Kohli, 2004]. Une question cruciale pour l'étude des transporteurs nanoparticulaires est le site de stockage des nanoparticules : sont-elles déposées en surface de la peau, ou bien pénètrent elles en profondeur dans les couches de la peau et/ou dans ses appendices soutenant ainsi la protection contre l'élimination rapide ?

Les échantillons de peau canine utilisés dans cette étude proviennent de l'animalerie Merial (Saint Vulbas, France). La peau a été prélevée sur deux Beagles ne présentant aucun signe clinique antérieur et destinés à l'euthanasie. La peau a été tondue et un prélèvement de la partie dorsale a été réalisé à l'aide de scalpels. Les tissus adipeux ont été éliminés et la peau a été rincée à l'eau déionisée. Des cercles ont été coupés puis stockés à -18°C jusqu'à utilisation. Les répartitions dans/sur la peau des nanoparticules cationiques de 100, 200, 400 et 600 nm ont été étudiées.

Les particules obtenues ont été lavées par trois cycles de centrifugation consécutifs (20000 rpm, 20 minutes). Le MMA résiduel ainsi que le PVA résiduel dans le cas des particules de 100 nm ont ainsi pu être éliminés. La concentration en nanoparticules a été standardisée par dilution de la suspension grâce à la mesure du taux de solide des suspensions ($[\text{NP}] = 5,2 \text{ mg/ml} \pm 0,9$).

Des échantillons de peau dorsale ont été placés sur un support humidifié par une solution de tampon phosphate (pH 7,4). Cette expérience *in vitro* de perméation sur peau canine nécessite une manipulation minutieuse des tissus pour garantir des résultats reproductibles. Chaque expérience a été menée en double. Au temps t_0 , trois gouttes de suspension de taux de solide prédéfinis (Tableau II.3) ont été déposées à la surface en évitant toute friction ou contact prolongé. Après une période d'application fixe, l'excès de formulation a été éliminé de la surface de la peau avant un séchage délicat avec un papier filtre. La peau a été déposée sur une lame de microscope, surface de la peau au-dessus, et examiné au microscope, sans traitement des tissus supplémentaires. L'analyse par microscopie confocale a été effectuée juste après le dépôt des latex (t_0) et après un temps infini (24 heures de contact) à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Nous présentons dans ce manuscrit les images obtenues après 24 heures de contact.

Les images suivantes donnent des informations quant à la répartition des nanoparticules de latex appliqués sur la peau. Les zones bleues traduisent la présence des nanoparticules

marquées. La comparaison d'images obtenues par microscopie confocale et par spectromicroscopie prises en mode réflexion et en mode fluorescence permet la localisation de zones de stockage des latex.

Les particules de 100 nm de diamètre présentent une distribution diffuse intercellulaire, comme présenté en Figure II.17.

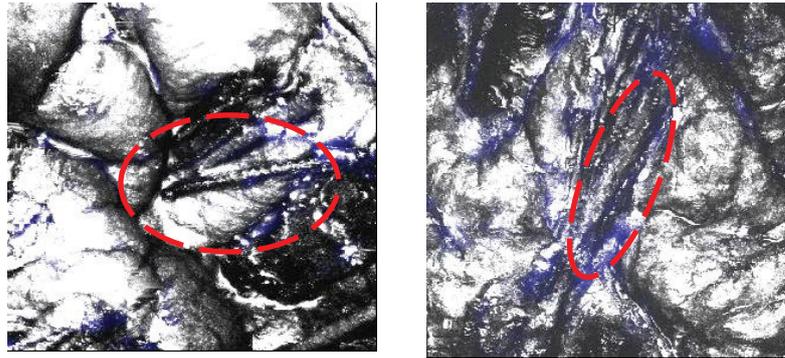


Figure II.17 : Images superposées obtenues par microscopie confocale à partir de peau canine traitées avec des nanoparticules cationiques de 100 nm. Les cercles rouges localisent les follicules pileux.

Les nanoparticules ont été détectées principalement autour des cornéocytes dans les espaces intercellulaires, et en quantité très faible dans les follicules pileux. A une profondeur de 150 μm le signal de fluorescence enregistré est très faible. Nous pouvons noter que les nanoparticules de tailles inférieures à 100 nm ne se fixent pas aux fibres pileuses.

Les nanoparticules de 200 nm se répartissent principalement autour de la fibre pileuse et dans les follicules pilosébacés. Il semblerait que le passage intercellulaire ne soit pas propice à ce type de particules. Elles ont été observées jusqu'à une profondeur de 205 μm .

Les nanoparticules ayant une taille de 200 nm sont stockées principalement dans les follicules pileux, autour des poils, comme nous pouvons le constater sur la Figure II.18.

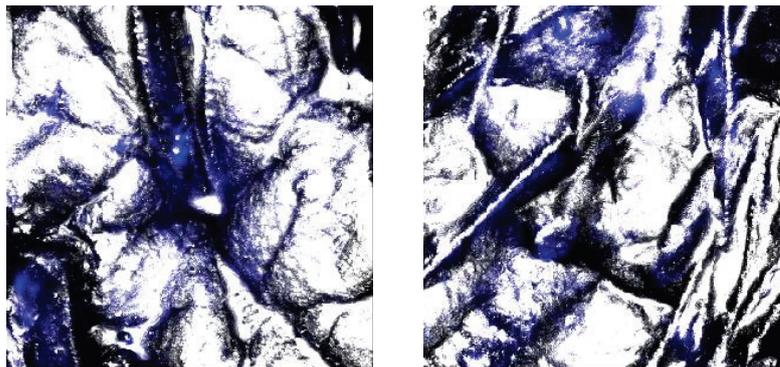


Figure II.18 : Images superposées obtenues par microscopie confocale à partir de peau canine traitées avec des nanoparticules cationiques de 200 nm.

L'étude des images obtenues à différentes profondeurs de champs a permis l'observation de la répartition des latex de 200 nm en fonction de la profondeur dans la peau (cf. Figure II.19). Nous pouvons voir que les nanoparticules se trouvent tout au long de la fibre pileuse est dans le sac folliculaires L'image de la peau canine suivant les axes (xy) affiche la localisation des nanoparticules marquées au voisinage du follicule pileux avec les fibres pileuses associées.

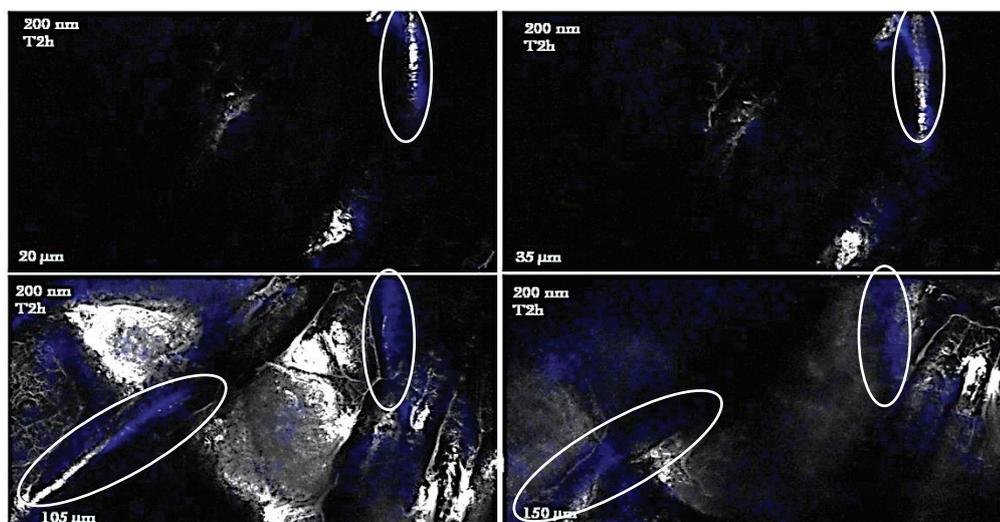


Figure II.19 : Images de la peau à différentes profondeur de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 200nm.

Les particules de latex de 400 nm de diamètre sont réparties dans les espaces intercellulaires de la peau et principalement en surface de la peau. La surface des fibres pileuses est également une zone où les particules de 400 nm ont été observées (cf. Figure II.20). D'ailleurs, cette figure indique qu'il n'y a pas de stockage dans le sac folliculaire dans le cas de nanoparticules de 400 nm.

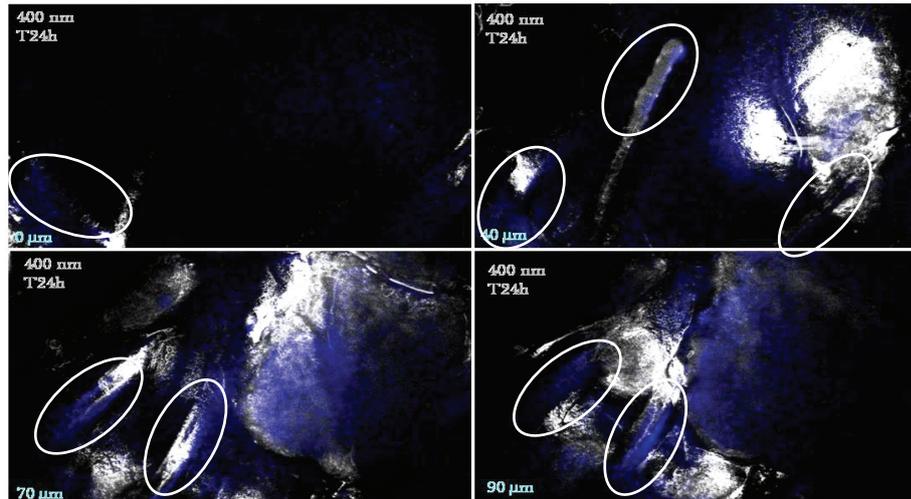


Figure II.20 : Images de la peau à différentes profondeurs de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 400 nm.

Les particules de 600 nm de diamètre entourent le poil et ne sont pas visibles autour des corneocytes. Il apparaît donc qu'elles n'ont pas la capacité d'entrer dans le follicule.

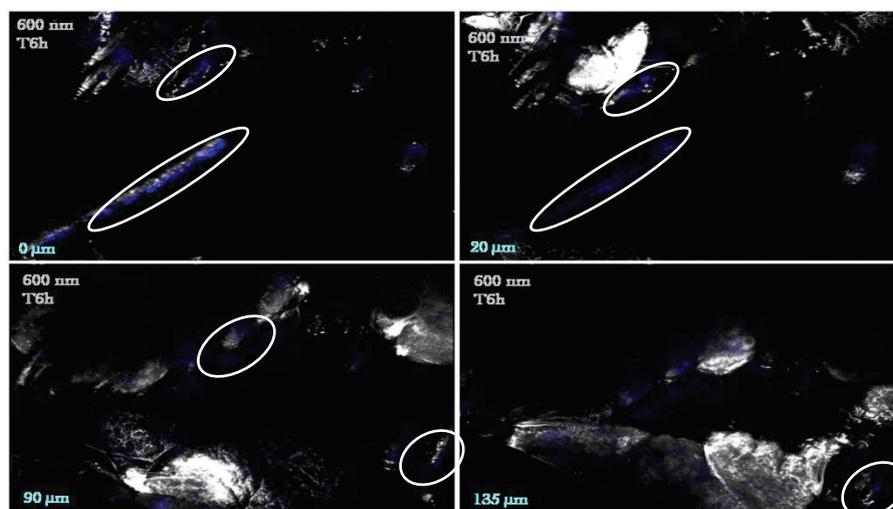


Figure II.21 : Images de la peau à différentes profondeurs de champs ayant subi un traitement avec des nanoparticules cationiques de 600 nm.

Afin de confirmer les observations par microscopie confocale, nous avons visualisé des coupes histologiques de peau canine traitée par les latex, après une procédure de coloration spécifique. En rouge nous pouvons voir la surface de la peau (coloration des cellules de la couche cornée, sur le côté droit des images). Les nanoparticules de 200 nm sont localisées en

surface et dans les follicules pileux. Les particules de 400 nm sont également localisées dans la couche cornée et dans les follicules. Cependant ces dernières n'apparaissent pas en profondeur.

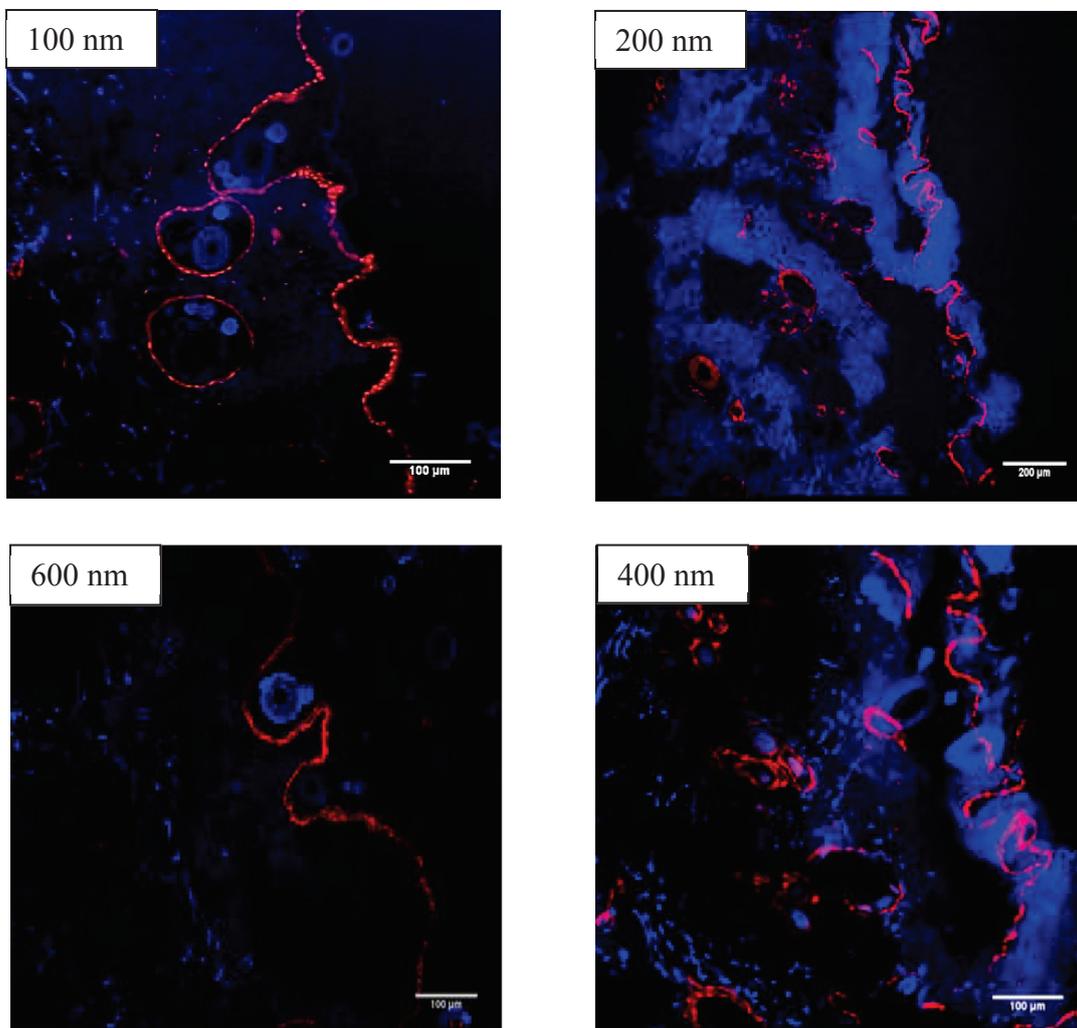


Figure II.22 : Images obtenues par microscopie à fluorescence après coloration spécifique.

Dans le cas des nanoparticules de 100 nm, la coloration bleu correspondant à la fluorescence des latex est diffuse et reste visible en profondeur. Au contraire les latex de 600nm ne pénètrent pas dans la peau, l'intensité de fluorescence est faible, les zones bleues semblent correspondre à l'autofluorescence de la peau. Ce manque de marquage de la peau est probablement dû au procédé de préparation des coupes de peau, qui éliminerait les nanoparticules de 600 nm initialement déposées sur la peau.

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que les nanoparticules de taille supérieures à 200 nm ne pénètrent pas dans les couches profondes de la peau. Les images obtenues indiquent clairement que les follicules pileux sont des chemins primordiaux pour

l'intromission des particules de latex de 200 nm et 400 nm dans la peau. Il apparait que sans application d'un stress mécanique, les particules de 600 nm ne pénètrent pas dans la peau canine. Ces résultats s'opposent aux résultats présentés par Lademann et al. [Lademann, 2006 - Lademann, 2004] rapportant que la taille optimale de particules permettant une pénétration profonde dans le follicule pileux est de 500 nm. Par contre Shim *et al.* ont rapporté que le comportement de perméation des nanoparticules à base de PCL a été promu lorsque la taille des nanoparticules est diminué. [Shim, 2004]. Dans notre cas d'étude les particules sont à base de méthacrylate de méthyle, et la peau provient de chiens. Ces deux paramètres pourraient être responsables des différences significatives des résultats obtenus.

VI. Etude de l'adsorption sur le poil canin

Nous avons démontré qu'une taille de particules de 200 nm permet un stockage préférentiel dans les follicules pileux. C'est pour cela que l'étude électrocinétique a été conduite sur ce lot de particules.

L'adsorption des nanoparticules sur les fibres pileuse a été suivie par mesure du potentiel d'écoulement. Il a été nécessaire dans un premier temps de déterminer les variations du potentiel zêta des nanoparticules en suspension en fonction du pH. Des phases aqueuses à différents pH ont été préalablement préparées, une quantité de particules de latex a été introduite. Les préparations ont été placées sous agitation magnétiques 12 heures et le potentiel zêta des nanoparticules en suspension a été mesuré. Les nanoparticules présentent une charge de surface positive pour tous les points expérimentaux, comme montré par la Figure II.23.

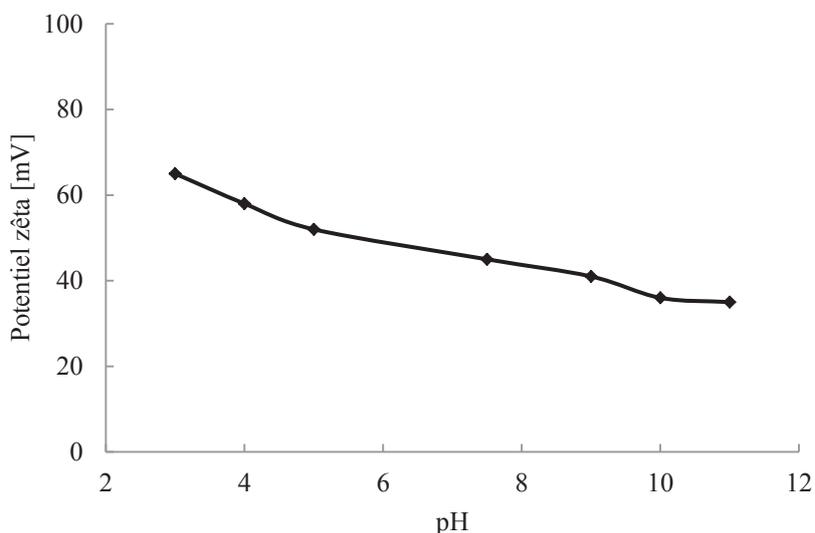


Figure II.23: Etude du potentiel zêta en fonction du pH des latex de PMMA (cationique, 200 nm).

Le potentiel zêta diminue avec l'augmentation du pH en raison de la réduction de charges cationiques sur la surface des particules. Cette diminution peut être attribuée à la déprotonation des groupes amides lorsque le pH est proche du pKa du groupement amidine (pKa = 9,5) [Ganachaud, 1998]. Jusqu'à un pH de 11, nous n'avons pas noté de phénomènes de déstabilisation, cependant pour un pH supérieur, des phénomènes d'agrégation ont été visibles. Par conséquent les expérimentations ont été conduites pour des pH toujours inférieur ou égal à 11.

Afin d'obtenir des informations sur les interactions entre les particules et les poils, des latex de 200 nm ont été ajoutés à la solution aqueuse d'électrolyte ([NaCl] = 1mM). L'unité de

titration intégrée du SurPASS ajoute automatiquement une quantité présélectionnée de particules. Les mesures ont été conduites comme suit : après injection d'une quantité fixe de suspension colloïdale dans la solution électrolytique, la mesure a été répétée jusqu'à ce qu'une valeur stable du potentiel zêta soit obtenue. Cette étape d'addition de nanoparticules a été reproduite en vue d'obtenir une valeur du potentiel zêta de la surface des fibres pileuses en fonction de la teneur en nanoparticules.

L'étude électrocinétique de l'adsorption des nanoparticules de 200 nm sur les fibres pileuses canine a été conduite en utilisant une la solution électrolytique standard à pH constant. L'adsorption a été réalisée à un pH = 6,5, car à cette valeur, la différence entre le potentiel zêta des nanoparticules et des fibres pileuses est la plus importante, pouvant favoriser le processus d'adsorption via des interactions électrostatiques. Les résultats obtenus sont reportés en Figure II.24.

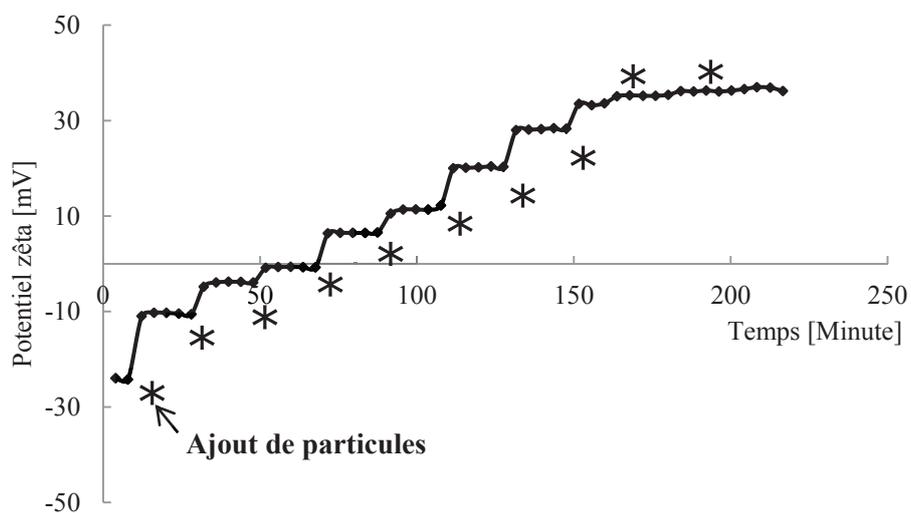


Figure II.24 : Suivi du potentiel zêta en fonction de la quantité en nanoparticules (PMMA NP) et en fonction du temps sur poils de chien. *: addition de PMMA NP dans la solution électrolytique.

L'étude d'adsorption des nanoparticules a été élaborée en commençant par la mesure du potentiel zêta des fibres pileuses non-traitées ($\zeta = -25$ mV), suivis successivement par des ajouts de suspension dans la solution électrolytique.

Cette variation est représentée sur la Figure II.25, où le potentiel zêta est reporté en fonction de la concentration en particules. La charge de surface des fibres pileuses évolue de manière croissante. Le passage d'une charge négative à une charge positive est dû à un recouvrement total de la surface des fibres par interaction forte, de type électrostatique.

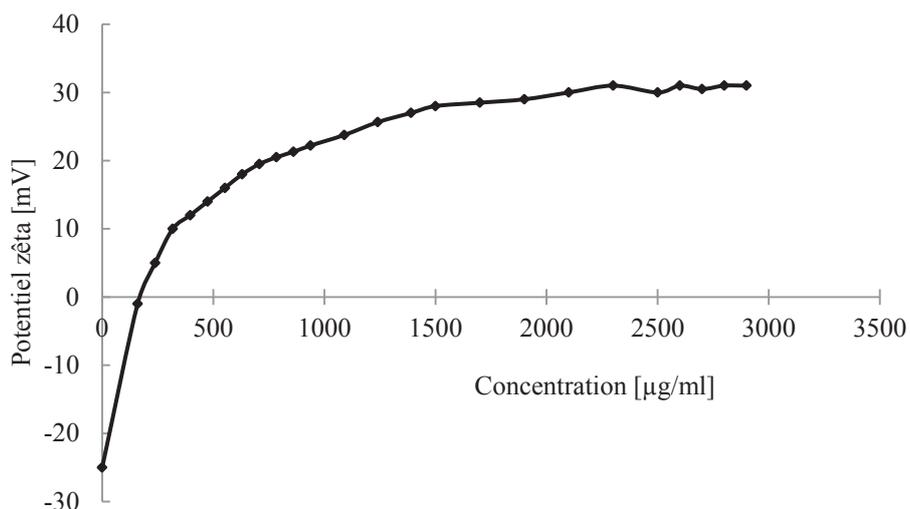
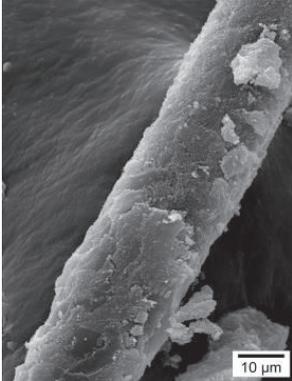
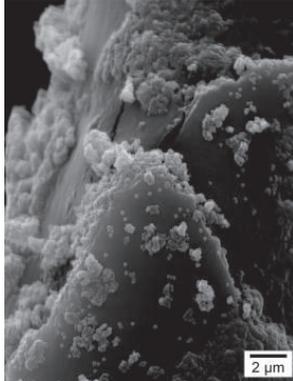
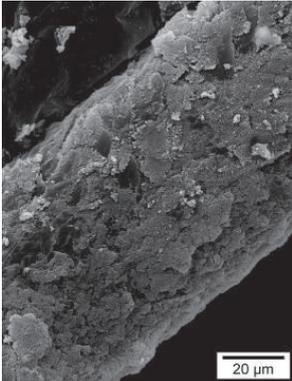
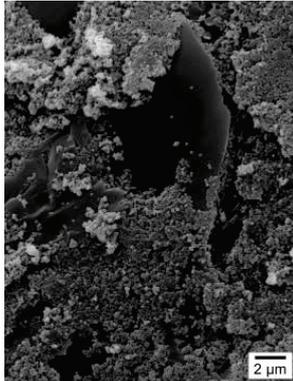


Figure II.25: Représentation du potentiel zêta en fonction de la concentration en latex cationique de 200 nm dans une solution d'électrolyte standard.

La concentration de nanoparticules permettant une possible saturation de la surface des fibres pileuses a été déterminée ($[NP] = 1300 \mu\text{g/ml}$, pour 800 mg de fibres pileuses) pour des particules cationiques de 200 nm de diamètre. Ces valeurs stables du potentiel zêta reflètent un état de surface constant.

Nous avons observés des poils canins présentant une charge de surface nulle ($\zeta = 0\text{mV}$) et une charge de surface positive maximale ($\zeta = +20 \text{mV}$). Pour un potentiel zêta égal à 0 mV, la surface recouverte de nanoparticules n'est pas saturée alors que pour un potentiel zêta égal à +20 mV, la surface est saturée comme nous pouvons le voir sur les images obtenues par MEB, rassemblées dans le Tableau II.3.

Tableau II.3 : Caractéristiques de poils canins ayant subi une étape d'adsorption à des doses de nanoparticules différentes

Potentiel zêta	[NP]	Photos MEB	
[mV]	[$\mu\text{g/ml}$]		
0	500		
+20	1300		

Conclusion

L'étude de la pénétration cutanée en fonction de la taille des particules a été menée avec succès, depuis la synthèse des particules jusqu'à leur visualisation en microscopie confocale.

Différents lots de particules cationiques ont été obtenus par polymérisation en émulsion du MMA. Des suspensions colloïdales de PMMA, de distribution de taille monomodale, avec une taille de particule variant de 100 à 600 nm, ont été préparées.

Ces particules appliquées sur des échantillons de peau canine ont montré des comportements différents dépendant de leur taille. La microscopie confocale sur des échantillons biologiques s'est avéré une méthode de qualité pour reproduire les conditions réelles de traitement dermique par des nanoparticules.

D'après nos résultats, les particules de 100 nm de diamètre auraient la capacité de pénétrer dans la peau canine de manière diffuse, probablement par des chemins intercellulaires. L'accumulation préférentielle des nanoparticules dans les orifices folliculaires a été plus apparente pour les nanoparticules de 200 nm de diamètre, en comparaison avec les particules de 400 nm et 600 nm. Nous pouvons supposer que cette capacité d'introduction dans les orifices folliculaires serait due à leur plus grande surface spécifique. Les conclusions concernant les particules de 100 nm de diamètre sont plus difficile à expliquer, étant donné que ces particules ont été synthétisées avec un agent stabilisant, contrairement aux 3 autres lots de particules.

L'étude d'adsorption des nanoparticules de 200 nm sur les fibres pileuses a conduit à l'observation d'interactions fortes se créant à l'interface solide/liquide (fibre pileuse/suspension). La charge de surface positive des nanoparticules conduit à une adsorption rapide de ces objets colloïdaux sur la fibre pileuse.

Par conséquent, les nanoparticules cationiques de 200 nm de diamètre possèdent la capacité de s'introduire dans les orifices folliculaires, considéré comme étant un lieu de stockage des nanoparticules. Ces nanoparticules ont la capacité de s'adsorber aux fibres pileuses par des interactions forte. Nous avons donc poursuivi nos travaux de recherche avec comme ligne maitresse la formulation de nanoparticules ayant un diamètre de 200 nm et une charge de surface positive.



Chapitre III



Formulation de Suspensions Nanoparticulaires

« Les plus importantes découvertes scientifiques sont le résultat de la patiente observation de petits faits subsidiaires, si particuliers, si menus, inclinant si imperceptiblement les balances - que l'on ne consentait pas jusqu'alors à en tenir compte » André Gide



Introduction	101
I. Matériels & Méthodes	103
I.1. Matières premières	103
I.2. Méthode de fabrication	107
I.3. Méthode de caractérisation	107
I.3.a. Taille et potentiel zêta	107
I.3.b. Caractérisation par microscopie	107
I.3.c. Détermination de l'efficacité d'encapsulation	108
I.4. Méthode de quantification	110
I.5. Vitesse d'évaporation des matières actives	111
II. Résultats & Discussions	112
II.1. Choix d'une matière active modèle	112
II.2. Nanoparticules biodégradables contenant du benzoate de benzyle	113
II.3. Formulation de nanoparticules polymériques cationiques	116
II.4. Etude paramétrique de formulations de nanoparticules d'Eudragit®RS100 chargées en benzoate de benzyle	121
II.4.a. Solubilité du benzoate de benzyle dans des mélanges éthanol/eau ..	121
II.4.b. Variables intensives, paramètres de procédés	122
<i>i.</i> Le débit d'injection	122
<i>ii.</i> La température	123
<i>iii.</i> Le mode d'incorporation	123
II.4.c. Teneur en molécules actives par nanoparticules	124
II.4.d. Rapport phase organique : phase aqueuse	127
II.4.e. Etude du pourcentage en solvant organique	128
II.5. Suivi de stabilité colloïdale	131
II.5.a. Stabilité colloïdale en fonction du pH	131
II.5.b. Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique	133
II.6. Visualisation des phénomènes d'affaissement par AFM	135
III. Application de la méthodologie à d'autres matières actives à propriétés répulsives	138
III.1. Formulation de la Picaridin®	138
III.2. Le DEET	143
Conclusion	145

Introduction

La formulation est le résultat de l'association de matières actives et d'excipients, sous forme de suspensions concentrées dans notre cas d'étude. Ces suspensions sont composées de particules solides dispersées dans une phase continue.

Les produits répulsifs vaporisables pour la protection individuelle d'usages courants présentent une perte d'activité rapide après leur application suite à une élimination rapide par des phénomènes physiques (friction) ou chimiques (évaporation). De nombreuses recherches ont prouvé que l'inclusion de matières actives dans des systèmes particuliers améliore significativement le contrôle de l'activité ainsi que le ciblage.

Nos travaux de recherche de formulation de nanoparticules ont été articulés autour de deux idées concomitantes. D'une part le procédé doit être transposable à l'échelle industrielle et d'autre part les suspensions nanoparticulaires doivent répondre à des caractéristiques physico-chimiques prédéfinies par le cahier des charges imposé par l'application ciblée.

Le Tableau III.1 regroupe les caractéristiques désirées pour les nanoparticules finales ainsi que les raisons de ces choix.

Tableau III.1 : Caractéristiques des suspensions nanoparticulaires répondant aux critères du cahier des charges.

Critères	Caractéristiques	Raisons
Type de fabrication	Suspension aqueuse	- Produit vaporisable
% en matière active	10	- Comparable à des formulations commerciales
Taille moyenne de particules	200nm	-Stockage préférentiel dans les follicules pilosébacés [Lademann, 2007] -Stabilité colloïdale [Wiese, 1970]
Type de distribution	Monomodale	-Stabilité colloïdale -Maitrise du relargage
Potentiel zêta	$\geq +25$ mV	-Interaction électrostatique avec le poil
Stabilité	1 an en vieillissement accéléré	-Conservation avant commercialisation et après ouverture

Mode de fabrication	Procédé par déplacement de solvant	- Industrialisable - Couple temps/température transposable
Procédé	Nanoprécipitation	- Reproductibilité/répétabilité/robustesse/ Maîtrise des caractéristiques physico- chimiques

Le balayage unidimensionnel de formulation est une méthode utilisée pour la détermination d'une formulation ciblée correspondant au cahier des charges imposé. Elle consiste à préparer une série de systèmes identiques, à l'exception d'une des variables de formulation appelée variable de balayage. Deux types de variables ont été étudiés :

- Les variables de formulation physico-chimiques : ce sont les **variables intensives** (indépendantes des concentrations) associées à l'état d'équilibre du système. Il s'agit de tous les paramètres physiques ou chimiques tels que la température, la vitesse d'agitation, la durée d'agitation, la nature chimique des composants.
- Les variables de composition : ce sont les **variables extensives** associées aux quantités et proportions des composants principaux. Il s'agit de la concentration en polymère, en matière active, en agent stabilisant, en solvant et les rapports associatifs.

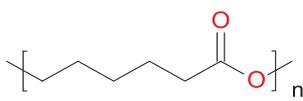
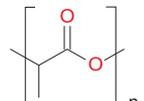
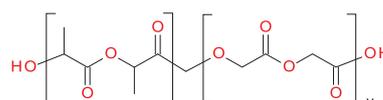
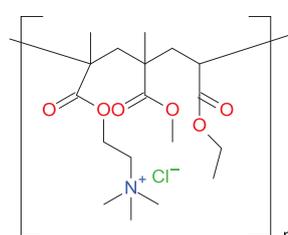
I. Matériels & Méthodes

I.1. Matières premières

Notre objectif premier a été de formuler une suspension concentrée en particules. Nous avons formulé des dispersions colloïdales avec des polymères biodégradables : la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), l'acide polylactide (PLD) et le copolymère acide polylactide-*co*-glycolide (PLDG) avec des poids moléculaires variables. Des polymères synthétiques de type Eudragit[®] ont également été étudiés.

La caractéristique principale de l'Eudragit[®] de type RS100 est la présence de groupements ammoniums quaternaires sur les chaînes polymériques qui confèrent une charge positive à la particule finale (cf Chapitre I.Partie 2). Le Tableau III.2 rassemble les caractéristiques principales des polymères formulés durant notre étude.

Tableau III.2 : Caractéristiques des polymères biodégradables utilisé dans l'étude préliminaire. M : Masse molaire ; Tf : température de fusion mesurée par DSC (Differential Scanning Calorimetry).

Polymère	M [g/mol]	Fournisseur	Formule chimique	Tf [°C]
PCL	14000	Sigma		62
PLD	17000	Purac		55
PDLG	44000	Purac		50
Eudragit [®] RS100	32000	Evonik		65

L'Eudragit[®]RS100 est un copolymère de poly(méthacrylate) (chlorure de Poly(éthyl acrylate-*co*-méthyl méthacrylate-*co*-triméthylammonioéthyl méthacrylate)) commercialisé par Evonik (France). Il est utilisé pour la fabrication de formulations pharmaceutiques en tant qu'agent de contrôle de la libération de matières actives [Haznedar, 2004]. Ce polymère insoluble dans

l'eau présente une perméabilité dépendante de son pourcentage en comonomère ionique (groupements ammonium). Sa stabilité au stockage est limitée par l'hydrolyse des groupements esters du polymère.

Nous avons formulé principalement cinq molécules actives à propriété répulsive tout au long de nos travaux de recherche. Elles ont été choisies pour répondre au mieux au cahier des charges suivant les critères suivants :

- Une activité répulsive d'insecte démontrée par des études antérieures ;
- Une faible solubilité dans l'eau, favorable pour l'encapsulation au sein d'une matrice polymérique pour la fabrication d'une suspension aqueuse ;
- Une enthalpie de vaporisation d'ordre de grandeur comparable à celle du DEET.

La Picaridin[®] et l'IR3535[®] sont des molécules dont l'activité insectifuge est comparable à celle du DEET [Badolo, 2004 – Naucke, 2006]. La Perméthrin, qui démontre une activité répulsive d'insectes d'intérêt a également été formulée [Franc, 2012]. Cette dernière présente comme caractéristique d'intérêt une enthalpie de vaporisation extrêmement basse en comparaison avec celles du DEET, de la Picaridin[®] ou de l'IR3535[®]. La Perméthrin a une action de répulsion dès lors que l'insecte est très proche de l'animal, voire en contact avec lui, c'est pour cela qu'elle a été qualifiée de répulsif de contact. Cette caractéristique est due à une tension de vapeur très basse.

Le benzoate de benzyle (BB) a été choisi en tant que molécule modèle pour l'étude complète de la formulation de suspensions nanoparticulaires. Cette molécule possède plusieurs qualités ; sa solubilité dans l'eau est très basse et son enthalpie de vaporisation est moyenne, entre celle du DEET et de la Picaridin[®]. Par ailleurs, sa structure chimique offre la possibilité de doser des quantités très faibles par spectroscopie UV. Le benzoate de benzyle est un liquide incolore et inodore dont la forme physique (liquide organique de faible viscosité) est comparable à d'autres matières actives répulsives couramment utilisées (DEET, IR3535[®], Picaridin[®]). Son activité répulsive contre les tiques est un avantage supplémentaire faisant de cette molécule un candidat de choix pour l'optimisation d'une formulation nanoparticulaire à propriété répulsive d'arthropodes.

Enfin, Le DEET est la molécule de référence dans le domaine des répulsifs d'insectes, il paraît donc judicieux de l'inclure dans nos travaux de recherche. Les caractéristiques physico-chimiques d'intérêt des cinq molécules actives citées sont rassemblées dans le Tableau III.3.

Tableau III.3 : Caractéristiques physico-chimiques de molécules actives d'intérêt formulées.

Molécule	Numéro CAS	Solubilité dans l'eau	EV
		25°C [g/L]	[kJ/mol]
DEET	134-62-3	7,5	54,0
Picaridin [®]	119515-38-7	4,1	66,5
Benzoate de benzyle	120-51-4	$7,9 \cdot 10^{-2}$	56,6
IR3535 [®]	52304-36-6	14	55,6
Perméthrin	52645-53-1	$3,8 \cdot 10^{-5}$	72,8

Dans la plupart des formulations décrites dans la littérature, un agent stabilisant est ajouté à la formulation en vue de stabiliser les particules en formation et obtenir une stabilité colloïdale de la suspension finale (prévention des phénomènes d'agrégation). La nature et la concentration des agents stabilisants influencent les propriétés des particules formées. La taille et le potentiel zêta sont des propriétés physico-chimiques importantes des particules, car elles déterminent la stabilité physique ainsi que les propriétés pharmaceutiques de la préparation (*e.g.* adsorption le long de la fibre pileuse, bio distribution dans les couches de la peau). Ils peuvent être disposés dans la couche limite entre la phase aqueuse et la phase organique lors de la formation des particules, ils peuvent aussi être incorporés à la surface des particules, modifiant des propriétés des particules telles que potentiel zêta.

L'alcool polyvinylique (PVA 4-88 ; Sigma, France ; CAS : 9002-89-5) a été utilisé car il confère des propriétés d'agents de surface et des propriétés d'adhésion aux nanoparticules qu'il enrobe [Pandey, 2003]. Le polysorbate 80 (Tween[®] 80 ; Sigma, France ; CAS : 9005-65-6) a également été étudié.

Les phases aqueuses utilisées durant nos travaux de recherche ont été préparées avec de l'eau déionisée (pH = 6,5 ; Résistivité R=18mΩ).

I.2. Méthode de fabrication

Les suspensions colloïdales ont été obtenues par le procédé de nanoprécipitation [Fessi, 1989 - Fessi, 1992]. Cette méthode de formulation de dispersions colloïdale est décrite dans le Chapitre I et en Annexe 1. Brièvement, la phase organique composée du polymère, de la matière active et du solvant organique est coulée dans la phase aqueuse composée d'eau déionisée et éventuellement d'un agent stabilisant, sous agitation modérée. La suspension finale est obtenue après élimination du solvant organique et d'une partie de la phase aqueuse afin d'obtenir une concentration en nanoparticules appropriée.

I.3. Méthode de caractérisation

I.3.a. Taille et potentiel zêta

L'analyse de la taille des nanoparticules a été effectuée par granulométrie laser utilisant la diffusion quasi-élastique de la lumière générée par le mouvement Brownien des particules en suspension. La taille moyenne des particules et leur indice de polydispersité (estimation de la largeur de la distribution, PDI) ont été calculés par analyse des cumulants comme il l'a été défini dans la norme ISO13321 [ISO 13321, 1996]. La nature de la charge de surface des nanoparticules a été déterminée par l'intermédiaire du potentiel zêta, obtenu par la mesure de la mobilité électrophorétique des particules en suspension. L'équipement utilisé est un Zetasizer NanoZS (cf. Chapitre II).

I.3.b. Caractérisation par microscopie

Les nanoparticules ont été observées par microscopie électronique (MEB et MET, cf. Chapitre II) et par microscopie à force atomique. L'aspect de surface, la morphologie interne et les phénomènes de filmification des nanoparticules appliquées sur un support solide ont été observés. Les méthodologies d'observation pour le MEB et le MET ont été présentées dans le Chapitre II.

La microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy) est une méthode de microscopie à champs proche (appelée également à sonde locale). Elle est un outil d'analyse topographique d'une surface solide de très haute résolution pouvant aller jusqu'à la résolution d'objets de quelques nanomètres. Les images sont obtenues par balayage d'une surface à l'aide d'un levier muni d'une pointe pour en avoir une image en trois dimensions. L'information majeure est apportée par la déflexion du levier.

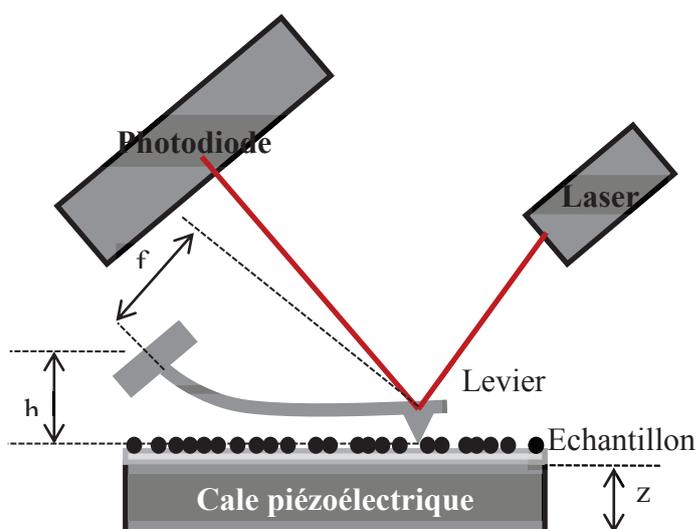


Figure III.1 : Représentation du principe d'analyse microscopique par AFM.

La dimension z est égale au déplacement vertical de la cale piezoélectrique, si la hauteur (h) entre le support fixe du levier et le point de contact est constante. La valeur de h dépend de la déflexion (f) mesurée par le système. La coopération de tous ces éléments permet de balayer la surface à hauteur constante en asservissant z .

Ces déflexions sont détectées par une diode à cadrans en suivant le mouvement d'un rayon laser réfléchi à l'extrémité du levier. Le déplacement relatif de la pointe par rapport à la surface est accompli par un transducteur piezoélectrique dans les 3 directions x , y et z .

L'imagerie par AFM peut se faire en mode contact ou en mode contact intermittent. Dans le mode contact, la pointe reste en contact permanent avec la surface pendant le balayage. Ce mode permet d'obtenir des images de haute résolution sur des objets peu rugueux. Dans le mode contact intermittent, la pointe oscille verticalement à une distance de quelques angströms de la surface. Ce mode est préconisé dans le cas d'échantillons contenant des composants souples et fragiles car il endommage peu les surfaces et limite les déformations latérales. C'est ce dernier qui a été utilisé durant nos observations.

L'avantage de l'analyse par AFM est l'obtention d'une valeur traduisant le caractère filmogène des nanoparticules, le facteur de forme (FF). Une comparaison du facteur de forme initiale (FF_{t0}) et après 7 jours d'application des nanoparticules sur un support solide (FF_{t7}) permet d'évaluer le caractère filmogène de la suspension.

$$FF = \frac{D}{H} \quad \text{Equation III.1}$$

- avec : - FF : Facteur de Forme ;
 - D : Diamètre d'une particule ;
 - H : Hauteur d'une particule.

Le microscope utilisé est un AFM MPF3D (Asylum Research), disposé au LPMCN (Laboratoire de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures, Campus de la Doua, Université de Lyon).

Procédure d'analyse : une suspension contenant 0,2mg/ml de particules est déposée sur une plaque de microscope en verre, préalablement nettoyée et soumise à une étape d'ultrasons afin de garantir la présence minimum de poussières ou impuretés. Les plaques de microscopie contenant les nanoparticules ont été déposées sous hotte pendant 24 heures, le surplus de suspension a été éliminé à l'aide d'un papier filtre et l'analyse par AFM a été effectuée. Des images de type « z sensor » ont été acquises avec une fréquence de travail de 1Hertz.

1.3.c. Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation a été obtenue par séparation de la matière active non encapsulée (en phase continue) et de la matière active encapsulée au sein de la matrice polymérique. Deux méthodes ont été comparées.

La première est basée sur l'entraînement de la partie organique de la suspension. Pour ce faire, nous avons utilisé des filtres séparateurs de phases (Fisherbrand 110mm, Fisher Scientific, France). La quantité totale de molécule active dans la formulation a été déterminée après dissolution de la suspension dans une quantité spécifique de solvant de dosage. Une quantité connue de suspension a été placée dans un entonnoir équipé d'un papier filtre séparateur de phase, avec un flacon en compartiment inférieur, récepteur de phase organique. Du chloroforme (non solvant du polymère) a été versé dans l'entonnoir, baignant la suspension nanoparticulaire étudiée. Ce solvant entraîne dans le compartiment récepteur les molécules actives non encapsulées. La suspension aqueuse nanoparticulaire restante sur le filtre est récupérée et les nanoparticules sont solubilisées dans le solvant de dosage, libérant

ainsi les molécules encapsulées. La quantité totale (matière active encapsulée et libre) a été déterminée par dissolution de la suspension dans le solvant de dosage. Les trois solutions obtenues ont été adéquatement diluées et dosées par des méthodologies analytiques validées décrites dans la suite de ce chapitre.

Une deuxième méthode de détermination de l'efficacité d'encapsulation a été réalisée, basée sur la séparation des nanoparticules et du milieu continu. Cette méthodologie a été réalisée à l'aide d'unités de filtration par centrifugation Amicon Ultra-0,5ml (seuil de coupure : 10 kDa), permettant une ultrafiltration rapide. La suspension a été introduite dans le compartiment supérieur et après 10 minutes de centrifugation à 11000 tours par minute, la phase continue contenant la part de matière active non encapsulée a été recueillie. Ce filtrat a été adéquatement dilué dans un solvant de dosage et la matière active présente dans cette préparation est quantifiée.

Chaque analyse a été réalisée en triple et les valeurs moyennes ont été utilisées pour l'efficacité d'encapsulation suivant l'Equation III.2.

$$EE = \frac{MA_t - MA_l}{MA_t} \quad \text{Equation III.2}$$

avec : - EE : Efficacité d'Encapsulation ;
- MA_t : Matière Active totale ;
- MA_l : Matière Active libre.

L'efficacité d'encapsulation de la méthode 1 (EE_1) et l'efficacité d'encapsulation de la méthode 2 (EE_2) ont été comparées.

I.4. Méthode de quantification

Le benzoate de benzyle a été dosé par HPLC (chromatographie liquide en phase inverse, High Performance Liquid Chromatography) couplée à un détecteur UV-Vis tout au long de nos travaux de recherche. La méthodologie analytique a été utilisée pour

- le calcul des efficacités d'encapsulation (EE) ;
- l'élaboration des profils de libération (cf. Chapitre IV et Chapitre V) ;
- l'étude de la pénétration percutanée (cf. Chapitre IV).

Le dispositif d'analyse est une HPLC Waters (St Quentin en Yvelines, France) composée d'un injecteur Waters 717, une pompe Waters 600, une colonne en phase inverse XTerra[®]MS C18 (3,9 x 100 mm, 3,5 m) et un détecteur UV à barrette de photodiodes Waters 2996 travaillant à 230 nm de longueur d'onde. L'élution avec un solvant composé de méthanol et d'eau (70:30) à 1,5 ml/min de débit et 25°C en température de travail a donné un temps de rétention pour le benzoate de benzyle de 3,7 minutes. Le volume d'injection a été fixé à 5µl. La courbe d'étalonnage pour l'analyse quantitative est linéaire jusqu'à la limite de détection (LOD = 40 µg/ml) et la limite de quantification (LOQ) est de 400 pg de benzoate de benzyle.

Dans le cas de l'étude de la Picaridin[®] nous avons utilisé l'analyse par spectrophotométrie UV (Spectrophotometer Shimadzu UV 1800 CE 230V). Le solvant utilisé est l'éthanol absolu. La courbe d'étalonnage pour l'analyse quantitative est linéaire pour des concentrations de Picaridin[®] comprises entre 6µg/ml et 200µg/ml. La longueur d'onde de travail est $\lambda = 210$ nm.

I.5. Vitesse d'évaporation des matières actives

Une étude de l'évaporation des molécules actives d'intérêt a été menée par méthode gravimétrique. Brièvement, dix gouttes de matière active sans excipients ont été déposées sur une plaque d'aluminium. Cette plaque a été pesée initialement et après 30 jours à 25°C, en effectuant des relevés de masse à intervalle de temps régulier (n = 3). Un profil d'évaporation de la matière active à l'état pur a été obtenu en calculant la moyenne et l'écart type des trois essais à chaque temps d'analyse.

II. Résultats & Discussions

II.1. Choix d'une matière active modèle

Le choix de la matière active s'est porté sur des critères propres à la physico-chimie des molécules, avec en tant que critères primordiaux leur hydrophobicité et leur enthalpie de vaporisation. Le suivi de la perte en masse des matières actives a donné accès à leurs profils d'évaporation, ils sont présentés en Figure III.2.

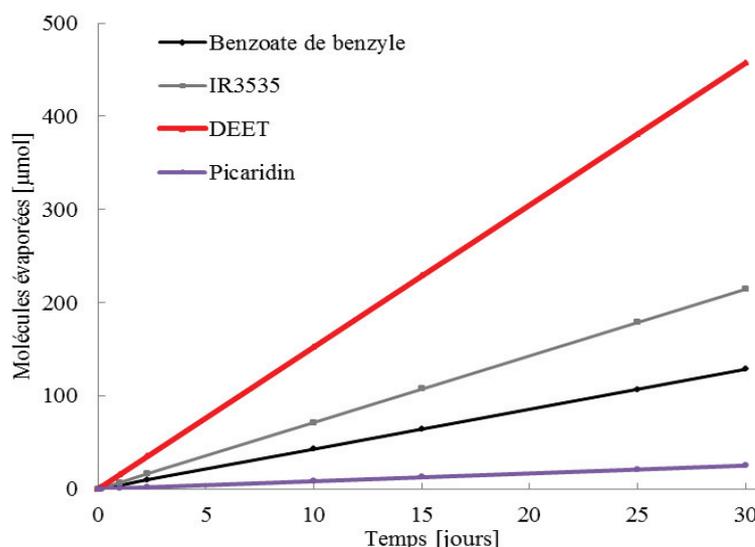


Figure III.2 : Profils d'évaporation de molécules répulsives d'arthropodes.

Les résultats obtenus ont prouvé une linéarité parfaite, attestées par des coefficients de corrélation $R^2 > 0,99$. Le DEET possède la vitesse d'évaporation la plus importante ($0,635 \mu\text{mol}/\text{heure}$) parmi les quatre molécules d'intérêt étudiées. Nous n'avons pas présenté les résultats obtenus pour la Permethrin car les variations de masse mesurées sont extrêmement faibles, dû à sa pression de vaporisation extrêmement faible. L'IR3535[®] et la Picaridin[®] ont présenté des vitesses d'évaporation de $0,298 \mu\text{mol}/\text{heure}$ et $0,035 \mu\text{mol}/\text{heure}$ respectivement. Cette faible vitesse d'évaporation mesurée pour la Picaridin[®] permet de comprendre que pour une même dose appliquée, la Picaridin[®] mettra 18 fois plus de temps pour être évaporée que le DEET. Le benzoate de benzyle a présenté une vitesse d'évaporation moyenne ($0,179 \mu\text{mol}/\text{heure}$), il apparaît donc comme étant un bon compromis en tant que matière active modèle pour la recherche de formulations nanoparticulaires.

II.2. Nanoparticules biodégradables contenant du benzoate de benzyle

L'incorporation du benzoate de benzyle dans des nanoparticules à base d'acide polylactide (PLD) a été étudiée. Le procédé de nanopréciipitation repose sur la précipitation du polymère par déplacement du solvant organique de la phase organique vers la phase aqueuse. Le polymère précipite sous forme de particules colloïdales solides. Quand une molécule active est incorporée dans la phase interne, deux comportements sont possibles. Le polymère peut précipiter de manière indépendante, la suspension contiendra des nanosphères de polymère et des globules de molécules actives. La seconde possibilité est celle pour laquelle bien le polymère précipite autour des gouttelettes de matières actives liquides, conduisant à la formation de particules chargées de type sphères ou capsules.

Une étude de l'influence de la quantité de molécules actives dans la formule a été conduite. Ces premiers résultats ont été élaborés en utilisant du PVA 4-88 en tant qu'agent stabilisant [Zambaux, 1998]. Nous avons fixé son pourcentage à 1 % massique de la phase aqueuse. Le pourcentage en nanoparticule a été fixé à 2 % massique, obtenu après élimination du solvant et concentration de la suspension. Nous avons maintenu une masse constante de polymère (0,40 g) et la masse de benzoate de benzyle a été variée entre 0 et 1 g, soit entre 0 % et 71 % de benzoate de benzyle par nanoparticule. Les quantités d'acétone et de phase aqueuse ont été maintenus constants pour des valeurs de 25 g et 50 g respectivement. Le Tableau III.4 montre les caractéristiques des lots de suspensions nanoparticulaires.

Tableau III.4 : Formulations du benzoate de benzyle par nanopréciipitation dans une matrice polymérique de PLD. % BB/NP : teneur en benzoate de benzyle par nanoparticules. Sol : Solution aqueuse de PVA 4-88

Benzoate de benzyle [g]	% BB/NP	Taille moyenne [nm]	PdI
0	0	200	0,06
0,15	27,27	208	0,07
0,35	46,67	231	0,09
0,5	55,56	233	0,10
0,65	61,9	253	0,08
0,8	66,67	500	0,40
1	71,43	550	0,40

Toutes les dispersions présentées ont montré des tailles submicroniques, sans phénomènes de précipitation du polymère sous forme d'agrégats ou de gouttelettes de molécules actives. Cette série expérimentale donne accès à la variation des caractéristiques granulométriques en fonction de la teneur en benzoate de benzyle des nanoparticules. La Figure III.3 présente les résultats de l'influence de la quantité de benzoate de benzyle sur le diamètre moyen et la distribution de taille des objets formés.

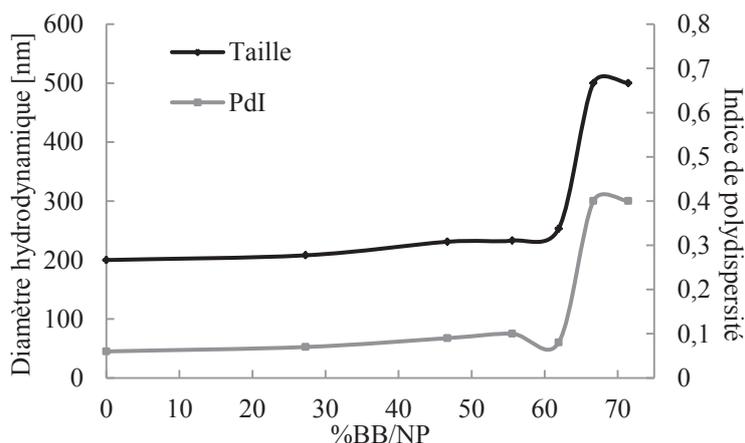


Figure III.3 : Evolution de la taille moyenne des nanoparticules en suspension et de l'indice de polydispersité en fonction du pourcentage en benzoate de benzyle par nanoparticule.

L'augmentation de la quantité de benzoate de benzyle conduit à une augmentation du diamètre moyen des particules générées, avec un élargissement de la distribution des tailles de particules. Ceci peut être expliqué par une augmentation de la viscosité de la phase organique. Selon Quintanar-Guerrero *et al.* [Quintanar-Guerrero, 1996], la dispersion d'une phase organique est d'autant plus difficile que sa viscosité est importante, ce qui aboutirait à une taille de particule croissante.

Une internalisation de la molécule active très hydrophobe dans la matrice polymérique jusqu'à une valeur limite est par conséquent observable. Une coalescence des gouttelettes peut être visible lorsqu'une grande quantité de phase interne est incluse dans la formulation, ceci est traduit par une déstabilisation colloïdale rapide par sédimentation. Une teneur en benzoate de benzyle supérieure à 62% par nanoparticule n'a pas été envisageable dans nos conditions expérimentales car des phénomènes d'agrégation ont été observés après une semaine de stockage à 25°C.

Les mêmes formulations ont été élaborées avec la PCL ($M_w = 10000$; 42000 et 80000 g/mol) et le PLDG ($M_w = 44000$; 406000 g/mol) donnant la même tendance.

Un a démontré une déstabilisation rapide par des phénomènes d'agrégation conduisant à une sédimentation des particules initialement en suspension. Les polymères exposent un temps de dégradation fonction de la nature du polymère et de son poids moléculaire. Ainsi les PLDG ont un temps de dégradation court, qui conduit à une instabilité rapide de la formulation (2 mois pour le PLDG 44000). Les nanoparticules à base de PLD 17000 ont présenté une stabilité colloïdale de 6 mois à 25°C pour un stockage en étude à 40°C. Il est à noter que des polymères de même nature mais de poids moléculaires plus élevés conduisent à des durées de dégradation plus importantes (supérieures à 16 mois pour un PLD 406000). Cependant leur formulation est plus délicate, les particules obtenues ont été de tailles supérieures à 300 nm. Ainsi les formulations à base de polymères biodégradables (PCL, PLD, PLDG) ne permettent pas d'obtenir des suspensions nanoparticulaires avec un pourcentage en matière active et une stabilité colloïdale suffisantes.

Par ailleurs les valeurs de potentiel zêta mesurées sont nulles ($\zeta = 0 \pm 5\text{mV}$). La fonctionnalisation de surface des nanoparticules dans le but de conférer une charge de surface positive (*e.g.* adsorption de macromolécules chargées) obtenues avec des polymères biodégradables n'a pas été réalisée en raison du faible pourcentage en matière active des suspensions finales obtenues. Rappelons qu'une charge positive de la particule est un critère important dans le développement d'une formulation pour une application sur la fourrure de l'animal (présentant une charge de surface négative).

II.3. Formulation de nanoparticules polymériques cationiques

Nous nous sommes focalisés sur la formulation de nanoparticules à base de polymères synthétiques judicieusement choisis, présentant une charge positive. La raison principale est de permettre une adsorption par liaison forte des nanoparticules exprimant une charge de surface positive sur toute la longueur des poils canins, qui eux ont une charge de surface négative. Pour ce faire, nous avons choisi de formuler des polymères de type Eudragit®RS100 et RL100.

Nous avons utilisé le Tween® 80 en solution aqueuse (1% massique), en tant qu'agent stabilisant pour la formulation de nanoparticules blanches (sans matière active). Les caractéristiques de formulation et les données analytiques de cette suspension sont rassemblées dans le Tableau III.5.

Tableau III.5 : Données de formulation et d'analyse d'une suspension nanoparticulaire monomodale à base d'Eudragit®RS100.

Eudragit®RS100	Acetone	Solution aqueuse de Tween® 80	Taille moyenne	Potentiel zêta
[mg]	[g]	[g]	[nm]	[mV]
200	12,5	25	115	+35

Les nanoparticules obtenues ont présenté une distribution de taille monomodale confirmée par un indice de polydispersité faible ($PdI = 0,05$).

Différents pourcentages de Tween® 80 ont été étudiés. La taille de particules ne varie pas de manière significative ($115 \text{ nm} \pm 5\text{nm}$) dans la gamme de pourcentage testé (de 0 à 5%). Par contre une variation du potentiel zêta mesuré a été observée.

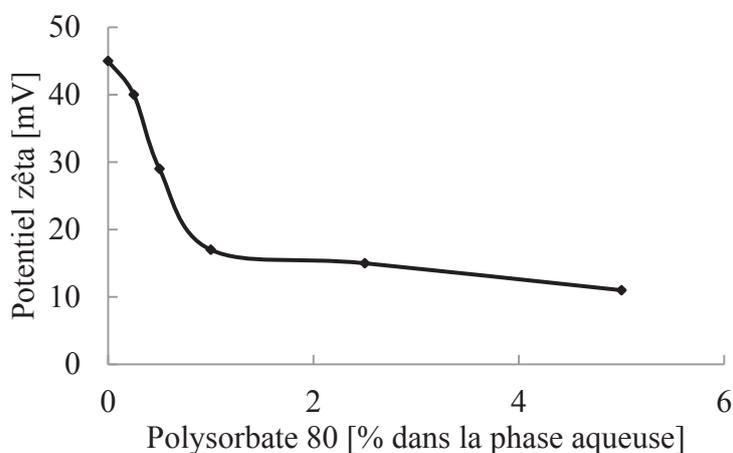


Figure III.4 : Potentiel zêta en fonction du pourcentage en Tween®80 dans la phase aqueuse.

Le potentiel zêta des nanoparticules obtenues en utilisant du Tween[®]80 décroît dès lors qu'une faible quantité de cet agent de surface est ajouté dans la formulation. A un pH et une force ionique données, les particules formulées avec du Tween[®]80 sont moins mobiles que les particules obtenues sans agent de surface, en raison de la présence de ces macromolécules en surface des particules. Cette adsorption de surface éloigne la position du plan d'écoulement (potentiel zêta) de la surface des particules.

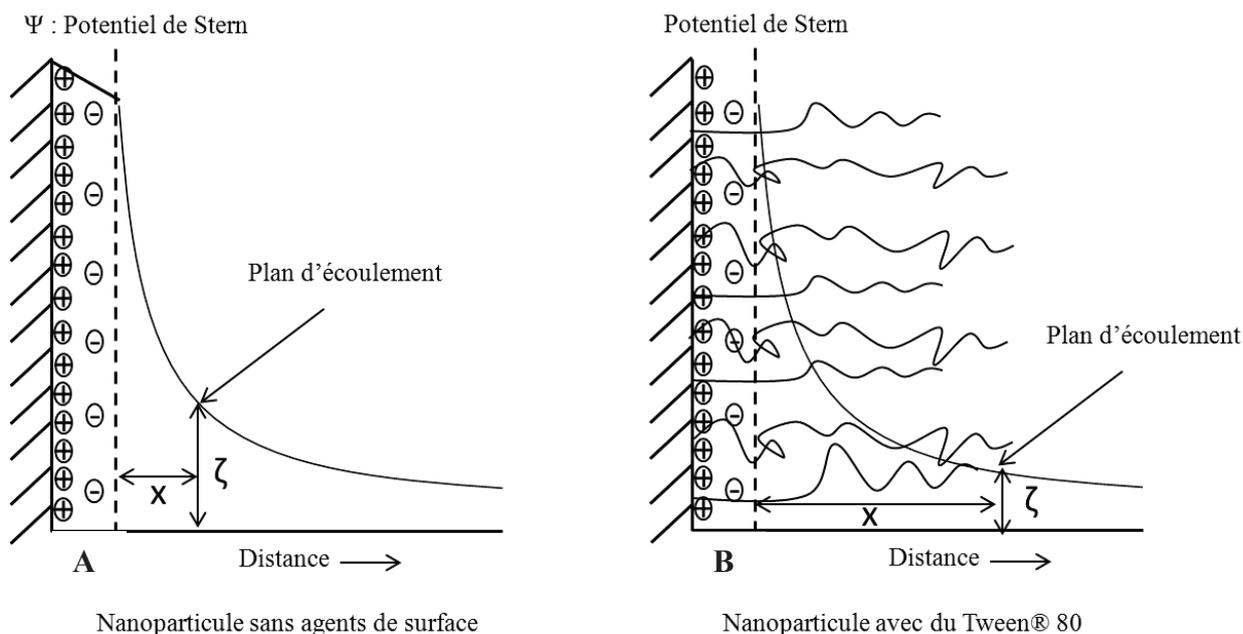


Figure III.5 : Représentation schématique de la double couche électrique des surfaces de nanoparticules d'Eudragit[®]RS100 formulées sans Tween[®]80 (A) et avec (B).

Dans notre cas, la présence d'une couche d'agents stabilisant entraîne une diminution du potentiel zêta. Ce résultat peut être interprété à l'aide de la relation de Eversole-Boardman [Eversole , 1941], qui permet de relier le potentiel zêta (ζ), le potentiel de Stern (ψ), la position du plan d'écoulement (t) et la double couche de Debye-Hückel (χ).

$$\ln \tanh \frac{ze\zeta}{4KT} = \ln \tanh \frac{ze\psi}{4KT} - t\chi \quad \text{Equation III.3}$$

- avec :
- T : Température absolue ;
 - z : valence de l'espèce ionique ;
 - e : charge de l'électron ;
 - K : constante de Boltzmann.

La variation de la quantité d'agent stabilisant a apporté un contrôle du potentiel zêta sans influencer significativement la taille des nanoparticules. Il est à noter que nous avons obtenu des nanoparticules de tailles semblables avec et sans agents stabilisants. Cette caractéristique est due à la nature chimique du polymère utilisé. Les charges positives auraient une action stabilisante des particules.

Nous avons augmenté le pourcentage en Eudragit®RS100 afin d'obtenir une suspension nanoparticulaire à fort taux de solide.

Tableau III.6 : Caractéristiques de formulation et données analytiques de nanoparticules d'Eudragit®RS100 obtenues par nanoprécipitation.

Eudragit®RS100	Acétone	Eau	Nanoparticule	Taille
[% massique]	[% massique]	[% massique]	[% massique]	[nm]
0,5	33	67	0,75	115
1,0	33	66	1,5	112
2,5	33	64,5	3,9	115
5,0	33	62	8,1	109
7,5	33	59,5	12,6	107
10,0	33	57	17,5	119

Les tailles moyennes des particules sont de 112 nm \pm 4 nm pour cette série expérimentale. L'Eudragit®RS100 apparait donc comme un polymère synthétique capable de répondre aux critères du cahier des charges (obtention d'une suspension hautement concentrée en nanoparticules, charge de surface positive pour l'adhésion au poil, stabilité colloïdale satisfaisante, procédé d'obtention industrialisable).

Nous avons inclus le benzoate de benzyle dans la formulation, à hauteur de 1% massique de la suspension finale. Par ailleurs la nature du solvant organique a été étudiée en se basant sur une formulation contenant 2 %massique en particule dans la suspension finale (1% massique de polymère, 1% massique de benzoate de benzyle).

Nous avons utilisé des solvants basiques de type alcools principalement pour leurs miscibilités totales dans l'eau et leur capacité à former une phase organique homogène avec l'Eudragit®RS100 et les matières actives utilisées dans nos travaux de recherche. Nous présentons par la suite les résultats obtenus avec l'acétone, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol [de Filippis, 1995].

Tableau III.7 : Effet de la nature du solvant sur les caractéristiques finales des nanoparticules.

Type de solvant	Temps de dissolution	Taille moyenne	Potentiel zêta
	[heure]	[nm]	[mV]
Acétone	0,25	135	51
Ethanol	4	158	50
Methanol	1	172	51
Isopropanol	12	159	77

L'acétone est un solvant présentant plusieurs avantages en termes de volatilité (élimination du solvant rapide).

L'éthanol, le méthanol et l'isopropanol ont permis l'obtention de suspensions nanoparticulaires de distribution de taille resserrée mesurée par DLS présentant une stabilité colloïdale supérieure à 12 mois de stockage à 25°C. Pour des raisons de toxicité nous avons écarté le méthanol de nos formulations. L'isopropanol a également été écarté pour des raisons de coût en temps (12 heures pour l'isopropanol contre 4 heures pour l'éthanol). L'éthanol ne présentant pas de toxicité notable dans une formulation pour un usage topique, il a été envisagé de le conserver dans la formulation finale. De plus, l'éthanol jouera un rôle de conservateur.

La Figure III.6 et III.7 présentent la distribution de taille obtenue par DLS et des images de MEB de la formulation dite de référence. Cette formulation a été obtenue à 25°C après introduction de la phase organique dans la phase aqueuse sous agitation magnétique modérée, basée sur un rapport 1 : 1 en Eudragit®RS100 : benzoate de benzyle, avec l'éthanol en tant que solvant.

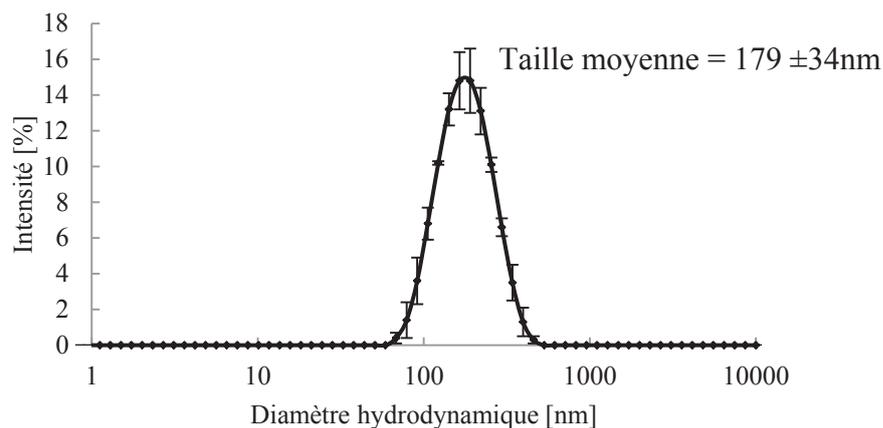


Figure III.6 : Distribution granulométrique obtenue par DLS de la formulation de référence. Distribution de taille exprimée en intensité de lumière diffusée.

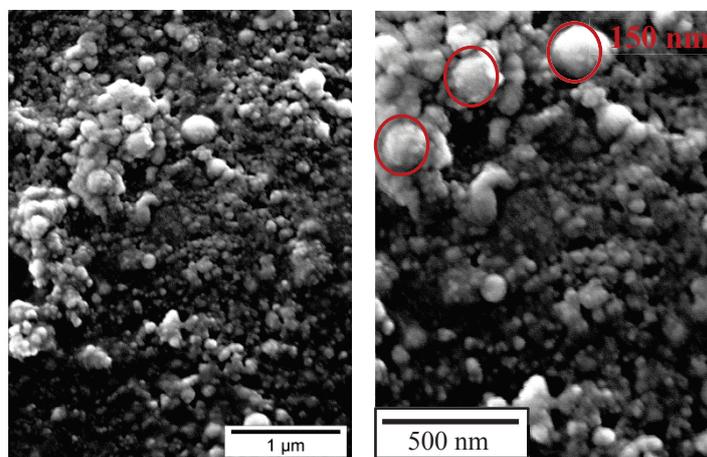


Figure III.7 : Images MEB d'un dépôt de suspension nanoparticulaire de la formulation de référence.

Les images MEB présentent des particules de taille plus faibles avec une polydispersité importante par rapport aux résultats obtenus par DLS. Des particules d'environ 150 nm ont été observées, présentant un aspect de surface non lisse, d'aspect nodulaire. L'aggrégation visible des particules pourrait être due au séchage des particules avant leur observation par MEB.

La distribution de taille des particules obtenue par DLS surestime la taille réelle des particules visualisées en microscopie. Deux explications sont données à cette différence :

- Le rayon hydrodynamique mesuré par DLS correspond à celui d'une particule théoriquement sphérique entourée de sa couche diffuse ;
- Les résultats d'analyse obtenus en utilisant les données en intensité sont très sensibles aux agrégats et aux particules de taille les plus grandes. Il est à noter que les résultats

obtenus en granulométrie pour la formulation de référence ont été sensiblement comparables pour des résultats exprimés en intensité, volume et nombre.

La taille moyenne observée par DLS en intensité est de 179 nm, l'indice de polydispersité donné par le logiciel Malvern étant de 0,140 ; la suspension est considérée comme faiblement polydisperse. Nous avons augmenté le pourcentage massique en particules dans la formulation jusqu'à 20 % massique, en conservant 50% de matière active par nanoparticules. Les résultats d'analyse par DLS ont été semblables à ceux présentés dans la Figure III.6. Des observations par MET ont été effectuées, donnant accès aux images présentées dans la Figure III.8.

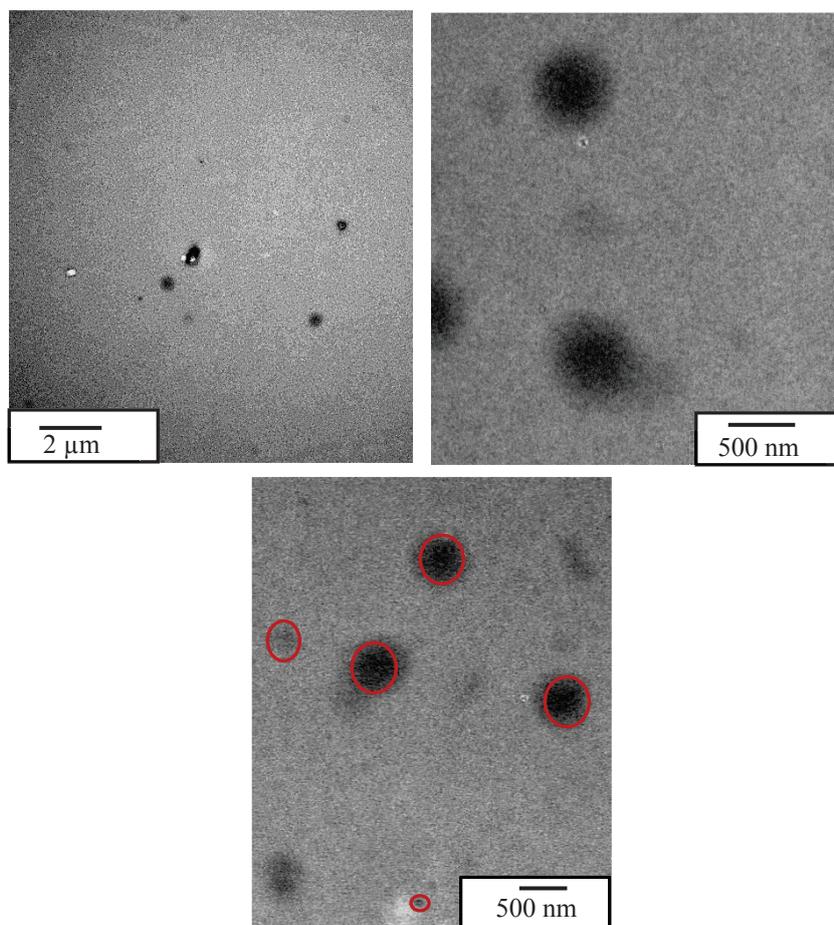


Figure III.8 : Images MET d'un dépôt de suspension nanoparticulaire de la formulation de référence.

Les tailles de particules obtenues par MET correspondent aux tailles obtenues par MEB et DLS (entre 150 et 200 nm). Des particules de taille plus grandes (jusqu'à 350 nm) ont été observées, elles correspondent probablement aux systèmes agrégés visibles en MEB. Une structure interne de type sphère a été difficilement visualisée, la matière active se trouve sous forme de plusieurs mini réservoirs au sein d'un objet d'environ 200 nm. Une étude systématique sur la formulation de nanoparticules à base d'Eudragit® RS100 a été nécessaire.

II.4. Etude paramétrique de formulations de nanoparticules d'Eudragit[®]RS100 chargées en benzoate de benzyle

Le procédé de fabrication a consisté à verser une phase organique constituée d'Eudragit[®]RS100, de benzoate de benzyle et d'éthanol, dans une phase aqueuse constituée exclusivement d'eau déionisée. La nanosuspension finale est ainsi obtenue sans étape d'évaporation de solvant ni de concentration.

Dans cette partie, nous décrivons l'influence des paramètres de formulation (intensifs et extensifs). La stabilité colloïdale a été suivie pendant deux mois de stockage en étuve à 40°C.

Un examen approfondi de l'influence du pH et de la force ionique sur la stabilité des nanoparticules en suspension a été réalisé.

II.4.a. Solubilité du benzoate de benzyle dans des mélanges éthanol/eau

Le profil de solubilité à l'équilibre du benzoate de benzyle dans l'éthanol absolu, dans l'eau et dans divers mélanges éthanol/eau a été déterminée par une méthode de mélange par agitation en flacon. Un gramme de benzoate de benzyle a été additionné à une phase de dissolution (eau, éthanol ou mélange) afin de constituer un mélange final de 10 grammes. Les flacons ont été scellés pour éviter toutes modifications dues à l'évaporation du solvant. Les mélanges ont été agités pendant 24 heures à température contrôlée ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) sur un mélangeur à rouleaux. Un retour à l'équilibre a été généré par l'arrêt de toute agitation pendant 6 heures. Le benzoate de benzyle ayant une densité de $1,12 \text{ g/cm}^3$, la partie non solubilisée se trouve en fond de bouteille dans le cas d'une phase continue insuffisante pour la solubilisation de la quantité de benzoate de benzyle introduite. Le surnageant a été correctement dilué et le benzoate de benzyle a été dosé par HPLC. Le profil de solubilité expérimental est reporté en Figure III.9.

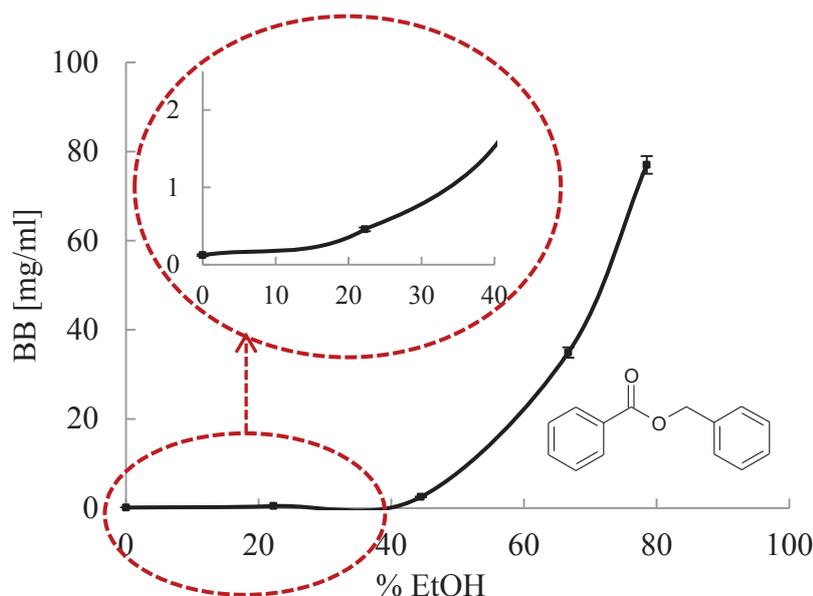


Figure III.9 : Evolution de la solubilité du benzoate de benzyle dans des mélanges eau/éthanol en fonction du pourcentage en éthanol (% massique) à 25°C (n = 3).

La solubilité mesurée du benzoate de benzyle dans l'eau est de 122 $\mu\text{g/ml}$ à 25°C. Cette valeur augmente drastiquement à partir d'un pourcentage en éthanol de 20 % massique. Les points expérimentaux mesurés pour des systèmes monophasiques n'ont pas été représentés car les systèmes ne sont pas dans un état d'équilibre.

D'après cette étude de miscibilité, nous pouvons envisager la présence d'une faible quantité de benzoate de benzyle à l'extérieur des nanoparticules après leur fabrication. La présence de molécules actives en phase continue peut être bénéfique pour un effet immédiat de la formulation. Cette efficacité immédiate du produit final, régulée par la quantité de benzoate de benzyle présent en phase continue, est par conséquent dépendante de la teneur en éthanol.

II.4.b. Variables intensives, paramètres de procédés.

Le débit d'injection, la température et le mode d'incorporation ont été étudiés en utilisant une formulation composée de 1% massique de benzoate de benzyle, 10% massique d'Eudragi[®]RS100, 30% massique d'éthanol et 58% d'eau déionisée.

i. Le débit d'injection

Le débit d'injection de la phase organique dans la phase aqueuse a été étudié en utilisant un système d'injection équipé d'une seringue avec une aiguille immergée dans la phase aqueuse (procédé de nanopréciipitation à l'échelle laboratoire décrit dans la littérature [Mora Huertas, 2011]).

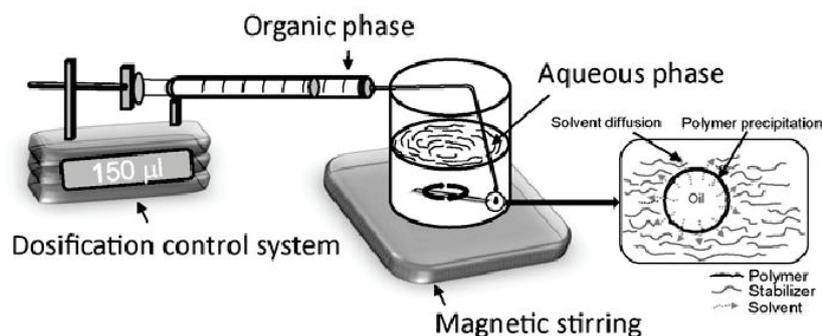


Figure III.10 : Procédé de nanoprecipitation couramment décrit dans la littérature.

Les résultats d'analyse de taille et du potentiel zêta n'ont démontré aucune différence significative dépendante du débit d'injection. Aussi, dans un but d'un transfert à l'échelle industrielle, nous avons effectué les fabrications par nanoprecipitation de la manière la plus robuste et reproductible possible, en versant directement la phase organique sur le vortex d'agitation de la phase aqueuse.

ii. La température

Les phases organiques et aqueuses ont été chauffées ou refroidies à la température désirée. La phase organique a été introduite dans la phase aqueuse de manière rapide, sous agitation magnétique modérée.

Les températures étudiées sont comprises entre 4 et 70°C (4, 16, 20, 40, 50, 60, 70°C). Les résultats d'analyse granulométrique et l'analyse du potentiel zêta des différentes formulations n'ont présentés aucune différence significative entre les suspensions de nanoparticules en termes de taille, de potentiel zêta et de stabilité colloïdale ($118 \pm 4\text{nm}$; $\zeta = +60\text{mV} \pm 5\text{nm}$).

iii. Le mode d'incorporation

Le mode d'introduction a été étudié en comparant la précipitation directe (phase organique versée dans la phase aqueuse) et la précipitation indirecte (phase aqueuse versée sur la phase organique). Aucune différence n'a été détectée entre l'introduction de la phase organique dans la phase aqueuse et l'introduction de la phase aqueuse dans la phase organique, en termes de taille, de distribution de la taille et de stabilité. Cependant, la question de l'efficacité d'encapsulation se pose puisqu'une précipitation directe permet une inclusion de la matière

active à l'intérieure de la particule alors qu'une précipitation indirecte conduit à une inclusion de la matière active préférentiellement à la surface des nanoparticules.

II.4.c. Teneur en molécules actives par nanoparticules

Des formulations contenant 10% massique de nanoparticules (Eudragit[®]RS100 et benzoate de benzyle) ont été étudiées en faisant varier le rapport phase interne : polymère. Cette série expérimentale a permis d'étudier l'effet de la teneur en molécules actives des nanoparticules à base d'Eudragit[®]RS100. Le Tableau III.8 rassemble les composants de la formulation ainsi que les résultats d'analyse associés, obtenus juste après fabrication.

Tableau III.8 : Etude de la teneur en benzoate de benzyle des nanoparticules à base d'Eudragit[®]RS100 (%BB/NP) ; n=3. Valeurs des composants exprimés en pourcentage massique.

Benzoate de benzyle	Eudragit [®] RS100	%BB/NP	Taille moyenne	PdI
[%]	[%]	[%]	[nm]	SU
10	0	NA	NA	NA
9,17	0,83	91	400	0,350
8,33	1,67	83	215	0,213
7,5	2,5	75	210	0,135
6,67	3,33	66	180	0,126
5	5	50	170	0,135
3,33	6,67	41	150	0,114
1,67	8,33	33	125	0,102
0	10	0	117	0,098

Des suspensions colloïdales de nanoparticules contenant du benzoate de benzyle ont été obtenues avec différents rapports benzoate de benzyle : Eudragit[®]RS100. Pour des rapports phase interne : polymère variant de 0,2 : 1 (%BB/NP = 33%) à 5 : 1 (%BB/NP = 83%), des nanoparticules de taille comprise entre 125 nm et 210 nm ont été obtenues, présentant une distribution de taille resserrée comme montré sur la Figure III.11.

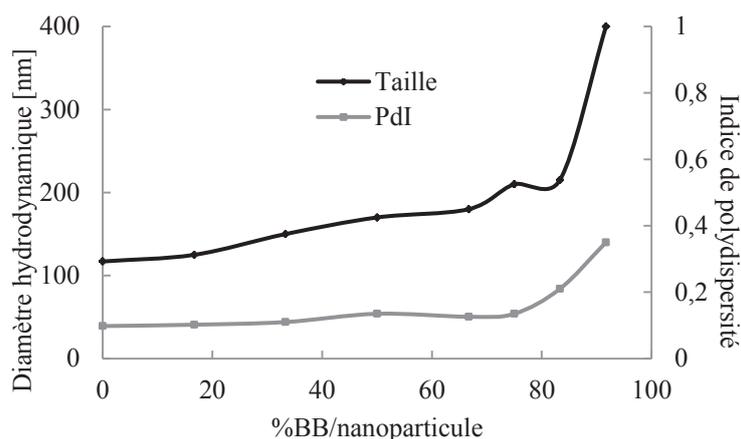


Figure III.11 : Evolution de la taille et de la distribution de taille des particules mesurée par DLS en fonction du pourcentage en benzoate de benzyle par nanoparticule.

L'augmentation de taille des particules avec le rapport phase interne : polymère serait dû à l'augmentation de la viscosité de la phase dispersée, comme nous l'avons précédemment décrit dans la partie II.2 de ce chapitre. Il se formerait des agrégats de particules préférentiellement pour des pourcentages en matière active par nanoparticules élevés. L'indice de polydispersité s'en trouve par conséquent élevé.

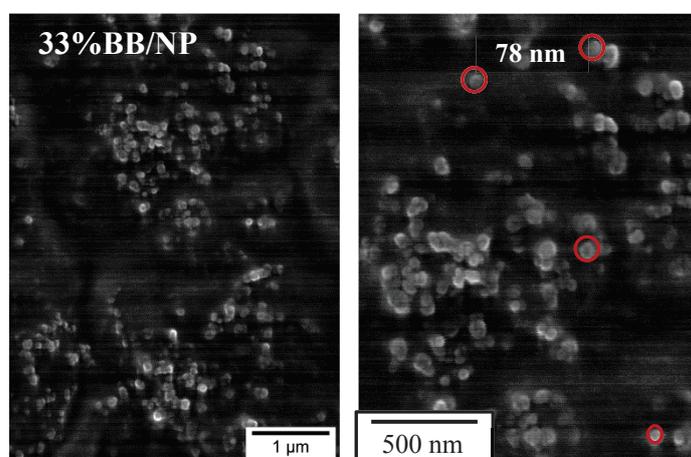


Figure III.12 : Images MEB d'un dépôt d'une suspension nanoparticulaire contenant 33% massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.

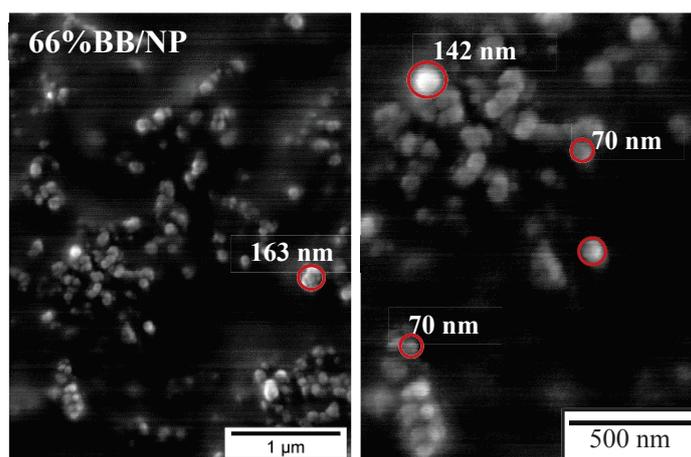


Figure III.13 : Images MEB d'un dépôt d'une suspension nanoparticulaire contenant 66%massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.

Les images obtenues par MEB témoignent de tailles de particules individuelles plus fines que celle obtenues par DLS. Les particules présentent un aspect de surface rugueux, un aspect en « grappe de raisin » est visible quel que soit le pourcentage en benzoate de benzyle par particules, il est d'autant plus visible que ce pourcentage est élevé.

Par conséquent nous avons mis en évidence une distribution de taille de polydispersité moyenne, avec un phénomène d'auto-assemblage créant des structures multiparticulaires, visibles en MEB sous l'aspect de « grappes de raisins ».

Des images MET ont été obtenues pour des formulations de nanoparticules d'Eudragit®RS100 chargées en benzoate de benzyle à différents pourcentages.

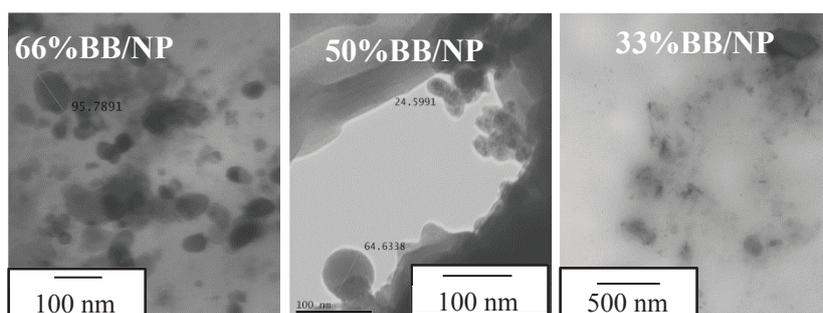


Figure III.14 : Images MET de trois lots de nanoparticules contenant 66, 50 et 33% massique de benzoate de benzyle par nanoparticules.

L'image présentée pour des nanoparticules contenant 50% de benzoate de benzyle par nanoparticules montre la structure matricielle des particules, avec une taille de particules fine et variable. L'évolution des tailles de particules est visible entre les échantillons contenant 50 et 66 % en benzoate de benzyle par particules. Cette observation n'est pas probante dans le

cas d'un pourcentage plus bas en matière active. D'après ces observations, nous pouvons envisager que les tailles mesurées par DLS sont des agglomérats en solution, contenant une multitude de particules de tailles inférieures à 100 nm de diamètre.

Une autre méthode de détermination de la structure interne des nanoparticules est la centrifugation en gradient de densité. Cette méthodologie consiste à séparer les composants d'une formulation par rapport à leur densité. Une capsule aura une densité plus importante qu'une sphère, elle-même plus importante qu'une émulsion dans le cas de molécules actives ayant une densité plus faible que celle de la phase continue. Cette méthodologie n'a pas pu être appliquée dans le cas de la formulation du benzoate de benzyle car cette matière active présente une densité plus élevée que l'eau.

D'après les résultats obtenus nous avons poursuivi nos travaux expérimentaux avec un pourcentage de 50% de benzoate de benzyle par nanoparticules en tant que rapport molécule active de référence.

II.4.d. Rapport phase organique : phase aqueuse

Il a été intéressant de connaître le pourcentage maximum en nanoparticules au sein de la suspension composée d'eau, d'éthanol, de benzoate de benzyle et d'Eudragit®RS100.

L'effet de la quantité de phase organique sur les caractéristiques granulométriques de la suspension finale a été étudié. La phase organique utilisée est composée de 20% massique d'Eudragit®RS100, 20% massique de benzoate de benzyle et 60% massique d'éthanol. La phase aqueuse utilisée est exclusivement composée d'eau déionisée ([NaCl] = 1mM). Le rapport phase organique : phase aqueuse a été varié de 0,1 : 1 à 2 : 1.

Tableau III.9 : Influence du rapport phase organique : phase aqueuse (PO : PA) sur la taille et le potentiel zêta de particules. NA = analyse Non Applicable.

Eudragit®RS100	BB	Ethanol	Eau	PO : PA	Taille moyenne	Potentiel zêta	EE
[g]	[g]	[g]	[g]	SU	[nm]	[mV]	%
0,3	0,3	0,9	15	0,1	165	61	98
0,75	0,75	2,25	15	0,25	178	59	96
1,5	1,5	4,5	15	0,5	185	62	96
3	3	9	15	1	168	59	97
4,5	4,5	13,5	15	1,5	175	70	72
6	6	18	15	2	NA	NA	NA

La Figure III.15 reprend les courbes de distribution des tailles de particules en fonction des rapports phase organique : phase aqueuse (0,25 : 1 en bleu vs 0,5 : 1 en rouge vs 1 : 1 en vert).

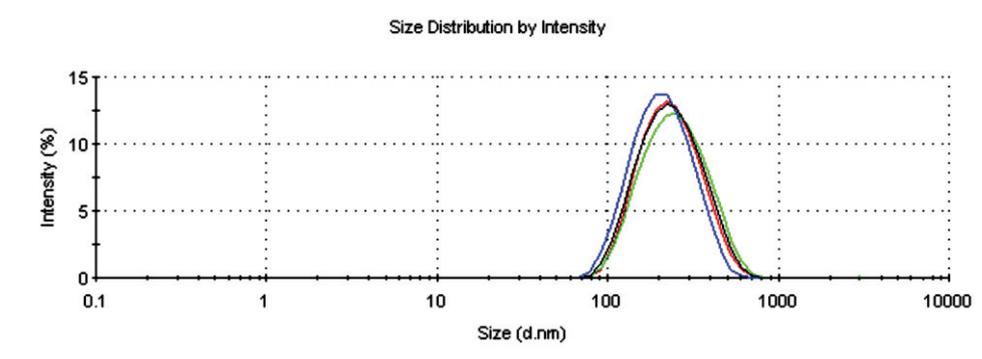


Figure III.15 : Distributions granulométriques obtenues par DLS de trois formulations variant pour leur rapport phase organique : phase aqueuse.

Il est important de noter que pour les formulations avec un rapport PO : PA supérieur à 1, le phénomène de précipitation du polymère n'est pas complet. Il en a été conclu que ce rapport n'influence pas la taille des particules, ni leur distribution de taille pour des rapports étudiés de 0,1 à 1. Le rapport 1,5 a été écarté car le pourcentage en éthanol conduit à une efficacité d'encapsulation relativement basse de 72 %. L'analyse des tailles des particules en fonction du temps en vieillissement accéléré (étuve à 40°C) a confirmé une stabilité colloïdale intéressante. Les résultats d'analyse du potentiel zêta confirment cette stabilité par l'obtention d'une valeur de 65 ± 5 mV juste après la formulation, et après trois mois de stockage en vieillissement accéléré (analyse à t_0 ; $t_{1\text{semaine}}$; $t_{1\text{mois}}$; $t_{2\text{mois}}$; $t_{3\text{mois}}$). Ainsi, afin de formuler des suspensions hautement chargées en nanoparticules et présentant des caractéristiques physico-chimiques intéressantes, nous avons sélectionné un rapport 1 : 1 pour la suite de nos expérimentations.

II.4.e. Etude du pourcentage en solvant organique

Une étude de l'influence du pourcentage en éthanol sur les caractéristiques physico-chimiques ainsi que sur la stabilité colloïdale a été nécessaire. Les résultats d'analyse sont représentés en Figure III.16.

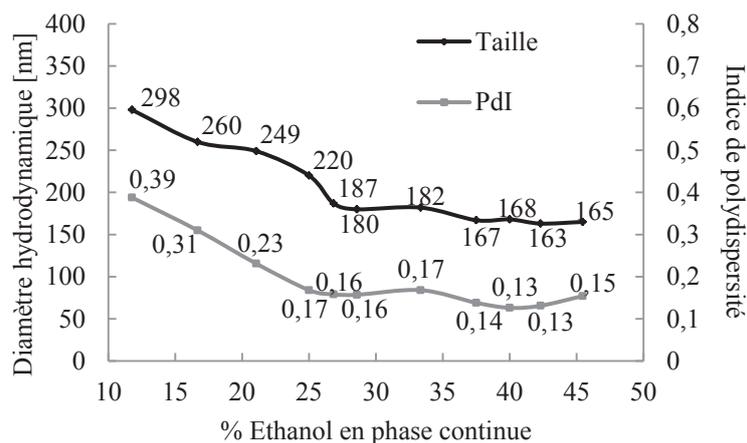


Figure III.16 : Evolution de la taille et de la distribution de taille des nanoparticules en fonction du pourcentage en éthanol dans la phase continue.

L'étude du pourcentage en éthanol a été limitée à des valeurs permettant une solubilité faible de la matière active. C'est pour cela que le pourcentage maximum d'étude a été 40% de la phase continue ; à ce pourcentage le benzoate de benzyle a présenté une miscibilité à hauteur de 1,65mg/ml.

La Figure III.17 présente les courbes de distribution de taille en intensité de 4 formulations contenant 21%, 25%, 33% et 37,7% d'éthanol en phase continue.

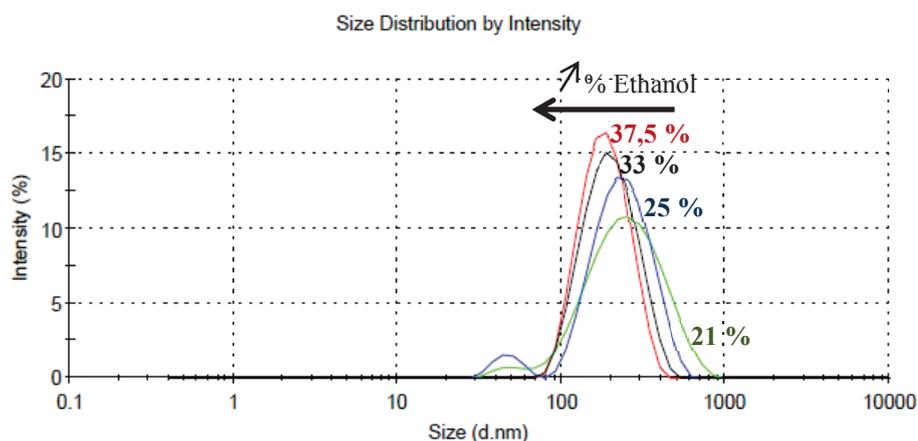


Figure III.17 : Comparaison des distributions de tailles en fonction du pourcentage en éthanol dans la phase continue.

La valeur minimum d'éthanol dépend de la viscosité de la phase organique. Une phase organique contenant une proportion faible en éthanol donne accès à une phase extrêmement visqueuse, l'introduction dans la phase aqueuse devient difficile sans utilisation d'un système d'ajout plus sophistiqué. L'obtention de nanoparticules de taille et de dispersion de taille plus grande (pour des pourcentages faibles en éthanol : 21 % et 25 %) est principalement due à une

viscosité plus importante de la phase organique. Nous pouvons supposer que l'utilisation d'un dispositif d'agitation plus performant pourrait conduire à l'obtention de particules de taille plus faible.

Afin d'obtenir une distribution granulométrique resserrée, et une taille de particule mesurée par DLS de l'ordre de 200 nm, nous avons choisi de poursuivre nos travaux avec une phase continue composée de 37,5 % d'éthanol et 62,5 % d'eau déionisée (stabilité colloïdale de 3 ans à 25°C, EE=98%)

Tous les lots ont montré une taille moyenne mesurée par DLS faible, adapté pour une application dermique. La taille moyenne des nanoparticules varie entre 114 à 290 nm. Cette variation est principalement due à une augmentation du pourcentage de matière active par particules et le pourcentage en solvant organique.

La formulation permettant l'obtention de nanoparticules cationiques de distribution de taille resserrée et présentant une taille moyenne de 200 nm a été obtenue avec 10% massique de benzoate de benzyle, 10% massique d'Eudragit®RS100, 30% massique d'éthanol absolu et 50% d'eau déionisée. Cette formulation a été utilisée en tant que formulation de référence pour les études de stabilité et les expérimentations par microscopie à force atomique présentées ci-après.

II.5. Suivi de stabilité colloïdale

Les propriétés de surface des nanoparticules sont dues à la nature chimique des chaînes polymériques dans un environnement spécifique. Elles sont modifiables avec les conditions environnementales telles que le pH et la force ionique des solutions. L'étude des phénomènes engendrés par la variation de la nature de la phase dispersée sur la stabilité colloïdale est donc nécessaire.

II.5.a. Stabilité colloïdale en fonction du pH

La formulation utilisée dans cette étude est composée de 10% massique de benzoate de benzyle, 10% massique d'Eudragit®RS100, 30% massique d'éthanol, 50% d'eau déionisée ([NaCl] = 1mM).

Nous avons dans un premier temps préparé des solutions d'eau déionisée ([NaCl] = 1mM) à différents pH. Quelques gouttes de suspension ont été introduites à ces solutions. Le Tableau III.10 rassemble les données analytiques de la série d'expérience.

Tableau III.10 : Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules chargées en benzoate de benzyle en fonction du pH. n=3.

pH	Taille [nm]	Potentiel zêta [mV]
3	153	+66
4	171	+56
5	180	+51
6,5	170	+48
7,5	161	+49
9	161	+42
10	148	+35
11	146	+34
12	259	+19

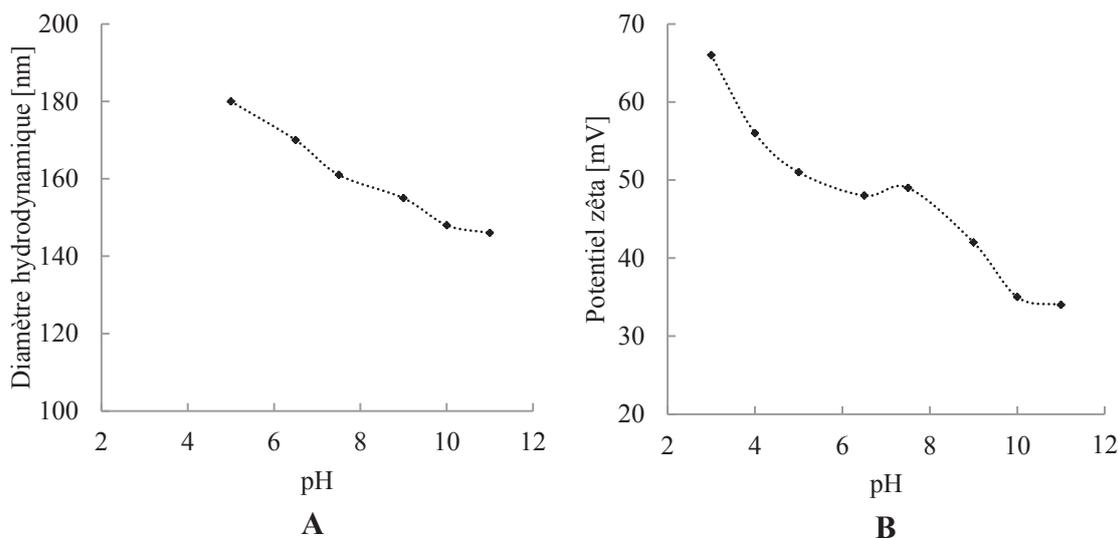


Figure III.18 : Effet du pH de la phase continue sur la taille moyenne des nanoparticules présentant une distribution de taille monomodale (A) et sur leur potentiel zêta (B) (n = 3).

La taille des nanoparticules de la formulation de référence est de 170 nm juste après leur préparation (pH = 6,5). La taille des nanoparticules diminue de façon linéaire avec l'augmentation des valeurs du pH de la phase continue (à partir d'une valeur de pH = 5). Pour toutes les suspensions étudiées, les nanoparticules présentent des valeurs positives de potentiel zêta dans la région de pH analysée. Les valeurs du potentiel zêta décroissent de manière linéaire dans une depuis un pH = 3 à un pH = 11. La Figure III.19 illustre l'effet du pH des suspensions nanoparticulaires sur leur taille et leur potentiel zêta. Nous avons représenté un cas de déprotonation parfait, dans notre cas d'étude des groupements ammonium (cationiques) restent présents sur les chaînes polymériques dans toute la gamme de pH étudiée.

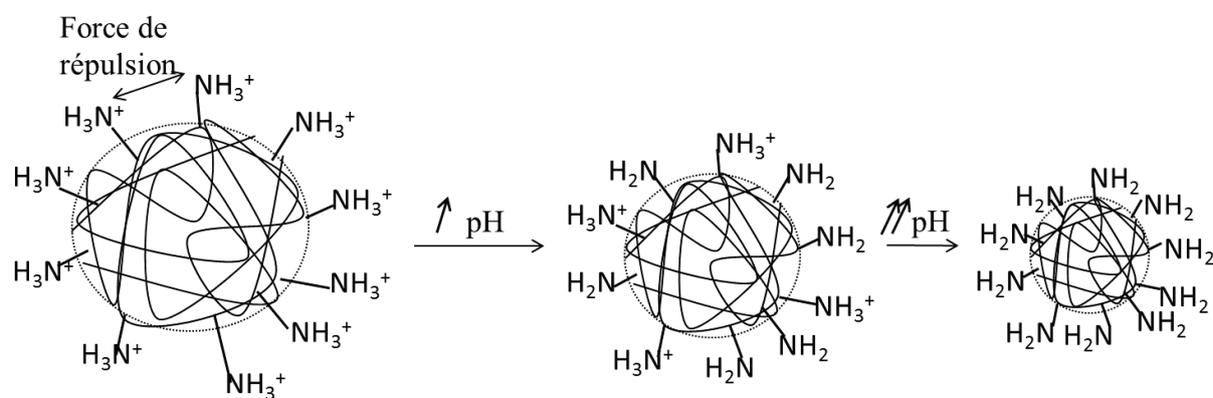


Figure III.19 : Représentation schématique de la déprotonation des fonctions amines avec l'augmentation du pH.

Dans des solutions de pH supérieur à 5, les chaînes polymériques subissent une force de répulsion ionique plus faible en raison de la baisse de protonation, conduisant ainsi à un volume hydrodynamique plus petit, comme représenté sur la Figure III.19.

Dans les solutions de pH inférieurs à 5, nous n'avons pas noté de changements significatifs des tailles de particules. Ces résultats n'ont pas été ceux attendus, car selon le raisonnement décrit précédemment, les chaînes polymériques devraient s'étendre d'avantage en raison de la hausse de protonation, ce qui conduirait à l'augmentation du volume hydrodynamique des nanoparticules. Ces résultats concernant la variation du potentiel zêta en fonction du pH attestent du phénomène de déprotonation des fonctions amines présents sur les chaînes polymériques, confirmant la présence de ces groupements cationiques à l'interface.

De manière plus générale, les nanoparticules présentent une stabilité au pH pour des valeurs de pH allant de 3 à 11. Au-delà, des phénomènes de déstabilisation de type agrégation apparaissent.

II.5.b. Stabilité colloïdale en fonction de la force ionique

L'étude de l'influence de la force ionique sur la déstabilisation de la suspension nanoparticulaire a été conduite de la même façon que pour l'étude de l'influence du pH. Ainsi, des solutions contenant des concentrations en sel monovalent (chlorure de sodium, NaCl) variables ont été préalablement préparées et quelques gouttes de suspensions de référence ont été ajoutées afin d'obtenir des suspensions diluées contenant 0,5%w.w. de nanoparticules. Les suspensions diluées ont été disposées sur des rouleaux pour garantir une agitation uniforme en continue pour une durée de 24 heures. Le Tableau III.11 rassemble les données relatives à cette étude.

Tableau III.11 : Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules chargées en benzoate de benzyle en fonction de la force ionique (n = 3). NA : Non Applicable.

NaCl	Taille moyenne	Potentiel zêta
[mmol/L]	[nm]	[mV]
100	NA	NA
10	192	+31
1	177	+40
0,1	179	+42
0,01	179	+56
0,001	175	+51
0,0001	170	+50

Le diamètre hydrodynamique moyen augmente avec la concentration en chlorure de sodium dans la phase continue. Lorsque les nanoparticules d'Eudragit®RS100 chargées en benzoate de benzyle ont été dispersées dans l'eau déionisée et dans une solution à 1 mM de NaCl, les tailles moyennes ont été similaires (170 nm vs 177 nm). Les dispersions sont stables, ceci est dû aux forces de répulsion électrostatiques dominantes sur les forces d'attraction. Une augmentation d'un facteur 10 de la concentration en NaCl a entraîné une augmentation de la taille notable (177 nm vs 192 nm).

A une concentration de 100 mM de NaCl, les forces d'attraction entre les particules deviennent dominantes. Ceci est dû à un écrantage des charges de surface, les phénomènes de répulsion électrostatique diminuent par conséquent. Une déstabilisation colloïdale est ainsi engendrée et des phénomènes d'agglomération deviennent visibles à l'échelle macroscopique. Dans ces conditions, le diamètre hydrodynamique mesuré a été supérieur à 4000 nm, ce qui s'approche de la limite supérieure de mesure de l'équipement (Zetasizer NanoZS). La mesure de taille pour cette suspension n'a pas pu être validée car l'échantillon a présenté une dispersion de taille trop importante. Il aurait été intéressant de poursuivre ces essais en utilisant des sels divalents ou trivalents.

Par conséquent, une suspension colloïdale formulée à pH = 6,5 dans un milieu de force ionique faible est initialement stable. Sa stabilité dans le temps a été prouvée par l'observation en microscopie électronique à balayage après 1 an de stockage en condition de vieillissement accéléré (40°C).

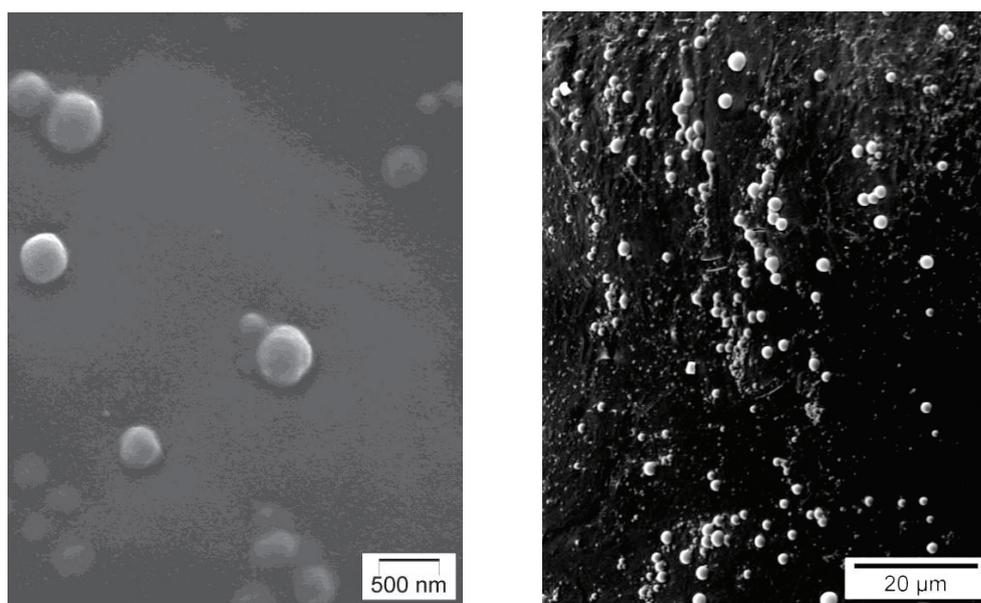


Figure III.20: Images obtenues par MEB de la formulation de référence après 3 ans de stockage en vieillissement accéléré.

II.6. Visualisation des phénomènes d'affaissement par AFM

Les tailles de particules obtenues par DLS ont été déterminées pour des particules dispersées dans l'eau. Il a été nécessaire d'observer les nanoparticules à l'état solide, les phénomènes d'affaissement des nanoparticules ont été étudiés. Pour ce faire nous avons visualisé des nanoparticules obtenues depuis la formulation de référence appliquées sur une plaque de verre de microscope. L'échantillon appliqué a été optimisé au niveau de sa concentration en particules, afin d'obtenir un étalement homogène des particules et non une superposition trop importante d'objets. Les visualisations initiales (quelques heures après dépôt) et après une semaine ont été réalisées. Le facteur de forme a été calculé à partir de mesures sur 30 particules (diamètre et hauteur), selon l'Equation III.1. Des images topographiques présentées en Figure III.21 ont donné accès à une vue d'ensemble des nanoparticules déposées.

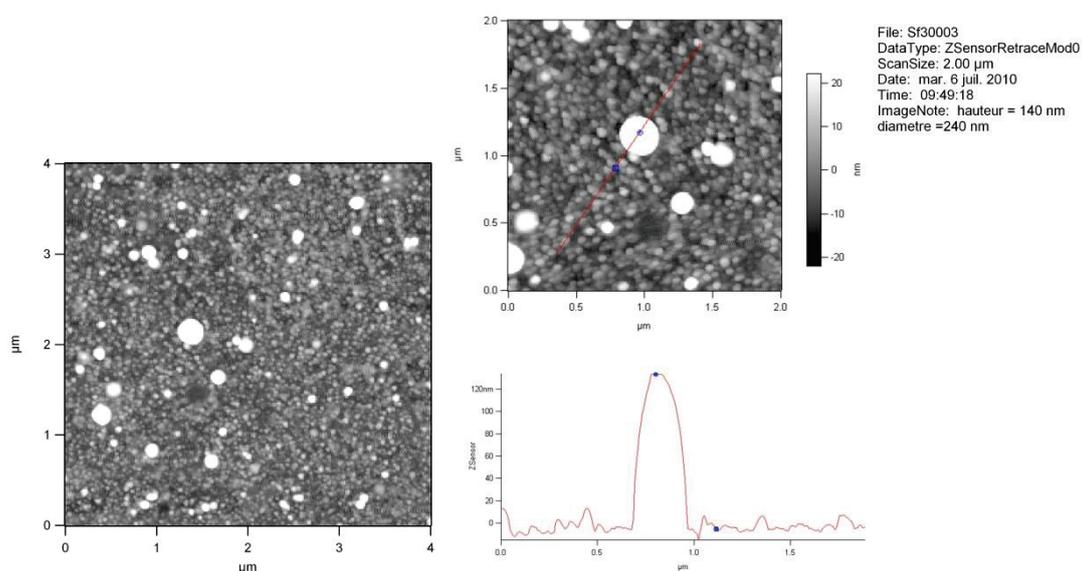


Figure III.21 : Images topographiques obtenues par AFM de nanoparticules de la suspension de référence 24 heures après dépôt sur une lame de microscopie.

Les tailles des objets observés sont en accord avec les analyses DLS effectuées sur la formulation de référence. Une population de particules fines est visible, correspondant à des nanoparticules de tailles inférieures à 100 nm, comme il l'a été observé par MEB.

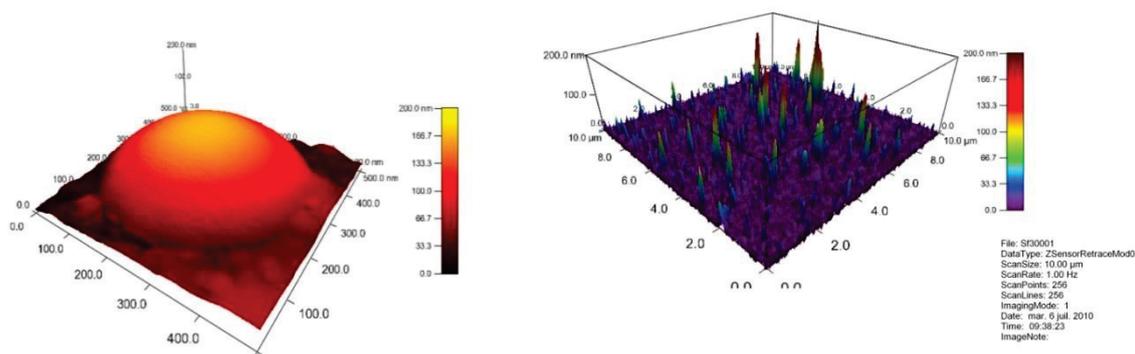


Figure III.22 : Images en trois dimensions de particules de la formulation de référence. (A) image d'une particule individuelle, (B) image de l'ensemble d'une zone analysée.

L'observation d'une particule individuelle en trois dimensions atteste de l'aspect peu rugueux de la surface des particules de 200 nm de diamètre et de leur sphéricité (cf. Figure III.22). Par ailleurs, la visualisation de l'ensemble d'une zone recouverte de nanoparticules atteste de la présence de particules de tailles inférieures à 200 nm.

Le facteur de forme obtenu en moyennant les diamètres et les hauteurs de 30 particules a été calculé sur des particules de taille comprises entre 70 et 300 nm de diamètre.

$$FF_{t0} = \frac{\text{Diamètre moyen}}{\text{Hauteur moyenne}} = \frac{220 \text{ nm}}{70 \text{ nm}} = 3,23$$

Nous avons analysé ces mêmes particules déposées sur une lame de verre après 7 jours à 25°C, à l'abri de la poussière. Nous avons obtenu l'image présentée par la Figure III.23

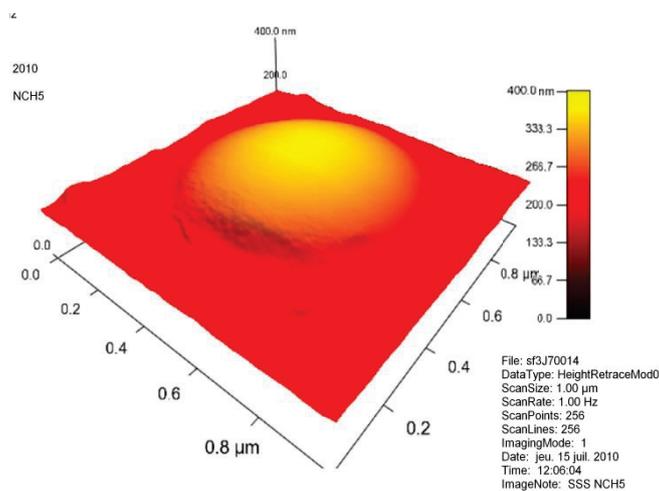


Figure III.23 : Image obtenue par AFM après 7 jours de dépôt sur lame de verre.

Le facteur de forme résultant des nanoparticules après 7 jours d'application a été calculé.

$$FF_{t7} = \frac{220 \text{ nm}}{60 \text{ nm}} = 3,66$$

La variation du facteur de forme est visualisable par superposition des courbes qui témoignent de la taille des particules, comme présenté par la Figure III.24.

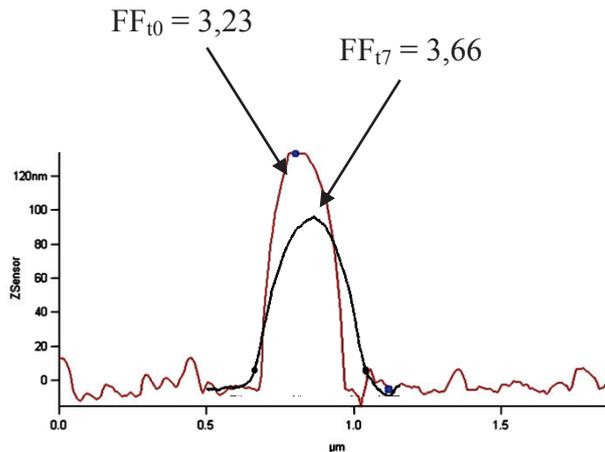


Figure III.24 : Superposition des courbes de taille d'une nanoparticule obtenue par AFM à t_0 (24 heures après dépôt) et $t_{7\text{jours}}$.

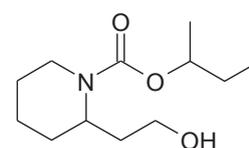
Cette différence de facteur de forme indique un phénomène d'affaissement des particules, début de la filmification des particules. Il a été intéressant d'observer que même si le facteur de forme évolue de manière croissante, la forme sphérique des nanoparticules est conservée après une durée de 7 jours, considéré comme étant un temps infini.

III. Application de la méthodologie à d'autres matières actives à propriétés répulsives

Rappelons que le produit final doit avoir un spectre d'activité large, et qu'une matière active seule ne recouvre pas la protection contre tous les insectes. La formulation finale à envisager devra être composée d'un mélange de matières actives afin de garantir une protection optimale contre la majorité des arthropodes visés. La Picaridin[®] et le DEET sont des molécules actives d'intérêt comme nous l'avons précédemment présenté dans le Chapitre I (efficacité et large spectre d'activité).

III.1. Formulation de la Picaridin[®]

Nous avons travaillé sur l'extrapolation des résultats obtenus avec le benzoate de benzyle à une autre molécule répulsive d'insecte, la Picaridin[®]. Nous avons élaboré un panel de séries expérimentales, les séries les plus probantes sont présentées ci-après.



Le Tableau III.12 rassemble les formulations élaborées ainsi que les résultats d'analyse en termes de tailles, de distribution de taille et de potentiel zêta pour des nanoparticules formulées par nanopréciipitation contenant de l'Eudragit[®]RS100, de la Picaridin[®], de l'éthanol et de l'eau. Les efficacités d'encapsulation mesurées ont toutes été comprises entre 80 et 85%.

L'étude du pourcentage en polymère par nanoparticules a été menée en formulant des suspensions colloïdales contenant 10% massique de Picaridin[®] dans la formulation finale.

Tableau III. 12 : Caractéristiques de formulation et résultats d'analyse de suspensions nanoparticulaires pour l'encapsulation de la Picaridin[®]. %pol/part : pourcentage en polymère par nanoparticule.

Picaridin [®] [%]	% pol/part	Taille [nm]	PdI	Potentiel zêta [mV]	
10	33,3	186	0,13	76,9	
10	42,9	149	0,112	73,4	*
10	45,9	167	0,109	76,6	
10	48,7	174	0,084	64,8	
10	50	208	0,069	88	*
10	52,4	160	0,083	77,5	
10	55,6	237	0,105	103	*
10	60	580	NA	102	
10	63,6	NA	NA	NA	

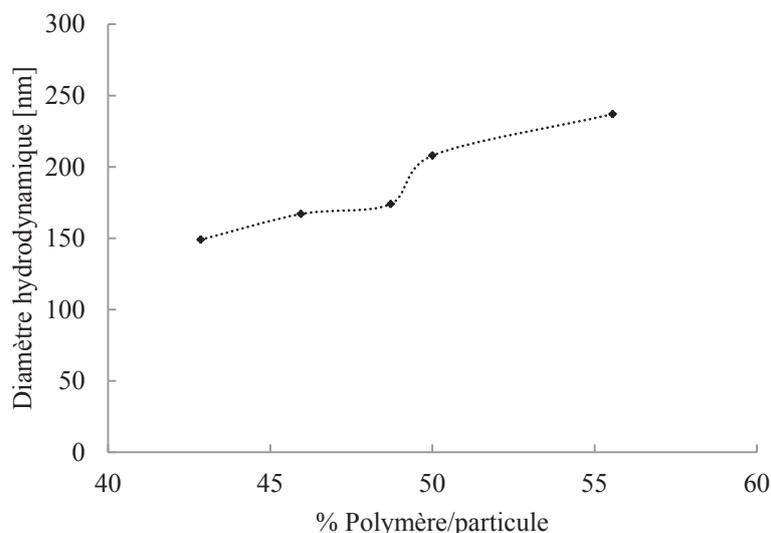


Figure III.25 : Evolution de la taille des particules en fonction de la quantité de polymère par nanoparticule.

La taille des particules est dépendante de la quantité de polymère dans la formulation. Le diamètre hydrodynamique mesuré par DLS évolue de manière linéaire pour un pourcentage en polymère variant de 42 % à 57,5 % (cf. Figure III.25). Pour des formulations contenant un pourcentage en polymère par particules plus faible, des phénomènes de déstabilisation colloïdale apparaissent quelques heures après leur formulation. Il semblerait que la matière active encapsulée n'interagisse pas. Le potentiel zêta présente une évolution anarchique, nous ne pouvons aboutir à aucune conclusion probante concernant la variation de la charge de surface des nanoparticules en fonction du pourcentage en polymère.

Nous avons choisi de travailler sur trois formulations à base de Picaridin[®] présentant des caractéristiques physico-chimiques intéressantes. Elles correspondent aux formulations marquées d'un astérisque dans le Tableau III.12. Nous avons observé ces suspensions par MET (cf. Figure III.26) et par MEB (cf. Figure III.27).

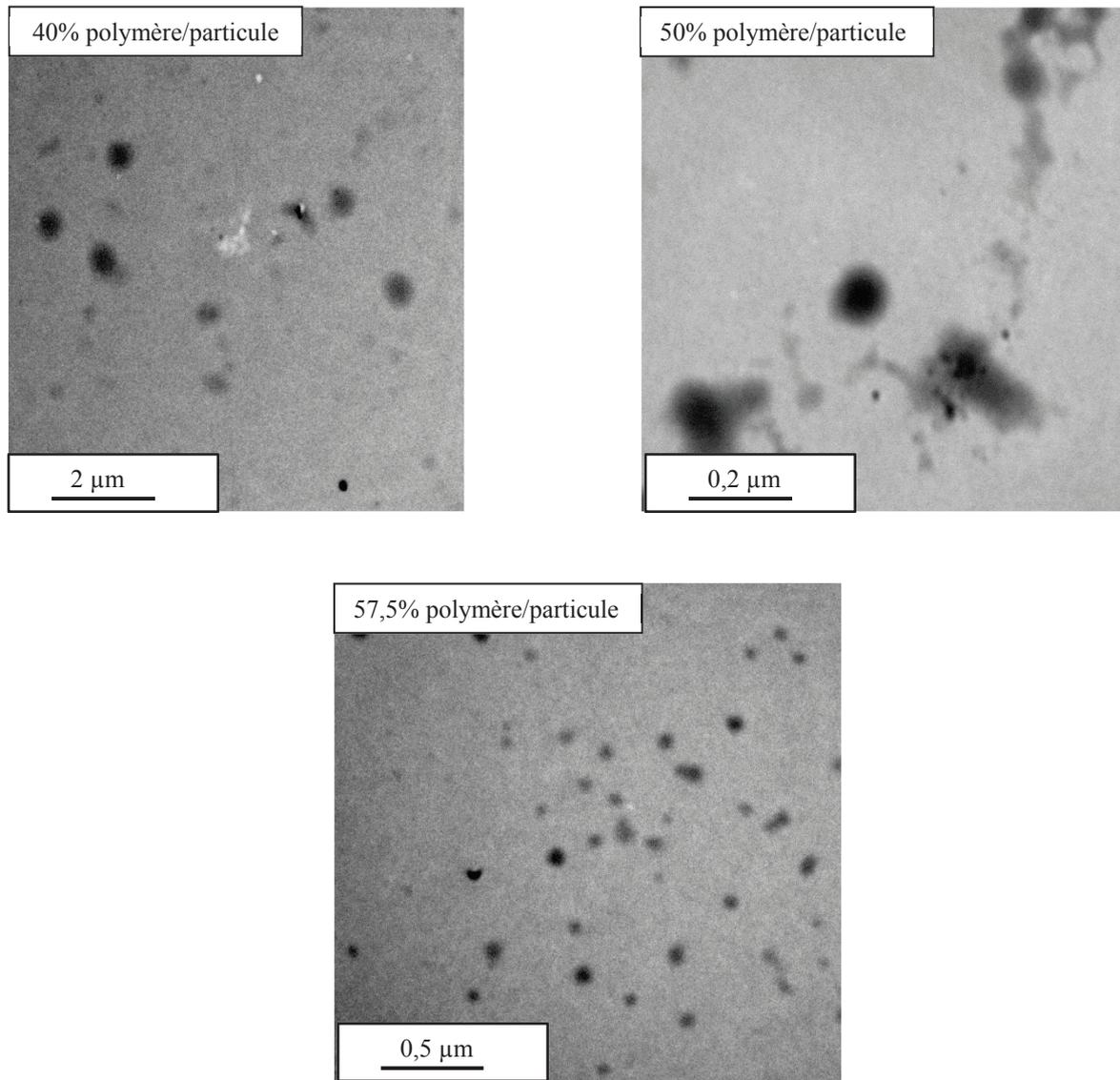
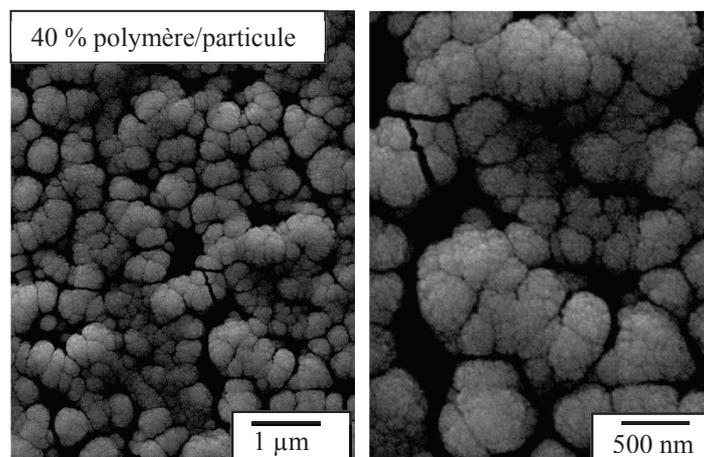


Figure III.26 : Images obtenues par MET de trois lots de particules chargées en Picaridin®.



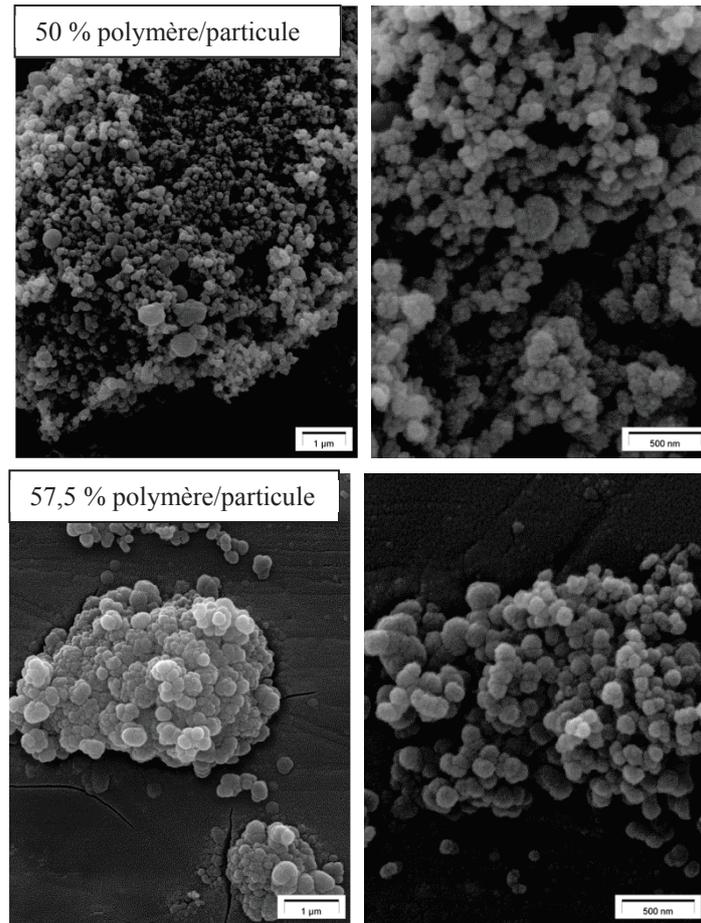


Figure III.27 : Images obtenues par MEB de trois lots de particules se différenciant par leur pourcentage en polymère par particule.

Nous avons pu observer la formation de films de nanoparticules déposées sur un support solide par MEB. La Figure III.28 montre le phénomène d'étalement des particules, qui forment une couche de particules par réarrangement.

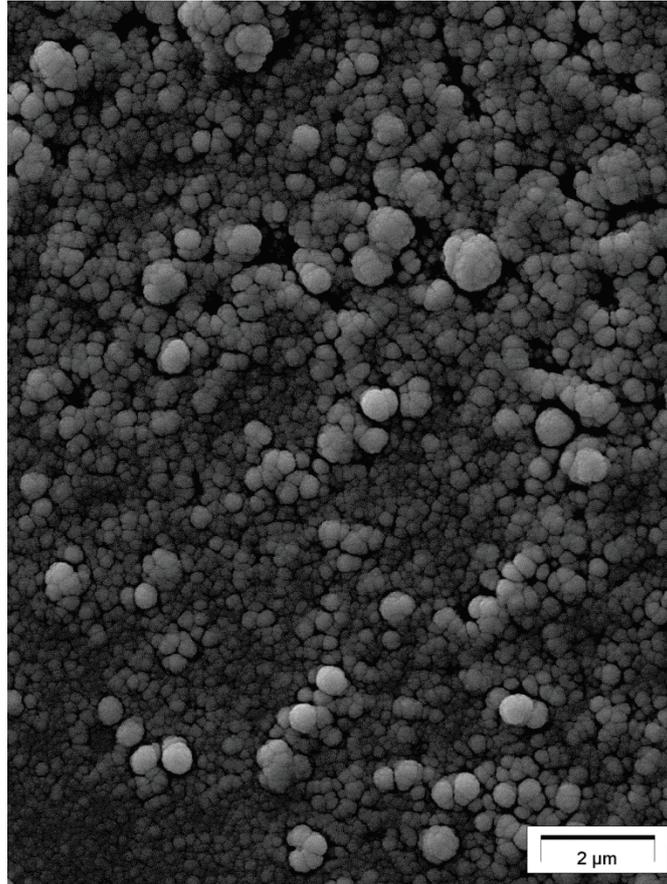
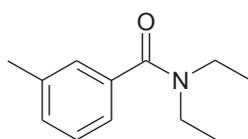


Figure III.28 : Image obtenue par MEB d'une formulation contenant 50 % en polymère par nanoparticule. Visualisation de la formation d'un film de nanoparticules.

Après un suivi de stabilité colloïdale de 2 semaines à 25°C, seules les suspensions formulées avec un pourcentage en polymère compris entre 42% et 48% permettent l'obtention d'objets colloïdaux de tailles inférieures à 200 nm pour une distribution de taille resserrée (suivi de l'aspect visuel et par DLS).

Pour un pourcentage supérieur, les suspensions ont présenté une instabilité très rapide par des phénomènes d'agrégation, ceci est dû au pourcentage trop important en particule dans la suspension. Il apparaît également que pour un pourcentage inférieur à 42% de polymère par nanoparticule, la formation de particules stables n'est pas envisageable.

III.2. Le DEET



Les formulations obtenues avec la Picaridin[®] ont été extrapolées au DEET afin de juger la possibilité de transposition à d'autres molécules actives. Le Tableau III.14 regroupe les données de formulation et les résultats analytiques obtenus pour des formulations à base de DEET.

Tableau III. 13 : Caractéristiques de formulation et résultats d'analyse de suspensions nanoparticulaires pour l'encapsulation du DEET. %pol/part : pourcentage en polymère par nanoparticule.

DEET [%]	Eudragit [®] RS100 [%]	%pol/part	Taille [nm]	PdI SU	Potentiel zêta [mV]
10	5	33,33	155	0,094	72
10	7,5	42,85	144	0,096	66
10	10	50	202	0,086	73
10	12,5	55,55	467	0,857	109
10	15	60	5311	NA	102

Il est donc possible de formuler le DEET, référent dans le domaine des répulsifs d'insectes, sous la forme de suspensions nanoparticulaires polymériques.

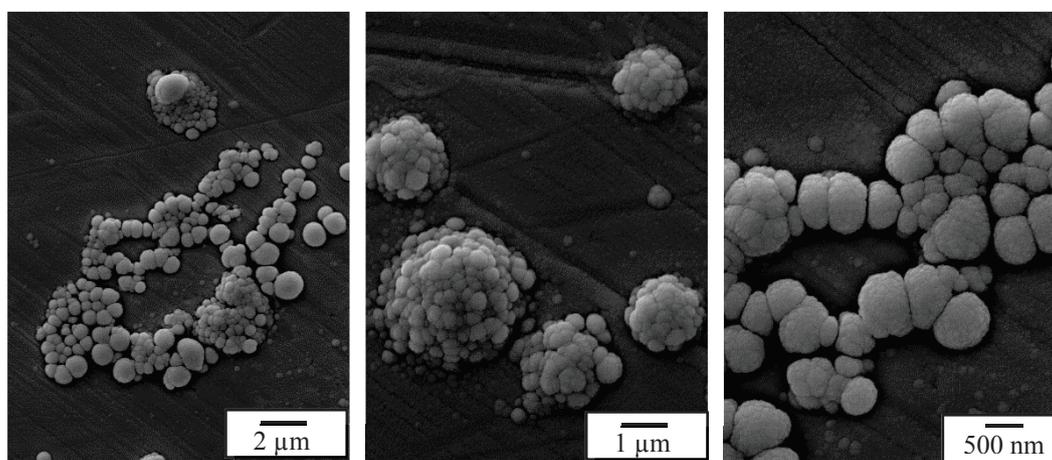


Figure III.29 : Images obtenues par MEB d'une formulation nanoparticulaire de DEET (formulation intermédiaire, 10%Eudragit[®] RS100, 10%DEET).

L'aspect des nanoparticules est semblable à celui obtenu pour les nanoparticules chargées en Picaridin[®].

Conclusion

Des nanoparticules cationiques de 200 nm présentant une distribution de taille resserrée ont été obtenues. Le protocole de fabrication utilisé dérive du procédé de nanoprécipitation, qui est un procédé robuste garantissant la répétabilité et la reproductibilité du procédé de fabrication. Il repose sur la précipitation instantanée du polymère par diffusion du solvant depuis la phase organique jusqu'à la phase continue, provoquant l'agrégation du polymère sous forme de particules colloïdale contenant les molécules actives encapsulées. Le procédé de nanoprécipitation pour l'obtention de suspensions colloïdales a nécessité une seule étape de fabrication, les étapes d'élimination de solvant et de concentration n'ont pas été nécessaires. Le solvant utilisé durant nos travaux étant l'éthanol, sa présence dans la formulation finale garantit un effet conservateur.

Nous avons optimisé la formulation de suspensions de nanoparticules hautement concentrées (jusqu'à 31% massique en nanoparticules), avec un pourcentage en molécules actives de 10% massique de la formule finale. Il est à noter qu'un tel pourcentage en particules obtenu de manière directe, sans étape de concentration, n'a pas été décrit dans la littérature.

D'autre part, la formation des particules ainsi que leurs stabilités ont été obtenus sans agents de surface. Nous avons prouvé que l'ajout de stabilisants n'influence pas les tailles des particules obtenues, leur action a cependant été prouvée en tant que régulateur de la charge de surface des nanoparticules (modification du potentiel zêta).

La taille des particules, le potentiel zêta, la morphologie et l'efficacité d'encapsulation ont été étudiés pour caractériser ces systèmes de délivrance innovants de molécules actives répulsives. Les tailles de particules générées ont présenté des valeurs croissantes dépendantes de la teneur en molécules actives des nanoparticules, de 80 nm pour les particules non chargées à 300 nm pour les nanoparticules hautement chargées (75% de molécule active par particule). Il est à noter que cette observation n'a pas été vérifiée pour la formulation de la Picaridin[®].

Dans le cas du benzoate de benzyle, des efficacités d'encapsulation de 95% ont été obtenues pour un pourcentage de 37,5% d'éthanol en phase continue. Cette valeur est principalement le résultat d'une concentration élevée en polymère, d'une miscibilité parfaite du solvant organique dans la phase aqueuse et d'une forte hydrophobicité de la molécule active encapsulée.

Ces caractéristiques conduisent à une précipitation rapide du polymère due au déplacement du solvant organique, piégeant de manière instantanée la matière active hydrophobe au sein de la matrice polymérique en cours de formation.

La morphologie des nanoparticules est variable, elle dépend principalement du pourcentage de matière active par nanoparticule. Nous avons observé une morphologie matricielle pour de faibles pourcentages bas en matière active par particule, puis une morphologie de type capsule (cœur-écorce) pour des pourcentages supérieurs à 60% de matière active par nanoparticule. Ces différentes morphologies ont la capacité de modifier les profils de libération de la matière active.

Par ailleurs, les analyses du facteur de forme ont démontré que les nanoparticules appliquées sur un support solide subissent un phénomène d'aplatissement léger, cependant la formation d'un film continu n'a pas été observée.

Les stabilités des formulations à base de benzoate de benzyle en fonction du pH et de la salinité ont été évaluées, ne démontrant aucun phénomène d'instabilité pour un pH variant de 3 à 11 et pour une salinité inférieure à 10 mM (NaCl).

L'IR3535[®], la Permethrin, différentes huiles essentielles et le DEPA, un analogue structural du DEET ont été formulés seuls ou en mélange avec d'autres molécules actives. Les résultats démontrent une capacité de formulation de ces molécules actives à approfondir.



Chapitre IV



Bioadhésion et interactions avec la cible

« Nous ne connaissons pas le vrai si nous ignorons les causes » Aristote



Introduction	149
I. Formulation et Caractéristiques Physico-chimiques	153
II. Interactions des nanoparticules avec les poils canins <i>in vitro</i>	154
II.1. Matériels & Méthodes	155
II.2. Résultats & Discussions	155
III. Libération <i>in vitro</i>	163
III.1. Matériels & Méthodes	158
III.1.a. Etude de la libération <i>in vitro</i> sur poils canins	158
III.1.b. Etude de la libération <i>in vitro</i> sur papier filtre	158
III.2. Résultats & Discussions	158
III.2.a. Profil de libération du benzoate de benzyle <i>in vitro</i> sur poils canins	160
III.2.b. Profil de libération du benzoate de benzyle sur support cellulosique	160
III.2.c. Comparaison des résultats de libération pour le benzoate de benzyle	161
IV. Etude de la Pénétration Cutanée	164
IV.1. Matériels & Méthodes	165
IV.1.a. Biopsie de peau canine	166
IV.1.b. Mesure de la perte en eau <i>trans</i> épidermique	166
IV.1.c. Montage de la cellule de diffusion	167
IV.1.d. Méthodologie de séparation des couches de la peau	167
IV.1.e. Analyse des données	170
IV.2. Résultats & Discussions	171
V. Etude de la libération <i>in vivo</i> sur beagles	174
V.1. Matériels & Méthodes	174
V.1.a. Formulation et application sur l'animal	174
V.1.b. Echantillonnage	174
V.1.c. Extraction du benzoate de benzyle	175
V.2. Résultats & Discussions	176
V.2.a. Benzoate de benzyle sur les poils	176
V.2.b. Benzoate de benzyle sur la peau	178
Conclusion	180

Introduction

Des systèmes de délivrance à base de nanoparticules ont connu un intérêt croissant dans le domaine de la santé, car ils ont la capacité de modifier les caractéristiques pharmaco-cinétiques et la biodistribution des molécules actives encapsulées [Grazú, 2012 - Couvreur, 1993 - Couvreur, 1995]. Les systèmes nanoparticulaires ont été étudiés pour améliorer l'efficacité de molécules actives en fournissant une protection et un contrôle de la libération [Langer, 1998]. Le design de ce type de système doit considérer la stabilité, l'administration, l'éventuelle absorption et la biodisponibilité au site cible. En contrôlant tous ces paramètres, une application à des intervalles de temps long est envisageable, des doses plus faibles sont concevables et les effets secondaires potentiels peuvent être minimisés [Peppas, 2004]. La libération de molécules actives volatiles est dépendante de leurs caractéristiques intrinsèques (*e.g.* pression de vaporisation, lipophilie ...), du type de formulation dans laquelle elles sont incorporées (dans notre cas les nanoparticules) et des conditions environnantes (*e.g.* température, taux d'humidité). Les molécules actives encapsulées sont soumises à un phénomène de diffusion à travers la matrice polymérique avant d'atteindre le milieu extérieur. La libération et la stabilisation des molécules encapsulées sont fortement influencées par les affinités entre la molécule active et la matrice qui l'enrobe [Boury, 2010]. Les nanoparticules « intelligentes » ont un intérêt particulier en raison de leur aptitude à fournir une libération et un ciblage spécifique et contrôlé. Deux sites cibles sont à prendre en considération dans notre cas d'étude : les poils et la peau du chien. Nous discutons dans ce chapitre des interactions entre les nanoparticules et leurs supports finaux (poils et peau). Les poils de l'animal sont un site privilégié dû leur présence dense en surface de l'animal. Leurs structures particulières, leurs composants, ainsi que leurs caractéristiques de surface doivent être prises en considération pour le développement de nanoparticules pour un ciblage spécifique [Wertz, 1989 – Robbins, 2012]. La peau quant à elle est un organe complexe dont le rôle de barrière a deux fonctions distinctes : elle freine l'entrée ou la sortie de composés (diffusion d'eau depuis le milieu interne ou entrée de composés toxiques depuis l'environnement externe). Des phénomènes d'échanges ont continuellement lieu (sécrétion de sébum, échange thermique), l'intromission d'une molécule active appliquée sur la peau dans le milieu interne est possible par voies intercellulaire, intracellulaire ou folliculaire [Lademann, 2011]. Ces phénomènes de pénétration cutanée sont liés aux caractéristiques physico-chimiques des molécules ou des complexes appliqués. Comme il l'a été décrit par Vogt, dans le cas de nanoparticules, la taille est une caractéristique

d'importance intervenant au niveau de leur lieu de stockage dans le *stratum corneum* et plus particulièrement dans les follicules pileux [Vogt, 2006]. L'examen des interactions entre la peau et les nanoparticules a été décrit par Schneider et al. [Schneider, 2009]. De nombreuses études cliniques soutiennent l'hypothèse que les particules de tailles supérieures à 10 nm de diamètre sont peu susceptibles de pénétrer à travers la couche cornée dans la peau humaine viable [Prow, 2011]. Les aspects théoriques et pratiques de la pénétration cutanée de formulations de molécules actives ont été l'objet de nombreux textes de références, rapportés par Roberts et al [Roberts, 2002], Monteiro-Riviere et Baroli [Monteiro-Riviere, 2010], qui discutent des sites potentiels pour le ciblage des nanoparticules ; ils comprennent la surface de la peau, les sillons, et les follicules pileux [Baroli, 2010]. Le débat sur la pénétration cutanée des nanoparticules est alimenté par la nécessité rigoureuse des approches multidisciplinaires, rencontrées pour les produits étudiés en vue d'un développement industriel.

Nous avons exposé dans le Chapitre II la détermination d'une taille et d'un potentiel zêta caractéristiques à une application en surface de l'animal. Les particules cationiques de PMMA de 200 nm de diamètre s'introduisent dans le follicule pileux et dans le *stratum corneum* (cf. Chapitre II). Les charges positives à la surface des particules interagissent de manière électrostatique avec les poils de l'animal. Ces lieux de stockage stratégiques seraient des garants d'une rétention longue des particules. Des nanoparticules préservées de l'élimination rapide (e.g. actions mécaniques de friction) pourront protéger l'animal contre les arthropodes pendant une période bien plus importante que dans le cas de formulations basiques de type solution. Cependant, ces résultats obtenus sur des particules de PMMA sont qualitatives (cf. Chapitre II), et la nature polymérique de la particule intervient dans les phénomènes de pénétration cutanée. D'autre part les études présentées dans la littérature utilisent des explants de peau humaine (ou de porc), et les phénomènes de pénétration cutanée sont fonction de l'espèce traitée, notamment chez des espèces animales poilues où l'on soupçonne une importance considérable du passage par voie *trans*-folliculaire. C'est pour cela qu'une étude de pénétration cutanée donnant accès à des résultats quantitatifs avec les particules chargées en matière active a été nécessaire en utilisant des explants de peau canine.

Nous présentons dans ce chapitre trois études nécessaires pour le développement d'une formulation innovante de produits répulsifs sprayable.

L'étude des interactions entre les nanoparticules et les poils canins implique des mécanismes d'adsorption et de désorption résultant d'interactions à l'interface solide/liquide. Ces phénomènes ont été analysés dans nos travaux de recherche au travers des variations du

potentiel électrocinétique des fibres pileuses en contact avec des nanoparticules. Nous avons utilisé dans cette étude des nanoparticules sans molécules actives et des nanoparticules contenant de la Picaridin[®] car il est un candidat d'intérêt dans le développement d'un produit répulsif.

Pour rendre compte des phénomènes d'adhésion pouvant influencer les phénomènes de libération de la molécule active, une méthodologie spécifique d'étude des profils de libération a été mise au point, adaptée à notre cas d'étude. La littérature décrit l'étude de la libération de molécules actives encapsulées au travers d'expériences en milieu aqueux. Peppas a quant à lui étudié la libération de parfums par des analyses thermodynamiques [Peppas, 1996]. Les conditions bien spécifiques fixées par l'application finale du produit répulsif imposent le développement d'une méthode d'analyse spécifique dans des conditions expérimentales mimant au mieux les conditions réelles. Par conséquent l'influence des interactions poils/particules et les particularités de la diffusion des molécules actives depuis des nanoparticules qui adhèrent sur ce support sont exposées. Afin d'assurer un effet réservoir des particules étudiées nous exposons l'influence de la matrice polymérique sur la libération de molécules actives au travers des résultats comparatifs entre la forme libre (solution) et la forme encapsulée (suspension nanoparticulaire) du benzoate de benzyle en tant que molécule active modèle. Les supports *in vitro* de la formulation ont par conséquent été des poils canins d'une part et des supports standards de type cellulosique (papiers filtres) d'autre part. L'utilisation de support de type papier filtre est un outil de choix pour deux raisons : l'influence des spécificités des fibres pileuses a été déterminé, ces supports de formulation ont été utilisés dans l'étude d'efficacité et par conséquent une corrélation entre la dose et l'efficacité a été obtenue (cf. Chapitre V).

L'extrapolation aux conditions *in vivo* sur beagles est présentée dans ce chapitre, permettant d'apprécier la capacité d'interaction des nanoparticules en condition réelle. Nous avons travaillé sur des beagles dans l'animalerie Merial (Saint Vulbas, France), avec exclusivement une formulation de nanoparticules chargées en benzoate de benzyle.

La répartition des nanoparticules à la surface et dans la peau canine a été étudiée grâce à un dispositif de diffusion statique de type cellule de Franz. Une formulation nanoparticulaire a été comparée à une formulation basique (solution aqueuse) de benzoate de benzyle. L'étude de l'influence d'une matrice polymérique sur la pénétration cutanée et par conséquent le stockage de la molécule active dans la peau est nécessaire pour :

- Rendre compte de l'éventuelle absorption cutanée qui doit être évitée pour une meilleure efficacité (pas de perte de matière active en milieu interne) ;
- Etudier la capacité de stockage des nanoparticules contenant la molécule active encapsulée dans les follicules pileux et dans les couches externes de la peau.

Un point clé de nos travaux a été la validation des résultats expérimentaux. Basés sur des résultats statistiquement validés, la moyenne et l'écart-type (et l'erreur type dans le cas de l'étude de pénétration cutanée) de chaque point expérimental ont été utilisés dans la représentation des résultats expérimentaux.

I. Formulation et Caractéristiques Physico-chimiques

Des dispersions colloïdales de nanoparticules polymériques cationiques à base d'Eudragit[®]RS100 et de benzoate de benzyle (BB) ont été obtenues sous forme de produits pulvérisables et entièrement caractérisées (cf. Chapitre III). Nous avons étudié une formulation de benzoate de benzyle présentant un pourcentage de 50% massique de BB par nanoparticules pour attester de l'influence de la matrice polymérique sur la libération de la molécule active et sur les interactions avec la peau et les poils.

La formulation et les caractéristiques physico-chimiques de la suspension nanoparticulaire à base de benzoate de benzyle (BB-NP) utilisée dans ces études sont rassemblées dans le Tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Composants de la formulation de référence (BB-NP) utilisé dans l'étude de la libération et de pénétration cutanée ; quantités exprimées en pourcentage massique.

Composants	[%]	Taille	Potentiel zêta	EE
Benzoate de benzyle (BB)	10	169 nm	+59 mV	98%
Eudragit [®] RS100	10			
Ethanol absolu	30			
Eau	50			

Une solution alcoolique de benzoate de benzyle a été utilisée en tant que formulation témoin dans l'élaboration des profils de libération *in vitro* (solutions à 10%massique dans l'éthanol). L'étude de la pénétration cutanée a nécessité la préparation d'une suspension et d'une solution à une concentration spécifique en molécules actives afin de respecter une dose d'application spécifique. La dose d'application en condition de traitement réel a été déterminée à hauteur de 196,85 µg de BB par cm² de peau. Le dispositif expérimental (cellule de Franz) donne accès à une zone de traitement de 2,54 cm², étant donné que la quantité appliquée est de 1 ml, nous avons réalisé des formulations contenant 500 µg/ml de molécules actives. La suspension nanoparticulaire à cette concentration a été obtenue par dilution dans l'eau déionisée de la formulation BB-NP décrite dans le Tableau IV.1. La formulation de benzoate de benzyle dite « libre » a été obtenue en solubilisant par ultrasons du benzoate de benzyle dans une solution aqueuse à 5% massique de polyoxyéthylène 20 oleyl éther (Brij 98[®]).

Les formulations ont été préparées et caractérisées juste avant leur utilisation pour l'élaboration des profils de libération et l'étude de la pénétration cutanée. L'étude des profils de libération a été menée en utilisant des solutions éthanoliques contenant 10% massique de molécules actives.

II. Interactions des nanoparticules avec les poils canins *in vitro*

La valeur du potentiel zêta d'une surface solide macroscopique est obtenue par la mesure du potentiel d'écoulement. L'écoulement d'une solution aqueuse électrolytique au travers d'une surface solide dans des conditions opératoires prédéfinies (pression, température) donne accès à ces valeurs. Pendant la mesure, la solution électrolytique s'écoule à travers l'échantillon solide. Il se produit un gradient de pression et une séparation de charge à l'interface solide/liquide. Le potentiel d'écoulement est la réponse électrique générée avec l'évolution de la charge de surface. Ceci permet une vision qualitative de la chimie de ces groupements fonctionnels de surface. L'addition de produits chimiques à la solution aqueuse (*e.g.* nanoparticules) donne en outre un éclairage sur les interactions sélectives de ces composants avec la surface solide étudiée.

II.1. Matériels & Méthodes

L'immobilisation des nanoparticules polymériques à base d'Eudragit[®]RS100 sur les fibres pileuses a été étudiée au travers des variations du potentiel électrocinétique de la surface du poil, en utilisant un zétamètre Surpass (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Le potentiel zêta a été déterminé d'après la mobilité électrophorétique en utilisant l'équation de Smoluchowski [Delgado, 2005] suivant la méthodologie expérimentale décrite dans le Chapitre II. Dans le cas de l'étude de l'adsorption des nanoparticules, l'unité de titration intégrée du SurPASS a permis d'ajouter automatiquement une quantité présélectionnée de nanoparticules en suspension.

Les conditions de pH, de salinité et de température ont été les suivantes : pH = 6,5 ; [NaCl] = 1mM ; T = 25°C. L'échantillon de fibres pileuses ($m_{\text{poils}} = 0,800\text{g} \pm 0,050\text{g}$) a été équilibré pendant 20 minutes (cf. Chapitre II). L'étude d'adsorption des nanoparticules a été élaborée en commençant par la mesure du potentiel zêta des fibres pileuses non-traitées, suivie des mesures après ajouts successifs de suspension nanoparticulaire dans la solution électrolytique. Après injection d'une quantité spécifique de suspension de nanoparticules dans la solution électrolytique, la mesure du potentiel zêta a été répétée jusqu'à ce qu'une valeur stable soit obtenue. Cette étape d'addition de nanoparticules a été répétée après chaque stabilisation de la du potentiel zêta en vue d'obtenir une valeur du potentiel zêta en fonction de la quantité de nanoparticules.

La morphologie des nanoparticules adsorbées à la surface des fibres pileuses a été observée par microscopie électronique à balayage (Hitachi S800), la méthode a été décrite dans le Chapitre II.

Nous avons étudié l'adsorption des nanoparticules cationiques élaborées durant nos travaux de recherche Deux lots de nanoparticules à base d'Eudragit®RS100 ont été utilisés pour l'étude des interactions entre les nanoparticules et les fibres pileuses, une suspension de nanoparticules sans molécules actives (Eud-NP), et une suspension nanoparticulaire chargée en Picaridin® (Pica-NP).

Tableau IV.2 : Formulations utilisé dans l'étude des interactions de surface nanoparticules/poils. quantités exprimées en pourcentage massique.

Composants	Unités	Eud-NP	Pica-NP
Benzoate de benzyle	[%]	0	10
Eudragit®RS100	[%]	10	10
Ethanol absolu	[%]	30	30
Eau	[%]	60	50
Taille	[nm]	98	208
Potentiel zêta	[mV]	+54	+88

II.2. Résultats & Discussions

L'étude de l'adsorption des nanoparticules le long des fibres pileuses a été réalisée à un pH = 6,5, car à cette valeur, la différence entre le potentiel zêta des nanoparticules et des fibres pileuses est le plus important et favoriserait ainsi le processus d'adsorption.

Le potentiel zêta des fibres pileuses est négatif ($\zeta = -25\text{mV}$; cf. Chapitre II) tandis que celui des particules étudiés durant nos travaux de recherche est positif ($\zeta = +45\text{mV}$; cf. Chapitre III). Les variations du potentiel zêta des fibres pileuses sont liées aux réactions d'adsorption ou de désorption de surface des nanoparticules.

Des variations du potentiel zêta de surface ont été observées en fonction du temps et en fonction de la quantité de nanoparticules introduite dans la solution d'électrolyte. Les résultats obtenus sont présentés par la variation du potentiel zêta en fonction de la concentration en nanoparticules dans la solution électrolytique, ils sont représentés en Figure IV.1 et en Figure IV.2.

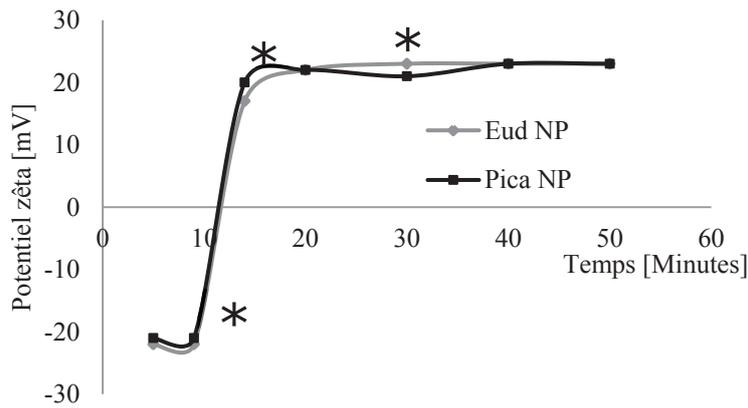


Figure IV.1: Variation du potentiel zêta de surface en fonction du temps et de la quantité de nanoparticules introduites dans la solution électrolytique. *: addition de NP dans la solution électrolytique.

La concentration permettant la saturation de la surface des fibres a été déterminée, comme il l'est présenté dans la Figure IV.2.

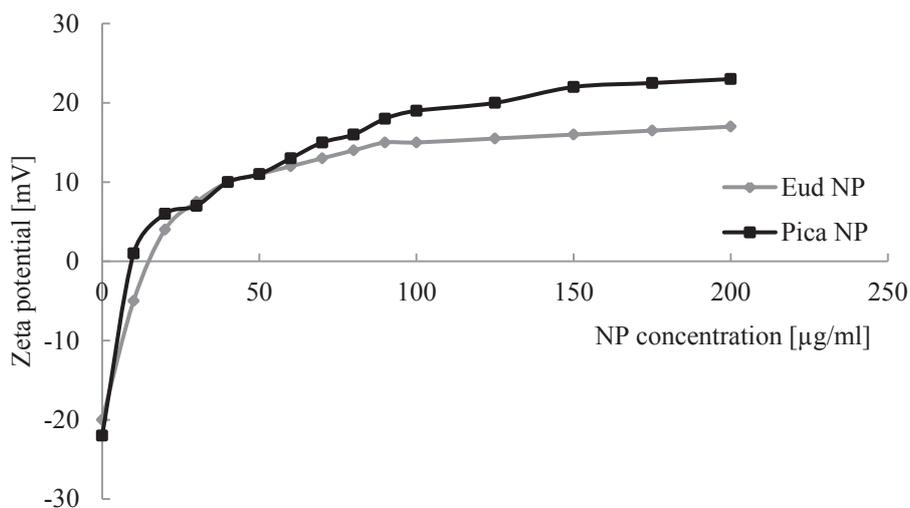


Figure IV.2: Variation du potentiel zêta en fonction de la concentration en nanoparticules dans la solution électrolytique.

Comme présenté sur la Figure IV.2, que ce soit pour les particules chargées ou non chargées, les phénomènes d'adsorption sont très rapides et ont lieu à partir des premiers instants de contact entre les fibres et les nanoparticules.. Une différence importante peut être notée entre les nanoparticules modèles (résultats présentés dans le Chapitre II) et les nanoparticules d'Eudragit® RS100. Pour les nanoparticules modèles à base de PMMA, 1300µg/ml ont été nécessaires pour saturer la surface des fibres de poils contre une concentration de 100µg/ml

pour les particules blanches d'Eudragit[®] RS100 (Eud-NP) et 158 μ g/ml pour les nanoparticules chargées en Picaridin[®] (Pica-NP). Par conséquent, il était possible de conclure que l'Eudragit[®] S100 est un polymère judicieusement choisi qui conduit à une adsorption rapide et instantanée sur les poils canins. Le potentiel zêta optimal des nanoparticules a été défini comme étant une valeur positive, de préférence supérieure (en valeur absolu), à celui de la surface du poil.

Des images MEB ont été acquises, elles sont rassemblées dans la Figure IV.3. Ces images montrent une couche de particules qui forme une gaine autour de la fibre. La répartition des particules est ordonnée et continue.

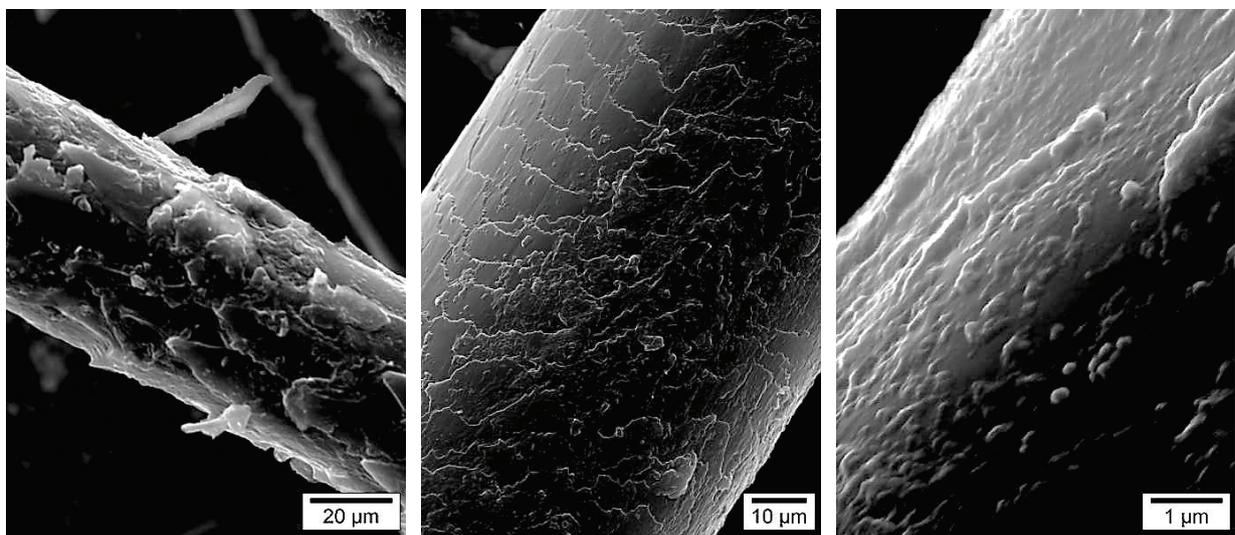


Figure IV.3: Observation MEB de fibres pileuses après adsorption de nanoparticules, le potentiel zêta de la surface de la fibre est stable et égal à +25mV.

Les nanoparticules ont été visualisées tant à la surface des poils que dans leurs écailles. La surface d'adsorption n'est pas une surface lisse et régulière, les fibres capillaires sont variables en termes de longueur, de diamètre et d'aspect de surface. Des modèles de phénomènes d'adsorption de nanoparticules ont été décrits dans la littérature [Adamczyk, 2010]. C'est à cause de la variabilité des formes et surface d'adsorption que l'étude de l'adsorption utilisant des modèles préétablis n'est pas envisageable dans notre étude (modèle RSA, Random Sequential Adsorption pas exemple).

III. Libération *in vitro*

III.1. Matériels & Méthodes

III.1.a. Etude de la libération *in vitro* sur poils canins

Les poils canins ont été collectés sur quatre beagles provenant de l'animalerie de Merial (Saint Vulbas, France). Les prélèvements ont été effectués par tonte sur animaux euthanasiés et les poils n'ont pas subi de lavages afin de conserver l'intégrité des caractéristiques de surface. Les poils ont été pesés sur un papier d'aluminium ($m_{\text{poils}} = 116 \pm 44\text{mg}$) et la formulation de benzoate de benzyle (solution ou suspension) a été appliquée par pulvérisation ($m_{\text{formulation}} = 404 \pm 140\text{mg}$). Ces échantillons ont été disposés dans une étuve dont la température a été fixée à 32°C sous circulation d'air contrôlé afin de mimer la température en surface de l'animal.

La quantité de benzoate de benzyle résiduelle a été déterminée à plusieurs temps d'analyse. A chaque temps d'analyse, les échantillons de poils et le papier d'aluminium ont été placés dans un volume de méthanol (10 ml \pm 5ml selon les temps d'analyse), une étape d'agitation forte par vortex a été réalisée afin de solubiliser tout le benzoate de benzyle avant son dosage par UV-HPLC. La méthodologie s'est appliquée pour un suivi sur 21 jours (t_0 , $t_{1\text{heure}}$, $t_{6\text{heures}}$, $t_{24\text{heures}}$, $t_{2\text{jours}}$, $t_{3\text{jours}}$, $t_{6\text{jours}}$, $t_{14\text{jours}}$ et $t_{21\text{jours}}$) en quadruple. La méthode de quantification du benzoate de benzyle par UV-HPLC a précédemment été décrite dans le Chapitre III.

III.1.b. Etude de la libération *in vitro* sur papier filtre

Des papiers filtres présentant une surface d'application de 0,75 cm² (15 mm de long sur 5 mm de large, Sartorius, France) ont été préparés en tant que support de formulation. Chaque papier filtre a été introduit dans un tube Eppendorf de 1 ml tronqué à ses extrémités (cf. Figure IV.4). Nous avons appliqué une dose de 10 μL (\pm 0,5 μL) correspondant à une imprégnation totale du papier filtre.

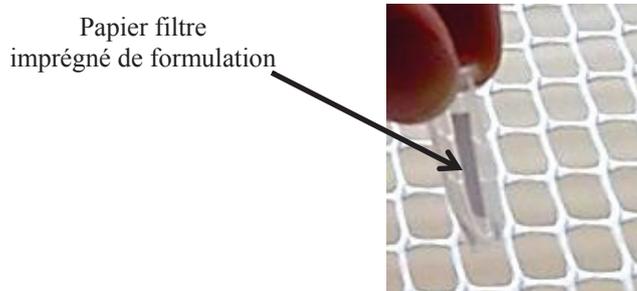


Figure IV.4 : Matériel expérimental utilisé pour l'élaboration de profils de libération.

Les tubes Eppendorf contenant les papiers filtres imprégnés de formulation (suspension ou solution) ont été placés dans une étuve à 32°C sous circulation d'air contrôlée. A chaque temps d'analyse, les tubes ont été immergés dans du méthanol, agités fortement puis la matière active a été dosée par HPLC. La méthode de dosage par HPLC du benzoate de benzyle est décrite dans le Chapitre III de ce manuscrit.

Un suivi sur 21 jours a été réalisé (t_0 , $t_{8\text{heures}}$, $t_{26,5\text{heures}}$, $t_{2\text{jours}}$, $t_{3\text{jours}}$, $t_{6\text{jours}}$, $t_{14\text{jours}}$, $t_{21\text{jours}}$) en quadruple pour chaque formulation étudiée.

III.2. Résultats & Discussions

III.2.a. Profil de libération du benzoate de benzyle *in vitro* sur poils canin

Les profils de libération obtenus depuis une solution et depuis une suspension ont présenté des différences significatives. Cette étude est importante pour l'évaluation de l'efficacité vis-à-vis des arthropodes (Chapitre V). La libération du benzoate de benzyle depuis une solution éthanolique a suivi deux comportements cinétiques consécutifs comme présenté dans la Figure IV.5.

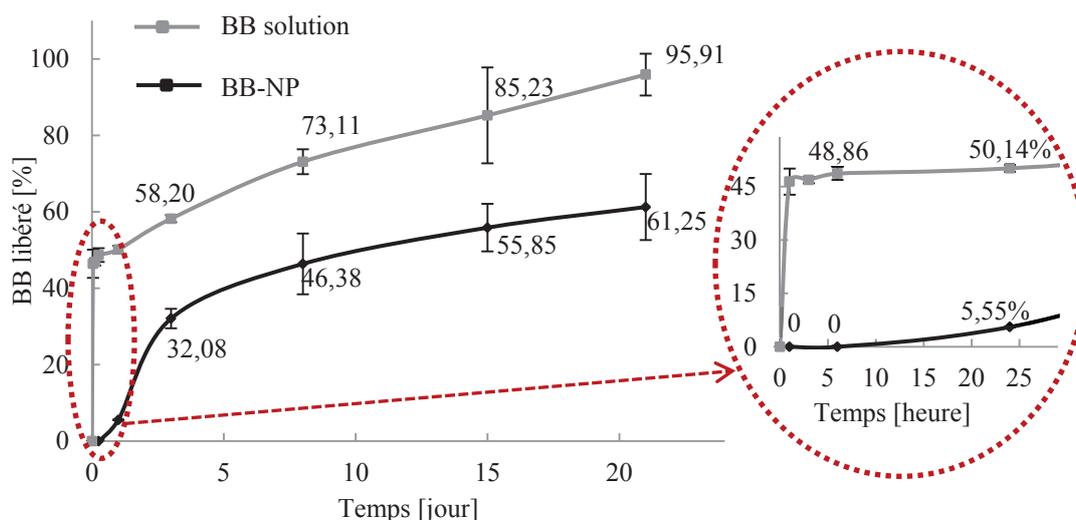


Figure IV.5 : Profils de libération du benzoate de benzyle sur poils canins en fonction du type de formulation.

Durant les premières heures de suivi (entre t_0 et $t_{3\text{heures}}$), la perte en benzoate de benzyle suit une vitesse moyenne d'évaporation de $132 \mu\text{g}/\text{heure}$ (perte de 49 % de la dose appliquée). Puis la perte de benzoate de benzyle en fonction du temps (depuis une solution) est d'ordre zéro en conformité avec l'Equation I.7 ($Q_t = k_0 t$). L'analyse de régression linéaire des données à partir de 3 heures jusqu'à 21 jours de suivi a abouti à l'équation $Q_t = 2,35 t + 49,20$.

Au contraire, la libération du benzoate de benzyle depuis des nanoparticules est dilatoire, présentant un profil de libération selon le modèle d'Higuchi (Equation I.9, $Q_t = k_H t^{(1/2)}$) caractéristique des phénomènes de diffusion au travers d'une matrice polymérique ($Q_t = 14,27 t^{(1/2)}$, $R^2 = 0,95$).

Le benzoate de benzyle encapsulé dans des nanoparticules diffuse dans l'air à hauteur de 5,55 % de la dose appliquée dans les premières 24 heures de l'étude, alors que la perte de benzoate de benzyle depuis une solution éthanolique s'élève à 51,15 % pour le même temps d'analyse. Après 21 jours, la présence résiduelle de benzoate de benzyle dans les

nanoparticules a été prouvée, alors que le benzoate de benzyle initialement présent dans la solution a été totalement éliminé.

Par conséquent, le benzoate de benzyle encapsulé continue de diffuser au travers de la matrice polymérique 21 jours après l'application d'une suspension nanoparticulaire sur des échantillons de poils canins. La présence d'un réseau de chaînes polymériques apporte une barrière à l'évaporation des molécules actives encapsulées, contraintes de diffuser au travers de la matrice polymérique avant leur évaporation.

Il y a d'une part la barrière constituée par la matrice polymérique et d'autre par la nature du support d'application. Le comportement d'évaporation discontinue observé pour la perte en benzoate de benzyle depuis une solution apporte des informations sur les phénomènes physiques pouvant retarder l'évaporation de la matière active. La structure physique du poil ainsi que la présence de sébum modifieraient le profil d'évaporation de la matière active sans excipient.

III.2.b. Profil de libération du benzoate de benzyle sur support cellulosique

Afin de contourner l'effet de la structure des fibres pileuses, les profils de libération du benzoate de benzyle depuis une solution éthanolique et une suspension nanoparticulaire appliquées sur des supports cellulosiques ont été réalisés. Les résultats expérimentaux sont présentés dans la Figure IV.6.

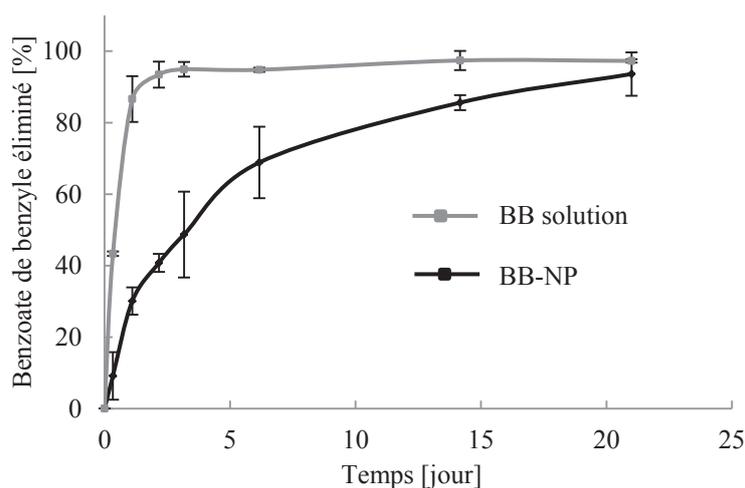


Figure IV.6 : Profils de libération du benzoate de benzyle sur support cellulosique en fonction du type de formulation.

Le suivi de la perte du benzoate de benzyle depuis la solution éthanolique démontre une évaporation rapide et linéaire avec 87 % de matière active éliminée dans les 26 premières heures, conformément à une équation d'ordre zéro (Equation I.7) ($Q_t = 82,73 t$).

Dans le cas du benzoate de benzyle encapsulé, une perte de 10 % de la dose appliquée a été observée après 26,5 heures. Le modèle d'Higuchi corrèle les données expérimentales obtenues ($Q_t = 22,98 t^{(1/2)}$; $R^2 = 0,95$) dans le cas des nanoparticules. Le Tableau IV.3 rassemble les données analytiques essentielles concernant la libération du benzoate de benzyle depuis une solution et une suspension nanoparticulaire.

Tableau IV.3 : Caractéristiques la libération du benzoate de benzyle (BB) depuis la suspension nanoparticulaire de référence et la solution éthanolique. ML : Modèle de libération.

	Dose initiale	BB après 8 heures	BB après 26,5 heures	ML
	[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	
BB solution	1266,67	717,88	169,81	Ordre 0
BB-NP	1212,51	1101,48	847,55	Higuchi

III.2.c. Comparaison des résultats de libération pour le benzoate de benzyle

L'étude de libération au laboratoire sur poils canins comparée à l'étude sur papier filtre a mis en avant l'influence du support sur la vitesse de libération du benzoate de benzyle. La Figure IV.7 rassemble les courbes obtenues pour une application sur poils canins et sur papier filtre. Pour une représentation claire des résultats, les barres d'écart types n'ont pas été ajoutées aux courbes.

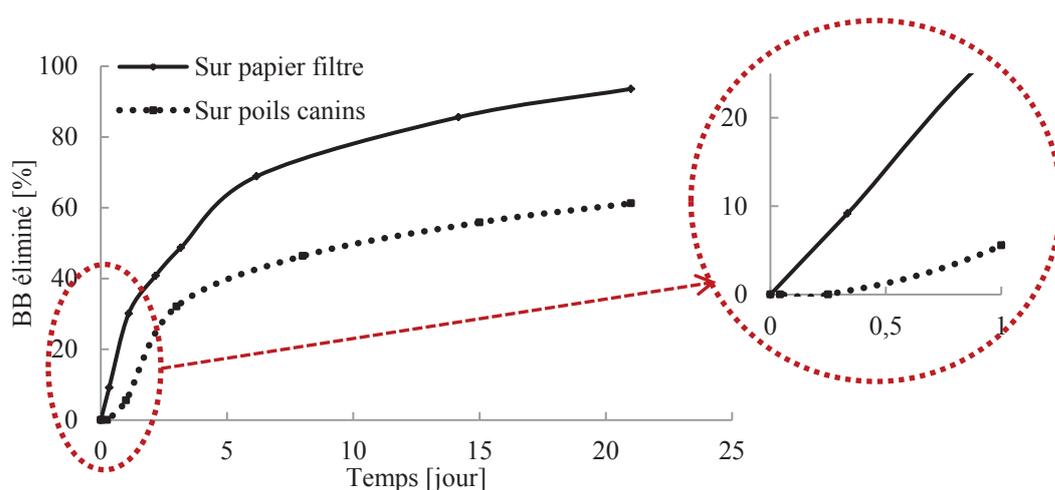


Figure IV.7 : Profils de libération du benzoate de benzyle depuis des nanoparticules déposées sur poils canins et sur papier filtre.

La libération du benzoate de benzyle à partir des nanoparticules dépend du temps et ne présente pas de libération initiale intense («burst effect») [Brazel, 2004]. Dans le cas du suivi sur poils canins, la libération du benzoate de benzyle depuis son support présente un effet de latence dans les premières 24 heures. Le poil canin en tant que support de la formulation a ainsi prouvé sa capacité à ralentir l'évaporation du benzoate de benzyle. Plusieurs paramètres pourraient être à l'origine de ce phénomène : la structure en écaille pourrait ralentir la sortie du benzoate de benzyle encapsulé dans les nanoparticules, elles-mêmes immobilisées dans ces structures plus ou moins profondes (cf. Figure IV.8).

Les études de libération du benzoate de benzyle présentées permettent de conclure que :

- Les nanoparticules ont la capacité de ralentir l'évaporation de la molécule active encapsulée en imposant un processus de diffusion de la matière active au travers des chaînes polymériques ;
- Les fibres pileuses jouent un rôle dans la réduction de la vitesse d'évaporation des molécules appliquées.

Par conséquent une adsorption forte des nanoparticules sur les fibres pileuses permettrait de rassembler ces deux aspects pour ralentir la libération de la matière active encapsulée.

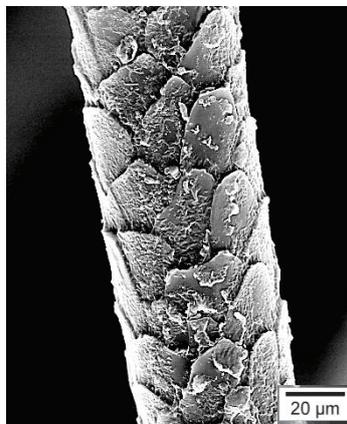


Figure IV.8 : Image MEB d'un poil canin traité par la suspension nanoparticulaire

Nous avons donc prouvé que les fibres pileuses ralentissent la libération de la molécule active, il serait intéressant de vérifier que cette libération retardée ne soit pas au détriment de l'efficacité. Une étude de la libération *in vivo* a été nécessaire pour tenir compte des paramètres que nous ne pouvons pas contrôler tels que les comportements de l'animal (position assise, grattage...).

IV. Etude de la pénétration cutanée

La pénétration cutanée est un phénomène passif qui tend à égaliser les concentrations de la matière active entre les différents compartiments de la peau (surface de la peau, couches de la peau, milieu interne mimé par le liquide récepteur). La diffusion est un phénomène de transport par mouvement Brownien, suivant un modèle de diffusion de Fick. Dans le cas d'une diffusion plane qui s'effectue suivant la direction normale à un plan (à la distance x de l'origine), les lois de Fick décrivent le flux d'une espèce $J(x, t)$. J représente le nombre de moles traversant ce plan par unité de temps et par unité de surface ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

La première loi de Fick lie le flux ($J(x, t)$) au gradient de concentration $\frac{\delta C}{\delta x}$ avec une constante de proportionnalité D , qui est le coefficient de diffusion de la molécule ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$):

$$J(x, t) = -D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \quad \text{Equation IV.1}$$

avec :

- J flux de molécules ;
- D coefficient de diffusion ;
- $\frac{\delta C(x, t)}{\delta x}$ gradient de concentration.

La concentration en matière active dans les différents compartiments évolue avec le temps (gradient de concentration $\frac{\partial C}{\partial x}$), il s'établit un flux en fonction du gradient. De manière plus concrète, cette première loi de Fick démontre qu'en tout point il y a prélèvement de la matière à un endroit pour la transporter en un autre.

La deuxième loi de Fick (Equation IV.2) permet de calculer les concentrations en tout point et à n'importe quel temps. La concentration en chaque point dépend à la fois de la distance x et de l'intervalle de temps (t).

$$\frac{\delta C(x, t)}{\delta t} = -D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad \text{Equation IV.2}$$

Les facteurs qui vont influencer la pénétration cutanée sont liés aux caractéristiques physico-chimiques de la molécule étudiée, du type de formulation appliquée (en particulier les excipients qui la composent) et des conditions opératoires (temps, température ...).

Une étape de forte importance dans l'étude de la pénétration cutanée a été la validation d'une procédure de séparation des couches de la peau. Durant nos travaux expérimentaux, les procédures rapportées dans la littérature ont été testées mais n'ont pas conduit à une extraction optimale du *stratum corneum*. Plusieurs méthodes d'extraction du *stratum corneum* ont été décrites dans des études biopharmaceutiques. La méthode du tape stripping décrite

pour la première fois par Wolf en 1940 [Wolf, 1940] est une méthode simple, peu coûteuse et peu invasive utilisable *in vitro* [Bolzinger, 2008] et *in vivo* [Jacobi, 2003 – Schwarb, 1999]. Le principe est l'extraction des couches de cellules en surface de la peau par des bandes adhésives. La procédure d'extraction du *stratum corneum* par tape stripping varie en fonction de l'espèce [Dupuis, 1984] et plusieurs paramètres critiques ont été rapportés par Lademann *et al* en 2009 [Lademann, 2009], c'est une méthode qui a démontré une répétabilité variable. Une alternative pour une séparation complète du *stratum corneum* (sans tape stripping) consiste à utiliser un traitement enzymatique avec trypsine (méthode introduite dans les années 60 par Kligman *et al.* [Kligmann, 1963 – Wu, 2006]. C'est en 1971 que Marks et Dawber ont introduit une méthodologie simple et rapide utilisant des bandes de cyanoacrylates, cette méthode est connue sous le nom de biopsie de la peau. Elle permet d'examiner la couche cornée par l'obtention d'une couche mince, rapidement par réaction de polymérisation de cyanoacrylates. Cette méthode supprime des cornéocytes en surface et dans les follicules pileux [Teichmann, 2005] présents dans ces parties de la peau. Pour cette raison, une distinction entre les itinéraires *trans*-épidermiques et *trans*-folliculaires de l'absorption percutanée est impossible [Surber, 2001].

IV.1. Matériels & Méthodes

Les travaux de Franz accomplis dans les années 1970 sont une base solide dans le domaine de l'étude *in vitro* de pénétration cutanée de molécules actives destinées à être appliquées sur la peau [Franz, 1975 – Franz, 1978], le modèle de cellule qu'il a développé porte son nom. Les cellules de Franz sont des dispositifs de diffusion statique, composées de 3 compartiments : un compartiment donneur, un compartiment récepteur et une membrane biologique intermédiaire, la peau.

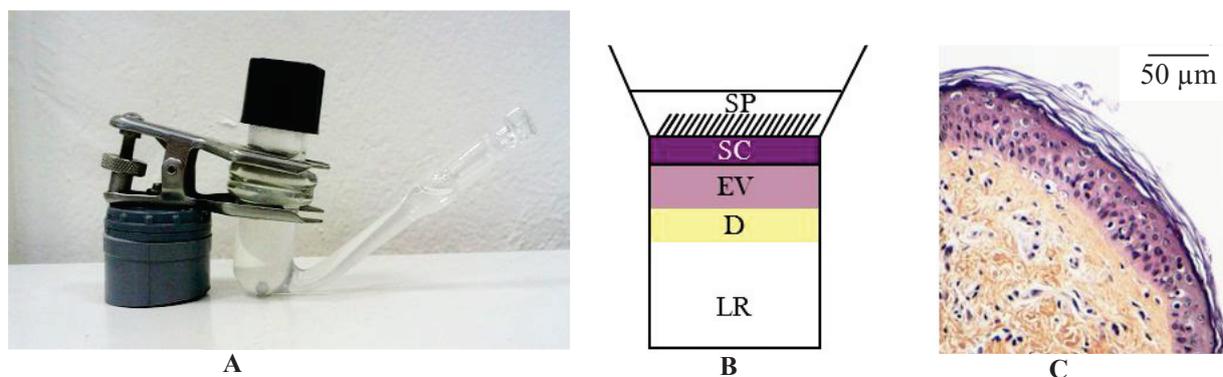


Figure IV.9 : Cellule de diffuse statique (cellule de Franz, A) ; Représentation schématique des compartiments de la peau (B) ; Image obtenues après HPS d'un fragment de peau canine (C).

Les profils de pénétration cutanée complets du benzoate de benzyle sous forme de solution (BB solution) et sous forme de suspension nanoparticulaire (BB-NP), après 24 heures en cellule de Franz, ont été élaborés depuis 8 échantillons de peaux provenant de 4 animaux.

La dose appliquée a été déterminée à hauteur de $196,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Chaque étape expérimentale a fait l'objet d'une optimisation permettant de valider ce protocole opératoire propre à des fragments de peau canine.

IV.1.a. Biopsie de peau canine

Les biopsies de peau canine ont été collectées sur quatre beagles (beagles adultes ; 2 mâles et 2 femelles) provenant de l'animalerie de Merial (Saint Vulbas, France) présentés pour l'euthanasie, sans aucun signe clinique ou maladies de la peau antérieures.

Le produit final est un spray pour application topique, essentiellement destiné à une application sur la zone dorsale de l'animal, c'est pour cela que nous avons prélevé cette zone pour nos études expérimentales. La zone excisée est celle partant du cou jusqu'au milieu du dos. Les poils ont été retirés à l'aide d'une tondeuse vétérinaire. La peau a été découpée dans toute son épaisseur, les tissus gras sous cutanés ont été soigneusement éliminés (épaisseur finale de $1,5 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$) et un examen des lésions cutanées a été réalisé. Des disques de peau ont été découpés de telle manière à avoir une zone de pénétration effective de $2,54 \text{ cm}^2$. Les échantillons de peau ont été congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

IV.1.b. Mesure de la perte en eau *trans* épidermique, indicateur de la viabilité de la peau

La TEWL (Trans Epidermal Water Loss) a été mesurée *via* un Tewameter[®] TM300 (Courage and Khazaka, Monaderm, Monaco). La mesure a été réalisée en triple sur la peau canine fraîchement décongelée avant son montage en cellule de Franz (cf. Figure IV.10). Seuls les échantillons de peau présentant une valeur de TEWL inférieure à $15 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ont été utilisés.



Figure IV.10 : Appareillage de mesure du TEWL.

IV.1.c. Montage de la cellule de diffusion

Il est déterminant pour l'étude du passage percutané d'éviter la saturation en molécules actives du liquide récepteur afin de ne pas biaiser les résultats. La lipophilie du benzoate de benzyle est relativement haute ($\log P = 3,7$; $M_w = 212$ g/mol), c'est pour cela que des composés permettant d'augmenter sa solubilité en solution aqueuse (des tensioactifs) ont été ajoutés. D'après l'étude de solubilité du benzoate de benzyle présentée dans le Chapitre III, cette molécule présente une solubilité dans l'eau de 122 $\mu\text{g/ml}$ à 25 °C. Le choix de la composition de la phase réceptrice a été validé par une étude de solubilisation du benzoate de benzyle dans des solutions aqueuses contenant différents pourcentages de Brij98[®]. Une solution de Brij98[®] à 5 % dans l'eau déionisée a permis l'obtention d'une solution de benzoate de benzyle à 2 mg/ml à 32°C, les conditions « sink » ont donc été respectées (solution réceptrice capable de solubiliser 4 fois la quantité de molécule active appliquée). Un volume de liquide récepteur (solution aqueuse de Brij98[®] à 5 %, 10 ml) a été introduit dans le compartiment inférieur de la cellule de Franz.

La dose de benzoate de benzyle déposée dans le compartiment donneur à la surface de la peau a été de 196,85 $\mu\text{g/cm}^2$ (volume déposé de 1 ml). Les formulations ont été déposées sur la face supérieure épidermique de l'explant de façon homogène et le compartiment supérieur a été fermé afin d'éviter l'évaporation de la formulation appliquée et ainsi garantir des conditions de flux de matière infini. Les cellules de Franz ont ensuite été placées dans un bain d'eau à température contrôlée. Une agitation continue et une température constante de 37°C ont garanti un maintien de l'intégrité physiologique de l'explant cutané et une température de surface de 32°C. La quantité de matière active répartie dans les différents compartiments de la cellule et dans les couches cutanées a été dosée après un temps considéré comme infini (24 heures).

IV.1.d. Méthodologie de séparation des couches de la peau

Les cellules de Franz ont été démontées après 24 heures de temps d'exposition. Les différentes couches de la peau (*stratum corneum* ou couche cornée, épiderme viable, derme) ont été isolées suivant une procédure spécifique de séparation des couches de la peau propre aux échantillons de peau canine. Il a été capital de s'assurer de l'isolation complète et uniforme des différentes couches de la peau. Nous avons utilisé la méthode décrite par Marks et Dawber [Marks, 1971], utilisant des bandes de cyanoacrylate car cette méthode est rapide, reproductible et répétable. Le temps de polymérisation, la masse de cyanoacrylate, le nombre de bandes de cyanoacrylate ont été testés sur des fragments de peau soumis à 24 heures en

cellules de Franz fermées à 32°C. La méthodologie d'étude systématique ainsi que les images histologiques rendant compte de l'élimination des couches de la peau en fonction de différents traitements sont rassemblées en Annexe 3.

Nous avons utilisé le méthanol absolu en tant que solvant de dilution pour doser le benzoate de benzyle dans les différents compartiments car :

- La phase mobile de la méthode HPLC développée est constituée de 70% volumique de méthanol ;
- La courbe d'étalonnage a été obtenue avec des solutions utilisant ce solvant ;
- Le méthanol permet la mise en solution des constituants de la formulation (benzoate de benzyle et Eudragit® RS100).

La distribution du benzoate de benzyle a été déterminée à partir du compartiment récepteur jusqu'au compartiment donneur pour les formulations de benzoate de benzyle sous forme encapsulée et sous forme libre de la manière suivante.

Benzoate de benzyle dans le liquide récepteur (LR) : Le liquide récepteur a été recueilli et dilué dans 5 ml de méthanol (solution S₁).

Traitement de la surface de la peau (SP) : La formulation restante dans le compartiment donneur a été prélevée et dix lavages consécutifs utilisant 1 ml de solution aqueuse de Brij98® à 5 % ont été réalisés. La peau a été séchée en surface deux fois avec des disques de papier filtre. La solution de lavage récoltée et les disques de séchage ont été placés dans 10 ml de méthanol (solution S₂).

Extraction du stratum corneum (SC) et de l'épiderme viable (EV) : Une lame de microscope (76x26 mm; Roth, Karlsruhe, Allemagne) a été recouverte de résine cyanoacrylate (Loctite Super Glue-3, Henkel, France), la peau a été déposée (coté SC sur la résine). Après un temps de polymérisation défini de 20 minutes la peau a été retirée, permettant de récolter le *stratum corneum* et les fibres pileuses déposés sur la lame [Montenegro, 1996]. La même méthodologie a été suivie pour l'extraction de l'épiderme viable.

Chaque lame de microscope a été coupée et placée dans un volume de 5 ml de DMSO, soumis à un traitement par ultrasons pendant 10 minutes afin de dissoudre la résine polymérisée et la matrice polymérique des nanoparticules, libérant ainsi l'intégralité du benzoate de benzyle. Un volume de méthanol (5 ml) a ensuite été ajouté afin de faire précipiter les chaînes

polymériques de cyanoacrylate avec une solubilisation complète du benzoate de benzyle (obtention des solutions S₃ et S₄ correspondant respectivement aux solutions obtenues depuis le *stratum corneum* et l'épiderme viable).

Traitement du derme (D) : Le derme, obtenu après extraction des couches supérieures de la peau, a été coupé en petits morceaux et placé dans un volume de méthanol (solution S₅).

La Figure IV.11 rassemble les photographies des différents compartiments de la peau soumise au protocole de séparation des couches. Les images obtenues en coupe histologique après coloration HPS permettent l'observation des compartiments isolés.

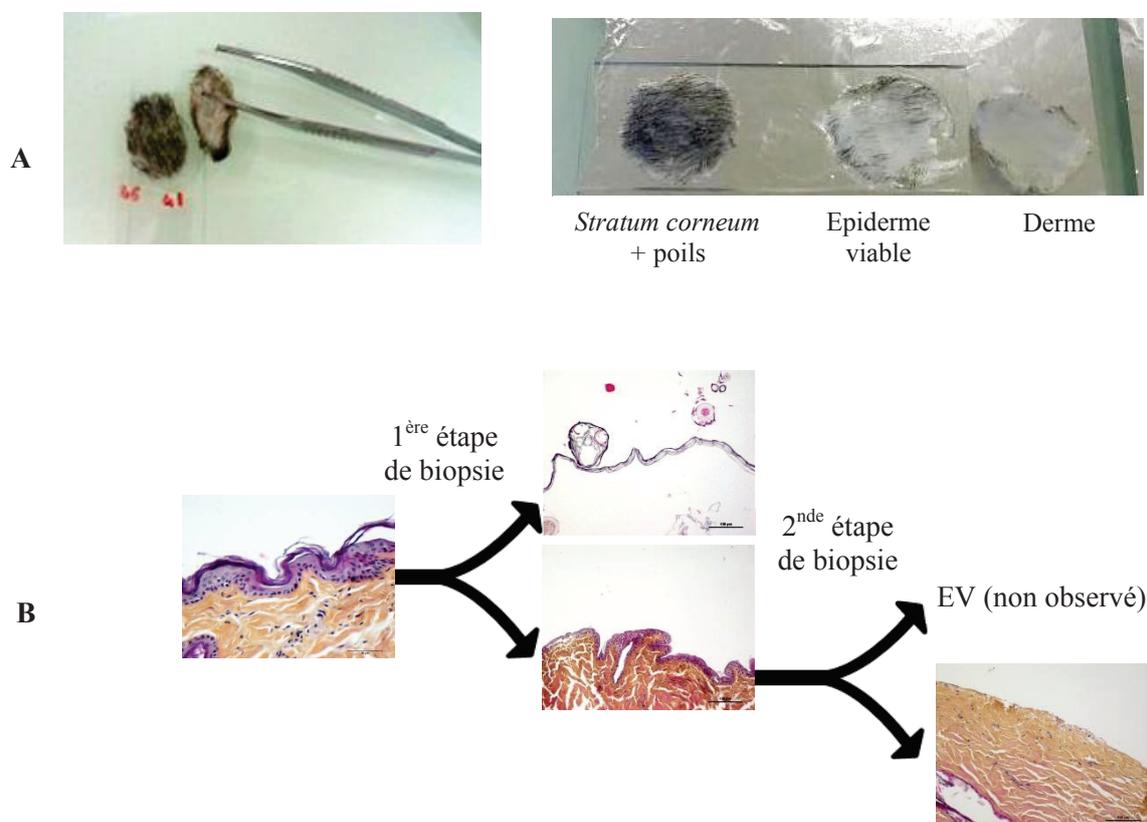


Figure IV.11 : Observation macroscopique (A) et microscopique (B) de la peau canine au cours du traitement de séparation des couches.

Les solutions obtenues (S₁, S₂, S₃, S₄, et S₅) ont été soumises à un traitement aux ultrasons pendant 20 minutes. Elles ont été filtrées et le benzoate de benzyle a été quantifié par UV-HPLC.

IV.1.e. Analyse des données

Les résultats valides présentant une dose récupérée de 85 % à 105 % ont été utilisés dans les calculs des moyennes et des erreurs types (ET, Equation IV.3) obtenus depuis 8 répétitions.

$$ET = \sigma \sqrt{\bar{n}} \quad \text{Equation IV.3}$$

avec : - ET Erreur Type ;
 - σ écart type ;
 - n nombre de répétition.

Les résultats ont été normalisés à 100% pour une meilleure comparaison des valeurs moyennes et des erreurs types de la moyenne.

Les comparaisons statistiques ont été obtenues en utilisant le test de Student (deux échantillons en supposant des variances égales) et l'analyse de variance (ANOVA à un facteur) avec un niveau de significativité à $p \leq 0,05$.

Nous avons distingué la quantité de benzoate de benzyle absorbée, et la quantité non absorbée. Les parties non absorbée et absorbée ont été calculées selon les Equations IV.4 et IV.5.

$$Non\ Abs = (Q_{BB}SP + Q_{BB}SC) \quad \text{Equation IV.4}$$

$$Abs = (Q_{BB}EV + Q_{BB}D + Q_{BB}LR) \quad \text{Equation IV.5}$$

avec : - Abs quantité de benzoate de benzyle absorbée ;
 - Non Abs quantité de benzoate de benzyle non absorbée ;
 - Q_{BB} Quantité de benzoate de benzyle dosée ;
 - SP Surface de la peau ;
 - SC *Stratum Corneum* ;
 - EV Epiderme Viable ;
 - D Derme ;
 - LR Liquide Récepteur.

IV.2. Résultats & Discussions

Les profils de pénétration cutanée du benzoate de benzyle obtenus depuis deux types de formulations ont montré des différences significatives.

La Figure IV.12 présente ces profils, élaboré sur peau canine pour une solution et une suspension de benzoate de benzyle.

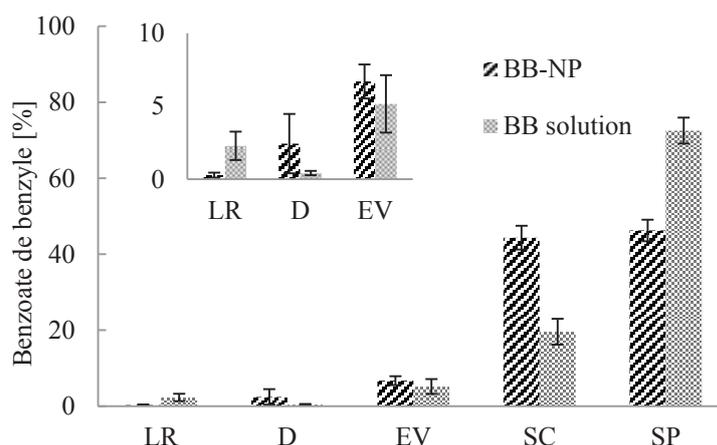


Figure IV.12 : Profils de pénétration cutanée du benzoate de benzyle depuis une solution et depuis une suspension nanoparticulaire. LR: Liquide Récepteur; D: Derme; EV: Epiderme Viable; SC: *Stratum corneum*; SS: Surface de la Peau.

Pour les deux formulations, la quantité absorbée calculée selon l'Equation IV.5 est relativement faible (7,86% et 9,41% pour BB solution et BB-NP respectivement). Par conséquent la partie non absorbée a été calculée à hauteur de 90,57 % pour BB-NP et 92,12 % pour BB solution.

L'influence de la matrice polymérique sur la pénétration cutané du benzoate de benzyle a été montrée dans les dosages du benzoate de benzyle depuis les compartiments composants la partie non absorbée, obtenue selon l'Equation IV.4. Dans le cas de la solution, la majeure partie du benzoate de benzyle a été dosée en surface de la peau (72,53 % \pm 3,42 % de la dose appliquée). Le benzoate de benzyle encapsulé dans les nanoparticules a été localisé en moindre proportion en surface de la peau (46,24 % \pm 2,83 % de la dose appliquée). En conséquence, la quantité de benzoate de benzyle dosé dans la première couche de la peau (*stratum corneum* et fibres pileuses associées) a montré des différences significatives entre la solution et la suspension (44,33 % \pm 3,13 % pour BB-NP contre 19,60 % \pm 3,41 % pour BB solution).

Le Tableau IV.4 traduit les résultats en quantité de molécules actives dosées en fonction des couches de la peau.

Tableau IV.4 : Résultats analytiques obtenus pour le dosage du benzoate de benzyle dans les différents compartiments de la peau. QT : quantité totale dosée. (Données exprimées en $\mu\text{gBB}/\text{cm}^2$) ; ET : Erreur Type.

	LR	D	EV	SC	SP	QT
BB-NP						
Moyenne	0,57	5,36	14,31	95,22	98,54	214,00
						4,81
ET	0,32	4,52	2,67	7,82	5,27	
BB solution						
Moyenne	4,21	0,94	9,05	36,99	149,90	201,10
ET	1,71	0,32	3,42	7,42	10,35	6,95

La dimension des nanoparticules est un paramètre important car ces nanovecteurs provoquent des phénomènes d'inclusion par les follicules pilosébacés. Alvarez-Roman [Alvarez Roman, 2004] a constaté que les particules de polystyrène de 20 à 200 nm sont préférentiellement accumulées dans les ouvertures des follicules et leur introduction dans le follicule est dépendant du temps. Les particules de taille inférieures (diamètre variant entre 7 et 20 nm) ont été majoritairement détectées dans l'infundibulum du follicule pileux et en profondeur [Schaefer, 1990 - Meidan, 2005]. D'après Vogt *et al.* [Vogt, 2006] les particules de 40 nm de diamètre pénètrent dans le derme par un chemin périfolliculaire au travers des follicules pileux. En revanche, pour la pénétration *trans*-cutanée des particules par chemin intercellulaire (à travers la matrice lipidique du *stratum corneum*) van den Bergh *et al.* [van den Bergh, 1999] ont démontré que les « particules élastique » (à base de polyéthylène glycol, PEG-8) de 100-150 nm de diamètre pourraient pénétrer dans la matrice cellulaire du *stratum corneum* via des structures de type canaux pour y rester confiner. Les particules élastiques affecteraient l'ultrastructure des couches cellulaires du *stratum corneum*. Les travaux de Honeywell-Nguyen *et al.* [Honeywell-Nguyen, 2004] ont montré que les particules élastiques étaient en mesure d'atteindre la jonction épiderme entre le *stratum corneum* et l'épiderme viable alors que les particules rigides n'en ont pas la capacité. Nous avons rapporté dans le Chapitre III que les nanoparticules formulées pendant nos travaux de recherche présentent la capacité de se déformer (de s'affaisser). Ce phénomène pourrait conduire à une

inclusion plus profonde des nanoparticules polymériques à base d'Eudragit®RS100, en comparaison avec l'inclusion décrite pour des particules polymériques rigides. Les premières couches de cellules du *stratum corneum* deviendraient plus lâches, l'inclusion de nanoparticules serait favorisée. Les cellules composant le *stratum corneum* subissent continuellement le processus de desquamation, les particules subiraient une externalisation subséquente à leur internalisation.

Le Tableau IV.5 présente de manière synthétique les résultats de pénétration cutanée obtenus.

Tableau IV.5 : Données essentielles obtenues pour l'étude de pénétration cutanée du benzoate de benzyle libre et encapsulé. Rapport SP/SC = BB en surface de la peau / BB dans le SC.

	BB solution	BB-NP
BB appliquée [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	220,65	228,49
BB dose [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	201,10	214,00
BB en surface [%]	74,00 \pm 3,42	46,24 \pm 2,42
BB dans le <i>stratum corneum</i> [%]	18,28 \pm 3,42	44,33 \pm 3,13
SP/SC	4/1	1/1

Ainsi, l'inclusion du benzoate de benzyle dans une matrice polymérique de type nanoparticule cationique permet de :

- Certifier d'une présence en périphérie de molécules actives (en surface et dans les compartiments interstitiels du *stratum corneum*) permettant de garantir un effet pharmacologique immédiat ;
- Garantir un stockage en profondeur de la molécule active encapsulée (le long des follicules pileux et dans les sacs folliculaires) pour procurer une libération retardée de la matière active et par conséquent une activité pharmacologique retardée ;
- Assurer la non-absorption de molécules actives.

V. Etude de la libération *in vivo* sur beagles

La méthode expérimentale utilisée est détaillée en Annexe 4. Nous rappelons ici les points essentiels du protocole expérimental utilisé.

V.1. Matériels & Méthodes

V.1.a. Formulation et application sur l'animal

Cinq beagles ne présentant aucun signe clinique ont été utilisés pour l'élaboration de l'adsorption et de la libération d'une matière active encapsulée dans des nanoparticules polymériques.

Cette étude a été réalisée à l'animalerie de Merial (Saint Vulbas, France) avec le support technique de Catherine Ollagnier et Emilie Arthaud. La dose appliquée a été de $196,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondant à un traitement homogène sur l'intégralité de la surface de l'animal. Le traitement des beagles a été effectué de manière individuelle par pulvérisation d'une suspension nanoparticulaire chargée en benzoate de benzyle sur la surface de l'animal à une distance d'environ 10 cm du manteau pileux. L'application a été exécutée de manière directe en veillant à effectuer un traitement le plus homogène que possible, aucune friction du manteau pileux n'a été réalisée.

V.1.b. Echantillonnage

Nous avons déterminé la présence du benzoate de benzyle sur le manteau pileux des beagles pendant 15 jours ($t_{1\text{heure}}$, $t_{1\text{jour}}$, $t_{2\text{jours}}$, $t_{3\text{jours}}$, $t_{8\text{jours}}$, $t_{15\text{jours}}$) après une application de la formulation décrite ci-dessus. Des échantillons de poils ont été prélevés sur 5 beagles en utilisant une tondeuse électrique vétérinaire. Une corrélation entre la surface de prélèvement et la masse de fibres pileuses prélevée a été réalisée sur 2 beagles. Chaque site d'étude a subi une étape de tonte sur $2,65 \pm 0,74 \text{ cm}^2$. Les poils récoltés ont été pesés et la zone tondu a été mesurée. Une corrélation entre la masse de poils prélevés et la surface de prélèvement a été établie, en fonction du site d'étude. Afin de déterminer l'importance du site de traitement dans l'élimination de la formulation, 5 sites ont été étudiés. Les zones de prélèvement ont été choisies dans le but de représenter les sites en contact avec les produits répulsifs pulvérisés en condition réelle. Ces sites sont les suivantes : la nuque (site 1), le milieu du dos (site 2), la zone lombaire (site 3), le côté droit du thorax (site 4) et le côté gauche du thorax (site 5).

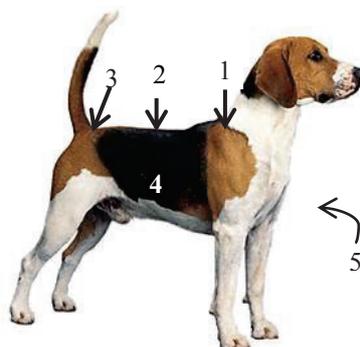


Figure IV.13 : Localisation des 5 sites d'étude sur beagles. 1 : nuque ; 2 : milieu du dos ; 3 : zone lombaire ; 4 : côté droit du thorax ; 5 : côté gauche du thorax.

Afin de savoir si les particules chargées en benzoate de benzyle peuvent d'une part atteindre la surface de la peau et d'autre part être stockées dans les premières couches de la peau, une étape d'essuyage de la surface de la peau a été ajoutée. L'étape d'essuyage de la surface de la peau a été réalisée sur le site 2 (milieu du dos) en utilisant un coton imbibé d'acétone afin de récolter le benzoate de benzyle en surface et dans les premières couches de la peau (*stratum corneum*). L'acétone est le solvant utilisé car c'est un solvant du benzoate de benzyle, du polymère et il permet d'éliminer les premières couches de cellules du *stratum corneum*. La méthode expérimentale utilisée est détaillée en Annexe 4.

V.1.c. Extraction du benzoate de benzyle

Le benzoate de benzyle a été totalement libéré en immergeant les fibres pileuses récoltées dans du méthanol (10ml \pm 5ml). Une étape d'agitation forte a permis la dissolution totale de l'Eudragit[®]RS100 et du benzoate de benzyle. Le méthanol contenant le benzoate de benzyle extrait a été dosé par HPLC puis retiré du flacon (méthode HPLC décrite dans le Chapitre III). Du méthanol propre a été introduit dans le flacon et une seconde étape d'agitation forte a été réalisée.

Il en a été de même pour les cotons provenant de l'étape d'essuyage de la surface de la peau du site 2.

V.2. Résultats & Discussions

V.2.a. Benzoate de benzyle sur les poils

La corrélation entre la masse de fibres pileuses prélevées et la surface de prélèvement est présentée dans la Figure IV.14.

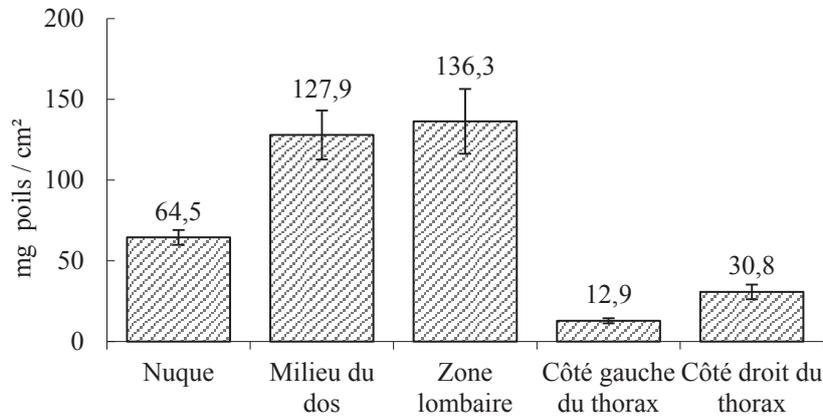


Figure IV.14 : Variation de la densité de fibres pileuses en fonction de la zone de prélèvement.

Ces valeurs présentées en Figure IV.14 ont permis de traduire les données analytiques (premièrement obtenues en $\mu\text{g}_{\text{BB}}/\text{mg}_{\text{poils}}$) dans une unité plus représentative de la réalité ($\mu\text{g}_{\text{BB}}/\text{cm}^2_{\text{peau}}$). La Figure IV.15 présente la quantité de benzoate de benzyle résiduel exprimé en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ depuis les différents sites d'étude de l'animal en fonction du temps. Pour une meilleure représentation des résultats, les données obtenues depuis les 5 beagles ont été moyennées.

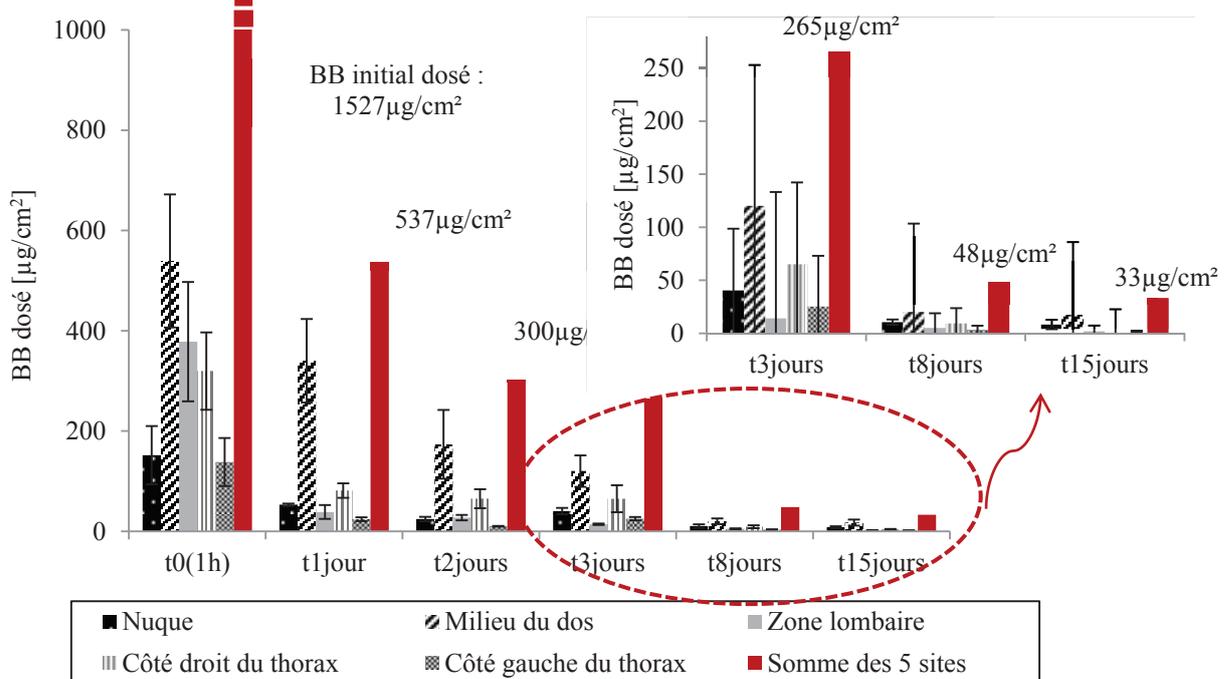


Figure IV.15: Benzoate de benzyle dosé sur 5 beagles en fonction de la zone de prélèvement et du temps. Représentation de la moyenne des résultats obtenus sur 5 beagles.

La quantité initiale de benzoate de benzyle est considérée comme étant la valeur dosée sur les échantillons récoltés une heure après le traitement. Le site d'étude a montré son importance sur la rétention de la formulation. Le Tableau IV.6 rassemble les données expérimentales exprimées en pourcentage recouvré en prenant comme dose initiale la quantité dosée à $t_{1\text{heure}}$.

Tableau IV.6 : Données analytiques du suivi de la perte du benzoate de benzyle formulé sous forme nanoparticulaire et appliqué sur beagles. Données exprimées en % de la quantité initiale appliquée ($t_{1\text{heure}}$).

	$t_{1\text{jour}}$	$t_{2\text{jours}}$	$t_{3\text{jours}}$	$t_{8\text{jours}}$	$t_{15\text{jours}}$
Nuque					
Moyenne	39,51	22,28	21,59	6,94	5,46
ET	8,69	17,31	14,67	42,52	29,96
Milieu du dos					
Moyenne	62,30	28,09	11,63	2,85	2,48
ET	11,55	13,86	2,61	1,06	1,10
Zone lombaire					
Moyenne	18,09	9,79	3,32	1,77	0,34
ET	5,75	4,01	0,85	1,17	0,09
Côté droit du thorax					
Moyenne	34,14	28,56	7,11	3,81	2,18
ET	6,29	10,84	2,32	1,50	0,75
Côté gauche du thorax					
Moyenne	27,77	15,39	1,69	4,99	2,72
ET	5,88	1,32	0,20	1,48	0,45
Moyenne des 5 sites					
Moyenne	36,36	20,82	9,07	4,07	2,64
ET	7,63	9,47	4,13	9,54	6,47

Le milieu du dos présente une capacité plus importante à retenir la formulation appliquée par sprayage direct en comparaison avec les autres sites étudiés. La forte élimination du benzoate de benzyle sur la zone lombaire serait due à la position assise de l'animal. D'autre part, les flancs de l'animal seraient des zones propices à l'essuyage par frottement et par conséquent à une élimination rapide de la formulation appliquée

De manière globale, le benzoate de benzyle est soumis à une forte élimination dans les premières 24 heures, en moyenne 63,64% de perte. Après ces premières 24 heures la perte est plus régulière. Ce résultat traduit une capacité de rétention d'une certaine quantité de la formulation appliquée. La structure particulière des fibres pileuses pourrait agir sur la rétention des nanoparticules, d'une part grâce aux interactions électrostatiques et d'autre part par un stockage dans les renforcements créés par les écailles des fibres pileuses. Des

observations par MEB ont été réalisées pour des fibres pileuses prélevées au temps $t_{1\text{heure}}$ (Figure IV.16) et au temps $t_{15\text{jours}}$ (Figure IV.17) provenant du site 2. Ces observations attestent de la présence des particules en début d'étude et également après 15 jours de suivi.

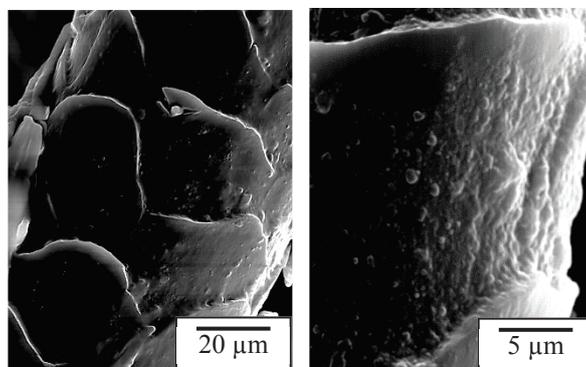


Figure IV.16 : Observation d'une fibre pileuse prélevée sur un beagle une heure après l'application de la suspension nanoparticulaire

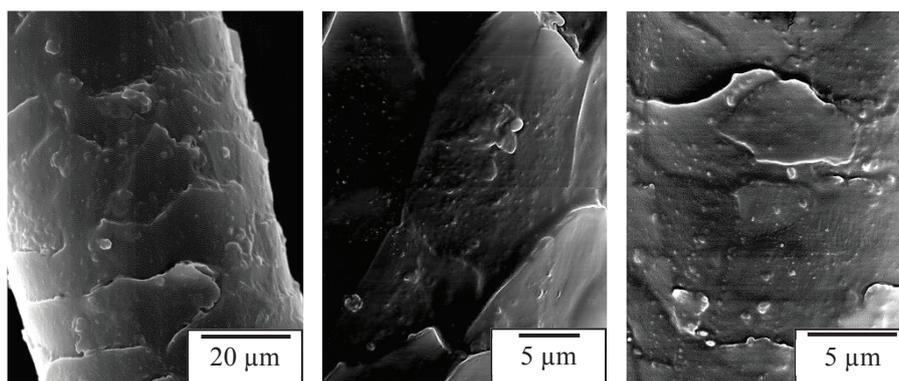


Figure IV.17 : Observation d'une fibre pileuse prélevée sur un beagle 15 jours après l'application de la suspension nanoparticulaire

Les nanoparticules sont réparties le long des fibres pileuses et dans les écailles. L'observation des fibres prélevées après une heure de traitement permet de confirmer l'adsorption des nanoparticules appliquées par sprayage direct de l'animal. Leur visualisation après une période relativement longue de 15 jours corrobore les résultats de dosage présentés précédemment. Par conséquent, cette étude *in vivo* sur animal cible renseigne sur la capacité d'adsorption des nanoparticules polymériques à base d'Eudragit[®]RS100 développés pendant nos travaux de recherche.

V.2.b. Benzoate de benzyle sur la peau

La quantité de benzoate de benzyle capable d'atteindre la peau a été quantifiée sur le site 2. La littérature décrit le dos comme étant un bon compromis entre des zones d'absorption

percutanée rapide et lente [Bronaugh, 1989]. Nous avons comparé les quantités résiduelles trouvées sur les poils et la peau canine, soumise à un traitement d'essai.

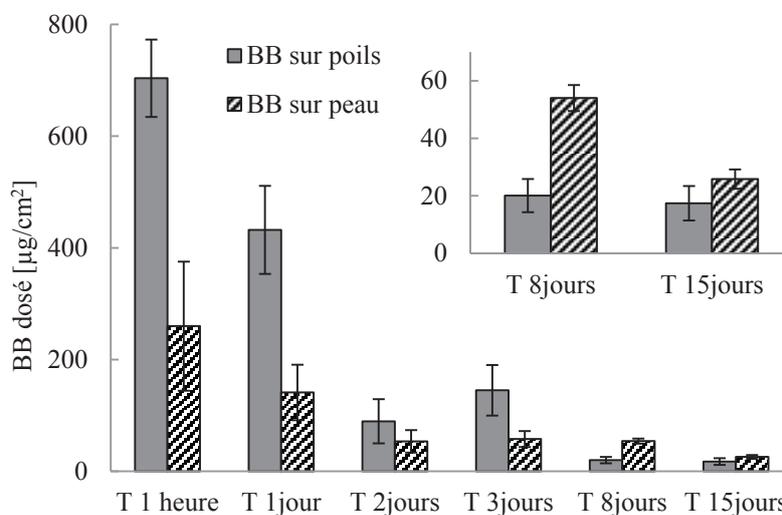


Figure IV.18 : Dosage du benzoate de benzyle résiduel sur poil de chien et sur la peau en fonction du temps pour le site 2 (milieu du dos).

Comme nous pouvons le voir sur la Figure IV.18, les nanoparticules ont la capacité d'atteindre la surface de la peau de l'animal. Par conséquent, étant donné que l'efficacité d'encapsulation est de 98%, les nanoparticules contenant le benzoate de benzyle sont capables de traverser la barrière formée par le manteau pileux. Le suivi de la perte en benzoate de benzyle à la surface de la peau montre une forte diminution entre $t_{1\text{heure}}$ et $t_{1\text{jour}}$, puis la perte devient régulière jusqu'à la fin de l'étude.

La perte en benzoate de benzyle est comparable que ce soit sur la peau ou sur les poils de t_0 à $t_{3\text{jours}}$. Durant cette période, la quantité de benzoate de benzyle dosée à partir des poils est supérieure à celle trouvée à la surface de la peau. Cette tendance s'inverse pour les temps d'analyses suivants, confirmant un effet réservoir des premières couches de la peau. Par conséquent il semble judicieux de préférer une autre méthode d'application, par exemple un sprayage de la formulation à rebrousse-poil, afin d'introduire les nanoparticules au plus proche de la peau, et donc de privilégier le stockage des nanoparticules en surface de la peau, dans les premières couches de cellules de la peau (le *stratum corneum*) et dans les follicules pileux. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de pénétration cutanée obtenus *in vitro* utilisant les cellules de Franz.

Par conséquent, une application à rebrousse-poil en privilégiant les zones dorsale de l'animal favoriserait le stockage des nanoparticules sur les fibres pileuses et dans le *stratum corneum*.

Conclusion

Les nanoparticules formulées avec de l'Eudragit®RS100 présentent une capacité de bioadhésion forte avec les fibres pileuses. Elles interagissent par des liaisons de type électrostatiques engendrées par les valeurs de potentiel zêta opposées entre les particules et de la fibre pileuse.

D'après l'étude comparative des profils de libération obtenus à partir de poils canins et de papiers filtres, le support influence la libération de la molécule active encapsulée. Il semblerait que la multitude d'écailles des fibres pileuses offre un espace de stockage des nanoparticules. Les molécules incorporées dans la matrice polymérique nécessiteraient un temps de séjour sur le poil plus long pour atteindre la phase gaz. Hormis l'influence de support, la prolongation de la libération d'une matière active encapsulée est dépendante de deux principaux mécanismes : la diffusion passive de la matière active au travers de la matrice polymérique et la dégradation du polymère enrobant. Dans le cas des systèmes particuliers de type matriciel, les cinétiques obtenues par diffusion passive du benzoate de benzyle suivent un modèle d'Higuchi décrivant une quantité de matière libérée proportionnelle à la racine carrée du temps. L'effet retard dans le temps est ainsi assuré par un ralentissement des phénomènes de diffusion au travers de la membrane polymérique des nanoparticules adsorbées sur le poil, déposées dans les sillons et dans les appendices folliculaires.

Dans le cas de molécules sans excipients, un effet à long terme ne peut pas être observé, pour deux raisons principales : la molécule active n'est confrontée à aucune barrière d'évaporation, hormis les écailles des fibres pileuses, elle n'a pas la capacité d'être stockée dans les follicules pileux ou dans le *stratum corneum*.

La fonction principale de la peau est d'agir comme une barrière de protection contre la perte des composants du milieu interne et l'intromission de composés extérieurs dans l'organisme. Cette fonction est principalement assurée en surface par le *stratum corneum*. Cette couche externe est constituée de cellules mortes remplies de kératine et d'eau, qui sont noyées dans des lipides. Les substances localisées en surface de la peau ou dans les couches cellulaires supérieures après application topique sont rapidement et continuellement éliminées par desquamation. D'autre part la sécrétion de sébum dans les follicules pileux permet l'élimination de substances potentiellement introduites. Par conséquent les nanoparticules introduites dans le *stratum corneum* seront continuellement ramenées en surface par desquamation. Les nanoparticules présentes dans les follicules pileux pourront être externalisées avec la sécrétion et l'élimination de sébum.

Etant donné le nombre important de follicules pileux présents dans la peau canine, et les images présentées dans le Chapitre II, nous pouvons affirmer que les follicules pileux sont des réservoirs à long terme pour des substances appliquées localement. En sélectionnant la taille de particules optimale des transporteurs de matière active, une libération efficace et contrôlée accompagnée d'un stockage de la substance appliquée dans les follicules pileux est possible. Nous avons par conséquent prouvé qu'une libération prolongée de la molécule active encapsulée dans des systèmes nanoparticulaires est réaliste. Il est important de considérer l'aspect efficacité des formulations car une libération trop retardée pourrait altérer l'efficacité finale répulsive de la formulation.



Chapitre V



Libération et Efficacité

« Le fondement de la théorie c'est la pratique » Mao Tsé-Toung



Introduction	185
I. Matériels & Méthodes	186
I.1. Formulation et caractérisation	186
I.2. Support de formulation	186
I.3. Etude de l'efficacité répulsive sur drosophile	189
II. Résultats & Discussions	195
II.1. Efficacité répulsive des composants de la formulation	195
II.1.a. Molécules actives en solution éthanolique	195
II.1.b. Nanoparticules blanches	198
II.2. Étude de la durée d'action	198
II.2.a. Nanoparticules chargées en benzoate de benzyle	199
II. 2.b. Nanoparticules chargées en Picaridin	201
<i>i.</i> Profils de libération de la Picaridin®	201
<i>ii.</i> Efficacité des formulations à base de Picaridin®	205
Conclusion	207

Introduction

L'objectif poursuivi dans les chapitres précédents était de déterminer le type de nanoparticules le plus approprié pour la préparation de nano-vecteurs à base de polymères, contenant des molécules active à propriété répulsive d'arthropodes pour une protection individuelle d'animaux de compagnie. Les étapes de développement de suspensions de nanoparticules cationiques, leurs caractérisations, les interactions avec les fibres pileuses et la peau ont été exposés pour des études *in vitro* et *in vivo* dans les chapitres précédents. Il est essentiel de comprendre les profils de libération de molécules actives d'intérêt et de les corrélérer au pouvoir répulsif de la formulation après l'application. La libération des molécules actives volatiles incorporées dans une matrice polymérique est commandée par la teneur initiale en molécules actives dans la particule et la capacité des molécules à diffuser à travers la barrière polymérique jusqu'à la surface de la particule pour y être vaporisée dans le milieu environnant. Les interactions entre les molécules actives et la matrice polymérique, conjointement avec la pression de vapeur des substances volatiles de chaque côté de la matrice, sont les principales forces motrices qui influencent le phénomène de diffusion [Gan, 2007]. L'influence de la matrice polymérique sur le contrôle de la libération a été prouvée dans le Chapitre IV en utilisant le benzoate de benzyle sous forme de solution et sous forme d'une suspension nanoparticulaire.

Les arthropodes ont la remarquable capacité de détecter et de discriminer des milliers d'odeurs chimiquement distinctes principalement grâce à une famille de récepteurs olfactifs extrêmement large [Mombaerts, 1999]. Un enjeu de nos travaux de recherche a été l'évaluation du pouvoir répulsif des formulations innovantes obtenues. La plupart des études décrites dans la littérature utilisent des systèmes de cages dans lesquels des bras traités de volontaires humains sont introduits. La rémanence peut être déterminée par l'enregistrement de la durée entre le traitement et le premier atterrissage dans le cas d'un insecte volant [Fradin, 1998]. Une méthode d'étude pour les tiques a été décrite par Schreck. Elle consiste à traiter une phalange du doigt d'un volontaire et à déterminer la durée pour laquelle une tique déposée sur le doigt n'est plus affectée par la formulation déposée [Schrech, 1995]. Le WHO a décrit une procédure et des critères spécifiques et standards pour l'évaluation de l'efficacité de formulations de répulsifs de moustiques pour un traitement sur la peau humaine [WHO, 2009]. Une fois de plus ce test basé sur le comptage d'atterrissage sur des avant-bras nécessite des volontaires humains, ce test n'est par conséquent pas adaptable à notre cas d'étude. Tous

les calculs ont par contre en commun la détermination de la protection suivant un rapport entre la proportion d'insectes répondant au stimulus répulsif et un control.

L'efficacité répulsive des formes galéniques développées durant nos travaux de recherche a été évaluée au travers de tests utilisant un insecte volant modèle. Ces tests ont pour limitation leur faisabilité au laboratoire et la minimisation des coûts de mise en œuvre. Une étude sur animal cible n'a pas été envisageable étant donné l'investissement financier nécessaire. C'est dans cette optique de nous avons évalué la réponse comportementale des drosophiles adultes (*Drosophila melanogaster*) soumises à des stimuli de type « attractant » (nourriture) et « repoussant » (formulation de molécules répulsives). La méthodologie expérimentale développée par Vosshall *et al.* [Ditzen, 2008] a été appliquée à notre cas d'étude. Deux types d'efficacité doivent être différenciés, l'efficacité immédiate et l'efficacité dans le temps, qualifié de pouvoir rémanent de la formulation.

Dans ce chapitre, nous présentons l'étude de la libération de molécules actives que nous avons corrélées à des tests d'efficacité depuis deux molécules actives à propriétés répulsives (le benzoate de benzyle et la Picaridin[®]). L'influence de la proportion en agent matriciel en tant que régulateur de la libération de molécules actives est présentée dans ce chapitre pour des formulations à base de Picaridin[®], qui est une molécule candidate de fort intérêt de par son activité insectifuge démontrée [Pretorius, 2003 - Badolo, 2004].

Nous avons étudié le pouvoir répulsif immédiat de molécules actives en solution. L'effet répulsif de molécules actives connues a été analysé pour des solutions à différents pourcentages (DEET, Picaridin[®], benzoate de benzyle, à 1 %, 5 %, 10 % et 20 % massique) afin d'obtenir une courbe dose/réponse. Nous avons étudié l'effet répulsif des nanoparticules sans matières actives. Enfin des formulations nanoparticulaires combinant les particules et des matières actives ont été examinées et le pouvoir répulsif immédiat ainsi que la durée de protection (la rémanence) ont été déterminés. La littérature a présenté plusieurs formules mathématiques pour la détermination d'une valeur traduisant l'efficacité, elle est souvent exprimée en pourcentage d'insectes sensible à l'aversion générée par le produit testé [Ditzen, 2008 - WHO, 2009]. Dans notre cas d'étude nous parlerons d'un indice de répulsion, qui est une valeur comprise entre -1 et 1.

Par conséquent, nous présentons et discutons dans ce chapitre des indices de répulsion corrélés aux doses appliquées. Le support de la formulation a été maintenu constant que ce soit pour les tests d'efficacité ou pour l'élaboration des profils de libération. Nous porterons notre attention sur les résultats obtenus sur le benzoate de benzyle, la Picaridin[®] et le DEET.

I. Matériels & Méthodes

I.1. Formulation et caractérisation

Les formulations étudiées dans ce chapitre sont des suspensions nanoparticulaires et des solutions alcooliques. Les nanoparticules ont été obtenues suivant le procédé de nanoprécipitation comme nous l'avons décrit dans le Chapitre III.

Tableau V.1 : Caractéristiques physicochimiques des dispersions nanoparticulaires utilisées.

	Taille	Potentiel zêta	EE	% Pol/part
	[nm]	[mV]	[%]	[%]
Particules blanches	117	+45	-	100
BB-NP	168	59	97	50
Pica 1	149	73,4	90	40
Pica 2	208	88	85	50
Pica 3	237	103	90	57,5

Les solutions « témoins » ont été obtenues par mélange des molécules actives dans l'éthanol. Nous avons étudié le pouvoir répulsif de solutions contenant 1 %, 5 %, 10 % et 20 % massique de matière active. Nous présentons dans ce manuscrit les résultats obtenus pour le benzoate de benzyle la Picaridin[®] et le DEET.

I.2. Support de formulation

Des papiers filtres présentant une surface d'application de 0,75 cm² (15 mm de long sur 5 mm de large, Sartorius, France) ont été préparés en tant que support de formulation. Chaque papier filtre a été introduit dans un tube Eppendorf de 1 ml tronqué à ses extrémités (cf. Figure V.1). Nous avons appliqué une dose de 10 µL (±0,5 µL) correspondant à une imprégnation totale du papier filtre. Ces dispositifs ont été utilisés pour l'élaboration des profils de libération et l'étude de l'efficacité sur drosophiles (efficacité immédiate et rémanence).

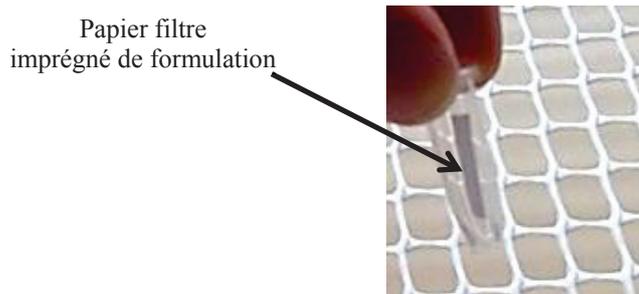


Figure V.1 : Matériel expérimental utilisé pour l'élaboration de profils de libération et pour l'évaluation de l'efficacité répulsive.

Pour l'étude de la rémanence et l'élaboration des profils de libération, les tubes Eppendorf contenant les papiers filtres imprégnés de formulation (suspension ou solution) ont été placés dans une étuve. Les tubes stockés en étuve thermo-régulée à 32°C. Une circulation d'air modérée garantit la non-saturation de l'air entourant les dispositifs expérimentaux.

- Pour l'élaboration des profils de libération : à chaque temps d'analyse, les tubes ont été immergés dans un solvant approprié (du méthanol dans le cas du benzoate de benzyle, de l'éthanol dans le cas de la Picaridin[®]), agités fortement puis la matière active a été dosée par HPLC dans le cas du benzoate de benzyle et par spectroscopie UV dans le cas de la Picaridin[®]. Les méthodes de dosage du benzoate de benzyle et de la Picaridin sont décrites dans le Chapitre III de ce manuscrit. Un suivi sur 21 jours a été réalisé (t_0 , $t_{8\text{heures}}$, $t_{24\text{heures}}$, $t_{2\text{jours}}$, $t_{3\text{jours}}$, $t_{6\text{jours}}$, $t_{14\text{jours}}$, $t_{21\text{jours}}$) en quadruple pour chaque formulation étudiée.
- L'activité répulsive des formulations en fonction du temps (étude de la rémanence), après une application a été déterminée pour des formulations à base de benzoate de benzyle (une solution et une suspension) et à base de Picaridin[®] (une solution et 3 types de suspensions) contenant toutes 10% massique de molécules actives. Les supports imprégnés ont été montés dans le dispositif expérimental présenté ci-après à des intervalles de temps prédéfinis. Nous avons effectué des suivis à plusieurs intervalles de temps, étalés sur 21 jours.

I.3. Etude de l'efficacité répulsive sur drosophile

Le principe de la méthodologie rapportée par l'équipe de recherche de Vosshall est de comparer le comportement de drosophiles adultes dans un schéma de recherche de nourriture, soumise à un choix de parcours (parcours traité par un répulsif et non traité, cf. Figure V.3) [Ditzen, 2008]. La drosophile a été choisie car elle présente plusieurs avantages pour l'étude en laboratoire. Son élevage est aisé et ne demande pas d'équipements particuliers. Par ailleurs les drosophiles ne sont pas hématophages, elles ne présentent pas de comportement type morsures ou piques, qui pourraient rendre leur manipulation fastidieuse. La taille de ces insectes est faible (2,5 à 3 mm), l'utilisation d'équipements de petite taille a par conséquent été possible. La drosophile est un insecte à métamorphose complète dont la reproduction est rapide : la durée d'un cycle est de 10 jours à 25°C. Les drosophiles extraites de leur enveloppe nymphale sont conservées avec leur milieu nutritif pendant 2 à 3 jours, avant leur introduction dans le montage expérimental. La Figure V.2 obtenue par MEB permet la visualisation des organes olfactifs de la drosophile

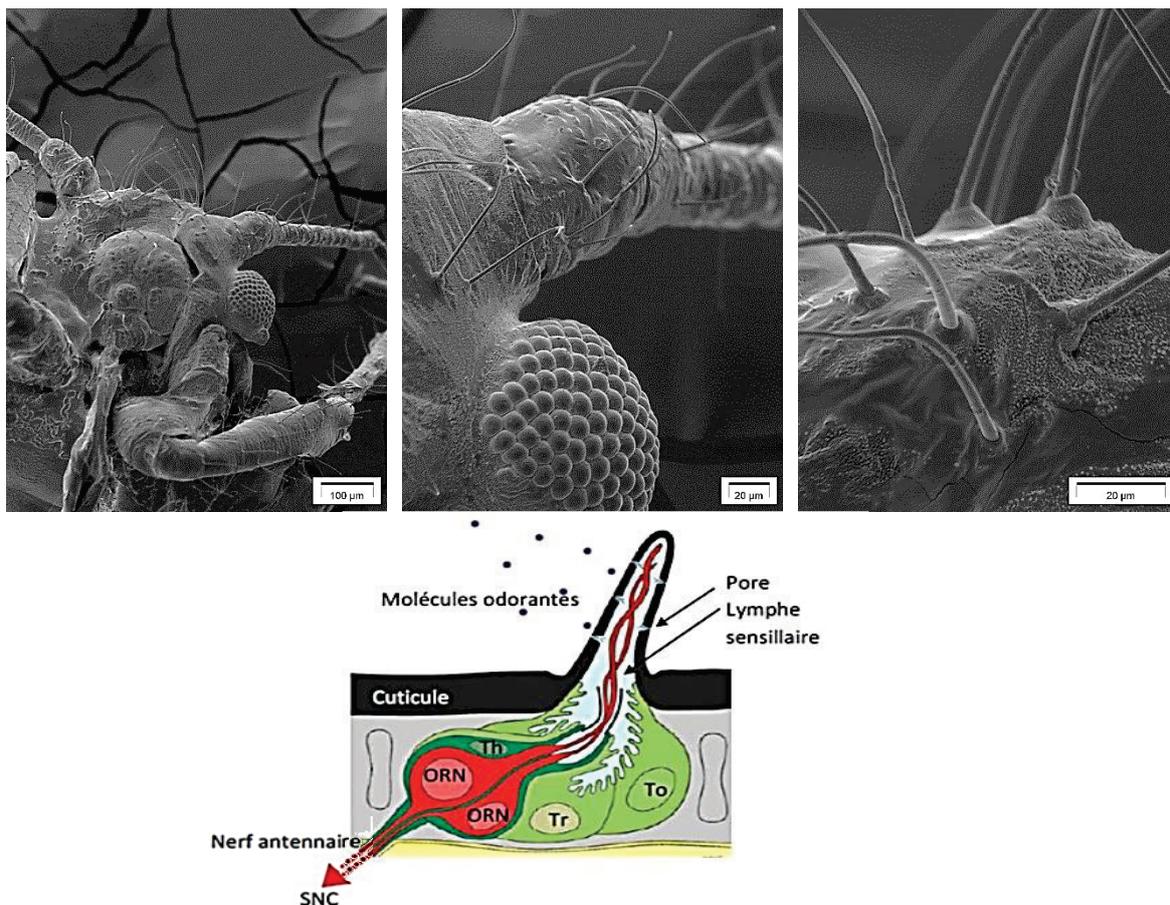


Figure V.2 : (A) Photos MEB des organes olfactifs de la drosophile. (B) Représentation schématique d'une sensille olfactive, ORN : Olfactive Receptor Neuron ; SNC : Système Nerveux Central.

Les molécules volatiles sont perçues par l'insecte principalement au niveau de ses antennes. À leur surface une multitude d'excroissances cuticulaires poreuses appelées sensilles olfactives renferment un ou plusieurs neurones récepteurs olfactifs baignant dans la lymphe sensillaire (cf. Figure V.2). Les OBP (Odorante Binding Protéin) captent ces molécules et leur fait traverser la lymphe sensillaire jusqu'au récepteur olfactif présent sur le neurone olfactif. Ce récepteur, couplé à un co-récepteur forme l'unité fonctionnelle olfactive. La liaison du complexe OBP/molécule odorante entraîne la dépolarisation de la membrane du neurone et ainsi l'initiation du message nerveux vers le système nerveux central. Les neurones partant des glomérules vont alors à leur tour activer des structures olfactives secondaires du système nerveux central qui induiront un comportement adapté à cette odeur : attraction ou répulsion.

Nous avons développé ces essais *in vivo* au laboratoire LBBE (Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université de Lyon, France) en collaboration avec Monsieur Rolland Allemand, chargé de recherche au CNRS. Les lots de drosophiles utilisés dans nos études ainsi que leur milieu nutritif principalement composé de farine de maïs, d'agar agar, et de levure, ont été obtenus au laboratoire LBBE de manière standardisée.

Pour étudier l'effet de formulations répulsives sur le comportement alimentaire de la drosophile, nous avons utilisé un système piège avec de la nourriture en tant qu'attracteur. Compte tenu de la possibilité que différents facteurs puissent modifier l'attraction des insectes (dépôt d'hormones, défécation...), tous les montages expérimentaux ont été soumis à une étape de lavage à l'eau savonneuse puis à l'éthanol, suivie par 12 heures de séchage à l'air ambiant. Les tubes contenant de la nourriture ont été remplis de façon identique.

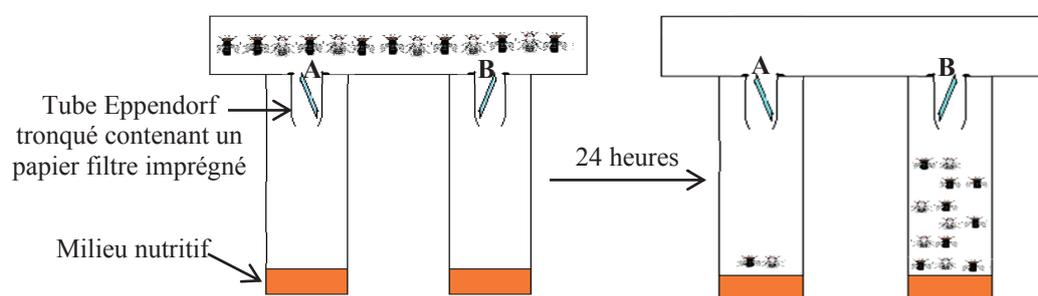


Figure V.3 : Schéma du dispositif expérimental pour l'évaluation de l'efficacité. (A) : formulation de matière active à propriété répulsive ; (B) : solution sans matière active.

Des boîtes rectangulaires de polypropylène ont été forées (réalisé par Jean Pierre Valour, Ingénierie de recherche LAGEP) pour l'introduction des tubes Eppendorf permettant le passage des drosophiles de la boîte supérieure à la boîte inférieure contenant le milieu nutritif. Les tubes Eppendorf de 1 ml ont été utilisés comme « chemin anti retour » entre la boîte supérieure et les tubes d'alimentation. L'opercule a été éliminé et une ouverture de taille prédéterminée a été réalisée. L'ouverture inférieure du tube Eppendorf permet le passage de la partie supérieure du dispositif à la partie inférieure, le chemin inverse n'est pas envisageable compte tenu de l'ouverture de taille trop faible. Les papiers filtres ont été découpés de manière standard pour une dimension de 10 mm sur 15 mm. Les milieux nutritifs (attractifs) utilisés pour les tubes de la partie inférieure des montages de test ont été minutieusement coulés en fond de tube afin d'éviter les dépôts sur les parois.

Des drosophiles adultes âgées de deux jours ont été mises à jeuner pendant 24 heures avec une source d'eau dans une pièce à température contrôlée avant de les introduire dans le montage de test. L'utilisation de lots de 40 drosophiles par montage expérimentale offre un volume de déplacement disponible suffisant par drosophile. La constitution des lots de 40 a été obtenue par comptage de drosophiles anesthésiées par le froid.

Les paramètres de haute importance dans l'élaboration de tests d'efficacité sont la haute répétabilité et la bonne reproductibilité des résultats obtenus. Il a donc été nécessaire d'optimiser l'espace de travail afin de suivre en parallèle le maximum de dispositifs expérimentaux. Pour ce faire, nous avons développé trois supports de dispositifs expérimentaux (cf. Figure V.4) permettant de suivre 15 boîtes expérimentales en parallèle, ainsi nous avons suivi 45 dispositifs expérimentaux par série d'expérience (développé par Jean Pierre Valour, Ingénierie d'étude LAGEP). Les étapes expérimentales sont illustrées par les photographies du dispositif à différents temps.



Figure V.4 : Support développé au laboratoire.

Les étapes expérimentales ont été conduites de manière identique pour tous les tests réalisés. Des tubes contenant le milieu nutritif ont été placés sur le support, la boîte supérieure contenant les tubes Eppendorf tronqués à leurs extrémités a été déposée et les papiers filtres ont été inclus, comme il l'est présenté en Figure V.5.

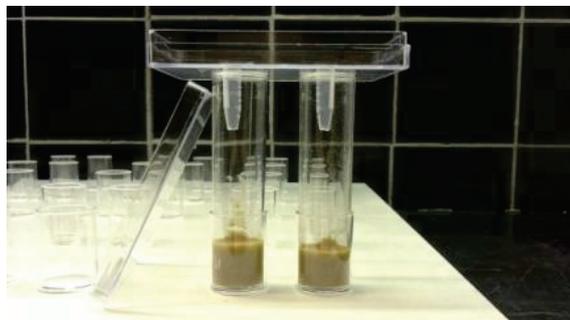


Figure V.5 : Montage d'un dispositif expérimental pour le test d'efficacité sur drosophiles.

30 minutes avant l'introduction des drosophiles, 10 μ L de la formulation à tester ont été introduits dans l'un des deux côtés du montage sur le papier filtre, alors que de l'autre côté du montage une solution sans matière active a été introduite à l'aide d'une micropipette parfaitement calibrée (cf. Figure V.6). Les drosophiles ont été introduites après anesthésie par le froid (utilisation de glace).

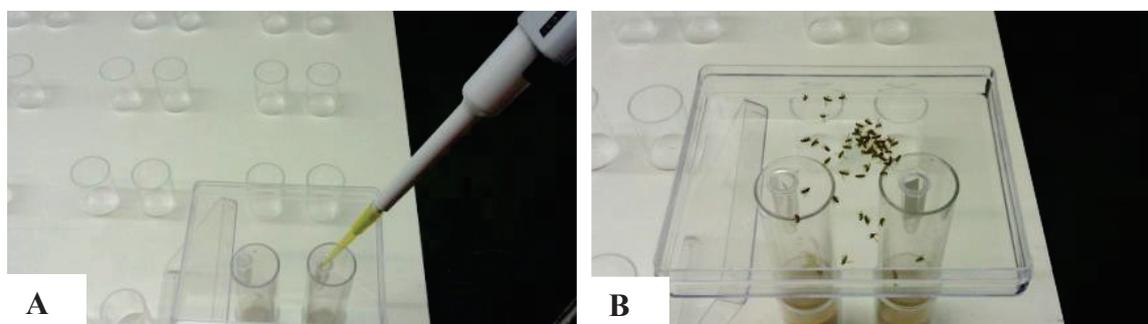


Figure V.6 : Introduction des produits testés (A) et des drosophiles anesthésiées (B).

Les boîtes ont été rapidement refermées, les drosophiles anesthésiées ont été réveillées par le retour à la température ambiante (cf. Figure V.7).

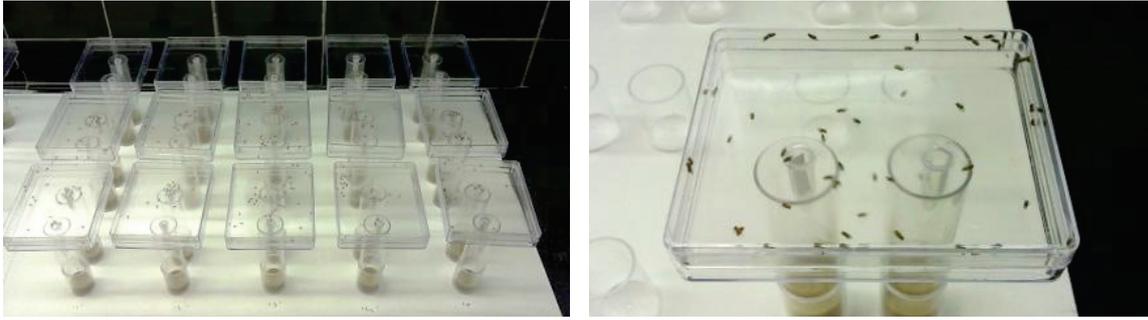


Figure V.7 : Boîtes expérimentales à t_0 .

Après 24 heures, la totalité des drosophiles se sont réparties dans les tubes inférieurs (cf. Figure 8). Le taux de mortalité a été dénombré dans la boîte supérieure et dans les tubes inférieurs. Les drosophiles dans les tubes inférieurs ont été endormies avec du dioxyde de carbone gazeux et dénombrées.



Figure V.8 : Boîtes expérimentales à $t_{24\text{heures}}$.

Chaque formulation a été testée sur au moins 6 boîtes expérimentales, afin de valider la reproductibilité des résultats.

Calcul de l'indice de répulsion IR

Les résultats sont exprimés en indices de répulsion, calculés en suivant l'Equation V.1.

$$IR = \frac{(N_1 - N_2)}{(N_1 + N_2)} \quad \text{Equation V.1}$$

- avec :
- IR indice de répulsion, compris entre -1 et 1 ;
 - N_1 nombre de drosophiles dans le côté ne contenant pas le produit répulsif ;
 - N_2 nombre de drosophiles dans le côté contenant le répulsif.

L'indice de répulsion traduit le pouvoir insectifuge de la formulation, il est compris entre -1 et 1. Toutes les valeurs positives traduisent une activité répulsive plus ou moins intense, avec une répulsion parfaite pour de IR égal à 1, comme il l'est représenté sur la Figure V.9.

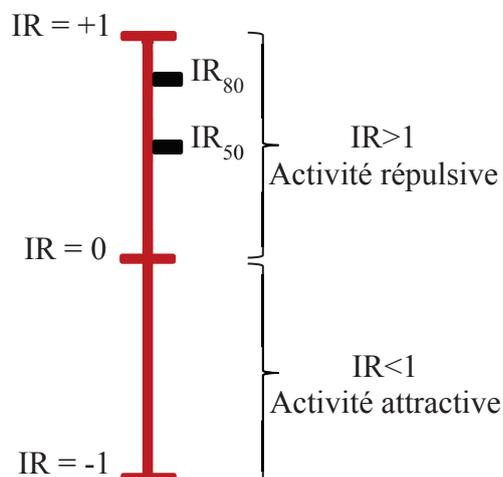


Figure V.9 : Echelle des valeurs des indices de répulsion et leurs significations.

Un indice de répulsion IR₈₀ ($IR \geq 0,8$) a été pris comme valeur comparative pour les formulations testées, traduisant une efficacité répulsive satisfaisante. Nous avons également considéré un IR₅₀ ($IR = 0,5$) comme valeur minimale permettant de traduire une efficacité faible mais non négligeable. Nous avons utilisé pour la représentation des résultats les valeurs moyennes et les erreurs types (ET) de chaque série expérimentale.

Validation du dispositif expérimental

La validation de l'équipement a consisté à tester la distribution équivalente entre deux tubes surmontés de papiers filtres imprégnés d'éthanol. Les résultats correspondent à des valeurs moyennes obtenues sur 15 dispositifs expérimentaux, les manipulations ont été réalisées sur cinq dates différentes afin de confirmer aussi bien la répétabilité que la reproductibilité.

Les résultats ont abouti à une répartition moyenne de 51% dans le tube gauche et 49% dans le tube droit (ET = 2%), aucun phénomène de répulsion ou d'attraction n'a été constaté, avec une valeur quasi nulle de l'indice de répulsion ($IR = 0,095 \pm 0,082$).

II. Résultats & Discussions

II.1. Efficacité répulsive des composants de la formulation

Les résultats en termes de pouvoir répulsif immédiat des composants des formulations sont présentés dans cette partie. Nous montrons les résultats obtenus pour le benzoate de benzyle, la Picaridin[®] et le DEET en exprimant la courbe dose/réponse des matières actives sans porteurs nanoparticulaires. D'autre part ces porteurs nanoparticulaires ne contenant pas de matières actives (des particules blanches) ont été testés.

II.1.a. Molécules actives en solution éthanolique

Le benzoate de benzyle, la Picaridin[®] et le DEET ont été testés en solution éthanolique afin d'apprécier leur pouvoir répulsif immédiat.

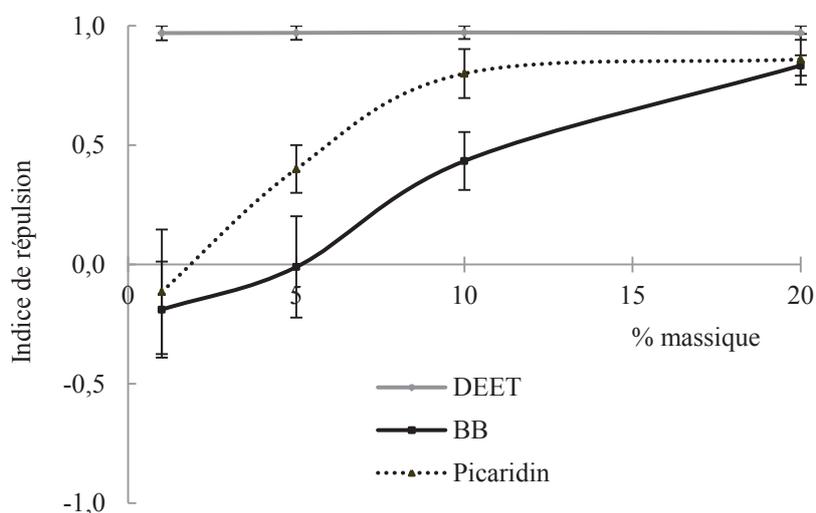


Figure V.10 : Evolution de l'indice de répulsion immédiat (IR) en fonction de la dose appliquée.

Dans la gamme de concentration étudiée, il apparaît que le phénomène de répulsion est dépendant de la quantité appliquée sur le support dans le cas du benzoate de benzyle et de la Picaridin[®] (cf. Figure V.10). Nous avons observé une activité intense du DEET avec une faible variabilité, même à des pourcentages faibles.

Grâce à l'obtention des courbes dose/réponse, nous avons déterminé le pourcentage minimal en molécules actives permettant l'obtention d'un indice de répulsion $IR = 0,5$ (IR_{50}). Les tendances des résultats obtenus sur le benzoate de benzyle et la Picaridin[®] sont représentées en Figure V.11, avec une ligne rouge représentant un $IR = 0,5$. Par conséquent l'intersection

entre cette ligne et la courbe expérimentale permet d'obtenir le pourcentage en molécules actives minimale permettant d'obtenir un effet répulsif notable.

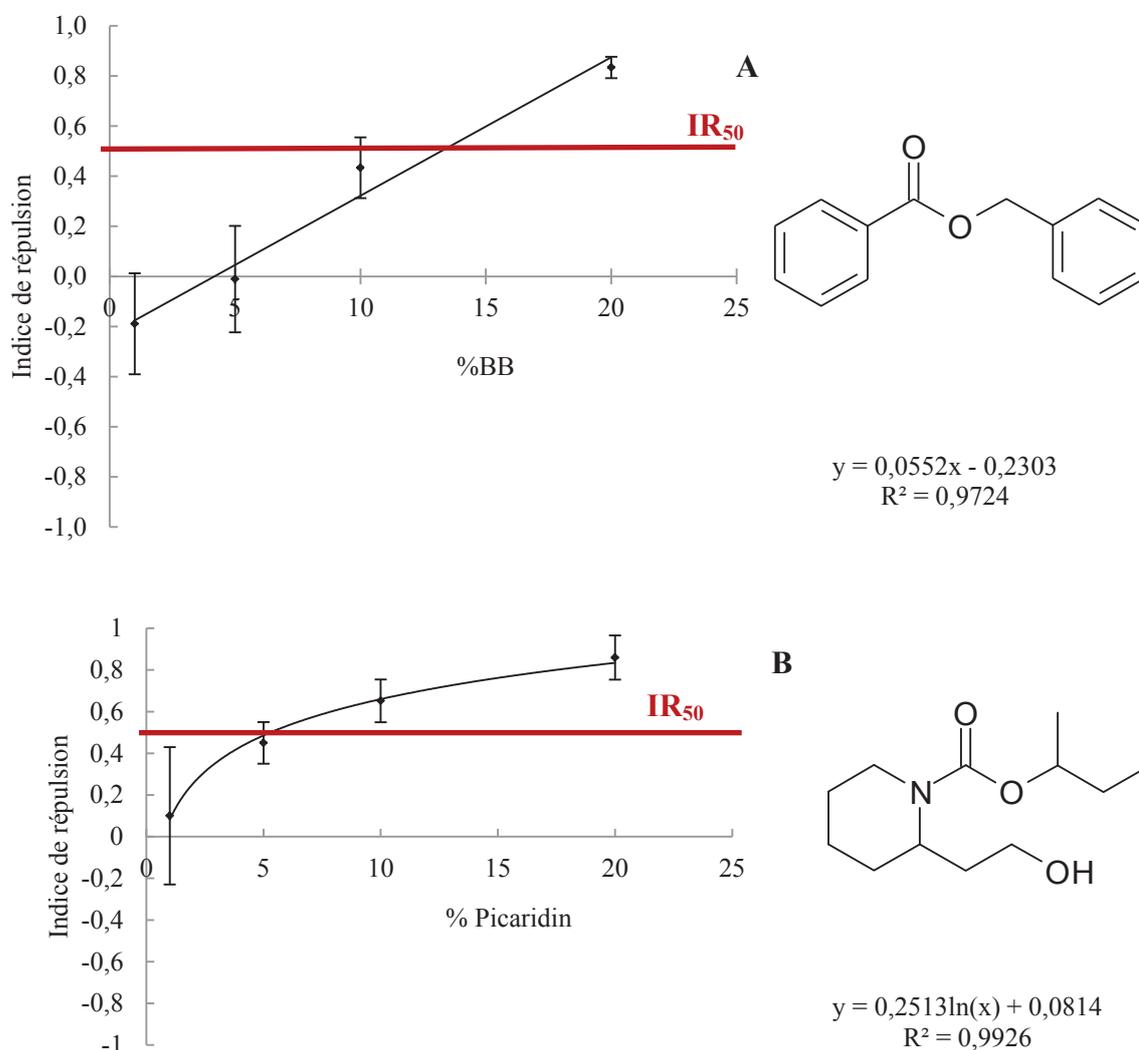


Figure V.11 : Evolution de l'indice de répulsion immédiat en fonction de la dose appliquée.

(A) benzoate de benzyle ; (B) Picaridin®.

La courbe dose/réponse obtenue pour le benzoate de benzyle montre un caractère linéaire du phénomène de répulsion en fonction de la quantité de benzoate de benzyle appliquée (ceci est valable dans la gamme de doses étudiées). Dans le cas de la Picaridin®, l'évolution du pouvoir répulsif en fonction de la dose appliquée évolue suivant une loi logarithmique. La Picaridin® a été décrite pour avoir une activité répulsive d'insectes comparable au DEET, dépendant de la dose et de la durée de l'application [Costantinia, 2004]. Un indice de répulsion immédiat satisfaisant ($IR = 0,86 \pm 0,10$) a été obtenu pour une dose appliquée de $6,92 \mu\text{mol}$ (solution éthanolique à 20% massique).

Les résultats d'efficacité obtenus pour la Picaridin[®] se sont révélés aléatoires pour les faibles concentrations en Picaridin[®]. En revanche les concentrations hautes ont démontré des ET faibles. Le Tableau V.4 rassemble des données caractéristiques de répulsion en fonction du pourcentage en molécules actives.

Tableau V.2 : Caractéristiques des tests d'efficacité réalisés sur le benzoate de benzyle et la Picaridin en solution éthanolique.

	1%	5%	10%	20%
BB [μmol]	0,37	1,87	3,74	7,49
IR \pm ET	-0,19 \pm 0,20	-0,01 \pm 0,21	0,43 \pm 0,12	0,83 \pm 0,04
Picaridin [®] [μmol]	0,46	1,73	3,46	6,92
IR \pm ET	-0,11 \pm 0,26	0,40 \pm 0,10	0,82 \pm 0,10	0,86 \pm 0,10

Les IR₅₀ et IR₈₀ ont été déterminés à partir des équations des courbes de tendances obtenues. Ces données sont combinées dans le Tableau V.5.

Tableau V.3 : Valeurs caractéristiques d'efficacité immédiate obtenues pour le benzoate de benzyle et la Picaridin[®] depuis une solution.

	IR ₅₀	IR ₈₀
Benzoate de benzyle [% massique]	14,32	19,75
Benzoate de benzyle [μmol]	5,36	7,39
Picaridin [®] [% massique]	5,28	17,41
Picaridin [®] [μmol]	1,73	5,71

Comme il l'a été mentionné dans le Chapitre I, une quantité minimale de répulsif est nécessaire pour la répulsion des insectes. Si nous raisonnons en quantité molaire de molécules actives, un nombre de moles moins important de Picaridin[®] est nécessaire pour obtenir la même intensité de répulsion. La courbe de décroissance de l'efficacité en fonction du pourcentage en matière active prend alors tout son sens. Il est à noter que la vitesse d'évaporation du benzoate de benzyle et de la Picaridin[®] mesurée par méthode gravimétrique est respectivement de 0,179 $\mu\text{mol}/\text{heure}$ et de 0,035 $\mu\text{mol}/\text{heure}$. Ainsi nous pouvons conclure de ces essais que la nature chimique et le nombre de moles appliquées influent sur l'efficacité insectifuge.

II.1.b. Nanoparticules blanches

Nous avons évalué le potentiel répulsif des chaînes polymériques de l'Eudragit®RS100 sous forme de particules. L'indice de répulsion obtenu depuis 10 répétitions partagées sur deux dates expérimentales a abouti à une valeur positive attestant d'une activité répulsive, $IR = 0,242 \pm 0,064$. Il apparaît donc que la nature chimique du polymère influe sur le comportement des drosophiles.

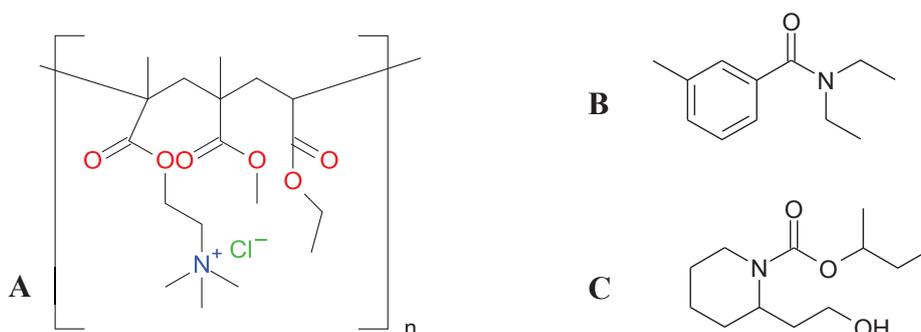


Figure V.12 : Structures chimiques de l'Eudragit®RS100 (A), du DEET (B) et de la Picaridin® (C)

L'Eudragit®RS100 est principalement composé d'unités répétées d'esters méthyliques, d'esters éthyliques et du groupement ammonium quaternaire. La comparaison fonctionnelle (cf. Figure V.12) de cette chaîne polymérique avec des molécules connues pour leur activité répulsive suggère une corrélation structure/activité. Il semblerait que la présence de la fonction ammonium quaternaire joue un rôle dans les phénomènes d'aversion observés chez la drosophile.

L'Eudragit®RS100 étant un polymère dont les temps de dégradation est extrêmement long, ses groupements chimiques n'ont pas la capacité de passer en phase vapeur et par conséquent nous pouvons en conclure que l'Eudragit®RS100 provoque un phénomène d'aversion après le contact entre l'insecte et la surface traitée. Il jouerait donc le rôle de répulsif de contact.

II.2. Étude de la durée d'action

L'extension de la durée de protection a été au centre des travaux de recherche. Nous avons prouvé que l'inclusion de molécules actives dans des nanoparticules influe sur leur libération, il est donc nécessaire d'étudier l'effet répulsif immédiat et dans le temps de ces formulations. Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus pour des formulations à base de benzoate de benzyle et de Picaridin®. Pour conserver la clarté des figures, nous n'avons pas inclus les barres d'erreurs types, ils sont cependant cités dans le texte.

II.2.a. Nanoparticules chargées en benzoate de benzyle

Les résultats de libération de molécules actives présentés dans le Chapitre IV ont été obtenus en utilisant le même dispositif de support de formulation (papier filtre imprégné et introduit dans un tube Eppendorf tronqué à ses extrémités). Ces résultats ont été convertis en dose appliquée par rapport à la surface d'application ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et corrélés aux résultats obtenus pour les tests de l'efficacité répulsive sur drosophiles. Nous avons comparé les résultats obtenus depuis une solution de benzoate de benzyle et une suspension nanoparticulaire, contenant 10% massique de benzoate de benzyle (formulation BB-NP citée dans le Tableau V.1). Les analyses ont été arrêtées à partir du moment où l'indice de répulsion s'est avéré non satisfaisant ($\text{IR} < 0,2$).

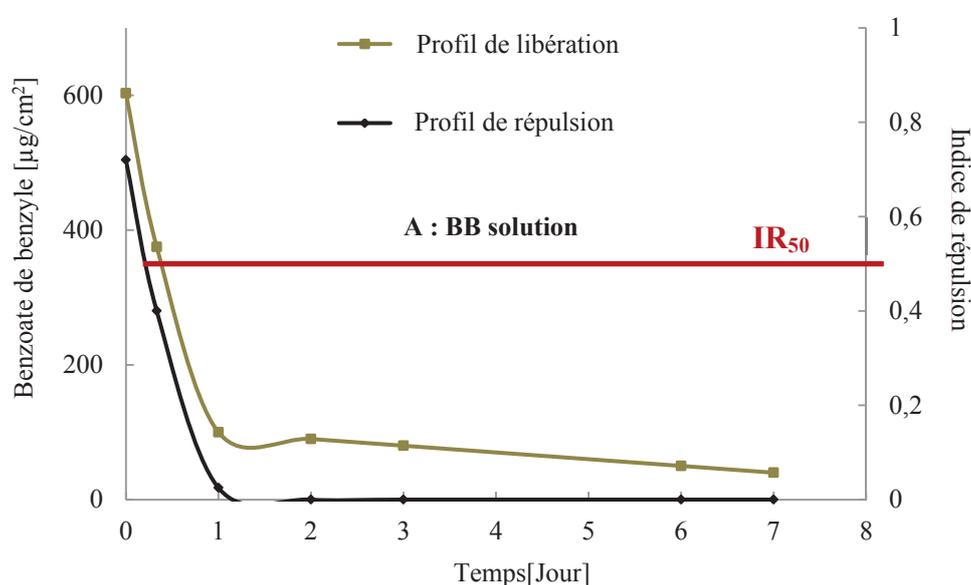


Figure V.13 (A) : Etude sur une solution de benzoate de benzyle. Mise en parallèle des profils de libération et des résultats d'efficacité répulsive sur drosophile en fonction du temps (BB solution).

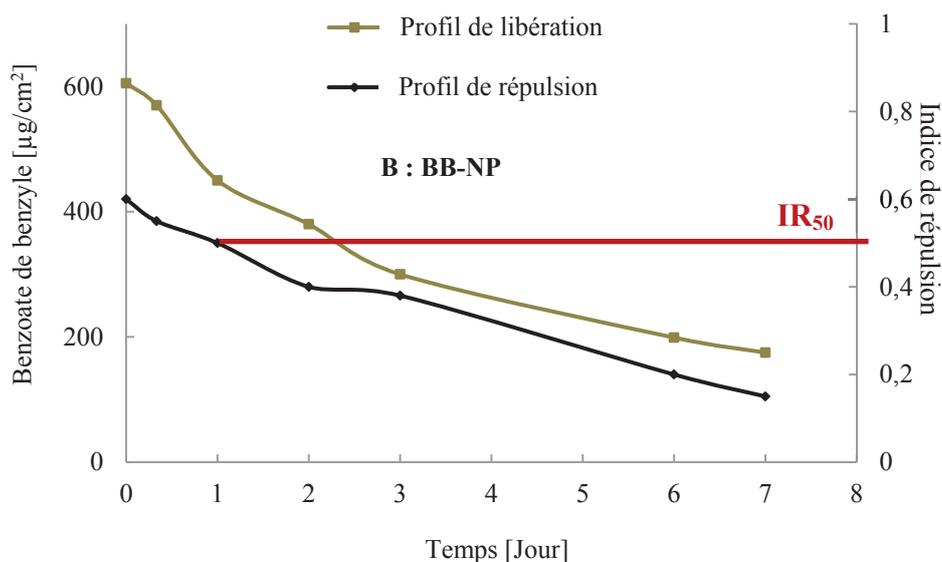


Figure V.13 (B) : Étude d'une dispersion de benzoate de benzyle. Mise en parallèle des profils de libération et des résultats d'efficacité répulsive sur drosophile en fonction du temps (BB-NP).

Le pouvoir répulsif décroît de la même manière que la quantité de benzoate de benzyle dosée sur le support. Dans le cas de la solution, l'indice de répulsion initial traduit une répulsion de plus de 50% des insectes ($\text{IR}_{t_0} = 0,72 \pm 0,05$, $n = 8$), en revanche il chute rapidement en quelques heures, et atteint une valeur nulle après 24 heures de suivi ($\text{IR}_{t_{24\text{heures}}} = 0,025 \pm 0,15$, $n = 8$).

En revanche, l'étude d'efficacité de la suspension nanoparticulaire chargée en benzoate de benzyle a abouti à un indice de répulsion initial légèrement plus faible ($\text{IR}_{t_0} = 0,61 \pm 0,09$, $n = 7$), qui décroît de manière linéaire suivant l'équation $\text{IR}_{\text{BB-NP}} = -0,06 t + 0,56$, avec un coefficient de corrélation satisfaisant ($R^2 = 0,98$).

Tableau V.4 : Valeurs caractéristiques d'efficacité répulsive des formulations de benzoate de benzyle. IR_{50} : dose nécessaire pour observer un indice de répulsion de 0,5 ; $t_{\text{IR}50}$: temps nécessaire pour obtenir un indice de répulsion de 0,5.

	BB solution	BB-NP
$\text{IR}_{50} [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$	493	451
$t_{\text{IR}50} [\text{heure}]$	5,28	24

De manière générale et au vu des résultats obtenus en termes de profils de répulsion et de profils de libération, la durée et l'intensité du phénomène de répulsion sont fonction de deux paramètres critiques :

- la quantité appliquée : plus la dose est élevée, plus l'intensité de la répulsion est haute ;
- la présence d'excipients : l'apport d'une barrière au phénomène d'évaporation (ajout du phénomène de diffusion dans la matrice polymérique) étend la durée d'élimination de la matière active et pour une dose efficace libérée, l'effet répulsif est étendu dans le temps.

II. 2.b. Nanoparticules chargées en Picaridin

Trois dispersions nanoparticulaires chargées en Picaridin[®] (Pica 1, Pica 2 et Pica 3, décrites dans le Tableau V.1.) et une solution éthanolique ont été formulées. Leurs profils de libérations ont été comparés et l'efficacité répulsive a été mesurée sur les drosophiles. L'effet qualitatif et quantitatif apporté par l'adjonction d'une matrice polymérique a ainsi pu être étudié. Nous présentons de manière distincte les profils de libération et les résultats d'efficacité répulsive pour conserver la clarté des données.

i. Profils de libération de la Picaridin[®]

Le suivi dans le temps de la libération de la Picaridin[®] en fonction de la proportion en agent matriciel est présenté en Figure V.14.

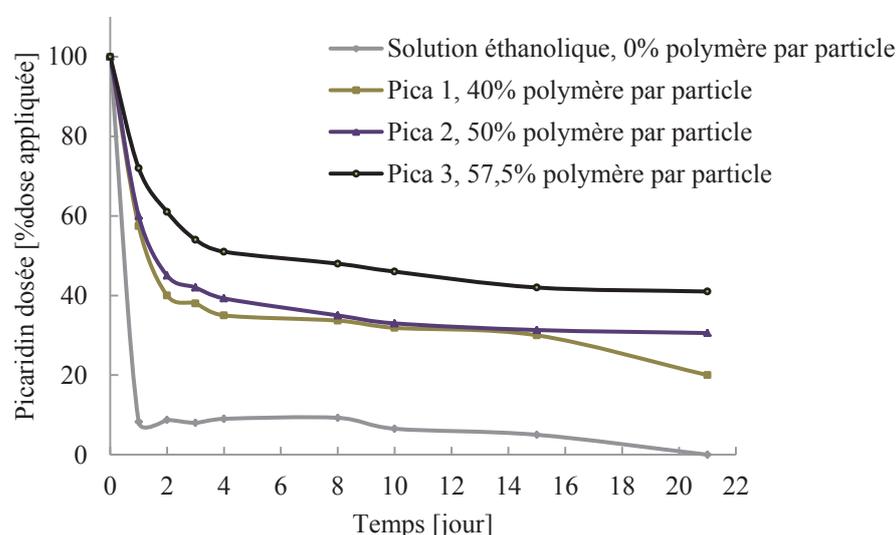


Figure V.14 : Profils de libération sur 21 jours de la Picaridin[®] en fonction du pourcentage en polymère par nanoparticule.

La libération de la Picaridin[®] depuis une solution éthanolique a présenté une évaporation intense pendant les premières 24 heures à une vitesse de 38 $\mu\text{g}/\text{heures}$ ($0,167\mu\text{mol}/\text{heure}$, 91 % de perte de la dose appliquée), plus lente que dans le cas du benzoate de benzyle. Cette

différence de vitesse d'évaporation est fonction des propriétés thermodynamiques propre à chaque molécule, en particulier la pression de vapeur saturante ($PV_{\text{Picaridin}^{\text{®}}} = 1,18 \cdot 10^{-5} \text{Torr}$; $PV_{\text{benzoate de benzyle}} = 2,25 \cdot 10^{-4} \text{Torr}$ à 25°C). Selon les lois de la thermodynamique, la volatilité d'une molécule évolue de manière proportionnelle avec la pression de vapeur pour une température de travail donnée [Abbot, 1978].

La quantité résiduelle de Picaridin[®] après 24 heures subit une libération longue dans le temps, il semblerait qu'une faible partie des molécules soient l'adsorbées sur le support cellulosique, empêchant leur passage normal en phase gaz.

L'adjonction de polymère à la formulation expose des différences notables. Pour les trois formulations nanoparticulaires, au moins deux phases de libération de la Picaridin[®] sont distinguables, comme nous pouvons le constater sur la Figure V.15. Les courbes représentent la libération de la Picaridin en fonction de la racine carré du temps (Equation I.9, modèle d'Higuchi).

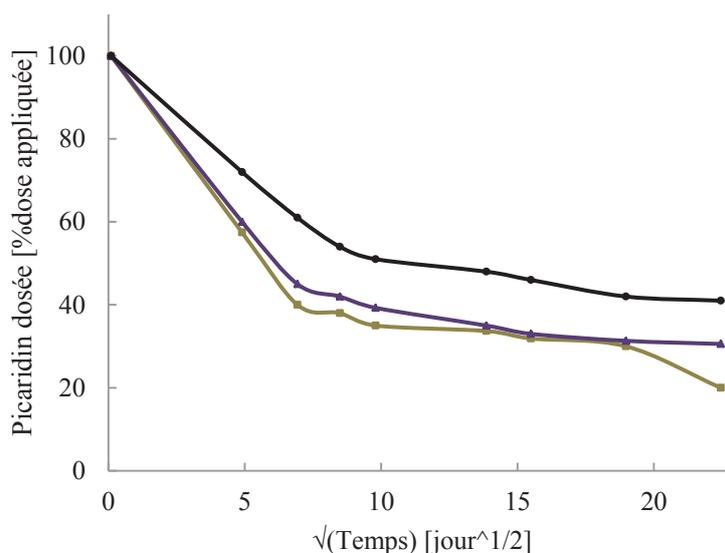


Figure V.15 : Profils de libération de la Picaridin[®] depuis 3 suspensions nanoparticulaires en fonction de la racine carré du temps.

La première phase de libération répond dans les trois cas à une libération selon le modèle d'Higuchi, traduisant une libération de la Picaridin[®] par des phénomènes de diffusion au travers d'une matrice polymérique. Cette libération initiale serait due à la présence de molécules présentes dans les premiers nanomètres en périphérie de la nanoparticule ou adsorbées en surface.

L'application du modèle d'Higuchi permet de visualiser deux cinétiques de libération de la Picaridin[®] pour les formulations Pica 2 et Pica 3, tandis que la formulation Pica 1 a présenté trois cinétiques de libération successives.

La cinétique de libération entre t_0 à $t_{3\text{jours}}$ de la formulation Pica 3 suit un modèle d'Higuchi confirmé par un coefficient de corrélation $R^2 = 0,998$ ($100-Q_t = 5,55\sqrt{t}$). L'application du modèle d'Higuchi a été validée pour les premières 48 heures dans le cas des formulations Pica 1 et Pica 2 ($R^2 = 0,999$; $100-Q_t = 8,67\sqrt{t}$ et $R^2 = 0,999$; $100-Q_t = 8,01\sqrt{t}$).

La libération de la Picaridin[®] dans ces deux cas peut être qualifiée de retardée par rapport à la libération depuis une solution. Pour la formulation Pica 3, un profil de libération contrôlée a été obtenu. La libération est moins intense, confirmé par les constantes de vitesse inversement proportionnelle au pourcentage de polymère par nanoparticules, ceci est dû à un laps de temps plus important nécessaire aux molécules pour diffuser dans la matrice polymérique avant d'atteindre l'extrémité de la particule.

Dans les trois cas étudiés, les phases de libération subséquentes sont gouvernées principalement par la diffusion de la molécule active au travers de la matrice polymérique suivant une libération retardée exponentielle. Les nanoparticules de type nanosphères (système matriciel) exposent généralement une cinétique de libération d'ordre 1 [de Villier, 2009].

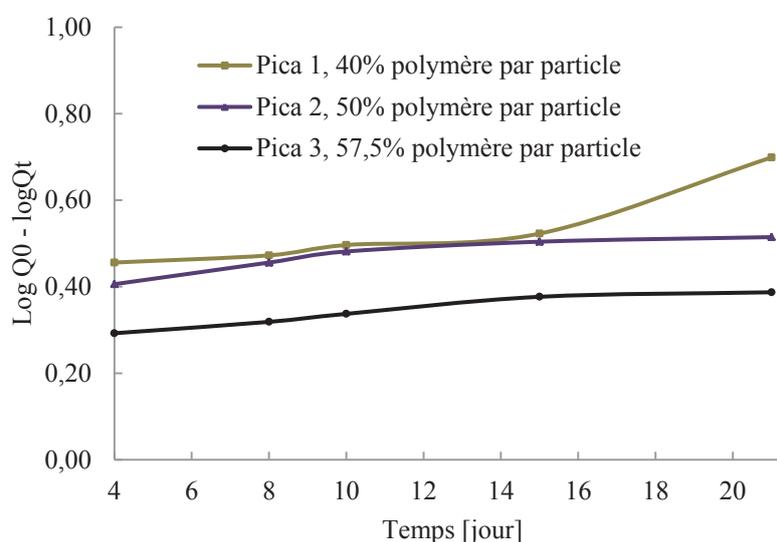


Figure V.16 : Profils de libération de la Picaridin[®] en fonction du pourcentage en polymères par nanoparticules, représentation de $t_{2\text{jours}}$ à $t_{21\text{jours}}$.

Les résultats en termes cinétiques de libération pour cette deuxième phase de libération ont été étudiés entre $t_{4\text{jours}}$ et $t_{15\text{jours}}$. La formulation Pica 3 répond au modèle de cinétique d'ordre 1 avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ ($\log Q_0 - \log Q_t = 7.10^{-3} t + 0,260$). Les formulations Pica 2 et Pica 3 ont présenté un profil de libération avec des coefficients de corrélation et des équations de libération $R^2 = 0,973$; $\log Q_0 - \log Q_t = 6,3.10^{-3} t + 0,429$ et $R^2 = 0,933$ et $\log Q_0 - \log Q_t = 8,9.10^{-3} t + 0,379$ respectivement. Nous pouvons attribuer cela au phénomène de coalescence des nanoparticules pendant le procédé de séchage conduisant à la formation d'un film de nanoparticules en surface du support, comme nous avons pu l'observer par MEB (Chapitre III).

Il semblerait que la libération de la Picaridin[®] à partir de 15 jours soit gouvernée par d'autres phénomènes de type érosion de la particule, ou encore la libération à partir d'une matrice de type film homogène. Les phénomènes de dégradation du polymère n'ont pas été retenus dans notre cas d'étude car le polymère utilisé présente un temps de dégradation long. Nous pouvons déduire de nos résultats obtenus en fin d'étude que les trois lots de particules étudiés présentent une capacité de rétention des molécules actives supérieure à 21 jours.

Plusieurs paramètres influencent la vitesse d'évaporation de la matière active encapsulée dans une matrice polymérique. Dans le cas de particules qui conservent leur sphéricité, le degré de porosité a une influence sur la vitesse de libération [le Bolay, 2009]. Nous avons observé un aspect de surface des particules de type nodulaire par MEB (cf. Chapitre III), ce paramètre pourrait jouer un rôle essentiel dans la compréhension des variations observées des phénomènes de diffusion en fonction du type de formulation. Cette caractéristique physique des particules peut être déterminée par des méthodologies d'adsorption d'azote par porosimétrie comme présenté par Sant *et al.* [Sant, 2005]. Durant le processus de préparation des nanoparticules, l'évaporation du solvant organique entraîne la précipitation du polymère en un réseau complexe formé de pores de diamètres variables. Plus une membrane est poreuse et les diamètres des pores grands, plus la vitesse de libération est élevée. La diffusion de la matière active à travers la matrice polymérique dépend également de sa nature chimique, de sa charge dans la matrice, de son état physique et de son affinité avec les chaînes polymériques composant la matrice particulaire. La compatibilité entre le polymère et la matière active encapsulée joue aussi un rôle important. Lui *et al.* [Liu, 2004] ont suggéré que des paramètres de solubilité similaires permettraient de prédire une rétention accrue de la matière active dans le vecteur.

Des paramètres de solubilité (δ) semblables pour la matière active et le polymère permettent de réduire au minimum l'enthalpie du mélange (ΔH_m), ce qui diminue la valeur de l'énergie libre du système (ΔG_m).

$$\Delta H_m = \varphi_1 \cdot \varphi_2 (\delta_1 - \delta_2) \quad \text{Equation IV.1}$$

avec : - φ_1 et φ_2 fractions volumiques de la molécule active (1) et du polymère (2) ;
- δ_1 et δ_2 paramètres de solubilité de la molécule active (1) et du polymère (2).

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \Delta S_m \quad \text{Equation IV.2}$$

avec - ΔG_m énergie libre du système ; - ΔH_m enthalpie du système ;
- ΔS_m entropie du système ; - T température.

D'autre part la méthode de nanoprécipitation utilisée pour la formation des particules pourrait également conduire à l'obtention d'objets différents, et particulièrement des nanogouttelettes (des émulsions). L'obtention de ce type d'objets est d'autant plus envisageable cas il semblerait que la Picaridin[®] ait un pouvoir solubilisant du polymère, et par conséquent la cinétique de libération s'en trouverait affectée.

Dans le cas de matière active ayant la capacité de cristalliser (*i.e.* Permethrin), lorsqu'elle est présente à un pourcentage élevé, celle-ci peut cristalliser à l'intérieur des nanoparticules; la libération de la matière active dépend alors de la vitesse à laquelle les cristaux se dissolvent et à laquelle les molécules diffusent à travers la matrice de polymère [Polakoviča, 1999].

ii. Efficacité des formulations à base de Picaridin[®]

L'effet répulsif immédiat et dans le temps en fonction de la teneur en polymère par nanoparticule a été réalisé. La Figure V.17 rassemble des efficacités insectifuges de trois formulations nanoparticulaires se différenciant par leur pourcentage en polymère par nanoparticules et de la solution de Picaridin[®] (n = 8 pour chaque point expérimental).

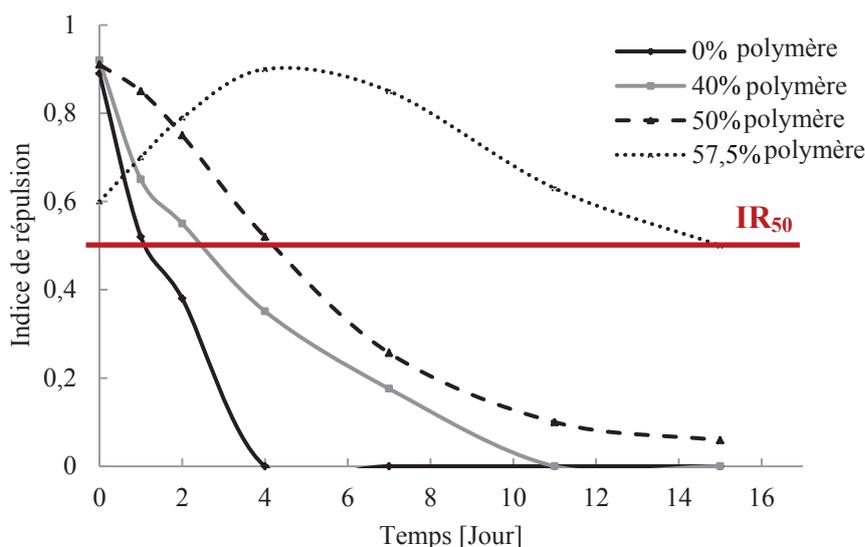


Figure V.17 : Indice de répulsion en fonction du temps et du type de fabrication. Comparaison de trois formulations nanoparticulaires et d'une solution éthanolique, toutes contenant 10% massique de Picaridin®.

L'activité insectifuge obtenue pour la forme libre de la Picaridin® s'inscrit dans la durée d'action décrite dans la littérature pour des formulations commerciales (Insect Ecran Special Tropic, 25 % Picaridin®, 8 heures de protection revendiquées [lecrat.org, 2012]).

Les profils de répulsion obtenus corroborent parfaitement avec les courbes de libération précédemment présentées, particulièrement pour les formulations Pica 1 et Pica 2. Ainsi il apparaît clairement que la quantité de polymère par nanoparticule joue un rôle décisif sur les phénomènes d'aversion, que ce soit en termes de durée ou d'intensité. Le Tableau V.7 rassemble les données caractéristiques corrélant la quantité présente sur le support aux indices de répulsion observés.

Tableau V.7 : Valeurs caractéristiques d'efficacité répulsive des formulations de Picaridin®. IR₅₀ : dose nécessaire pour observer un indice de répulsion de 0,5 ; t_{IR50} : temps nécessaire pour obtenir un indice de répulsion de 0,5.

	0%	40%	50%	57,5%
IR ₅₀ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	88	513	573	560
t _{IR50} [Jour]	1,1	2,5	4,2	15

La dose efficace IR₅₀ (pour obtenir un IR>0,5) déterminée pour la solution de Picaridin® est de 88 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, soit six fois plus faible que dans le cas des suspensions étudiées. Cette valeur

semble correspondre à un biais expérimental pour la raison suivante : la répartition des drosophiles dans les premières heures après le lancement du dispositif expérimental. Par conséquent les drosophiles sont soumises à une dose plus importante que celle dosée après 24 heures. Nous ne prendrons pas en considération cette première valeur pour cette raison.

Une valeur de $549 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Picaridin[®] conduit à une valeur d'indice de répulsion moyen (IR_{50}). L'indice de répulsion $\text{IR} = 0,5$ est atteint après des durées différentes selon la formulation étudiée. Plus il y a de polymère par nanoparticule, plus la durée nécessaire pour atteindre cette valeur est longue. Par conséquent le rapport polymère : matière active conditionne la durée d'action de la formulation finale, et par conséquent la durée de protection dans nos conditions de mesure spécifiques.

Une formulation de Picaridin[®] contenant 57,5% de polymère par nanoparticule présente une activité répulsive concurrentielle après 4 jours de traitement dans nos conditions expérimentales, alors que des formulations contenant moins de polymère par nanoparticule ont une activité immédiate satisfaisante. Il semble incompatible qu'une unique formulation puisse répondre aux besoins souhaités du produit final. Une formulation unique donnera une libération soit immédiate soit retardée. Seul le mélange d'au moins deux types de formulations nanoparticulaires ou d'une formulation de type solution avec une formulation de type nanoparticules permettrait de répondre à ces deux exigences (effet immédiat et retardé).

Il est important de noter que dans le cas de l'utilisation de papier filtres, les phénomènes de vaporisation de la matière active sont plus rapide que dans le cas de l'application de la formulation sur poils canins (cf. Chapitre IV). Il aurait été intéressant d'évaluer l'efficacité répulsive de formulations appliquées sur le support réel (les poils canins) en condition *in vitro* et *in vivo* afin de considérer tous les phénomènes physico-chimiques et physiologiques pouvant avoir lieu.

Conclusion

Les résultats en termes de test d'efficacité répulsive sur drosophile ont prouvé l'intérêt de la matrice polymérique sur l'effet immédiate et à long terme de molécules actives à propriétés répulsives. Le benzoate de benzyle a démontré un pouvoir répulsif qui est fonction du temps et du type de formulation. Une dose de benzoate de benzyle permettant l'obtention d'un indice de répulsion IR_{50} a été déterminé, cette valeur a été atteinte pour des durées variable en fonction du type de formulation, avec un effet rémanent observé dans le cas de la suspension nanoparticulaire.

Les processus de libération *in vitro* à partir de quatre formulations contenant de la Picaridin® ont permis de comprendre le comportement de la Picaridin® encapsulée dans une matrice polymérique. L'influence du pourcentage en polymère par particules a été évalué en terme de profils de libération et ces résultats ont été corrélés aux efficacités répulsives immédiates et dans le temps. La solution de Picaridin® a montré une libération de la molécule active très rapide, produisant un effet immédiat intense sans effet retardé.

Les phénomènes de diffusion au travers de la matrice polymérique gouvernent la sortie des molécules actives depuis la particule jusqu'à l'air environnant. Par conséquent, plus il y a de polymères par nanoparticules, plus la sortie des molécules actives est retardée. Ainsi, une formulation réfléchie permet le contrôle de la libération et ainsi le contrôle de l'activité. A partir de l'étude de l'efficacité répulsive des suspensions chargées en Picaridin®, nous pouvons affirmer que la formulation influence la description du type de libération de la molécule active, ce dernier permettant de prédire la performance des formulations. L'effet répulsif qui en découle est ainsi contrôlé, avec dans le cas de la Picaridin®, un effet répulsif immédiat intense pour des formulations contenant entre 0 et 50 % de polymères par particules, et un effet retardé à plusieurs jours pour des formulations contenant plus de 50 % en polymères par particules.



Discussion Générale



« Si vous ne pouvez expliquer un concept à un enfant de six ans, c'est que vous ne le comprenez pas complètement » Albert Einstein

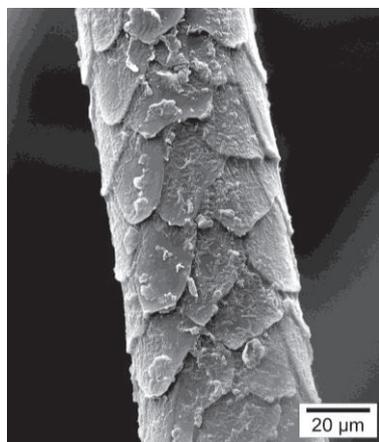


L'objectif principale de ce projet de thèse de doctorat a été l'élaboration d'une formulation innovante de répulsif d'arthropodes. La formulation est destinée à une application externe de l'animal, avec le chien en tant qu'espèce cible. Le critère prédominant du cahier des charges a été l'augmentation de la durée d'action. L'objectif du projet était d'augmenter la durée de d'activité de produits répulsifs. Pour ce faire, nous avons donc élaboré et optimisé la formulation de dispersions nanoparticulaires. Suite au caractère anionique du poil de chien, nous avons choisi l'élaboration de particules cationiques afin de favoriser l'adsorption *via* des interactions de type électrostatiques attractives. Une taille de particules de 200 nm a été déterminée comme étant la taille propice à un stockage dans les premières couches de la peau et particulièrement dans les follicules pileux. Nous avons ensuite orienté nos travaux sur la mise au point d'une dispersion stable de nanoparticules cationiques et composée de 10 % massique en matière active en tant que pourcentage minimum pour le développement d'un produit répulsif destiné au marché vétérinaire. La méthodologie industrialisable utilisée est basé sur le procédé de déplacement de solvant : la nanoprécipitation.

L'Eudragit[®]RS100 a été utilisé comme macromolécule formant la matrice polymérique lors de la formation des particules, permettant ainsi d'encapsuler des molécules actives hydrophobes à propriétés répulsives. Ce polymère apporter une charge cationique permettant une bonne stabilisation électrostatique des particules. Enfin, l'effet de la teneur en polymère a été étudié en tant que régulateur de la libération des molécules volatiles répulsives. L'évaluation de ces particules sur drosophiles a montré un effet répulsif marqué et encourageant.

I. Les particules modèles

Les phénomènes d'adsorption des particules sur les poils canins ont été démontrés par l'étude

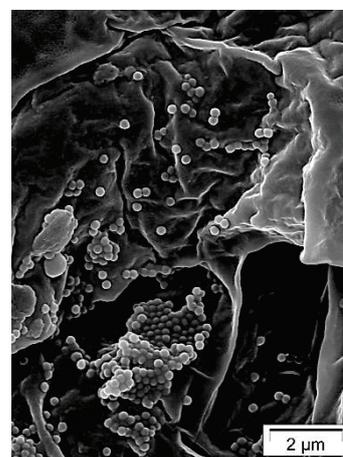


de la variation du potentiel zêta de la fibre pileuse en présence de nanoparticules. Une adsorption rapide des nanoparticules formant une gaine autour du poil a été observée, par évolution du potentiel zêta de surface et par des observations en MEB. Les nanoparticules appliquées à la surface de l'animal ont la capacité d'interagir le long des fibres pileuses. Des études *in vitro* de lavage des fibres pileuses ont été conduites. Ces études préliminaires ont été menées en utilisant des phases

aqueuses standards (eau déionisée pH = 6,5 ; [NaCl] = 0,001 M).

Nous n'avons pas observé de variation du potentiel zêta en fonction des cycles de lavage, ce qui laisse penser que la quantité de particules adsorbées n'est pas affectée par la présence d'eau sur le pelage de l'animal.

Le suivi de pénétration cutanée de particules modèles a été réalisé par microscopie confocale sur des fragments de peau canine. Il apparaît que des particules modèles (à base de PMMA) de 200 nm présentent une meilleure capacité d'introduction dans les orifices folliculaires, en comparaison avec des particules de même nature de 100 nm, 400 nm et 600 nm de diamètre (observations par microscopie confocale et par microscopie à fluorescence). Ceci évite l'élimination de la formulation par simple friction. Lademann *et al.* [Vogt, 2006 - Lademann, 2008] ont démontré que les particules ne sont pas en mesure de traverser la barrière cutanée (que ce soit par voie intercellulaire, intracellulaire ou folliculaire). Les nanoparticules pénètrent de manière efficace et plus profondément que les formes non particulaires dans les orifices folliculaires. Ils ont également rapporté que les particules de tailles de 300 nm à 600 nm sont des meilleurs candidats pour une introduction profonde des nanoparticules dans les follicules pileux [Schaefer, 2001 - Lademann, 2011]. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans nos travaux de recherche, qui ont permis de discriminer une taille de 200 nm pour une pénétration profonde dans les follicules pileux. Il est difficile de faire cette comparaison car elles ont été effectuées sur des supports différents, nous avons utilisé des explants de peau canine alors que la majorité des évaluations de pénétration cutanée sont élaborées sur peau de porc (de part leur proximité structurale avec la peau humaine). Des études sur des fragments de peau canine n'ont pas été rapportées à notre connaissance, et une comparaison tangible avec des résultats de la littérature n'est pas envisageable. Basés sur nos résultats, nous avons choisi de travailler sur des nanoparticules de 200 nm de diamètre pour leur capacité d'introduction dans les orifices folliculaires, leur stockage dans les couches cellulaires du *stratum corneum*, et de charge positive pour leurs interactions fortes avec les fibres pileuses.



II. Formulation

L'étude préliminaire nous a conduits à élaborer des formulations de dispersions colloïdales de nanoparticules cationiques d'environ 200 nm de diamètre par un procédé de formulation industrialisable. Par conséquent l'élaboration de particules à partir de polymères préformés est

une voie privilégiée. La nanoprecipitation a été le procédé de formulation au centre de nos travaux de recherche. Aucun apport d'énergie externe n'est nécessaire pour la formation de nanoparticules (pas d'agitation forte, de cisaillement élevé ou de sonication), la nanoprecipitation est un procédé de fabrication accessible, avec des besoins en équipement modestes et de faible coût [Aubry, 2009]. A titre comparatif, les techniques d'émulsification diffusion de solvant (ou méthodes appariées) impliquent généralement l'utilisation d'équipements plus sophistiqués [Mora-Huertas, 2011].

Les travaux précédemment décrits dans le domaine de la formulation de particules polymériques obtenues par nanoprecipitation décrivent trois étapes principales de fabrications : la précipitation du polymère, l'élimination de solvant et enfin la concentration de la suspension. L'élimination des solvants organiques doit être réalisée avec précaution, car cette étape peut conduire à une déstabilisation rapide de la suspension. L'étape de concentration des particules peut aller jusqu'à une élimination totale de la phase continue pour l'obtention d'une poudre. Etant donné qu'il s'agit d'un produit d'usage courant, il a été nécessaire de diminuer au maximum les étapes coûteuses en temps et en énergie. Dans notre cas d'étude, il a été nécessaire d'avoir un pourcentage en matière active élevée, et par conséquent une haute concentration en systèmes vecteurs (les nanoparticules). Ces caractéristiques ont été obtenues en procédant de la manière suivante : le procédé de nanoprecipitation a été conduit en commençant par la préparation des phases organique et aqueuse, l'introduction de l'une dans l'autre a abouti à l'obtention de la suspension finale, sans étape d'évaporation de solvant ou de concentration des nanoparticules. Ces deux dernières ont pu être évitées car le solvant organique utilisé est l'éthanol, il prend alors le rôle de conservateur de la formulation. Par ailleurs la formulation contient 20% de nanoparticules, l'étape d'élimination d'eau par concentration n'est donc pas nécessaire.



La nature chimique chargée du polymère utilisé (l'Eudragit®RS100) a permis d'élaborer des formulations de nanoparticules chargées positivement [Ubrich, 2005].

Par ailleurs l'ajout d'agents de surface n'a pas été nécessaire. Tous les constituants des formulations sont reconnus comme non toxiques par la FDA et sont autorisés pour une application externe. Les formulations obtenues ont été des suspensions colloïdales de nanoparticules cationiques de taille comprise entre 100 nm et 300 nm, cette taille dépend du rapport matière active :

polymère, pour un pourcentage en matière active de 10% massique. La forte teneur en

nanoparticules obtenue sans étapes de concentration fait de cette méthode de fabrication un procédé de grand intérêt. A notre connaissance, de telles suspensions colloïdales contenant un pourcentage en nanoparticule supérieur à 5% n'ont pas été décrites dans la littérature sans étapes de concentration. La plupart des dispersions sont décrites pour une teneur de 3% massique en nanoparticules, sans étape de concentration de particules [Mora-huertas, 2010]. Les observations des nanoparticules appliquées sur support solide, par MEB et AFM, ont démontré une capacité d'affaissement des nanoparticules. Routh et Russel [Routh, 1999] ont résumé les mécanismes possibles de déformation des particules au cours de leur coalescence, prédisant la coalescence des particules à différents temps et différentes températures. Notre étude sur les phénomènes de filmification s'est arrêtée à l'observation de la formation d'un réarrangement des nanoparticules le long de la fibre pileuse traitée, ceci à température corporelle (32°C). Le réarrangement des nanoparticules permet de décupler la surface de contact entre les nanoparticules et la surface des poils. Il serait intéressant d'effectuer une étude des paramètres de solubilité des polymères et des molécules actives. Ces données pourraient participer à une meilleure compréhension des phénomènes moléculaires se produisant lors de la formation des particules [Rowe, 2006].

La stabilité colloïdale a été évaluée pour un suivi sur 2 ans à 40°C. Les dispersions colloïdales ont présenté les mêmes caractéristiques physico-chimiques après fabrication et après cette longue période de stockage. De par leur intérêt innovant, ces travaux de recherche ont fait l'objet d'un dépôt de brevet. Deux molécules actives ont été étudiées en détail durant nos travaux expérimentaux : le benzoate de benzyle et la Picaridin[®], ce dernier ayant démontré un pouvoir répulsif comparable à celui du DEET.

III. Interactions des particules chargées en molécules actives

Les interactions des nanoparticules d'Eudragit[®]RS100 chargées en matière active modèle (le benzoate de benzyle) avec les supports finaux (poils et peau canine) ont été étudiées. La capacité de s'introduire dans des couches supérieures de la peau est propre aux nanoparticules, contrairement à la matière active à l'état libre (études sur cellules de Franz). La méthodologie de séparation des couches de la peau n'a pas permis la séparation du *stratum corneum* en surface et dans les follicules pileux, c'est en comparant nos résultats obtenus par microscopie confocale et à fluorescence que nous pouvons affirmer que les nanoparticules ont la capacité de transporter les molécules actives dans des espaces protégés tels que les follicules pileux. Cette caractéristique est d'autant plus intéressante dans notre cas d'étude car

le chien est un animal de compagnie, il est souvent caressé par ses propriétaires. D'autre par son gout prononcé pour l'exploration fait de son pelage une zone de friction, l'élimination continue de formulations basiques déposées à sa surface est fortement envisageable. Les caractéristiques physicochimiques de la molécule étudiée entrent en ligne de compte, particulièrement son caractère lipophile, exprimé par son coefficient de partage octanol/eau (logP). Il a été postulé que les composants très polaires ont la capacité de traverser le *stratum corneum* (lipophile) *via* les pores aqueux, alors que le transport de molécules peu polaires est limité par leur passage depuis le *stratum corneum* jusqu'aux compartiments aqueux des tissus subjacents [Potts, 1992]. Dick et al ont étudié la pénétration de matières actives de lipophilie variable [Dick, 1997 - Lotte, 1997]. Ils ont démontré que la lipophilie des molécules joue un rôle prédominant dans la perméation transcutanée. Le renouvellement continu des cellules de la peau permet aux nanoparticules chargées en matière active de ne pas pénétrer dans des couches plus profondes. Dans notre cas d'étude, des nanoparticules polymériques de type polyacrylate, ont montré par microscopie confocale et par cellule de Franz, que les particules de 200 nm s'incluent dans les orifices folliculaires et tout le long du *stratum corneum* entre les feuillets le composant.

IV. Profils de libération

Les cinétiques de libération des matières actives ont été suivies *in vitro* et *in vivo*, sous leur forme libre et encapsulée. La partie d'étude *in vitro* a été un point clé de nos travaux de recherche en tant que preuve de l'apport des nanoparticules dans la rétention des molécules actives encapsulées, la mise au point d'une méthodologie mimant au mieux les phénomènes réels se produisant après une application sur l'animal a été nécessaire. La littérature décrit des modes opératoires basés sur des libérations en milieu dispersé, le passage de la matière active se fait depuis la particule à une phase continue aqueuse [Solomon, 2012 – Maji, 2007]. Ces méthodologies ont tendance à forcer la sortie de la matière active en utilisant des milieux continus appropriés à leur mise en solution. La comparaison entre la matière active en solution n'est pas possible dans le cas d'une méthodologie en milieu dispersé. Dans les conditions réelles, la phase continue est l'air environnant et par conséquent des phénomènes physico-chimiques différents peuvent avoir lieu.

Nous avons élaboré une méthodologie d'étude du profil de libération permettant la comparaison d'une part des profils de libération et d'autre part l'étude de l'efficacité immédiate et dans le temps. La matrice polymérique a clairement montré son intérêt dans la rétention de la matière active encapsulée. Des différences significatives ont été observées

entre les types de formulation (solution et suspension) et également entre les formulations nanoparticulaires. Les suspensions nanoparticulaires ont présenté un effet réservoir de molécules actives, permettant à ces dernières de diffuser dans la matrice polymérique avant leur sortie et leur passage en phase gazeuse.

Une étude a été conduite sur beagle avec une formulation nanoparticulaire à base de benzoate de benzyle. L'utilisation d'animaux nous a contraints à étudier une seule formulation étant donné les moyens mis en œuvre. Ces études sur beagles ont démontré de fortes interférences du au comportement naturel de l'animal. C'est pour cela que nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude d'une seule zone, la partie dorsale. Le dosage de la matière active résiduelle sur cette zone a montré la présence de matière active après 15 jours de traitement. Les étapes d'essuyage de la peau de cette zone ont mis en avant l'importance de l'étude de la pénétration cutanée. Les résultats obtenus sur beagles restent mitigés car ils ont présentés plusieurs critères de biais (lavage quotidien de la cage).

V. Efficacité

Ces profils de libération ont été parfaitement corrélés aux **profils d'efficacité** obtenus sur un insecte modèle. Il a été rapporté dans la littérature que l'adjonction de polymères rend possible l'allongement de la durée d'action. Déjà en 1993, un brevet décrivant une extension de la durée d'activité a été publié [Domb, 1993]. Ce brevet décrit la fabrication de « liposphères » contenant du DEET, qui apporterait une libération contrôlée en minimisant son absorption dans la peau. Les particules testées sont au minimum de 10 microns, obtenues par des méthodes nécessitant plusieurs étapes de procédé. L'extension de la durée d'activité a été trouvée dépendante du rapport matrice lipidique (ou polymérique) : matière active pour une durée maximale de 6 heures. Dans ce cas d'étude, comme dans la plupart des cas rapportés dans la littérature, le test utilisé pour démontrer l'activité durable est celui de l'avant-bras, utilisant des Hommes et des moustiques [Mark, 2002 - Pretorius, 2003]. Il n'a pas été nécessaire dans notre cas d'utiliser ce type de test car le produit envisagé est pour une application sur chien. Dans le cas idéal, il aurait été intéressant d'effectuer des tests d'efficacité sur chiens. Ce type de test étant très onéreux il n'a pas pu être effectué pendant nos travaux de recherche.

Par conséquent les tests élaborés sur drosophiles ont constitué une méthodologie peu coûteuse permettant l'établissement d'une batterie importante de tests. Nous avons comparé des molécules à l'état libre et formulées sous forme de nanoparticules. Le résultat d'importance

prédominante a été l'observation d'une efficacité répulsive dépendante de la part de polymères par nanoparticules. Nous avons démontré que des particules élaborées avec une quantité de polymères inférieure à 47% en polymères par particules ne parvenaient pas à limiter de manière satisfaisante la libération des molécules actives. Ce type de particules confère une activité immédiate intense mais peu prolongée dans le temps. Les essais élaborés sur des particules contenant une part importante en polymère (>57% en polymères par particules) ne présentent pas d'activité immédiate, mais confèrent une protection de plusieurs jours voire plusieurs semaines subséquents à un temps de latence nécessaire à la diffusion de la matière active dans la matrice polymérique. Les expériences effectuées avec les drosophiles ont prouvé que la durée d'efficacité est dépendante du type de formulation et particulièrement du type de nanoparticules formulées. Il est à noter que ces résultats sont valables pour des conditions opératoires bien précises, c'est-à-dire pour une dose appliquée de $13\mu\text{L}/\text{cm}^2$, imposée par le matériel expérimental. Par conséquent, nous pourrions facilement envisager un mélange de nanoparticules constituées d'un rapport polymère : matière active différents, afin de garantir un effet immédiat et rémanent sur plusieurs heures, et un effet persistant pour une protection après quelques jours de l'application. Ces résultats méritent d'être complétés par une extrapolation sur d'autres types d'arthropodes (moustiques, tiques...) de façon à étudier l'étendue du spectre d'activité de ces formulations

Les résultats présentés dans ce manuscrit constituent une base de recherche dans le développement de formulations innovantes pour la protection contre les maladies transmissibles par les insectes en contrôlant la libération des molécules actives judicieusement choisies. Ce type de formulation pourrait avoir un avenir dans la protection de l'Homme, de l'habitat ou des cultures, au travers d'une formulation vaporisable ou par imprégnation sur des textiles. Le type de formulation ainsi que le procédé d'obtention peuvent rapporter de nombreuses utilités dans divers domaines de développement de produits à des échelles industrielles (pharmaceutique, cosmétologie, dermatologie, agroalimentaire, peinture, colle ...).



Conclusions et Perspectives



« Il n'est pas d'un homme raisonnable de blâmer par caprice l'étude des insectes, ni de s'en dégoûter par la considération des peines qu'elle donne. La nature ne renferme rien de bas. Tout y est sublime, tout y est digne d'admiration » Aristote



L'application de produits répulsifs d'arthropodes a pour but de prévenir l'approche des insectes porteurs de pathogènes. L'industrie vétérinaire est particulièrement concernée par cette thématique de recherche étant donné le nombre important de maladies contractées par les animaux après des piqûres ou des morsures d'arthropodes. Les nanoparticules à base de polymères constituent une alternative intéressante pour les formulations de répulsifs d'arthropodes, avec comme objectif primordial l'extension de la durée de protection. Les nanoparticules développées dans ces travaux de thèse ont démontré une rétention adéquate du principe actif encapsulé après administration. Le potentiel de ciblage des nanoparticules dans des sites protégés de la peau ainsi que l'adsorption le long des fibres pileuses sont tributaires de la taille et du potentiel zêta des particules. À cette fin, des limites de taille et des propriétés de surfaces spécifiques (le potentiel zêta) doivent être respectées afin d'assurer des interactions fortes du vecteur à l'égard de la peau et des fibres pileuses de l'hôte.

Les nanoparticules cationiques de 200 nm de diamètre ont présenté la capacité de s'adsorber à la surface des poils canins, d'atteindre les premières couches de la peau, et de s'introduire dans les follicules pileux. Leur fabrication a été élaborée *via* une méthode dérivée du procédé de nanopréciipitation, nécessitant une seule étape de fabrication. L'effet de la matrice polymérique sur les profils de libération des molécules actives encapsulées. Par conséquent, nous pouvons envisager qu'un mélange de particules au sein d'une dispersion permettrait de rassembler une protection immédiate et une protection longue durée.

Pour finir, la transposition à l'échelle pilote du procédé de fabrication des suspensions nanoparticulaires contenant une matière active à propriété répulsive a été concluante, rendant envisageable la production industrielle de ce type de formulation.

Perspectives

Nous avons élaboré des expérimentations supplémentaires pendant la thèse, nous discuterons brièvement dans les paragraphes qui suivent des tests les plus pertinents effectués, faisant l'objet de perspectives expérimentales supplémentaires.

Une **évaluation cosmétique** d'une formulation de type suspension colloïdale chargée en Picaridin[®] a été menée afin d'évaluer l'acceptabilité de l'aspect visuel et de la sensation au toucher après un traitement topique. L'étude a été conduite sur un jour sur trois groupes de chiens (2 témoins, 2 traités de manière direct, 2 traités à rebrousse-poil). Tous les observateurs ont considéré comme acceptable l'aspect visuel et de l'appréciation lors du toucher pour tous les chiens à tous les temps d'analyse. L'apparence, la sensation au toucher et une échelle de visualisation analogique ont montré une variabilité importante entre les opérateurs et dans les groupes. Il n'y avait pas de tendance claire après 1 heure de traitement entre les groupes traités. Les groupes 2 et 3 ont été considérés comme moins acceptables que le groupe de contrôle avec des valeurs moyennes d'acceptabilité de 12,3 et 17,4, comparativement à 3,3 pour le groupe témoin. Le rapport d'étude est fourni en Annexe 5. Il apparaît donc que l'aspect visuel de la formulation après un traitement externe de l'animal doit être amélioré. L'adjonction de molécules émoullientes pourrait permettre l'obtention de formulation présentant un aspect plus acceptable. Il serait également intéressant d'évaluer l'ajout de silice dans la formulation nanoparticulaire. L'adjonction de silice en tant qu'agent de touche permettrait de réduire l'éventuel l'effet collant de préparations.

D'autres **formes de vecteurs** de molécules actives ont été pensées pendant nos travaux de recherche. Des premiers essais de complexation avec des cyclodextrines ont été effectués. L'inclusion de la Picaridin[®] et du DEET dans des cyclodextrines natives et dans une cyclodextrine modifiées (hydroxypropyl- β -cyclodextrine) a été réalisée dans des études préliminaires. Nous avons établi un suivi de la libération de la Picaridin[®] depuis l'hydroxypropyl- β -cyclodextrines, il est apparu que la Picaridin[®] n'a pas la capacité de s'extraire de la cyclodextrine pour passer dans l'air environnant. Par conséquent le principe de répulsion à distance n'a pas pu être envisageable, c'est pour cela que nous n'avons pas poursuivi nos travaux de recherche vers cette nouvelle voie. Il serait intéressant de comparer nos résultats de rémanence obtenus à partir de nanoparticules sur des objets de taille plus importante, les microparticules.

Un travail expérimental d'importance a été la recherche de méthodes permettant d'étudier la **libération de molécules actives**, au plus proche des phénomènes rencontrés dans des conditions réelles. En plus des expérimentations présentées dans ce manuscrit, la combinaison en ligne d'un analyseur thermogravimétrique (ATG) et d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été appliqué pour analyser la présence de produits volatiles (les agents répulsifs) dans la phase gazeuse au cours du temps. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire C2P2 (Chimie Catalyse Polymères et Procédés, Université Lyon 1) avec la collaboration de Monsieur Olivier Boyron (Ingénieur caractérisation des polymères). Ce dispositif a permis de caractériser la nature des composés chimiques qui passent en phase gazeuse depuis une suspension déposée. La caractérisation thermique a été réalisée avec une thermobalance, Mettler Toledo TGA/DSC1. Un échantillon de suspensions contenant de la Picaridin[®] a été pesé avec précision et ramené à 32°C afin de mimer la température de surface de l'animal. Le gaz porteur circulant à un débit minimal a été l'air. Les spectres IR ont été réalisés sur un IS10 Nicolet (Thermo Scientific). Les spectres ont été enregistrés à une résolution de 4 cm⁻¹ avec une moyenne de 64 balayages pendant 6000 minutes (4 jours). La perte de poids mesurée par ATG et les spectres dynamiques de gaz analysés par FTIR ont été enregistrés avec les logiciels STAR v10.0 et Omnic v8.0. Ce montage a permis de corrélérer la perte en masse aux spectres infrarouges obtenus en fonction du temps. Cette méthode expérimentale n'a été conduite que sur un échantillon de nanoparticules afin de prouver la faisabilité d'une telle méthode pour la comparaison de profils de libération. Cette méthode pourrait être d'un grand intérêt pour l'étude comparative d'un nombre important de formulations.

D'autre part, l'élaboration d'une méthodologie permettant d'évaluer **l'efficacité répulsive** des formulations a été envisagée en utilisant un suivi par caméra. Ces travaux ont été réalisés avec la collaboration de Monsieur Alain Rivoire (LAGEP). Nous avons réalisé des essais préliminaires sur un montage composé d'une caméra filmant en continue une boîte contenant des drosophiles, avec d'un côté un papier filtre imprégné de la formulation répulsive et de l'autre côté un autre papier filtre témoin. Par comptage en continue en utilisant le logiciel Matlab, il a été possible de voir la présence statistique de drosophiles dans la partie traitée et non traitée en fonction du temps. Cette méthodologie a pour avantage un suivi en ligne, sans comptage à des temps définis. Il serait intéressant dans des travaux futurs d'inclure ce type de dispositif afin d'observer la répartition des drosophiles en fonction du temps, en

évitant l'étape de comptage fastidieuse et l'arrêt de dispositifs expérimentaux à des temps préétablis.

Ce travail de thèse est le fruit de plusieurs années de réflexion et d'expérimentation dans une multitude de domaines scientifiques. Certaines expériences ont été menées jusqu'à l'obtention de résultats comparatifs et satisfaisants, d'autres sont des portes d'entrée pour l'approfondissement d'études dans le domaine pluridisciplinaire qu'est le développement de produits répulsifs pour l'industrie vétérinaire.

« Celui qui trouve sans chercher est celui qui a longtemps cherché sans trouver »

Gaston Bachelard

Annexe 1



Publication acceptée dans le journal *Recent Patent on drug delivery and formulation*

Nanoparticles *via* Nanoprecipitation Process

A. Minost^{1,2,3}, J. Delaveau³, M.A. Bolzinger^{1,2}, H. Fessi^{1,2*}, A. Elaissari¹

¹ Université de Lyon, F- 69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR 5007, LAGEP, CPE-308G, 43 bd. 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France.

² Université de Lyon F-69373, Lyon, France. Université Lyon 1, Lyon, France. ISPB, Villeurbanne, France.

³ Merial SAS, 29 Avenue Tony Garnier, Lyon 69348 Cedex 07, BP 7123, France.

DOI : 10.2174/10001

Abstract:

Various encapsulation approaches have been explored during the last years in order to encapsulate classical active molecules and new synthesized molecules principally for *in vivo* therapy as drug delivery nanocarriers and also for *in vivo* biomedical diagnostic. These approaches lead to new and versatile systems exhibiting high encapsulation yields of small molecules mainly. Due to the use of biodegradable polymers, the final particles and dispersions exhibit low cytotoxicity and in some cases total biocompatibility. To enhance local targeting efficiency, nanoparticles are chemically grafted using specific antibody for a specific disease. One of the easy processes leading to rapid particles formation is nanoprecipitation. Such process is mainly based on polymer transfer from good solvent to poor solvent condition, leading consequently to nanoparticles formation *via* self-assembly of precipitated polymer chains.

Key words: nanoprecipitation, preformed polymer, controlled drug release, active molecule protection, polymer-based nanoparticles.

Introduction

In the pharmaceutical industries, hundreds of the new active molecules created are abandoned each year during their development because they do not have the adequate physicochemical properties to be well administrated as medicaments, or because they have undesirable effects at the patient. In this context, we saw that the development of pharmacotechnical encapsulation is one of the important ways to format a potential active ingredient in order to obtain an optimal therapeutic effect. The encapsulation can be defined as the incorporation of an active ingredient within a material support using a natural polymer or a synthetic one. This process allows us to obtain individual particles with a size ranging from some nanometres to few millimeters (2mm). The active ingredient can be hydrophobic or hydrophilic, charged or non-charged, solid, liquid or gas and eventually in suspension or in emulsion like dispersion. In this direction, polymer-based particles have been largely used as solid supports or carriers in numerous biomedical applications such as latex or hybrid particles for *in vitro* biomedical diagnosis, biodegradable nanocapsules for drugs delivery (*i.e.* therapy) or in the cosmetic field. Recently, biodegradable particles are now actively used in therapy due to their ability to target particular organs, tissues, cells or intracellular compartments after specific surface functionalization. Moreover, the nanoparticles containing active molecules protect the active agent against quick elimination and continuous release of drug as well as they enhance local targeting in order to avoid side drug effects.

Historically, the encapsulation process was firstly known from its first commercial application in the field of paper treatment so that it aroused a great interest for the development of duplicating paper without carbon [1]. The encapsulation process has numerous advantages and offers important possibilities of application in various chemical fields including agrochemicals, pharmaceuticals, biotechnology and foods. The greatest chemical applications relate to the technology of ion exchange resins [2], coating of pigments [3], improvements of agriculture concerning the release of the pesticides and fertilizers [4-5], and one can finally quote the new forms improved of nutrients of foods [6].

In the pharmaceutical field, a large panel of active ingredients can be encapsulated for various goals; 1) to protect a sensitive therapeutic molecule and to isolate it from its environment (moisture, oxygen, heat, light) [7]; 2) to control the release of this molecule in order to get a prolonged therapeutic effect in a definite time with quite and precise kinetics [8]; and 3) to transport the therapeutic active agent to the targeted site in order to ensure local drug delivery [9].

In life science applications, various kinds of nanoparticles, from preformed polymers, have been prepared using different techniques, including nanoprecipitation, emulsion solvent diffusion, double emulsification, emulsion-coacervation, polymer-coating (or polymer deposition), emulsion solvent evaporation and sequential polymer adsorption (*i.e.* layer-by-layer encapsulation process). The emulsion solvent diffusion/evaporation techniques employed partially miscible solvents. In these last cases, an emulsion is generated, thus the emulsion thermodynamic rules must be considered. In

contrast, nanoprecipitation describes the precipitation of dissolved excipients (i.e. polymers, lipids, etc) after transfer to a non-solvent, which is totally miscible with the solvent (currently, water solution). Since the elaboration of capsules is mainly based on polymer precipitation during solvents mixing, this chapter will only focus on the classical nanoprecipitation technique. This nanoprecipitation process will be presented, discussed and the state of art will be adequately examined on the bases of some pertinent patent analysis. In addition, the general literature will be considered in order to give the readers more information in some specific parts.

1. Polymer precipitation

To prepare colloidal particles, several methods have been described in the literature and they are generally classified into two main broad categories; either by polymerization reaction, or by using a preformed polymer. Both methods are based on the polymer precipitation principle. In the case of polymerization, the nucleation step is mainly due to the self-assembly of oligomers that precipitate leading to precursor particle formation. In the case of the particle formulation from preformed polymers, the solubility parameter of the used polymers is the key point. In fact, the solubility of polymers in solvent depends on the chemical composition of the macromolecular chains, the solvent nature (*i.e.* polarity), pH, salinity and temperature of the dispersion medium. For instance, in the case of polyelectrolytes, the solubility in water is highly pH and salinity dependent [10], while in the case of poly(alkyl acrylamide) and poly(alkyl methacrylamide), the solubility in water is mainly temperature dependent [11]. The solubility of polymers in various solvents has been largely investigated and theoretically studied on the bases of Flory parameter integration [11].

The Flory χ - parameter plays incontestably a crucial role in the thermodynamic behaviour of the polymer in a given solution at given conditions. From the thermodynamic point of view, the interaction parameter (χ) is defined as the free energy change per solvent molecule (in $k_B T$ units) when a solvent-solvent contact is shifted to a solvent-polymer contact. Flory χ - parameter can be expressed as represented in following equation (1):

$$\chi = \frac{\Delta G}{k_B T} = \frac{\Delta H - T\Delta S}{k_B T} = \frac{1}{2} - A\left(1 - \frac{\Theta}{T}\right) \quad \text{Equation (1)}$$

Where k_B and T are Boltzmann constant and temperature, respectively; A and Θ parameters are defined as follow:

$$A = \frac{2\Delta S + k_B}{2k_B} \quad \text{Equation (2)}$$

$$\Theta = \frac{2\Delta H}{2\Delta S + k_B}$$

As can be seen from equation (2), the A parameter is directly related to entropy changes, whereas Theta (θ) temperature is a function of both entropic and enthalpic variations (equation 3). When Theta (θ) temperature = T, the corresponding Flory χ -parameter = 1/2, at which the second Virial coefficient is equal zero [12]. The second Virial coefficient can be easily determined from light scattering measurements of a diluted polymer solution. At Theta (θ) temperature conditions, the binary interactions among constituents will be negligible and only the excluded volume effects will be predominant. Then, the solvent will be a good solvent for the polymer when $\chi < 1/2$ and a poor one when $\chi > 1/2$.

2. Principle of polymer based nanoprecipitation process

This method was first patented by Fessi *et al.* in 1986 [13]. Nanoprecipitation process consists in adding a homogeneous organic phase, which contains polymer(s), active molecule(s) and surfactant(s) dissolved in a solvent or mixture of water miscible solvents to an aqueous phase consisting of a non-solvent or a mixture of non-solvents of polymer(s) and surfactant(s). Basically, this technique can be defined as the precipitation of a given polymer through its transformation from good solvent to poor medium. Solid dispersions exhibiting colloidal sizes are generated without preliminary emulsification step and in some cases do not need a stabilizer.

Upon addition of the organic phase into the aqueous phase under mechanical stirring, the nanoparticles are formed instantly by rapid diffusion of the solvent into the aqueous phase. Afterward, the solvent is removed by evaporation under reduced pressure. The solvents used in the organic phase are mostly acetone, ethanol, or a mixture of them. Figure 1 represents the main preparation steps for the nanoprecipitation process.

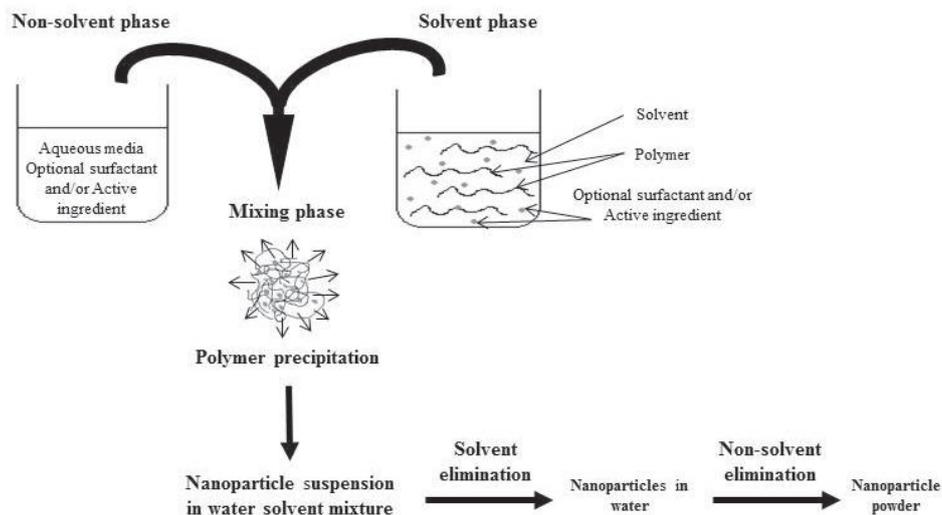


Figure1: Schematic illustration of nanoprecipitation process.

The mechanism of nanoparticle formation by this technique is explained by transitory interfacial turbulence due to the diffusion of organic solvent in water phase. The conditions to obtain nanoparticles should include the mutual and the total miscibility between solvents of the two phases so that the mixture of the two solvents must be a poor solvent for the used polymer.

This method has several advantages; it is rapid, it needs small quantities of surface-active agents as well as it is easy to be conducted in the industrial scale [13]. However, this technique is not indicated for the encapsulation of water-soluble or fairly water soluble active molecules due to the low encapsulation efficiency which is caused by the early salting out from the nanoparticle to the continuous media. Thus, the water solubility plays an important role in the entrapment of the active biomolecules inside the polymer matrix. Furthermore, the particle size is not only controlled by the formulation parameters such as the stirring rate, but also and mainly by the chemical composition of the used recipes.

The polymer matrix forming the particles can be used to encapsulate basic organic molecules (*i.e.* therapeutic agents), organic macromolecules (*e.g.* lipids, carbohydrates), metals, contrast agents, oils and radiolabel elements. More interestingly, biomacromolecules (*e.g.* nucleic acids, proteins and peptides) can be encapsulated by nanoprecipitation with a preliminary complexation step. It ensures the solubility of the active ingredient in the organic solvent and ensures the encapsulation efficiency due to the hydrophobic character of the created complex [14]. The choice of the compound mainly depends on the targeted application and more specifically on the final desired characteristics of the final dispersion in term of drug release profile, chemical nature and stability. Then, non-loaded nanoparticle suspensions and active ingredient loaded nanoparticle suspensions were elaborated in numerous industrial fields.

3. Preparation of non-loaded nanoparticle suspension

Particle size of the prepared non-loaded suspensions depends particularly on the solvent nature, the organic/aqueous phase ratio, the nature of polymer and stabilizing agent and their concentration. In addition, the particles can be specifically modified by well selection of the polymer (*i.e.* surface charge, porosity, biodegradability...*etc.*).

Concerning the solvent nature, a high water miscible solvent (*e.g.* Dimethyl formamide, DMF) tends to diffuse into water faster than a solvent with lower water miscibility (*e.g.* acetone, tetrahydrofurane THF) [15]. By changing solvent nature, the size varies consequently. For instance, acetone replaced by THF leads to a decrease in the particle size [16]. On the other hand, the polymer hydrophilicity or hydrophobicity plays an important role in the nucleation rate and thus the final particle size. For example, a highly hydrophobic polymer in a highly water miscible solvent leads to fast nucleation and lower particle size. Furthermore, the polymer nature (natural, synthetic or modified) controls the physico-chemical properties of final nanoparticles, in presence or absence of the active ingredient [17]. In addition, the particle size increase usually shows a linear correlation with the polymer concentration [18], as shown in Figure 2. In fact, the number of particles almost remains unchanged at fixed conditions, thus increasing polymer content in the formulation lead to more polymer chains per nanoparticles and consequently larger particle size. Moreover, the nanosize and narrow size distribution lead to a long-term colloidal stability.

Legrand *et al.* studied the parameters influencing PLA based nanoparticles formation using nanoprecipitation method [19]. They pointed out that the lower molar mass of polymer used lead to nanoparticles smaller in size. In addition, they also confirmed the importance of the dilution of the organic phase to obtain stable nanoparticles with low diameter and narrow size distribution.

Regarding to the charges on the particle surface, on one hand it permits colloidal stability for the particles, and on the other hand the electrostatic surface modifications with partially oppositely charged compounds containing target-specific ligands improve passive and active targeting.

Moreover, the presence of surfactants in the formulation has a crucial influence on controlling the size and more particularly the particle size distribution. Accordingly, the nature and percentage of the surfactant used decide the obtained particles size. In contrast, stirring process during addition of one phase to the other has no significant effect on the mean particle size. However, the absence of stirring has a tendency to increase the particle size distribution, as demonstrated in Figure 3. This phenomenon is usually observed in the case of organic phases with low viscosity.

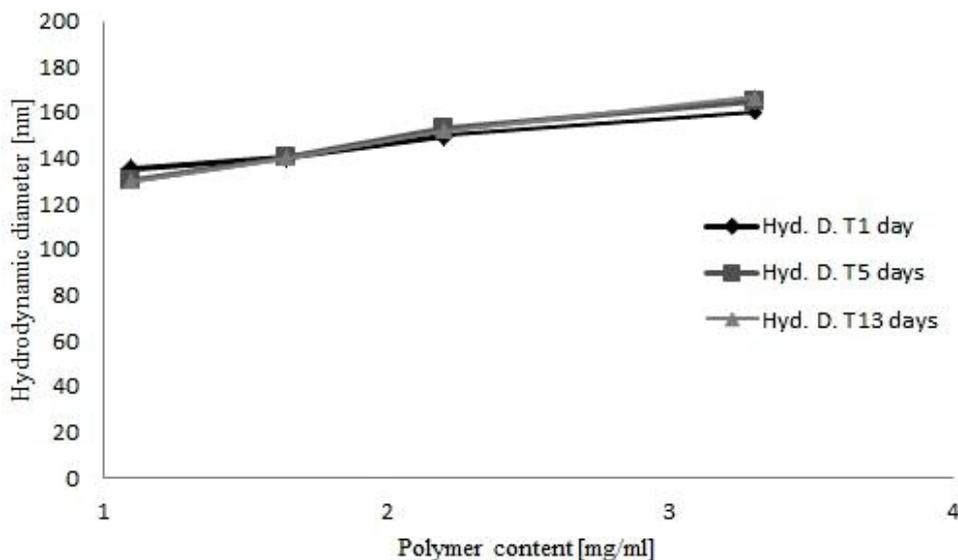


Figure 2: Hydrodynamic diameter of nanoparticles as function of polymer concentration at various times (days) intervals [18].

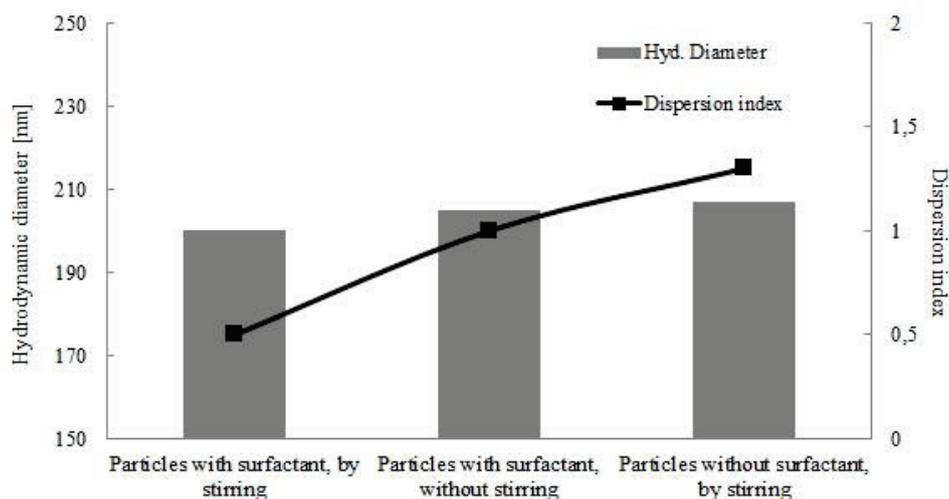


Figure 3: Effect of surfactant and/or stirring on hydrodynamic diameter (nm) and dispersion index of nanoparticles prepared by nanoprecipitation method [21].

Further, a core-shell like structure can be obtained with and without active molecules. Such morphology is a highly desired particularly for encapsulation of biomolecules. It is usually obtained in the case of oil encapsulation leading to oil core and polymer shell.

Recently, specific systems were used to improve the particle size distribution. Microfluidic system was employed to produce particles with specific and desirable characteristics [20]. It provides large-scale combinatorial screening of particle production conditions, with a concurrent size and size distribution control (narrow distribution with smaller size for the automated process, against large size distribution and bigger particle size).

4. Nanoprecipitation for pharmaceutical and cosmetic use

Effective drug therapy is the one that delivers sustained and controlled amounts of drugs to the target tissues and at the same time reduces the drug delivery to non-target tissues and consequently minimizes its eventual side effects. Many factors can affect the biodistribution and the pharmacokinetics of the active ingredient to be delivered; they include particle size, composition, charge, targeting moieties, and drug encapsulation efficiency.

Pharmaceutical preparations are generally exploited for therapeutic purpose rather than diagnostic application.

Hydrophobic molecules (*e.g.* Indomethacin: cancer therapeutic agent; Nifedipine : vasodilatator agent) entrapped in polymeric shell proved superiority in term of controlled drug release when compared to the active ingredient without elaborated formulations [21].

Stainmesse and coworkers have studied the effect of hydrophobicity of the active ingredient on the particle size and the encapsulation efficiency [21]. In such study, indomethacin (hydrophobic) and doxorubicine (hydrophilic) were compared with those formulated by nanoprecipitation technique using polylactic acid (PLA) as a particle shell. The indomethacin-loaded nanoparticles provided a particle size of 190 nm with 80% of entrapped active molecule, against 290 nm and 50% of entrapped active molecule for doxorubicin, as shown on Figure 4. The drug inclusion in the particle was performed by encapsulation during the polymer precipitation step. Moreover, the drug can be adsorbed on the polymer particle surface after nanoprecipitation process, giving nanoparticles with different physical parameters.

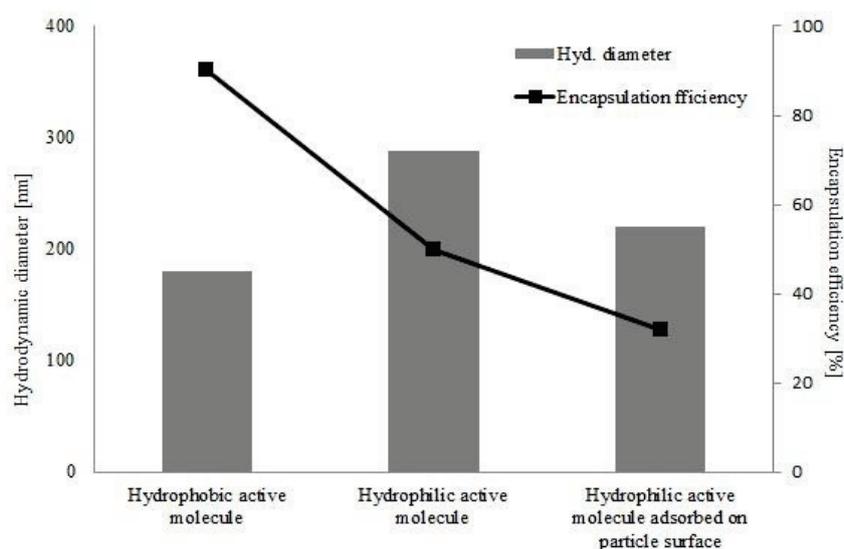


Figure 4: Hydrodynamic diameter (nm) and encapsulation efficiency (%) as function of active ingredient hydrophobicity and mode of active ingredient inclusion [21].

Currently, the targeting agent is non-covalently associated with the nanocarrier, located inside the particle or adsorbed at the particle's surface [22]. The nanometric size is superior in term of adsorption efficiency as compared with microparticle, thanks to a superior surface area. This encapsulation method is particularly useful in the case of protein derivatives.

In addition, the active ingredient can be covalently attached to the polymer chain to form nanoconjugated carriers after polymer precipitation [17]. Nanoconjugate carriers were synthesized to improve the encapsulation efficiency. The preparation of drug-polymer conjugates is useful in the preparation of micro and nanoparticles for *in vivo* drug delivery of therapeutic agents. Compared with conventional nanoprecipitates in which drug loading and encapsulation efficiency are extremely variable, the nanoconjugates prepared by nanoprecipitation method contain the same drug density in the polymer matrix. This in turn lead to the improvement of the controlled release of the active molecule encapsulated in the polymeric matrix, and consequently the possible drug burst release that can cause undesirable side effect and reduce the therapeutic efficacy can be avoided. Paclitaxel, used in cancer chemotherapy, was grafted to PLA polymer *via* copolymerization reaction. The release of this active ingredient is determined by both the hydrolysis of Paclitaxel-poly(lactid acid) ester linker and by the drug diffusion. The release profile of Paclitaxel was a function of the polymer content, so that more lactic acid in the nanoparticles leads to slower rate of release of Paclitaxel.

Further, the stability of nanoparticles is of a paramount importance in the pharmaceuticals field. For example, nanoparticles suspension stability can be extended for several months when stored under standard conditions at 25°C [18], where some active molecules in its free state would be rapidly degraded and have no longer efficiency or activity after few days.

The encapsulation of the highly sensitive biomolecule such as nucleic acid is possible [23] by direct encapsulation [24], or *via* a more complex encapsulation methodology through reverse micelles [25]. Formulation agents, and particularly the polymer, are carefully chosen to provide controlled delivery (targeting, control of the release profile). Nanoparticles can comprise a target specific tag for targeting the nanoparticles to a site of interest.

Otherwise, the addition of a lipid to the organic phase has proved an improvement of the encapsulation efficiency. Liposome-polymer nanocarriers formulated by nanoprecipitation and containing reverse micelles were investigated for the fabrication of vaccine nanocarriers [26]. These carriers have the ability to deliver one or a plurality of immunomodulatory agents. Since the liposome-polymer nanocarriers are limited to carry hydrophobic immunomodulatory agents within polymer-based nanoparticles, small reverse micelles (1 nm-20 nm) are formulated to encapsulate hydrophilic immunomodulatory agents and then mixed with amphiphilic polymers to fabricate polymeric shell of liposomes (Figure 5).

Figure 5: Schematic illustration of nanocapsules, nanospheres and liposome-based nanocarriers

Recently, a great interest has been paid to the formulation of cosmetic products, because of the high hydrophobicity of active ingredients used (hydrating oils, vitamins, antibacterial or antiviral agents, essential oils, emollients...*etc*), particularly using nanoprecipitation process. This could be attributed to the easy and rapid fabrication ability of these hydrophobic active ingredients, without need to more energy consumption. In the cosmetic field, and particularly for skin treatment, the use of active ingredients in the form of particulates permits to avoid the use of solvent. Accordingly, it will be suitable for cutaneous applications that possibly modify the skin barrier function. Indeed, the use of particulate drug carriers appeared to improve the drug residence in the skin without increasing transdermal transport [27-28]. Alvarez Roman and co-workers have demonstrated, using confocal microscopy, that polystyrene nanoparticles (20 nm and 200 nm) labeled with fluorescein tend to accumulate in *stratum corneum*, furrows and also in appendages which constitute a long-term reservoir for drug-loaded nanoparticles [29-30]. Therefore, nanoparticles not only ensure a sustained-release but also modulate the repartition of a drug in skin layers. Since the pioneering work by Schaefer and co-workers that have established a size-dependent effect on skin penetration using polymer particles there is still a debate about the mechanisms that drive nanoparticles penetration in the skin [31-32].

Recently, flash nanoprecipitation was described as a simple, rapid and robust method to elaborate nanoparticles [33]. This process was used to simultaneously encapsulate vitamin A, precursor, β -carotene in conjunction with gold particles for integrated drug delivery and imaging applications. By using this method, composite nanoparticles of approximately 80 nm diameter size were prepared [34]. Inorganic compounds were encapsulated by nanoprecipitation for industrial applications in the cosmetic and in the ink industries, for the preparation of stabilized nanoparticle composites in water. Polymer-enrobed pigment particles, copper or silicium complexes entrapped in polycarbonate matrix for the ink industry were formulated by nanoprecipitation process in order to improve the water miscibility of their highly hydrophobic molecules [35]. The Table 1 compiles and summarizes the formulations and the particles size (submicron in range) *via* nanoprecipitation preparation process using various active ingredients, polymers and solvents in order to the target specific application such as inks, cosmetics, diagnosis, pharmaceutical industry.

Table 1 : Nanoprecipitation for pharmaceutical, cosmetic and ink industries, encapsulation of active substances in polymer-based nanoparticles.

Application field	Active ingredient	Polymer	Solvent	Particle size [nm]	Particle percentage in the final formulation [wt.%]	References
Diagnostic	Indocyanine	PLG	Acetone	5 to 2000	0.30	[36]

Treatment of diseases	Nucleic acid in reverse micelles	PLG derivative	THF	100	2.00	[25]
Cancer therapy	Docetaxel	PLG	ACN	65	0.06	[37]
Gene therapy	Protein	PLG	Acetone	120	6.00	[38]
Gene therapy	SI-RNA	PCL	Acetone	180	5.40	[39]
Skin treatment	Dyes	Synthetic triblock copolymer	DMF	50	0.42	[29]
Skin treatment	Ursolic acid	Polyesters	DMF	112	5.00	[40]
Pigments, dyes	Copper, Silicium	Polycarbonate	THF	115	0.20	[35]

PLG : poly(lactide-co-glicolide) ; PCL : poly-ε-caprolactone; ACN : Acetonitrile ; DMF : Dimethyl formamide ; THF : Tetrahydrofurane.

The extensive studies of the state of the art of nanoprecipitation used in the encapsulation of active molecules have been recently reported by Mora Huertas *et al* [41]. As below represented in Table 2, various biodegradable polymers such as polylactide (PLA), poly-ε-caprolactone (PCL), poly(lactide-co-glicolide) PLGA, Eudragit polymers, and poly(alkyl cyanoacrylate (PACA) have been used in nanoprecipitation process. Using these polymers, various active molecules have been encapsulated in order to target well-defined therapeutic applications.

Table 2: Examples of raw materials used for the preparation of nanoparticles by the nanoprecipitation method described in the literature as reported by Mora Huertas *et al* [42].

Active ingredient	Therapeutic activity	Polymer	Core oil	Solvent	Stabilizing agent	Non-solvent	Reference
Gemcitabine 4-(N)-stearoylgemcitabine 4-(N)-valeroylgemcitabine 4-(N)-lauroylgemcitabine	Antineoplastic	PACA or Poly[H ₂ NPEGCA-co-HDCA]	Caprylic/capric triglyceride	Acetone Ethanol		Water	Stella et al, 2007
Indomethacin	Anti-inflammatory, analgesic Selective cytotoxicity	PLA	Benzyl benzoate Phospholipids	Acetone	Poloxamer 188	Water	Fessi et al, 1989 Fawaz et al, 1996
		PCL	Caprylic/capric triglycerides Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Pohlmann et al, 2008 Cattani et al, 2008
		PCL or PLA	Mineral oil Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Pohlmann et al, 2002
		PCL	Miglyol 840 Lecithin	Acetone	Poloxamer 188 Chitosan	Water	Poletto et al, 2008
Indomethacin ethylester	Anti-inflammatory, analgesic	PCL	Miglyol 840 Lecithin	Acetone	Poloxamer 188	Water	Cruz et al, 2006
		PLA, PCL or PLGA	Caprylic/capric triglycerides Sorbitan monooleate Benzyl benzoate Soybean lecithine	Acetone	Poloxamer 188	Water	Cattani et al, 2008 Cauchefer et al, 2003
Alvaquone	Antipneumocystic	PLA	Caprylic/capric triglycerides PEG-4 complex Oleic acid Phospholipids	Acetone	Poloxamer 188	Water	Dalençon et al, 1997
Rifabutine	Antibacterial (tuberculosatic)	PLA	Caprylic/capric triglycerides Benzyl benzoate Caprylic/capric triglycerides PEG-4 complex Phospholipids	Acetone	Poloxamer 188	Water	Dalençon et al, 1997
Tretinoin	Topical treatment of different skin diseases (acne vulgaris, ichthiosis, psoriasis), antineoplastic (hormonal)	PCL	Caprylic/capric triglycerides Sunflower seed oil Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Ourique et al, 2008
Fluconazole labeled with ^{99m} Tc-Technetium	Antifungal	PLA or PLA-PEG	Caprylic/capric triglycerides Soybean lecithin	Methanol Acetone	Poloxamer 188	Water	Nogueira et al, 2008
Primidone	Anticonvulsant	PCL	Benzyl alcohol	Acetone	Poloxamer 188	Water	Ferrari et al, 1999
Vitamin E	Vitamin antioxidant	PCL		Acetone	Polysorbate 20	Water	Charcosset et al, 2005
Spironolactone	Diuretic	PCL	Caprylic/capric triglycerides PEG-4 complex Sorbitan monooleate Sorbitan monooleate	Acetone	Poloxamer 188 Polysorbate 80 Polysorbate 20	Water	Limayem et al, 2006
Griseofulvine	Antifungal	PCL	Benzyl benzoate Span 80	Acetone	Polysorbate 80	Water	Zil et al, 2005
^{99m} Tc-HMPAO complex	Radio tracer	PLA PLA-PLG	Caprylic/capric triglycerides Soybean lecithin	Acetone	Poloxamer 188	Water	Pereira et al, 2008

Active ingredient	Therapeutic activity	Polymer	Core oil	Solvent	Stabilizing agent	Non-solvent	Reference
Melatonin	Antioxidant	Eudragit S100	Capric/caprylic triglyceride Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Schaffdzck et al., 2008
Diclofenac	Anti-inflammatory	PCL or Eudragit	Capric/caprylic triglyceride Benzyl benzoate Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Schaffdzck et al., 2003
Diclofenac	Anti-inflammatory	PLA	Benzyl benzoate Capric/caprylic triglyceride Phospholipids	Acetone	Poloxamer 188	Water	Gutierrez et al., 1995
Benzathine penicillin G	Antibacterial	PLGA	Sunflower oil Soybean oil Capric/caprylic triglyceride Benzyl benzoate Soyphosphatidylcholine	Acetone	Poloxamer 188	Phosphate buffer solution (pH 7.4)	Santos-Magalhães et al., 2000
Xanthone 3-methoxyxanthone	Anti-inflammatory Antitumor	PLGA	Soybean lecithin Capric/caprylic acid triglyceride	Acetone	Poloxamer 188	Water	Teixeira et al., 2005
Ursolic acid	Antineoplastic	PLGA	Soybean oil Soyphosphatidylcholine	Acetone	Poloxamer 188 Trehalose	Phosphate buffer solution (pH 7.4)	Da Silva et al., 2006
Tacrolimus	Immunosuppressant	Eudragit RS or Eudragit L	Argan oil Oleoyl polyoxyglycerides	Acetone Absolute ethanol		Water	Nassar et al., 2009
RU58668	Anti-estrogen	PLA PLGA PCL PLA-PEG PLGA-PEG PCL-PEG	Capric/caprylic triglycerides Soyphosphatidylcholine	Acetone	Poloxamer 188	Water	Ameller et al., 2003
Muramyl tripeptide cholesterol (MTP-Chol)	Immunomodulatory	PLA	Soybean lecithin Ethyl oleate	Acetone	Poloxamer 188	Water	Seyer et al., 1999
Benzazole dyes, O-aminophenol 1,2-phenylenediamine 5-aminosalicylic acid 4-aminosalicylic acid		Poly(N-acryloylamide) or Poly(styrene) or Poly(methyl methacrylate)	Capric/caprylic triglyceride Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Jäger, 2007
		PCL	Capric/caprylic triglycerides Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Tewa-Tagne et al., 2006 Tewa-Tagne et al., 2007a
		PCL	Capric/caprylic triglycerides Sorbitan monooleate	Acetone	Polysorbate 80	Water	Tewa-Tagne et al., 2007b
		PLA, PLGA, PCL, PLA-PEG, PLGA-PEG or PCL-PEG	Capric/caprylic triglycerides Lecithin	Acetone	Poloxamer 188	Water	Furtado et al., 2001a,b
		PLA	Capric/caprylic triglycerides	Acetone	Poloxamer 188	Water	Rübe et al., 2005

* PCL: Poly(ε-caprolactone); PLGA: Poly(lactide-co-glycolide); PEG: Poly(ethylene glycol); HPMC: Hydroxypropylmethylcellulose; HPC: Hydroxypropylcellulose; PVP: Polyvinylpyrrolidone

Current and future development

The recent advances in pharmaceutical technology, and principally in drug delivery, lead to designing of more sophisticated systems to improve the distribution of active ingredients to more specific and targeted sites inside the human body. These systems depend mainly on the nature and properties of the drug carrier. Among these systems, polymeric nanoparticles have received in recent years particular attention, especially those derived from biodegradable polymers, because of their therapeutic potential. Various preparation methods have been developed, allowing not only the use of numerous polymers for the preparation of nanoparticles, but also for the encapsulation of active ingredients bearing different physico-chemical properties.

Nanoprecipitation process is one of the most interesting techniques used for rapid elaboration of nanoparticles (nanocapsules or nanospheres) and it was found to be less sensitive to slight changes. In addition, such process has low energy consumption, and then it can well be adapted for the industrial scale [42]. Such attractive process lead to the production of well-defined polymeric colloids which have been used as carriers in various biomedical applications such as chemotherapy, *in vivo* diagnostic applications (*i.e.* magnetic resonance imaging *via* the encapsulation of contrast agent), local cosmetic applications, and finally in theranostic applications *via* the combination of diagnostic and therapeutic action, simultaneously.

Besides, it is interesting to mention here that solvent nature (conventionally eliminated after nanoprecipitation process) and polymer content have crucial and drastic effect on nanoparticle colloidal characteristics (*i.e.* size, size distribution, surface charge density, surface polarity and consequently colloidal stability). Consequently, various particles can be performed.

Even though nanoprecipitation method has various interesting features, it has some limitations in that the produced polymeric particles can have broad size distribution (polydispersity), low encapsulation efficiency of hydrophilic active molecules, and low storage stability in aqueous dispersion media. Moreover the particle size is hardly controllable by process parameters. Finally, nanoprecipitation technology appears to be a good and promising process for various applications in bionanotechnology.

Acknowledgements

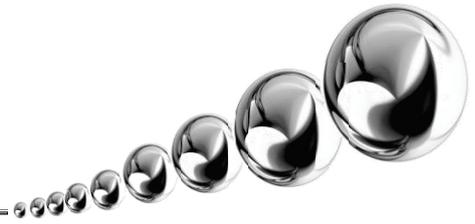
Thanks to Dr. Mohamed M. Eissa for careful reading, suggestions and comments. The authors thank also Merial Company for the financial support of Audrey Minost PhD thesis.

-
- [1] Green BK, Schleicher L. Oil-containing microscopic capsules and method for making them. US2800457 (1957).
- [2] Bolto BA, Jackson MB. Thermally regenerable ion-exchange resins. I the encapsulation of polyamine microparticles in a polyacid matrix. *React Polym, Ion Exch, Sorb.* 1983; 1: 119-28.
- [3] Wang QG, Choy R, Dai Q, Qstafin AE. Preparation of dye-loaded SiO₂ nanoparticles. *J Non-Cryst Solids.* 2007; 353: 354-65.
- [4] Devassine M, Henry F, Guerin P, Briand X. Coating of fertilizers by degradable polymers. *Int J Pharm* 2002; 242: 399-404.
- [5] El Bahri Z, Taverdet JL. Elaboration of microspheres and coated microspheres for the controlled release of the herbicide 2,4-D. *Polym Bull* 2007; 59: 709-19.
- [6] Madziva H, Kailasapathy K, Phillips M. Evaluation of alginate-pectin capsules in cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *Food Sci Technol* 2006; 39: 146-151.
- [7] Oh KS, Han KH, Choi YW, Lee JH, Lee JY, Yuk SH. Hydrogen-bonded polymer gel and its applications as a temperature-sensitive drug delivery system. *Biomater* 2004; 25: 2393-8.
- [8] Wang C, Ye W, Zheng Y, Liu X, Tong Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. *Int J Pharm* 2007; 338: 165-73.
- [9] Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frezard F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm* 2006; 315: 140-7.
- [10] De Gennes PG. *Scaling Concepts in Polymer Physics.* Cornell University Press: Ithaca: New York 1979.
- [11] Elaissari A. In: Birdi KS, 3rd edition. Thermally sensitive latex particles: preparation, characterization and application in the biomedical field. *Handbook of surface and colloid chemistry*, CRC Press, Taylor and Francis Group 2008: 539-66.
- [12] Elias HG. *An Introduction to Plastics.* 2nd ed. Wiley-VCH: Weinheim 2003.
- [13] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules. EP0274961 (1986).
- [14] Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *Int J Pharm* 2008; 354:210-16.
- [15] Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreni AF, Langer R, Farokhzad OC. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery. *Biomater* 2007; 28: 869-76.

-
- [16] Cheng J, Tong R. Particulate drug delivery. US20080248126 (2008).
- [17] Eliasof S, Crawford TC, Gangal GG, Relter LA, Ng PS. Polymer-agent conjugates, particles, compositions, and related methods of use. US20100247669 (2010).
- [18] Fisher K, General S. Functionalized, solid polymer nanoparticles comprising epothilones. US20090148384 (2009).
- [19] Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barrat G, Vauthier C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the preparation of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int J Pharm* 2007; 344:33-43.
- [20] Karnik R, Gu FX, Basto P, Cannizzaro C, Khademhosseini A, Langer RS, Farokhzad OC. Microfluidics synthesis of organic nanoparticles. US20100022680 (2010).
- [21] Stainmesse S, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F, Thies C. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. US5133908 (1992).
- [22] Collin-Djangone C, Simonnet JT. Double-stranded RNA oligonucleotides which inhibit tyrosinase expression. US20090081263 (2009).
- [23] Ahlin GP, Zvonar A, Kristl J, Jurkovic P, Kerc J. Preparation of nanoparticles by using vibrating nozzle device. EP2254560 (2009).
- [24] Contag CH, Shinde RR. Encapsulated nanoparticles for drug delivery. US20090312402 (2009).
- [25] Radovic-Moreno AF, Zhang L, Langer RS, Farokhzad OC. Polymer-encapsulated reverse micelles. US20100196482 (2010).
- [26] Von Andrian UH, Farokhzad OC, Langer RS, Junt T, Moseman A, Zhang L, Basto P, Iannaccone M, Alexis F. Vaccine nanotechnology. US20100233251 (2010).
- [27] Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 173-80.
- [28] Kohn, J.B., Michniak, B., Devore, D., Sheihet, L., Chandra, P., Batheja, P. Controlled releases of actives in skin. US20090317472 (2009).
- [29] Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* 2004; 99: 53–62.
- [30] Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Fessi H., Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 ; 58: 301–16.

-
- [31] Bolzinger MA, Briançon S, Chevalier Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2011; 3: 463-78.
- [32] Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res* 1993; 10: 1738-44.
- [33] Akbulut M, Ginart P, Gindy ME, Theriault C, Chin KH, Soboyejo W, Prud'homme, RK. Generic method of preparing multifunctional fluorescent nanoparticles using flash nanoprecipitation. *Adv Func Mater* 2009; 19: 718-25.
- [34] Prud'homme RK, Gindy M, Ungun B, Budijono S, Lui Y. Nanoparticles for photodynamic therapy. US20110022129 (2011).
- [35] Auweter H, Bohn H, Machtle W, Mielke M, Sens R, Siemensmeyer K. Method for producing polymer coated pigment particles by precipitation. US20056924035 (2005).
- [36] Tari SR, Barile GR, Kompella UB. Polychromatic, diversely-sized particles for angiography. US20090180950 (2009).
- [37] Wang Z, Farokhzad OC, Zhang L, Radovic-Moreno AF., Gu FG, Langer RS. Drug delivery system for pharmaceuticals and radiation. US201100027172 (2011).
- [38] Wendorf JR, Singh M, O'Hangan S. Nanoparticles for use in immunogenic compositions. US20100285135 (2010).
- [39] Collin-Djangone C, Simonnet JT. Double-stranded RNA oligonucleotides which inhibit tyrosinase expression. US20090081263 (2009).
- [40] Simonnet JT. Suspension of nanospheres of lipidic active principle stabilized with water-dispersible polymers. US20020142017 (2002).
- [41] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. *Adv Col Int Sci* 2011; 163: 90-122.
- [42] Briançon S, Fessi H, Lecomte F, Lieto J. Study of an original production process of nanoparticles by precipitation. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 1999 ; 13: 157-64.

Annexe 2



Brevet Merial/LAGEP

US 61/590,395

Titre : Long-acting nanoencapsulated arthropod repellent formulations and methods of use thereof.

Date de dépôt : 25 Janvier 2012

TITLE OF THE INVENTION

Long-acting nanoencapsulated arthropod repellent formulations and methods of use thereof

FIELD OF THE INVENTION

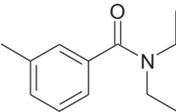
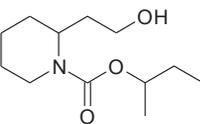
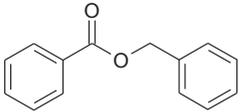
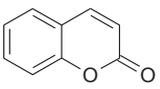
5 The present invention relates to novel nanoencapsulated compositions, methods for making such compositions, and methods of repelling insects and other arthropod pests away from animals, including humans. The present invention has particular, though not sole, application to repelling insects including flies and mosquitoes. The inventive compositions may be used to repel arthropods from animals, humans, plants, soil, or building structures. The
10 invention relates particularly to a nanoprecipitation process for small- to industrial-scale fabrication of nanoparticle/active ingredient suspensions having long-acting/slow-release properties.

BACKGROUND

15 Mosquitoes are disease vectors for human beings and animals, carrying malaria, heartworm, dengue fever, encephalitis, yellow fever and West Nile virus, and causing greater than 1 million human deaths around the world, every year. Health concerns and discomfort related to insect bites and stings have led to widespread use of insecticides and repellent products. Commercially available insecticides commonly include toxic active ingredients which act against the target pests. However if used in relatively confined environments and delivered as
20 aerosol sprays these products can become toxic to humans and treated animals. Various undesirable side effects may include immediate or delayed neurotoxic reactions and/or suffocation. The noxious odor alone can cause headaches or nausea in some individuals. These adverse side effects are exacerbated when such compositions come in contact with persons of increased sensitivity, or persons of small body mass such as children or babies.

25 Therefore efforts have been made to develop insecticidal compositions non-poisonous to humans and pets. These non-poisonous insecticidal compositions available heretofore have had limited efficacy. Furthermore, although insecticides, which kill the target pests, are usually the quickest forms of treatment, they kill not only the undesired insects, but beneficial insects as well. Insect repellents may offer a compromise that minimizes disease and discomfort in
30 animals, without disrupting the natural balance of insect populations. Several existing repellents are presented in Table 1.

Table 1: Commonly used repellents

<i>Name</i>	<i>Molecule</i>	<i>Molecular mass</i>	<i>Formula</i>
Diethyltoluamide (DEET)		191.13	C ₁₂ H ₁₇ NO
Picaridine		229.17	C ₁₂ H ₂₃ NO ₃
Benzyl benzoate		212.08	C ₁₄ H ₁₂ O ₂
Coumarin		146.15	C ₉ H ₆ O ₂

However, when used at concentrations effective to repel arthropod pests, existing repellents may also have toxic or otherwise undesirable consequences. Accordingly, there is a need for new formulations capable of effectively repelling pests, including insects, from animals, plants and building structures, and having improved safety and efficacy profiles. The formulations should be long lasting and of lesser toxicity than traditional repellents.

One possible solution to the problem may be the use of polymer-based colloidal particles, which have been largely used as solid support or carrier in numerous biomedical applications: latex or hybrid particles for in vitro biomedical diagnosis, biodegradable nanocapsules for in vivo drugs delivery (i.e. therapy), and in cosmetics. Biodegradable particles are particularly useful for therapy because they can be targeted to particular organs, tissues, cells or intracellular compartments *via* surface functionalization. Moreover, the use of active ingredient AI-loaded nanoparticles allows for both low-dose, continuous drug release, and local targeting, which together significantly reduce the severity of side effects as compared to, for example, those associated with systemic administration of the same AI.

Table 2: Insect repellent formulations described in the literature, AI: Active Ingredient; DEET: N,N-diethyl-m-toluamide

Form	AI	% AI	Formulation process	Reference
Microparticles	DEET	15%w/w	Interfacial precipitation	[1]
Microparticles	Limonella oil	30%v/v	Coacervation	[2]
Gel emulsion	DEET	10%w/w	Emulsification	[3]
Nanoemulsion	Citronella oil	20%w/w	High pressure homogenizer	[4]
Nanoemulsion	Essential oils	25%w/w	High pressure homogenizer	[5]
Solid lipid based nanoparticles	DEET	10%w/w	Emulsification	[6] [7]

One way to produce AI-loaded nanoparticles is *via* a process called “nanoprecipitation”. US 5049322 [8] (to CNRS) discloses a “...process for the preparation of dispersible colloidal systems in the form of spherical particles of the vesicular type and of a size less than 500 nm (nanocapsules), the wall of which is constituted by a substance A having film-forming properties and the core by a liquid substance B capable of being encapsulated by the substance A, comprising: combining (1) a first liquid phase consisting essentially of a solution of the substances A and B in a solvent for the substances A and B or in a mixture of solvents for the substances A and B, and (2) a greater amount of a second liquid phase consisting essentially of a non-solvent or a mixture of non-solvents for the substances A and B and including one or more surfactants, the solvent or the mixture of solvents of the first phase being miscible in all proportions with the non-solvent or mixture of non-solvents of the second phase, comprising a core of said liquid substance B surrounded by a layer of said substance A.”

Upon addition of the organic phase into the aqueous phase and slow mechanical stirring, the nanoparticles are formed instantaneously by the rapid diffusion of the solvent in the aqueous phase. The latter is then removed by evaporation under reduced pressure. Acetone, Ethanol or their mixture are widely used as organic phase. The formation mechanism of the nanoparticles by this technique is explained by transitory interfacial turbulence due to the diffusion of organic solvent in water phase. The conditions to obtain nanoparticles should include the mutual and the

total miscibility between solvents of the two phases and the fact that the mixture of the two solvents must be a poor solvent of the chosen polymer. Nanoprecipitation uses small quantities of surface-active agents, is rapid, and can easily be performed at industrial scale. However, this method is not indicated for the encapsulation of AI with little to no water-solubility. Further, the chosen organic solvent should be miscible in all proportions with the water phase, and the miscibility should be rapid in order to lead to a rapid nucleation process. FIG.1 presents an illustration of the nanoprecipitation process.

The polymer matrix forming the particles is able to encapsulate basic organic molecules (i.e. therapeutic agents), organic macromolecules (lipids, carbohydrates), biomacromolecules (nucleic acids, proteins and peptides), metals, contrast agents, oils, radiolabeled elements, and the like. The formulation recipe choice is driven by the targeted application and more specifically, the desired characteristics as regards drug release profile and physicochemical stability. Polymer based nanoparticles have been a focus of numerous studies since 1980 [9]. The technology of nanoparticles offers many advantages, such as the solubilization of lipophilic molecules, increased bioavailability, and the protection of AI against physical, chemical, and biological degradations during storage and use.

The nanoparticles intended for a dermal use offer several advantages, mainly in comparison with the emulsions and the liposomes. The AI-loaded nanoparticles are able to cross the surface layers of the stratum corneum and to diffuse in the basal layers of the skin to specifically release the AI. This penetration into the deeper layers widens the action space of the AI and it protects the AI against rapid elimination by simple friction. The solid matrix nature controls the AI release through the skin. The occlusive effect caused by the deposition of nanoparticles increases the tank effect of the cornea layer and increases percutaneous absorption [10]. For a cutaneous application, the nanoparticle nature and size will condition the routing of the AI until the target site (pilous follicles, stratum corneum, epidermis, etc.) improving the tissue tolerance. In addition, by modulating the properties of nanoparticle surface, the composition and the medium, the desired release model of the AI and its biodistribution can be controlled.

The major characteristic of nanoparticle suspension preparation is the size of the formulated objects. Nanoparticle size depends in particular on solvent nature, active molecule concentration, organic phase/aqueous phase ratio, polymer, surfactant nature and percentage.

Particle physicochemical characteristics can be specifically modified by judicious selection of polymer and surfactant properties (e.g. surface charge, porosity, biodegradability, etc.). Nanometric size and narrow size distribution lead to long term colloidal stability. A charged surface increases particle stability, and electrostatic surface modifications (with partially oppositely charged compounds) can contain target-specific ligands for improving passive and active targeting. Finally, the choice of solvent must be such that modifications of the physical properties of nanoparticles may occur. For example, a highly water miscible solvent (e.g., Dimethyl formamide, DMF) tends to diffuse into water faster than a solvent with lower water miscibility (e.g., acetone, tetrahydrofuran). The replacement of acetone by tetrahydrofuran is known to yield a decrease in particle size [11]. Polymers can be acquired commercially or synthesized from selected monomers or modified from preformed polymer, which allows for fine-tuning of the physicochemical properties of the final nanoparticles [12]. The particle size typically shows a linear correlation with the polymer concentrations because the number of particles remains essentially unchanged at the fixed condition [13].

Several factors impact particle size and size distribution. In general, a highly hydrophobic polymer in a highly water miscible solvent will nucleate very quickly and have a relatively smaller particle size. Surfactant presence in the formulation is a size control parameter; the nature and percentage allow achievement of a given particle size with a narrow size distribution. Finally, stirring process during the pouring of one phase in the other does not change the mean particle size, but does have tendency to decrease the polydispersity of the particles.

Active molecule hydrophobicity effect on the size and encapsulation efficiency of Indomethacin (hydrophobic) and doxorubicin (hydrophilic) formulated by nanoprecipitation using polylactide polymer shell were compared [14]. As example, Indomethacin-loaded nanoparticles provide a particle size of 190 nm with 80% of entrapped active molecule, against 290 nm and 50% of entrapped active molecule for Doxorubicin.

A major disadvantage of commercial pest repellent formulations has been the short duration of efficacy. Nanoparticle formulations could provide a useful solution, and as the above-described technologies have not yet been applied to the problem of pest repellency, it is an object of the instant invention to provide nanoparticle/AI formulations with improved safety and efficacy profiles, as compared with existing arthropod repellent formulations.

It is expressly noted that citation or identification of any document in this application is not an admission that such document is available as prior art to the present invention. Any foregoing applications, and all documents cited therein or during their prosecution (“application cited documents”) and all documents cited or referenced in the application cited documents, and all documents cited or referenced herein (“herein cited documents”), and all documents cited or referenced in herein cited documents, together with any manufacturer’s instructions, descriptions, product specifications, and product sheets for any products mentioned herein or in any document incorporated by reference herein, are hereby incorporated herein by reference, and may be employed in the practice of the invention.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

A first object of the invention is to provide novel nanoparticle/AI formulations with improved safety and efficacy profiles, as compared with existing arthropod repellent formulations. The formulations are active in repelling pests, including insects and acarids, that are a burden to animals including humans. In some embodiments, the formulations are effective repellents against mosquitoes, flies, ticks, and fleas. The formulations may be dispersible colloidal systems produced by a nanoprecipitation process. In an embodiment, a lipophilic AI is encapsulated in the form of spherical particles (matrix type) having a diameter less than 500 nm.

15

In an embodiment, the formulations are highly effective arthropod repellents.

20

A second object of the invention is to provide a method of producing novel nanoparticle / AI formulations, which may comprise the following steps:

(a) preparing a liquid phase comprising a solution of an active ingredient in a solvent or a mixture of solvents comprising one or more surfactant;

25

(b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or the mixture of non solvents for a substance that is miscible with the solvent or the mixture of solvents for the AI;

(c) adding one of the liquid phases prepared in (a) to (b) or (b) to (a) with stirring to produce a colloidal suspension of nanoparticles; and

(d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents to produce a colloidal suspension of nanoparticles of a desired concentration.

30

The formulations may comprise spherical nanoparticles of matrix type and size less than 500 nm, and be produced according to the following procedure:

(a) preparing a liquid phase comprising a solution of AI + polymer in a solvent or a mixture of solvents to which one or more surfactants may be added;

(b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or a mixture of non-solvents to which one or more surfactant may be added, wherein the non-solvent or the mixture of non-solvents should be miscible in all proportions with the solvent or mixture of solvents of the AI;

(c) adding the liquid phase prepared in (a) to that prepared in (b), or adding the liquid phase prepared in (b) to that prepared in (a), with moderate agitation to produce a colloidal suspension of nanoparticles;

(d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents and of non-solvent or mixture of non-solvent to make a colloidal nanoparticle suspension of a desired concentration.

The invention further relates to protecting an animal (e.g. a mammal or bird) against pests by administering an effective repelling amount of the formulations of the invention. Animals which can be treated include but are not limited to chickens/avians, humans, cats, dogs, cattle, cows, deer, goats, horses, llamas, pigs, sheep and yaks. In one embodiment of the invention, the animals treated are canines, felines, or humans.

The inventive formulations are highly effective for the repulsion of pests. Accordingly, the present invention provides methods for repelling pests away from animals, including humans, comprising applying a repulsive effective amount of the nanoparticle formulations, to the animal or human, or its surroundings.

It is an object of the invention to not encompass within the invention any previously known product, process of making the product, or method of using the product such that the Applicants reserve the right to this invention and hereby disclose a disclaimer of any previously known product, process, or method.

It is noted that in this disclosure and particularly in the claims, terms such as “comprises”, “comprised”, “comprising” and the like can have the meaning attributed to such terms in U.S. Patent law; *e.g.*, they can mean “includes”, “included”, “including”, and the like; and that terms such as “consisting essentially of” and “consists essentially of” have the meaning ascribed to them by U.S. Patent law, *e.g.*, they allow for elements not explicitly recited, but

exclude elements that are found in the prior art or that affect a basic or novel characteristic of the invention.

These and other embodiments are disclosed or are obvious from and encompassed by, the following Detailed Description.

5 **BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS**

A full and enabling disclosure of the present invention, including the best mode thereof, to one of ordinary skill in the art, is set forth more particularly in the remainder of the specification, including reference to the accompanying figures, wherein:

FIG. 1 depicts a nanoprecipitation process;

10 FIG. 2 is a graph indicating size and polydispersity index of polymer nanoparticles obtained by nanoprecipitation. Effect of surfactant and stirring process on size (Z-average, nm) and size distribution, determined by DLS (Dynamic Light Scattering) as analytical method;

FIG. 3A is a graph depicting the evolution of the nanoparticle (NP) size (Z-average, nm) and zeta potential (mV) as a function of the ratio BB/ERS.;

15 FIG. 3B is a graph depicting size distribution of the formulated NP suspension using DLS (dynamic light scattering) equipment;

FIG. 4 is a graph depicting size distribution of the formulated NP produced during the organic phase (OP) / aqueous phase (AP) study;

20 FIG. 5 is a graph depicting OP/AP ratio study for BB-loaded nanoparticle suspensions. Size (Z-average; nm) and Zeta potential (mV) were measured immediately following formulation and after 2 months at 40°C;

FIG. 6A is a graph of the DLA results for 9 formulations differing in EtOH percentage in the continuous phase;

FIG. 6B is a graph depicting the NP size distribution for the 9 formulations;

25 FIG. 7 are SEM micrographs of BB-loaded NP suspensions: AM 0.1 and AM0.5 were formulated with a ratio of OP:AP = 0.1 and 0.5, respectively; AM 0.35 and AM 2 were formulated with a ratio of BB:ERS100 = 0.35 and 2, respectively

FIG. 8 is a size and zeta potential stability investigation of an optimized formula; shows the effect of pH on the colloidal stability of BB-loaded NP suspension

30 FIG. 9 is a graph depicting NP stability for formulations with varying salinity content in the continuous phase;

FIG. 10 depicts the experimental design;

FIG. 11 presents an electron micrograph and a graphical plot of the NP for a BB-loaded NP suspension.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 The present invention provides novel nanoparticle formulations with insect and pest repellent activity, or pharmaceutically/veterinarily acceptable or pharmaceutically acceptable salts thereof, and compositions comprising the compounds or salts for the repulsion of insects or other pests away from an animal or a human. An important aspect of the invention is to provide nanoparticle formulations with high repellent activity against pests, particularly though not solely
10 insects, and improved safety to the user, the environment, and the animal.

The invention includes at least the following features:

(a) In one embodiment, the invention provides novel nanoparticle formulations, which are repellents of animal pests, including insects and acarids;

(b) veterinary and pharmaceutical compositions for repelling pests comprising repellent
15 effective amount of the nanoparticle formulations, in combination with a veterinarily or pharmaceutically acceptable carrier or diluent;

(c) veterinary and pharmaceutical compositions for repelling pests comprising a repellent effective amount of the formulations of the invention, in combination with one more other active agent, including other repellents, antiparasitics, and a veterinarily or pharmaceutically acceptable
20 carrier or diluent;

(d) methods for producing the nanoparticle formulations;

(e) methods for repelling pests, including insects and acarids, away from an animal, including a human, are provided, which methods comprise administering a repellent effective amount of the nanoparticle formulations, to the animal in need thereof;

25 (f) methods for the prevention of infestation/infection and/or the reduction of transmission of a pest-borne pathogen to animals, including humans, which comprise administering a repellent effective amount of the nanoparticle formulations to the animal in need thereof, thereby preventing infection/infestation and/or reducing the transmission of pest-borne pathogens to animals, including humans;

(g) methods for controlling pests at a locus (e.g. by repelling pests away from a locus), comprising administering or applying a repellent effective amount of the nanoparticle formulations, to the locus; and

(h) use of the nanoparticle formulations in the manufacture of a veterinary or pharmaceutical medicament for repelling pests, including insects and acarids.

A first aspect of the invention, therefore, is to provide novel nanoparticle/AI arthropod repellent formulations.

In an embodiment, the formulations may have improved safety and efficacy profiles, as compared with existing arthropod repellent formulations. The formulations may be active in repelling pests, including insects and acarids, that are a burden to animals including humans. In some embodiments, the formulations are effective repellents against mosquitoes, flies, ticks, and fleas.

In other embodiments, the formulations may be dispersible colloidal systems produced by a nanoprecipitation process. In an embodiment, a lipophilic AI is encapsulated in the form of spherical particles (matrix type) having a diameter less than 500 nm.

In an embodiment, the formulations are highly effective arthropod repellents.

A second aspect of the invention is to provide a method of producing novel nanoparticle / AI formulations, which may comprise the following steps:

(a) preparing a liquid phase comprising a solution of an active ingredient in a solvent or a mixture of solvents comprising one or more surfactant;

(b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or the mixture of non solvents for a substance that is miscible with the solvent or the mixture of solvents for the AI;

(c) adding one of the liquid phases prepared in (a) to (b) or (b) to (a) with stirring to produce a colloidal suspension of nanoparticles; and

(d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents to produce a colloidal suspension of nanoparticles of a desired concentration.

The formulations may comprise spherical nanoparticles of matrix type and size less than 500 nm, and be produced according to the following procedure:

(a) preparing a liquid phase comprising a solution of AI + polymer in a solvent or a mixture of solvents to which one or more surfactants may be added;

(b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or a mixture of non-solvents to which one or more surfactant may be added, wherein the non-solvent or the mixture of non-solvents should be miscible in all proportions with the solvent or mixture of solvents of the AI;

5 (c) adding the liquid phase prepared in (a) to that prepared in (b), or adding the liquid phase prepared in (b) to that prepared in (a), with moderate agitation to produce a colloidal suspension of nanoparticles;

(d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents and of non-solvent or mixture of non-solvent to make a colloidal nanoparticle suspension of a desired
10 concentration.

In an embodiment the nanoparticles may form instantaneously. The solution may become milky-white and show the typical “Tyndall effect” of colloidal suspensions. At this stage, it is preferable to add the liquid phase prepared in step (a) to the liquid phase prepared in the step (b), particularly if the latter is aqueous phase and more in the case of highly viscous phase prepared
15 in the step (a), but the reverse order is possible as disclosed in examples (below). The encapsulated AI arthropod repellent prepared according to the process of the invention may be practically any substance sufficiently soluble in a given solvent or a melt thereof.

The particle matrix substance may be a synthetic, semi synthetic or natural polymer or a mixture thereof.

20 The invention particularly described the use of copolymer of acrylic acid (EUDRAGIT[®]).

The encapsulated substance may be an essential oil, a fatty substance alone or a dissolved AI, a pure AI or a crystal form thereof. The formulation can contain one AI or a mixture of AIs or an active ingredient dissolved in a specific medium. AIs include, but are not limited to
25 pyrethroids (e.g. permethrin, cypermethrin, deltamethrin, cyphenothrin, etc.), acetamide derivatives (e.g. DEET, KBr3023, etc.), terpenoid derivatives (e.g. linalool, p-menthane 3-8-diol, geraniol, nepetalactone, etc.).

Now that the invention has been made, obvious variations will be readily apparent to skilled persons. For example, the process according to the invention can be applied equally well
30 to one AI or to more than one AI. In an embodiment, a second AI may be bound by absorption to

the surface of nanoparticles already formed in step (c) by simple addition to the colloidal suspension of the polymer.

In some embodiments, the solvent will be an organic solvent such that the liquid phase (a) will constitute an organic phase whereas the liquid phase (b) will constitute an aqueous phase.

5 In other embodiments, it is possible to use either two organic phase or two aqueous phases provided the conditions regarding solubility and miscibility are met. In yet another embodiment, solvents must be sufficiently volatile to allow for removal thereof, if concentration of the nanoparticle formulation is desired or required.

10 In an embodiment, the solvent for the polymer may be chosen from among a lower alcohol (e.g. methanol, ethanol, isopropanol, etc.), a lower ketone (e.g. acetone, methyl ethyl ketone, etc.) a light hydrocarbon or a mixture of light hydrocarbons (e.g. hexane, petroleum ether, etc.), a chlorinated light hydrocarbon (e.g. chloroform, methylene chloride, trichloroethylene, etc.) or common light solvents such as acetonitrile, dioxane etc.

15 In an embodiment, the non-solvent or the mixture of non-solvents is a liquid which does not dissolve the substance while being miscible with the solvent used. Thus, when the substance is a polymer such as EUDRAGIT[®], the solvent may be acetone or ethanol, and the non-solvent may be water.

In an embodiment, the surfactants of step (c) may be present in an amount from about 0% to about 10% (w/v).

20 In another embodiment, the concentration of the polymer in the solvent or the mixture of solvents may vary between about 0.1 and about 30%, and preferably between about 1% to about 15% by weight. The ratio of the solvents and non-solvents must be such as to allow the precipitation of the polymer. In an embodiment, increasing the solvent to non-solvent ratio decreases the size of the resultant nanoparticles.

25 In an embodiment where the amount of substances is sufficiently small, the moderate agitation of step (c) may be eliminated.

In another embodiment, the formulations may additionally comprise an electrolyte such as sodium chloride. In a particular embodiment, addition of up to about 10^{-2} M NaCl does not lead to coalescence or precipitation of the resultant nanoparticles.

In an embodiment nanoparticles smaller than 500 nm and having a narrow size distribution are produced using a method that does not require input of additional energy such as heat.

5 In another embodiment, polymers are selected from biocompatible polymers which may be naturally occurring polymers or synthetic polymers. Numerous innocuous polymers are well-known in the art and have long been and used for medical or cosmetic purposes.

10 In some embodiments, the solvent is biocompatible and need not be removed after formation of the nanoparticle formulations. In addition, the solvent may have preservative activity and/or be conducive to the production of formulations containing greater than about 20% of active ingredient, and/or conducive to the production of spherical nanoparticles exhibiting minimal size variation, for example, less than about 10% deviation from size average.

In other embodiment, the nanoparticles obtained are visible in the SEM and AFM, and appear to be approximately round in shape.

15 In an embodiment, the AI is selected from any disclosed in USSN 61/501,485 or USSN 61/538,425.

In certain embodiments, the nanoparticle formulations of the invention are useful in veterinary applications, including for repelling pests, including insects and acarids, away from an animal. In other embodiments, the inventive nanoparticle formulations are useful in pharmaceutical or veterinary applications for repelling insects or acarids.

20 In another embodiment, the invention provides an insect/pest repellent composition comprising formulations of the instant disclosure.

In an embodiment, the composition is in a form suitable for topical application to an animal. The composition may be a cream, gel, spray, liquid or spot-on.

25 In an embodiment, the invention provides a method for repelling pests comprising the step of applying a nanoparticle formulation of any of the disclosed embodiments to animals or a locus.

In another embodiment the animals are birds or mammals.

In another embodiment the mammals are humans, equines, felines, canines, bovines, or caprines.

30 In another embodiment the animals are equines or bovines.

In another embodiment the animals are humans.

Other obvious variations on the above-recited embodiments will be appreciated by persons skilled in the art.

For convenience, certain terms employed in the Specification, Examples, and appended Claims are collected here.

5 Unless otherwise explained, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this disclosure belongs. The singular terms “a”, “an”, and “the” include plural referents unless context clearly indicates otherwise. Similarly, the word “or” is intended to include “and” unless the context clearly indicates otherwise.

10 As used herein, the word “about”, where it is specifically used to describe a concentration, a mass, a weight, or a volume, is hereby defined to mean “plus or minus 10%” of the stated value.

As used herein, the term “animal” includes all vertebrate animals including humans. It also includes an individual animal in all stages of development, including embryonic and fetal
15 stages. In particular, the term “vertebrate animal” includes, but not limited to, humans, canines (*e.g.*, dogs), felines (*e.g.*, cats); equines (*e.g.*, horses), bovines (*e.g.*, cattle), ovine (*e.g.*, sheep), porcine (*e.g.*, pigs), as well as avians. The term “avian” as used herein refers to any species or subspecies of the taxonomic class *ava*, such as, but not limited to, chickens (breeders, broilers and layers), turkeys, ducks, a goose, a quail, pheasants, parrots, finches, hawks, crows and ratites
20 including ostrich, emu and cassowary, and includes all avians kept as either companion or production animals.

As used herein, the term “aqueous suspension” includes mixtures of insoluble particles in water. Aqueous suspensions may contain the active material in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients are suspending agents, for
25 example, colloidal silica, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, xanthan gum, hydroxy-propylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents may be a naturally-occurring phosphatide, for example lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic
30 alcohols, for example, heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol

monooleate, or condensation products of ethylene oxide, with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives, for example ethyl, or n-propyl, p-hydroxybenzoate, one or more coloring agents, one or more flavoring agents, and one or more
5 sweetening agents and/or bittering agents, such as those set forth above.

Veterinary compositions:

The compositions of the invention may also be in the form of oil-in-water or water-in-oil emulsions. The oily phase maybe a vegetable oil, for example, olive oil or arachis oil, or a mineral oil, for example, liquid paraffin or mixtures of these. Suitable emulsifying agents include
10 naturally-occurring phosphatides, for example, soy bean, lecithin, and esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example, sorbitan monooleate, and condensation products of the said partial esters with ethylene oxide, for example, polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsions may also contain sweetening agents, bittering agents, flavoring agents, and/or preservatives.

15 In one embodiment, the composition of the invention may be in the form of a microemulsion. Microemulsions are well suited as the liquid carrier vehicle. Microemulsions are quaternary systems comprising an aqueous phase, an oily phase, a surfactant and a cosurfactant. They are translucent and isotropic liquids.

Microemulsions are composed of stable dispersions of microdroplets of the aqueous
20 phase in the oily phase or conversely of microdroplets of the oily phase in the aqueous phase. The size of these microdroplets may be less than 200 nm (1000 to 100,000 nm for emulsions). The interfacial film may be composed of an alternation of surface-active (SA) and co-surface-active (Co-SA) molecules which, by lowering the interfacial tension, allows the microemulsion to be formed spontaneously.

25 In one embodiment of the oily phase, the oily phase may be formed from mineral or vegetable oils, from unsaturated polyglycosylated glycerides or from triglycerides, or alternatively from mixtures of such compounds. In one embodiment of the oily phase, the oily phase may be comprised of triglycerides; in another embodiment of the oily phase, the triglycerides are medium-chain triglycerides, for example C₈-C₁₀ caprylic/capric triglyceride. In
30 another embodiment of the oily phase may represent a % v/v range of about 2 to about 15%; about 7 to about 10%; and about 8 to about 9% v/v of the microemulsion.

The aqueous phase may include, for example water or glycol derivatives, such as propylene glycol, glycol ethers, polyethylene glycols or glycerol. In one embodiment, the glycol may be propylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, dipropylene glycol monoethyl ether or mixtures thereof. Generally, the aqueous phase will represent a proportion from about 1 to about 4% v/v in the microemulsion.

Surfactants for the microemulsion may include diethylene glycol monoethyl ether, dipropylene glycol monomethyl ether, polyglycolized C₈-C₁₀ glycerides or polyglyceryl-6 dioleate. In addition to these surfactants, the cosurfactants may include short-chain alcohols, such as ethanol and propanol.

Some compounds are common to the three components discussed above, i.e., aqueous phase, surfactant and cosurfactant. However, it is well within the skill level of the practitioner to use different compounds for each component of the same formulation. In one embodiment for the amount of surfactant/cosurfactant, the cosurfactant to surfactant ratio will be from about 1/7 to about 1/2. In another embodiment for the amount of cosurfactant, there will be from about 25 to about 75% v/v of surfactant and from about 10 to about 55% v/v of cosurfactant in the microemulsion.

Oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredient in a vegetable oil, for example, arachis oil, olive oil, sesame oil or coconut oil, or in mineral oil such as liquid paraffin. The oily suspensions may contain a thickening agent, for example, beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. Sweetening agents such as sucrose, saccharin or aspartame, bittering agents, and flavoring agents may be added to provide a palatable oral preparation. These compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid, or other known preservatives.

Aqueous suspensions may contain the active material in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients include suspending agents, for example, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxy-propylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents include naturally-occurring phosphatide, for example lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example, heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters

derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide, with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives, for example ethyl, or n-propyl, p-hydroxybenzoate, one or more coloring agents, one or more flavoring agents, and one or more sweetening agents and/or bittering agents, such as those set forth above.

Topical, dermal and subdermal formulations may include, by way of non-limiting example, emulsions, creams, ointments, gels, pastes, powders, shampoos, pour-on formulations, ready-to-use formulations, spot-on solutions and suspensions, dips and sprays. Topical application of an inventive compound or of a composition including at least one inventive compound among active agent(s) therein, in the form of a spot-on, spray-on or pour-on composition, may allow for the inventive composition to be absorbed through the skin to achieve systemic levels, distributed through the sebaceous glands or on the surface of the skin achieving levels throughout the coat. When the compound is distributed through the sebaceous glands, they may act as a reservoir, whereby there may be a long-lasting effect (up to several months) effect. Spot-on formulations are typically applied in a localized region which refers to an area other than the entire animal. In one embodiment, the location may be between the shoulders. In another embodiment it may be a stripe, e.g. a stripe from head to tail of the animal.

Pour-on formulations are described in U.S. Patent No. 6,010,710, also incorporated herein by reference. Pour-on formulations may be advantageously oily, and generally comprise a diluent or vehicle and also a solvent (e.g. an organic solvent) for the active ingredient if the latter is not soluble in the diluent.

Organic solvents that can be used in the invention include, but are not limited to, acetyltributyl citrate, fatty acid esters such as the dimethyl ester, diisobutyl adipate, acetone, acetonitrile, benzyl alcohol, ethyl alcohol, butyl diglycol, dimethylacetamide, dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, dipropylene glycol n-butyl ether, ethanol, isopropanol, methanol, ethylene glycol monoethyl ether, ethylene glycol monomethyl ether, monomethylacetamide, dipropylene glycol monomethyl ether, liquid polyoxyethylene glycols, propylene glycol, 2-pyrrolidone (e.g. N-methylpyrrolidone), diethylene glycol monoethyl ether, ethylene glycol, triacetin, C₁-C₁₀ esters of carboxylic acids such as butyl or octyl acetate, and diethyl phthalate, or a mixture of at least two of these solvents.

The solvent will be used in proportion with the concentration of the active agent compound and its solubility in this solvent. It will be sought to have the lowest possible volume. The vehicle makes up the difference to 100%.

A vehicle or diluent for the formulations may include dimethyl sulfoxide (DMSO), glycol derivatives such as, for example, propylene glycol, glycol ethers, polyethylene glycols or glycerol. As vehicle or diluent, mention may also be made of plant oils such as, but not limited to soybean oil, groundnut oil, castor oil, corn oil, cotton oil, olive oil, grape seed oil, sunflower oil, etc.; mineral oils such as, but not limited to, petrolatum, paraffin, silicone, etc.; aliphatic or cyclic hydrocarbons or alternatively, for example, medium-chain (such as C₈ to C₁₂) triglycerides.

In another embodiment of the invention, an emollient and/or spreading and/or film-forming agent may be added. In one embodiment, the emollient and/or spreading and/or film-forming agent may be:

(a) polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohols, copolymers of vinyl acetate and vinylpyrrolidone, polyethylene glycols, benzyl alcohol, mannitol, glycerol, sorbitol, polyoxyethylenated sorbitan esters; lecithin, sodium carboxymethylcellulose, silicone oils, polydiorganosiloxane oils (such as polydimethylsiloxane (PDMS) oils), for example those containing silanol functionalities, or a 45V2 oil,

(b) anionic surfactants such as alkaline stearates, sodium, potassium or ammonium stearates; calcium stearate, triethanolamine stearate; sodium abietate; alkyl sulphates (e.g. sodium lauryl sulphate and sodium cetyl sulphate); sodium dodecylbenzenesulphonate, sodium dioctylsulphosuccinate; fatty acids (e.g. those derived from coconut oil),

(c) cationic surfactants include water-soluble quaternary ammonium salts of formula N⁺R'R''R'''R''''⁺, Y⁻ in which the radicals R are optionally hydroxylated hydrocarbon radicals and Y⁻ is an anion of a strong acid such as the halide, sulphate and sulphonate anions; cetyltrimethylammonium bromide is among the cationic surfactants which can be used,

(d) amine salts of formula N⁺HR'R''R''' in which the radicals R are optionally hydroxylated hydrocarbon radicals; octadecylamine hydrochloride is among the cationic surfactants which can be used,

(e) nonionic surfactants such as sorbitan esters, which are optionally polyoxyethylenated (e.g. polysorbate 80), polyoxyethylenated alkyl ethers; polyoxypropylated fatty alcohols such as polyoxypropylene-styrol ether; polyethylene glycol stearate,

polyoxyethylenated derivatives of castor oil, polyglycerol esters, polyoxyethylenated fatty alcohols, polyoxyethylenated fatty acids, copolymers of ethylene oxide and propylene oxide,

- (f) amphoteric surfactants such as the substituted lauryl compounds of betaine; or
- (g) a mixture of at least two of these agents.

5 In one embodiment of the amount of emollient, the emollient used may be in a proportion of from about 0.1 to 50% or 0.25 to 5%, by volume. In another embodiment, the emollient used may be in a proportion of from about 0.1% to about 30%, about 1% to about 30%, about 1% to about 20%, or about 5% to about 20% by volume.

10 In another embodiment of the invention, the composition may be in ready-to-use solution form as is described in U.S. Patent No. 6,395,765, incorporated herein by reference. In addition to the compounds of the invention, the ready-to-use solution may contain a crystallization inhibitor and an organic solvent or a mixture of organic solvents. In some embodiments, water may be included with the organic solvent.

15 In various embodiments of the invention, the compositions may include a crystallization inhibitor in an amount of about 1 to about 50% (w/v) or about 5 to about 40% (w/v) based on the total weight of the formulation. In other embodiments, the amount of crystallization inhibitor in the inventive formulations may be about 1% to about 30%, about 5% to about 20%, about 1% to about 15%, or about 1% to about 10% (w/w). The type of crystallization inhibitor used in the
20 or inactive agents from the formulation. For example, in certain embodiments of the invention, a solvent or co-solvent of the formulation may also function as a crystallization inhibitor if it sufficiently inhibits the formation of crystals from forming over time when the formulation is administered.

25 Crystallization inhibitors which are useful for the invention include, but are not limited to:

- (a) polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohols, copolymers of vinyl acetate and vinylpyrrolidone, polyethylene glycols, benzyl alcohol, dimethylformamide, dimethylacetamide, dimethylsulfoxide, 2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidone, mannitol, glycerol, sorbitol or polyoxyethylenated esters of sorbitan; lecithin or sodium carboxymethylcellulose; or acrylic
30 derivatives, such as acrylates or methacrylates or polymers or copolymers thereof,

polyethyleneglycols (PEG) or polymers containing polyethyleneglycols, such as glycofurool and the like, and others;

(b) anionic surfactants, such as alkaline stearates (e.g. sodium, potassium or ammonium stearate); calcium stearate or triethanolamine stearate; sodium abietate; alkyl sulphates, which include but are not limited to sodium lauryl sulphate and sodium cetyl sulphate; sodium dodecylbenzenesulphonate or sodium dioctyl sulphosuccinate; or fatty acids (e.g. coconut oil);

(c) cationic surfactants, such as water-soluble quaternary ammonium salts of formula $N^+R'R''R'''R''''Y^-$, in which the R radicals are identical or different optionally hydroxylated hydrocarbon radicals and Y^- is an anion of a strong acid, such as halide, sulphate and sulphonate anions; cetyltrimethylammonium bromide is one of the cationic surfactants which can be used;

(d) amine salts of formula $N^+HR'R''R'''$, in which the R radicals are identical or different optionally hydroxylated hydrocarbon radicals; octadecylamine hydrochloride is one of the cationic surfactants which can be used;

(e) non-ionic surfactants, such as optionally polyoxyethylenated esters of sorbitan, e.g. Polysorbate 80, or polyoxyethylenated alkyl ethers; polyethylene glycol stearate, polyoxyethylenated derivatives of castor oil, polyglycerol esters, polyoxyethylenated fatty alcohols, polyoxyethylenated fatty acids or copolymers of ethylene oxide and of propylene oxide;

(f) amphoteric surfactants, such as substituted lauryl compounds of betaine;

(g) a mixture of at least two of the compounds listed in (a)-(f) above; or

(h) an organic solvent or mixture of solvents which inhibit the formation of crystals or amorphous solid after the formulation is administered.

In one embodiment of the crystallization inhibitor, a crystallization inhibitor pair will be used.

Such pairs include, for example, the combination of a film-forming agent of polymeric type and of a surface-active agent. These agents will be selected from the compounds mentioned above as crystallization inhibitor.

In some embodiments, one or more of the organic solvent(s) may have a boiling point of below about 100° C., or below about 80° C. In other embodiments, the organic solvent(s) may have a boiling point of below about 300° C, below about 250° C, below about 230°C, below about 210° C or below about 200° C.

In some embodiments where there is a mixture of solvents, i.e. a solvent and a co-solvent, the solvents may be present in the composition in a weight/weight (W/W) ratio of about 1/50 to about 1/1. Typically the solvents will be in a ratio of about 1/30 to about 1/1, about 1/20 to about 1/1, or about 1/15 to about 1/1 by weight. Preferably, the two solvents will be present in a weight/weight ratio of about 1/15 to about 1/2. In some embodiments, at least one of the solvents present may act as to improve solubility of the active agent or as a drying promoter. In particular embodiments, at least one of the solvents will be miscible with water.

The formulation may also comprise an antioxidizing agent intended to inhibit oxidation in air, this agent may be present in a proportion of about 0.005 to about 1% (w/v), about 0.01 to about 0.1%, or about 0.01 to about 0.05%.

In one embodiment of the film-forming agent, the agents are of the polymeric type which include but are not limited to the various grades of polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohols, and copolymers of vinyl acetate and of vinylpyrrolidone.

In one embodiment of the surface-active agents, the agents include but are not limited to those made of non-ionic surfactants; in another embodiment of the surface active agents, the agent is a polyoxyethylenated esters of sorbitan and in yet another embodiment of the surface-active agent, the agents include the various grades of polysorbate, for example Polysorbate 80.

In another embodiment of the invention, the film-forming agent and the surface-active agent may be incorporated in similar or identical amounts within the limit of the total amounts of crystallization inhibitor mentioned elsewhere.

The crystallization inhibitor inhibits the formation of crystals on the coat, and improves the maintenance of the cosmetic appearance of the skin or fur; that is to say without a tendency towards sticking or towards a sticky appearance, despite the high concentration of active material. Substances other than those mentioned herein may be used as crystallization inhibitors in the present invention. In one embodiment, the effectiveness of the crystallization inhibitor may be demonstrated by a test according to which 0.3 mL of a solution comprising 10% (w/v) of the active agent in an appropriate solvent as defined above, and 10% (w/v) of the compound acting as a crystallization inhibitor are placed on a glass slide at 20° C for 24 hours, after which fewer than 10 crystals, preferably 0 crystals, are seen with the naked eye on the glass slide.

In one embodiment of the antioxidizing agents, the agents are those conventional in the art and include but are not limited to butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene,

ascorbic acid, sodium metabisulphite, propyl gallate, sodium thiosulphate or a mixture of at least two compounds with antioxidant properties.

The formulation adjuvants discussed above are well known to the practitioner in this art and may be obtained commercially or through known techniques. These concentrated
5 compositions are generally prepared by simple mixing of the constituents as defined above; advantageously, the starting point is to mix the active material in the main solvent and then the other ingredients or adjuvants are added.

The volume of the formulation applied will depend on the type of animal and the size of the animal as well as the strength of the formulation and the potency of the active agents. In one
10 embodiment, an amount of about 0.1 to about 20 ml of the formulation may be applied to the animal. In other embodiment for the volume, the volume may be about 0.1 to about 10 ml, about 0.1 to about 5 ml, about 0.5 ml to about 10 ml, or about 0.3 to about 3 ml.

In another embodiment of the invention, application of a spot-on formulation according to the present invention may also provide long-lasting and broad-spectrum efficacy when the
15 solution is applied to the mammal or bird. The spot-on formulations provide for topical administration of a concentrated solution, suspension, microemulsion or emulsion for intermittent application to a spot on the animal, generally between the two shoulders (solution of spot-on type).

For spot-on formulations, the carrier may be a liquid carrier vehicle as described in U.S.
20 Patent No. 6,426,333 (incorporated herein by reference), which in one embodiment of the spot-on formulation may comprise a solvent or mixture of solvents including, but not limited to, acetone, an aliphatic alcohol such as methanol, ethanol, propanol, butanol, isopropanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, cyclopentanol, cyclohexanol, ethylene glycol, propylene glycol and the like; an aromatic alcohol such as phenol, cresol, naphthol, benzyl
25 alcohol and the like; acetonitrile, butyl diglycol, an organic amide such as dimethylacetamide, dimethylformamide, monomethylacetamide, 2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidone, vinylpyrrolidone and the like; dimethylsulfoxide (DMSO), a glycol polymer or an ether thereof, such as polyethylene glycol (PEG) of various grades, polypropylene glycols of various grades, dipropylene glycol n-butyl ether, ethylene glycol monoethyl ether, ethylene glycol monomethyl
30 ether, dipropylene glycol monomethyl ether, diethylene glycol monoethyl ether, ethylene glycol,

diethyl phthalate fatty acid esters, such as the diethyl ester or diisobutyl adipate, or a mixture of at least two of these solvents.

The liquid carrier vehicle may optionally contain a crystallization inhibitor including, but not limited to, those described in (a) to (h) above, or a compound that may act both as a solvent and a crystallization inhibitor (as defined above), or a mixture of these crystallization inhibitors.

Spot-on formulations may be prepared by dissolving the active ingredients into the pharmaceutically or veterinary acceptable vehicle. Alternatively, the spot-on formulation may be prepared by encapsulation of the active ingredient to leave a residue of the therapeutic agent on the surface of the animal. These formulations will vary with regard to the weight of the therapeutic agent in the combination depending on the species of host animal to be treated, the severity and type of infection and the body weight of the host.

Dosage forms may typically contain from about 0.1 mg to about 5 g. In other embodiments, the dosage form may contain about 0.5 mg to about 5 g of an active agent. In one embodiment of the dosage form, the dosage may contain from about 1 mg to about 500 mg of an active agent, typically about 25 mg, about 50 mg, about 100 mg, about 200 mg, about 300 mg, about 400 mg, about 500 mg, about 600 mg, about 800 mg, or about 1000 mg.

In one embodiment of the invention, the active agent may be present in the formulation at a concentration of about 0.05 to about 10% weight/volume. In another embodiment of the invention, the active agent may be present in the formulation as a concentration from about 0.1 to about 2% weight/volume. In yet another embodiment of the invention, the active agent may be present in the formulation as a concentration from about 0.25 to about 1.5% weight/volume. In still another embodiment of the invention, the active agent may be present in the formulation as a concentration about 1% weight/volume.

Methods of Treatment:

As discussed above, the nanoparticle formulations are effective in repelling insects and pests, and therefore may prevent insect/pest-borne infestations in animals or humans. In one embodiment, the invention provides a method for repelling insects or other pests away from an animal, comprising administering a repellent effective amount of a compound of formula (I) or (Ia), or veterinarily or pharmaceutically acceptable salts thereof, or a composition comprising the compounds, to the animal.

In still another embodiment of the invention, a method is provided for repulsion of insects/pests at a locus, which comprises administering or applying a repellent effective amount of a compound of formula (I) or (Ia), or veterinarily acceptable salts thereof, to the locus. With respect to animal health applications, "locus" is intended to mean a habitat, breeding ground, area, material or environment in which a parasite is growing or may grow, including in or on an animal.

Mammals which can be treated include but are not limited to humans, cats, dogs, cattle, chickens, cows, deer, goats, horses, llamas, pigs, sheep and yaks. In one embodiment of the invention, the mammals treated are humans, cats or dogs.

When an anthelmintic agent is added to the composition of the invention, the composition can also be used to treat against endoparasites such as those helminths selected from the group consisting of *Anaplocephala*, *Ancylostoma*, *Anecator*, *Ascaris*, *Capillaria*, *Cooperia*, *Dipylidium*, *Dirofilaria*, *Echinococcus*, *Enterobius*, *Fasciola*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia*, *Oxyuris spp.*, *Toxocara*, *Strongyloides*, *Strongylus spp.*, *Toxascaris*, *Trichinella*, *Trichuris*, and *Trichostrongylus*. The inventive compounds are particularly effective against organisms from the class of Protozoa, for example, *Eimeria spp.* and *Plasmodia spp.*

In each aspect of the invention, the compounds and compositions of the invention can be applied against a single organism/parasite or combinations thereof.

Additional pharmaceutical, pesticidal or veterinarily active ingredients, which include, but are not limited to, parasiticidals including acaricides, anthelmintics, endectocides and insecticides, may also be added to the formulations of the invention. Anti-parasitic agents may include both ectoparasiticidal and endoparasiticidal agents. Veterinary pharmaceutical agents are well-known in the art (see e.g. *Plumb' Veterinary Drug Handbook*, 5th Edition, ed. Donald C. Plumb, Blackwell Publishing, (2005) or *The Merck Veterinary Manual*, 9th Edition, (January 2005)) and include but are not limited to acarbose, acepromazine maleate, acetaminophen, acetazolamide, acetazolamide sodium, acetic acid, acetohydroxamic acid, acetylcysteine, acitretin, acyclovir, albendazole, albuterol sulfate, alfentanil, allopurinol, alprazolam, altrenogest, amantadine, amikacin sulfate, aminocaproic acid, aminopentamide hydrogen sulfate, aminophylline/theophylline, amiodarone, amitraz, amitriptyline, amlodipine besylate, ammonium chloride, ammonium molybdenate, amoxicillin, amoxicillin, clavulanate potassium, amphotericin B desoxycholate, amphotericin B lipid-based, ampicillin, amprolium, antacids

(oral), antivenin, apomorphine, apramycin sulfate, ascorbic acid, asparaginase, aspiring, atenolol, atipamezole, atracurium besylate, atropine sulfate, aurnofin, aurothioglucose, azaperone, azathioprine, azithromycin, baclofen, barbituates, benazepril, betamethasone, bethanechol chloride, bisacodyl, bismuth subsalicylate, bleomycin sulfate, boldenone undecylenate, bromides, bromocriptine mesylate, budenoside, buprenorphine, buspirone, busulfan, butorphanol tartrate, cabergoline, calcitonin salmon, calcitrol, calcium salts, captopril, carbenicillin indanyl sodium, carbimazole, carboplatin, carnitine, carprofen, carvedilol, cefadroxil, cefazolin sodium, cefixime, cefoperazone sodium, cefotaxime sodium, cefotetan disodium, cefoxitin sodium, cefpodoxime proxetil, ceftazidime, ceftiofur sodium, ceftiofur, ceftiaxone sodium, cephalixin, cephalosporins, cephapirin, charcoal (activated), chlorambucil, chloramphenicol, chlordiazepoxide, chlordiazepoxide +/- clidinium bromide, chlorothiazide, chlorpheniramine maleate, chlorpromazine, chlorpropamide, chlortetracycline, chorionic gonadotropin (HCG), chromium, cimetidine, ciprofloxacin, cisapride, cisplatin, citrate salts, clarithromycin, clemastine fumarate, clenbuterol, clindamycin, clofazimine, clomipramine, claonazepam, clonidine, cloprostenol sodium, clorazepate dipotassium, clorsulon, cloxacillin, codeine phosphate, colchicine, corticotropin (ACTH), cosyntropin, cyclophosphamide, cyclosporine, cyproheptadine, cytarabine, dacarbazine, dactinomycin/actinomycin D, dalteparin sodium, danazol, dantrolene sodium, dapson, decoquinat, deferoxamine mesylate, deracoxib, deslorelin acetate, desmopressin acetate, desoxycorticosterone pivalate, detomidine, dexamethasone, dexpanthenol, dexraazoxane, dextran, diazepam, diazoxide (oral), dichlorphenamide, dichlorvos, diclofenac sodium, dicloxacillin, diethylcarbamazine citrate, diethylstilbestrol (DES), difloxacin, digoxin, dihydrotachysterol (DHT), diltiazem, dimenhydrinate, dimercaprol/BAL, dimethyl sulfoxide, dinoprost tromethamine, diphenylhydramine, disopyramide phosphate, dobutamine, docusate/DSS, dolasetron mesylate, domperidone, dopamine, doramectin, doxapram, doxepin, doxorubicin, doxycycline, edetate calcium disodium, calcium EDTA, edrophonium chloride, enalapril/enalaprilat, enoxaparin sodium, enrofloxacin, ephedrine sulfate, epinephrine, epoetin/erythropoietin, eprinomectin, epsiprantel, erythromycin, esmolol, estradiol cypionate, ethacrynic acid/ethacrynate sodium, ethanol (alcohol), etidronate sodium, etodolac, etomidate, euthanasia agents w/pentobarbital, famotidine, fatty acids (essential/omega), felbamate, fenbendazole, fentanyl, ferrous sulfate, filgrastim, finasteride, fipronil, florfenicol, fluconazole, flucytosine, fludrocortisone acetate,

flumazenil, flumethasone, flunixin meglumine, fluorouracil (5-FU), fluoxetine, fluticasone propionate, fluvoxamine maleate, fomepizole (4-MP), furazolidone, furosemide, gabapentin, gemcitabine, gentamicin sulfate, glimepiride, glipizide, glucagon, glucocorticoid agents, glucosamine/chondroitin sulfate, glutamine, glyburide, glycerine (oral), glycopyrrolate, 5 gonadorelin, griseofulvin, guaifenesin, halothane, hemoglobin glutamer-200 (OXYGLOBIN®), heparin, hetastarch, hyaluronate sodium, hydrazaline, hydrochlorothiazide, hydrocodone bitartrate, hydrocortisone, hydromorphone, hydroxyurea, hydroxyzine, ifosfamide, imidacloprid, imidocarb dipropionate, impenem-cilastatin sodium, imipramine, inamrinone lactate, insulin, interferon alfa-2a (human recombinant), iodide (sodium/potassium), ipecac (syrup), ipodate 10 sodium, iron dextran, isoflurane, isoproterenol, isotretinoin, isoxxsuprine, itraconazole, ivermectin, kaolin/pectin, ketamine, ketoconazole, ketoprofen, ketorolac tromethamine, lactulose, leuprolide, levamisole, levetiracetam, levothyroxine sodium, lidocaine, lincomycin, liothyronine sodium, lisinopril, lomustine (CCNU), lufenuron, lysine, magnesium, mannitol, marbofloxacin, mechlorethamine, meclizine, meclofenamic acid, medetomidine, medium chain 15 triglycerides, medroxyprogesterone acetate, megestrol acetate, melarsomine, melatonin, meloxicam, melphalan, meperidine, mercaptopurine, meropenem, metformin, methadone, methazolamide, methenamine mandelate/hippurate, methimazole, methionine, methocarbamol, methohexital sodium, methotrexate, methoxyflurane, methylene blue, methylphenidate, methylprednisolone, metoclopramide, metoprolol, metronidazole, mexiletine, mibolerlone, 20 midazolam milbemyacin oxime, mineral oil, minocycline, misoprostol, mitotane, mitoxantrone, morantel tartrate, morphine sulfate, moxidectin, naloxone, mandrolone decanoate, naproxen, narcotic (opiate) agonist analgesics, neomycin sulfate, neostigmine, niacinamide, nitazoxanide, nitenpyram, nitrofurantoin, nitroglycerin, nitroprusside sodium, nizatidine, novobiocin sodium, nystatin, octreotide acetate, olsalazine sodium, omeprazole, ondansetron, opiate antidiarrheals, 25 orbifloxacin, oxacillin sodium, oxazepam, oxfendazole, oxibutynin chloride, oxymorphone, oxytretracycline, oxytocin, pamidronate disodium, pancrelipase, pancuronium bromide, paromomycin sulfate, parozetine, pencillamine, penicillins including penicillin G and penicillin V potassium, pentazocine, pentobarbital sodium, pentosan polysulfate sodium, pentoxifylline, pergolide mesylate, phenobarbital, phenoxybenzamine, pheylbutazone, phenylephrine, 30 phenypropanolamine, phenytoin sodium, pheromones, parenteral phosphate, phytonadione/vitamin K-1, pimobendan, piperazine, pirlimycin, piroxicam, polysulfated

glycosaminoglycan, ponazuril, potassium chloride, pralidoxime chloride, praziquantel, prazosin, prednisolone/prednisone, primidone, procainamide, procarbazine, prochlorperazine, propantheline bromide, propionibacterium acnes injection, propofol, propranolol, protamine sulfate, pseudoephedrine, psyllium hydrophilic mucilloid, pyrantel pamoate, pyridostigmine
5 bromide, pyrilamine maleate, pyrimethamine, quinacrine, quinidine, ranitidine, rifampin, s-adenosyl-methionine (SAME), saline/hyperosmotic laxative, selamectin, selegiline/l-deprenyl, sertraline, sevelamer, sevoflurane, silymarin/milk thistle, sodium bicarbonate, sodium polystyrene sulfonate, sodium stibogluconate, sodium sulfate, sodium thiosulfate, somatotropin, sotalol, spectinomycin, spironolactone, stanozolol, streptokinase, streptozocin, succimer,
10 succinylcholine chloride, sucralfate, sufentanil citrate, sulfachlorpyridazine sodium, sulfadiazine/trimethoprim, sulfamethoxazole/trimethoprim, sulfadimentoxine, sulfadimethoxine/ormetoprim, sulfasalazine, taurine, tepoxaline, terbinafine, terbutaline sulfate, testosterone, tetracycline, thiabendazole, thiacetarsamide sodium, thiamine, thioguanine, thiopental sodium, thiotepa, thyrotropin, tiamulin, ticarcilin disodium, tiletamine /zolazepam,
15 tilmocsin, tiopronin, tobramycin sulfate, tocainide, tolazoline, telfenamic acid, topiramate, tramadol, trimcinolone acetonide, trientine, trilostane, trimepraxine tartrate w/prednisolone, tripelennamine, tylosin, urdosiol, valproic acid, vanadium, vancomycin, vasopressin, vecuronium bromide, verapamil, vinblastine sulfate, vincristine sulfate, vitamin E/selenium, warfarin sodium, xylazine, yohimbine, zafirlukast, zidovudine (AZT), zinc acetate/zinc sulfate, zonisamide and
20 mixtures thereof.

In one embodiment of the invention, arylpyrazole compounds may be added to the compositions of the invention. Arylpyrazoles may include but are not limited to those described in U.S. Patent Nos. 6,001,384; 6,010,710; 6,083,519; 6,096,329; 6,174,540; 6,685,954 and 6,998,131, all of which are hereby incorporated by reference in their entirety, - each assigned to
25 Merial, Ltd., Duluth, GA). A particularly preferred arylpyrazole compound that may be combined with the compounds of the invention is fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl) phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl) pyrazole-3-carbonitrile, CAS No. 120068-37-3).

In another embodiment of the invention, nodulisporic acid and its derivatives (a class of
30 known acaricidal, anthelmintic, anti-parasitic and insecticidal agents) may be added to the compositions of the invention. These compounds are used to treat or prevent infections in

humans and animals and are described, for example, in U.S. Patent No. 5,399,582, 5,962,499, 6,221,894 and 6,399,786, all of which are hereby incorporated by reference in their entirety. The compositions may include one or more of the known nodulisporic acid derivatives in the art, including all stereoisomers, such as those described in the literature cited above.

5 In another embodiment, anthelmintic compounds of the amino acetonitrile class (AAD) of compounds such as monepantel (ZOLVIX) and the like may be added to the compositions of the invention. These compounds are described, for example, in WO 2004/024704; Sager et al., *Veterinary Parasitology*, 2009, 159, 49-54; Kaminsky et al., *Nature* vol. 452, 13 March 2008, 176-181.

10 The formulations of the invention may also be combined with paraherquamide compounds and derivatives of these compounds, including derquantel (see Ostlind et al., *Research in Veterinary Science*, 1990, 48, 260-61; and Ostlind et al., *Medical and Veterinary Entomology*, 1997, 11, 407-408). The paraherquamide family of compounds are known class of compounds that include a spirodioxepino indole core with activity against certain parasites (see
15 *Tet. Lett.* 1981, 22, 135; *J. Antibiotics* 1990, 43, 1380, and *J. Antibiotics* 1991, 44, 492). In addition, the structurally related marcfortine family of compounds, such as marcfortines A-C, are also known and may be combined with the formulations of the invention (see *J. Chem. Soc. – Chem. Comm.* 1980, 601 and *Tet. Lett.* 1981, 22, 1977). Further references to the paraherquamide derivatives can be found, for example, in WO 91/09961, WO 92/22555, WO
20 97/03988, WO 01/076370, WO 09/004432, U.S. Patent 5,703,078 and U.S. Patent 5,750,695, all of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

 In another embodiment, the formulations of the invention may be combined with cyclo-depsipeptide anthelmintic compounds including emodepside (see Willson et al., *Parasitology*, Jan. 2003, 126(Pt 1):79-86).

25 In another embodiment of the invention, the class of acaricides or insecticides known as insect growth regulators (IGRs) may also be added to the compositions of the invention. Compounds belonging to this group are well known to the practitioner and represent a wide range of different chemical classes. These compounds all act by interfering with the development or growth of the insect pests. Insect growth regulators are described, for example, in U.S. Patent
30 No. 3,748,356; U.S. Patent No. 3,818,047; U.S. Patent No. 4,225,598; U.S. Patent No. 4,798,837; U.S. Patent No. 4,751,225, EP 0 179 022 or GB 2 140 010 as well as U.S. Patent Nos.

6,096,329 and 6,685,954, all of which are hereby incorporated by reference in their entirety. Examples of IGRs suitable for use may include but are not limited to methoprene, pyriproxyfen, hydroprone, cyromazine, fluazuron, lufenuron, novaluron, pyrethroids, formamidines and 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl) phenylurea.

5 An anthelmintic agent that may be combined with the formulations of the invention may be a benzenedisulfonamide compound, which includes but is not limited to clorsulon; or a cestodal agent, which includes but is not limited to praziquantel, pyrantel or morantel.

 In some embodiments, a parasitocidal agent that may be combined with the formulations of the invention may be a biologically active peptide or protein including, but not limited to, 10 depsiptides, which act at the neuromuscular junction by stimulating presynaptic receptors belonging to the secretin receptor family resulting in the paralysis and death of parasites. In one embodiment of the depsiptide, the depsiptide may be emodepside.

 In other embodiments, an insecticidal agent that may be combined with the formulations of the invention may be a spinosyn (e.g. spinosad) or a substituted pyridylmethyl derivative 15 compound such as imidacloprid. Agents of this class are described above, and for example, in U.S. Patent No. 4,742,060 or in EP 0 892 060, both of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

 For endoparasites, parasiticides which may be combined include but are not limited to pyrantel, morantel, the benzimidazoles (including albendazole, cambendazole, thiabendazole, 20 fenbendazole, febantel, oxfendazole, oxibendazole, triclabendazole, mebendazole and netobimin), levamisole, closantel, rafoxanide, nitroxylin, disophenol and paraherquamide. For ectoparasites, insecticides which may be combined also include but are not limited to pyrethroids, organophosphates and neonicotinoids such as imidacloprid, as well as compounds such as metaflumizone, amitraz and ryanodine receptor antagonists.

25 The formulations of the invention may also comprise an antiparasitic macrocyclic lactone compound in combination with the active compound of the invention. The macrocyclic lactones include, but are not limited to, avermectins, such as abamectin, dimadectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, latidectin, lepimectin, selamectin, ML-1,694,554 and milbemycins, such as milbemectin, milbemycin D, moxidectin and nemadectin. Also included 30 are the 5-oxo and 5-oxime derivatives of said avermectins and milbemycins. Examples of compositions comprising macrocyclic lactones include but are not limited to those described in

U.S. Patent Nos. 6,426,333; 6,482,425; 6,962,713 and 6,998,131, all of which are incorporated by reference in their entirety; - each assigned to Merial, Ltd., Duluth, GA.

The macrocyclic lactone compounds are known in the art and can easily be obtained commercially or through synthesis techniques known in the art. Reference is made to the widely available technical and commercial literature. For avermectins, ivermectin and abamectin, reference may be made, for example, to the work "Ivermectin and Abamectin", 1989, by M.H. Fischer and H. Mrozik, William C. Campbell, published by Springer Verlag., or Albers-Schönberg et al. (1981), "Avermectins Structure Determination", J. Am. Chem. Soc., 103, 4216-4221. For doramectin, "Veterinary Parasitology", vol. 49, No. 1, July 1993, 5-15 may be consulted. For milbemycins, reference may be made, *inter alia*, to Davies H.G. et al., 1986, "Avermectins and Milbemycins", Nat. Prod. Rep., 3, 87-121, Mrozik H. et al., 1983, Synthesis of Milbemycins from Avermectins, Tetrahedron Lett., 24, 5333-5336, U.S. Patent No. 4,134,973 and EP 0 677 054.

Macrocyclic lactones are either natural products or are semi-synthetic derivatives thereof. The structure of the avermectins and milbemycins are closely related, e.g., by sharing a complex 16-membered macrocyclic lactone ring. The natural product avermectins are disclosed in U.S. Patent No. 4,310,519 and the 22,23-dihydro avermectin compounds are disclosed in U.S. Patent No. 4,199,569, each of which is incorporated herein by reference. Mention is also made of U.S. Patent Nos. 4,468,390, 5,824,653, EP 0 007 812 A1, U.K. Patent Specification 1 390 336, EP 0 002 916, and New Zealand Patent No. 237 086, *inter alia*, all of which are incorporated by reference in their entirety. Naturally occurring milbemycins are described in U.S. Patent No. 3,950,360 as well as in the various references cited in "The Merck Index" 12th ed., S. Budavari, Ed., Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, New Jersey (1996). Latidectin is described in the "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN)", *WHO Drug Information*, vol. 17, no. 4, pp. 263- 286, (2003). Semisynthetic derivatives of these classes of compounds are well known in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,077,308, 4,859,657, 4,963,582, 4,855,317, 4,871,719, 4,874,749, 4,427,663, 4,310,519, 4,199,569, 5,055,596, 4,973,711, 4,978,677, 4,920,148 and EP 0 667 054, all of which are incorporated by reference in their entirety.

In yet another embodiment of the invention, adulticide insecticides and acaricides can also be added to the formulations of the invention. These include pyrethrins (which include

cinerin I, cinerin II, jasmolin I, jasmolin II, pyrethrin I, pyrethrin II and mixtures thereof) and pyrethroids, organophosphate (which included but are not limited to chlorfenvinphos, crotoxyphos, dichlorvos, heptenophos, mevinphos, monocrotophos, naled, TEPP, tetrachlorvinphos) and carbamates (which include but are not limited to benomyl, carbanolate, 5 carbaryl, carbofuran, meththiocarb, metolcarb, promacyl, propoxur, aldicarb, butocarboxim, oxamyl, thiocarboxime and thiofanox).

In addition to the other active agents mentioned above, combinations of two or more active agents may be used with the formulations of the invention in a composition to treat a desired spectrum of pests and parasites. It would be well within the skill level of the practitioner 10 to decide which individual compound(s) can be used in the inventive formulation to treat a particular infection of an insect.

References

- [1] Kasting G. B., Bhatt V., Speaker T. Microencapsulation decreases the skin absorption of 15 N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 548–552.
- [2] Maji T.K., Baruah I., Dube S., Hussain M.R. Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology* 98 (2007) 840–844.
- [3] Qiu H., McCall J. W., Won Jun H. Formulation of topical insect repellent N,N-diethyl-m- 20 toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 163 (1998) 167–176.
- [4] Sakulku U., Nuchuchua O., Uawongyart N., Puttipipatkachorn S., Soottitantawat A., Ruktanonchai U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 372 (2009) 105-111
- 25 [5] Nuchuchua O., Sakulku U., Uawongyart N., Puttipipatkachorn S., Soottitantawat A., Ruktanonchai U. In Vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 1234-1242.
- [6] Iscan Y., Wissing S.A., Hekimoglu S., Müller R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for 30 topical drug delivery: incorporation of the lipophilic drugs N,N-diethylm-toluamide and vitamin.
- Die Pharmazie* 60 (2005) 905–909.

- [7] Yaziksiz-Iscan Y., Wissing S.A., Müller R.H., Hekimoglu S. Different production methods for solid lipid nanoparticles (SLN) containing the insect repellent DEET. Fourth World Meeting APGI/APV, Florenz, submitted for publication.
- [8] Devissaguet, JP., Fessi, H., Puisieux, F. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules. US5049322 (1991).
- [9] Schowalter, TD. 2006. Insect ecology. Academic Press.
- [10] Dingler A., Runge S., et Muller R. H. SLN (Solid Lipid Nanoparticles) as drug carrier for an IV administration of poorly water soluble drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences 4 (1996) 132-132.
- 10 [11] Cheng, J., Tong, R. Particulate drug delivery. US0248126 (2008).
- [12] Eliasof, S., Crawford, T.C., Gandal, GG., Relter, LA., Ng, PS. Polymer-agent conjugates, particles, compositions, and related methods of use. US0247669 (2010).
- [13] Fisher, K., General, S. Functionalized, solid polymer nanoparticles comprising epothilones. US0148384 A1 (2009).
- 15 [14] Stainmesse, S., Fessi, H., Devissaguet, JP., Puisieux, F., Thies, C. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. US5133908 (1992).

The invention will now be further described by way of the following non-limiting
20 examples.

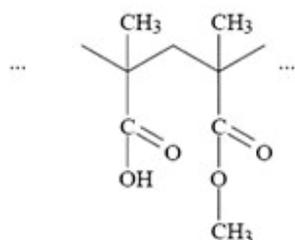
EXAMPLES

The following examples are provided to illustrate certain embodiments of the invention and are not to be construed in any way as limiting the scope of the invention. In summary, nanoparticle suspensions were prepared, characterized in term of physicochemical parameters,
25 drug release profile, repellent activity as long lasting efficiency were measured.

Briefly, the nanoparticle suspension preparation was the follow one: the arthropod repellent active ingredient, the polymer and the solvent were placed under magnetic stirring in order to obtain a perfectly homogeneous organic phase. This organic phase was poured under gentle magnetic stirring to the aqueous phase leading to the final nanoparticle suspension.

30 Example 1 - Characterization of arthropod repellent-loaded nanoparticle suspension

A reference formulation was produced, consisting of 10% (w/w) active ingredient (benzyl benzoate, BB); 10% (w/w) polymer (EUDRAGIT[®] S 100, “ERS100”); 30% (w/w) ethanol (EtOH) and 50% (w/w) deionized water. As defined herein, EUDRAGIT[®] S100 are anionic copolymers based on methacrylic acid and methyl methacrylate, and having CAS number 25086-
5 15-1 and IUPAC name of “poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2”.



EUDRAGIT[®] S 100

The resulting formulation provided access to a stable, monodisperse nanosuspension with a Z-average of 150 nm and a Zeta potential of +50 mV. The difference in nanoparticle (NP) size, size distribution and Zeta potential between six NP batches of this reference formulation were statistically non-significant, reflecting the high reproducibility of the preparation method. The temperature range variation of both phases before nanoprecipitation was studied from 4 to 70 °C. The size and Zeta potential analysis indicated the formulations obtained at different temperature (e.g. 4 °C, 16 °C, 20 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C) exhibited no significant differences as regards physicochemical characteristics. In agreement with the size and Zeta potential data, SEM showed the resulting NP possessed a highly similar surface aspect. The order of introduction (e.g. organic or aqueous phase first) had no significant effect on NP size, size distribution, Zeta potential and stability.
10
15

NP size / size distribution was measured on stable formulations. Overall, NP size averaged between 90 to 300 nm with monomodal population. The Zeta potential for all formulations was in the range of 50-60 mV, suggesting a net positive surface charge due to the functional group present on the polymer
20

NP loading capacity with varying BB/ERS100 ratio. The Z-average variation was determined to range from 110 to 210 nm (i.e. acceptable size range) over a broad BB:ERS100 range (from 11 to 0). AI loading capacity was evaluated, and as indicated by FIG. 3, NP size increased slightly with increasing AI content. The Zeta potential values decreased from 61mV to 50mV with increasing AI loading. When the ratio of BB:ERS100 was fixed at 5, the
25

corresponding formulation was stable, but presented a minor population of $\sim 5 \mu\text{m}$ -sized NP, presumably due NP aggregation.

NP preparations with different ratio OP/AP were formulated; the percentages of recipes are gathered in Table 3:

5 Table 3: Formulation composition for (organic phase : aqueous phase) ratio study

	AM 0.14	AM 0.35	AM 0.7	AM 1.4	AM 2
ERS100 (g)	0.3	0.75	1.5	3	5
BB (g)	0.3	0.75	1.5	3	5
EtOH (g)	1.5	3.75	7.5	15	20
Water (g)	15	15	15	15	15
Ratio OP/AP	0.14	0.35	0.7	1.4	2

Size analysis report obtained just after formulation presented a monodisperse NP size distribution, centered on 120 nm as shown in FIG. 4. These obtained analytical reports demonstrated no size changes for the formulations with a ratio OP/AP ranged from 0.14 to 1.4. Ratio OP/AP = 5 was eliminated because it did not present stable, monomodal size distribution.

10 The formulations were transferred to hermetic bottles in stored in an oven at 40°C, whereafter size and Zeta potential measurements/analyses were conducted at T=0, T=1week, T=3weeks, T=1month and T=2 months. The results obtained for T0 and T2 months are presented in FIG. 5. Formulations of BB-loaded NP suspensions obtained by varying the OP/AP ratio did not present any instability phenomenon for a ratio ranged from 0.14 to 2. According to the size and size
15 distribution study, formulations with a ratio ranged from 0.14 to 2 showed colloidal stability to at least 2 months at 40 °C. The nearly identical Zeta potential value at T=0 and T=2 months provides further support the NP formulations are stable for at least 2 months at 40 °C.

Organic solvent content study. The solubility of BB in a mixture of ethanol and water was then evaluated (Table 3).

20 Table 1 : Formulation and analytical data for the solvent content study; % EtOH is the solvent percentage in the continuous phase (EtOH + water).

	AM 6.6	AM 13.3	AM 20	AM 26	AM 33.3	AM 40	AM 46.6	AM 60	AM 73.3	AM 80	AM 86.6
% EtOH	6.6	13.3	20.0	26.7	33.3	40.0	46.6	60.0	73.3	80.0	86.6
Size (nm)	NA	NA	298	249	236	187	182	167	163	162	160

@ T0											
Zeta potential (mV) T0	NA	NA	56	54	52	58	60	55	57	59	54

The formulations displayed monomodal distributions for EtOH content greater than 40% in the continuous phase, with particle diameters ranging from 187 nm to 160 nm, and polydispersity indices ranging from 0.080 to 0.150. The formulations also demonstrated excellent physical storage stability (40°C) over long periods of at least 2 months. Comparison of NP size with the BB solubility indicated that increasing EtOH % results in greater amounts of BB in the continuous phase, with concomitant reduction in particle size. The data suggest that with 40% of EtOH in the continuous phase, approximately 2.4mg/ml of BB will not be associated with NP. FIG. As indicated by SEM (FIG. 7), BB-loaded NP generated by nanoprecipitation were spherical with smooth surfaces and had diameters between 250 and 90 nm, in accordance with DLS data. As expected, the SEM measurement indicated slightly smaller NP sizes, relative to the DLS measurement, because DLS necessarily includes any solvation shell surrounding the NP. After complete drying, several BB-loaded NP appeared to have self-assembled into spherical aggregates.

pH study. NP were formulated in an aqueous phase composed of deionized water and size, size distribution and Zeta potential were measured as before (FIG. 8). The diluted suspensions were composed to 0.5 % (w/w) of loaded nanoparticles. Dispersion of the reference nanoparticle suspension in water at a pH range from 3 to 10 resulted in a stable NP suspension. The Zeta potential had a maximum value of +66 mV at pH=3, decreased with increasing pH, and reached a minimal value of +35 mV at pH=10. At pH greater than 10, the BB-loaded NP formulations showed heavy aggregation resulting in object which were too large to be measured by DLS.

Salinity study. The stability of the samples was studied by analyzing the evolution of the particle diameters at different salt concentrations using sodium chloride. FIG. 9 displays the results for BB-loaded NP obtained from the reference formulation at pH 6.5 in the presence of NaCl. Briefly, a preselected volume of the reference BB-loaded NP formulation was diluted in a fixed aqueous volume at various salinity values. The bottles were sealed and suspension was stirred for 24 hours at room temperature. Particle size was analyzed by DLS after 24 hours of

stirring. A low salt content did not appear to disrupt the NP stability in suspension. A NaCl content at 10mMol/L slightly influenced the NP stability, as indicated by a Zeta potential increase.

Example 2 - Repellent nanoparticle suspensions

5 *Formulation I - AI-loaded NP using non ionic surfactant.* ERS100, Benzyl Benzoate and acetone were stirred until the polymer was completely dissolved. The aqueous phase consisting of 0.1% (w/v) of Polysorbate 80 was prepared. The organic phase was poured into the aqueous phase with gentle stirring. Acetone was then removed and physicochemical characterization was performed. The obtained particles presented a size of 125 nm with a narrow distribution and a
10 positive Zeta potential (+30mV). These suspensions showed a colloidal stability for 4 weeks at 40 °C.

Formulation II - AI-loaded NP using a polymeric surfactant. Formulation II was prepared according to above procedure, though in this case, the organic phase was composed of polyvinyl alcohol 3-88 polymer, from 0.1 to 0.5% w/v in water. The obtained particles presented a size
15 from 147 to 166 nm with a narrow distribution and a positive Zeta potential (+40mV +/-5mV). These suspensions showed a colloidal stability for 4 weeks at 40°C.

Formulation III - AI-loaded NP using different solvents. Ethanol (III-a), Methanol (III-b), N,N-diethyl-acetamide (III-c) and isopropanol (III-d) were tested using the follow formulation and process: The organic phase was prepared dissolving the polymer and the AI. 2g of ERS and
20 2g of BB were dissolved in the solvent. The aqueous phase (deionized water) was placed under gentle magnetic stirring and the homogeneous organic phase was then added. The obtained NP with ethanol, methanol and isopropanol did not demonstrate significant difference in term of particle size, polydispersity or surface charge (150 nm; narrow size distribution; +60mV +/-5mV). With N,N-dimethyl-acetamide, the particle size was 370 nm with a narrow distribution.
25 These NP suspensions exhibited colloidal stability for 4 weeks at 40°C.

Formulation IV - essential oil-loaded NP. Various essential oils were formulated by above-described nanoprecipitation process. 3g of essential oils, 3g of ERS and 9g of EtOH were stirred until complete polymer dissolution. The aqueous phase consisted of deionized water was placed under stirring and the organic phase was then added, resulting in the essential oil-loaded
30 NP suspension. Table 4 presents several physical parameters of suspensions made from different AI.

Table 4: Essential oil NP characteristics.

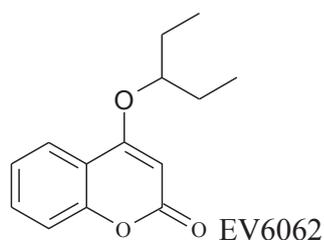
Formulation ID	Essential oil	Particle size (nm)	Polydispersity index
IV-a	Bergamot	500	0.200
IV-b	Lemongrass	186	0.160
IV-c	Tagetes	230	0.180
IV-d	Lime	360	0.200
IV-e	Lavender	140	0.136
IV-f	Citronella	227	0.150
IV-g	Peppermint	182	0.160
IV-h	Rosemary	210	0.180
IV-i	Geranium	178	0.140

Formulation V - AI-loaded NP using polycaprolactone polymer (PCL). Polycaprolactone (0.5g), ERS100 (2.5g), BB (3g), EtOH (9g), and acetone (4g) were placed under stirring until complete dissolution of the polymers. Thirty milliliters of deionized water was then placed under gentle stirring, and the organic phase was introduced thereto. Formulations presented a narrow size distribution centered on 150 nm.

Formulation VI - "melt" AI-loaded NP. Either a melt of DEET and BB (VI-a), or a melt of picaridine and DEET (VI-b) were combined with ERS100, EtOH, and water to produce NP suspensions using described methods. In both cases, the resulting NP suspensions presented a narrow size distribution centered on 200 nm +/- 40 nm.

Formulation VII - of a new molecule having an arthropod repellent power, a coumarin derivative.

A newly synthesized coumarin derivative, EV6062 (please see US 61/501,485, to Merial, which is herein incorporated by reference in its entirety) was formulated by the nanoprecipitation process described for *Formulation II*.



Briefly, EV6062 AI in the form of crystal was dissolved in EtOH with EUDRAGIT[®] S100 (ERS100) polymer to form a completely homogeneous organic phase. The organic phase was poured into the aqueous phase (deionized water), and mixed with stirring at room temperature. Immediately following formulation, the NP suspension presented a narrow size distribution centered on 175 nm. After 1 month at 25°C, no change was observed, indicating the formulation has desirable storage stability.

Example 2 - In vivo bioassays on drosophila vs. drug release profile

To investigate the effect of insect repellent formulations on food seeking behavior of *Drosophila melanogaster*, traps were baited with attractive food. FIG. 10 provides the experimental schema. The boxes were drilled to produce holes for the introduction of 1 ml eppendorf tubes, which were used as funnels between the higher box and the feeding tubes. The cap of each tube was removed and an opening of predetermined size was cut. Appropriate sized filter paper (10 mm x 15 mm) was placed inside the tubes. Nutrient media principally was composed of corn flour, agar and yeast as attractant media and neatly disposed at the bottom of tubes.

In a temperature controlled room with a control *Drosophila melanogaster* two days old were fasted for 24 hours. Thirty minutes before the introduction of drosophila, 10µl of tested product and formulation without AI were introduced using a 10µL-micropipette. Drosophila were introduced, the box was closed and the experiment was carried out for 24 hours. After the experimentation time, mortality was counted in the top box and in tubes. Drosophila were immobilized with carbon dioxide gas and then counted. Ten experimental boxes were used. Khi2 calculation was processed in order to validate the statistic result. A repellency power index and the standard error of the mean were calculated according to the follow equations:

$$\frac{(N1 - N2)}{(N1 + N2)} = RI$$

With N1 the number of non repelled drosophila and N2 the number of repelled drosophila. Index of repellence (RI) translates the repellent power of the formulation, comprised between 0 and 1. All the positive values translated repellent power. All tests were carried out on at least 6 experimental devices. For the drug release profile determination, filter papers in 0.5 ml-eppendorf tubes, the same experimental device used in the bioassays, were employed for the drug release profile performed. Filter papers, dimensions 1.5 x 0.5 cm, were introduced in 0.5ml

Eppendorf tubes cap less truncated at the extremity. Tested formulations were introduced on the filter paper by weighting (10mg +/-2mg). Eppendorf tubes containing filter papers were placed on a polystyrene support and introduced in an oven at 32°C with a slight air circulation. All experimental points were made in quadruple.

- 5 For the BB-loaded NP suspension vs. BB solution, differences in term of drug release profile and in term of Repellent Index were demonstrated (Table 5).

Table 5: BB-loaded NP

	Dose	Repellent index	Duration
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
Nanoparticles	600	0.6	immediately
	400	0.5	24 hours
	250	0.2	120 hours
Solution	600	0.75	immediately
	450	0.5	6 hours
	300	0.2	12 hours

- 10 For the Picaridine, three formulations were tested and compared to the solution of active ingredient. Picaridine nanoparticles were on three forms, which vary for their ratio active ingredient over polymer (Table 6).

Table 6: Picaridine-loaded NP.

	Repellent index	Duration
Nanoparticles A ratio 1:1	0.9	Immediately
	0.8	24 hours
	0.6	72 hours
Nanoparticles A ratio 1:2	0.6	Immediately
	0.7	24 hours
	0.75	72 hours
Nanoparticles A ratio 2:1	0.9	Immediately
	0.65	24 hours

	0.58	72 hours
Ethanol Solution	0.9	Immediately
	0.5	24 hours
	<0.3	72 hours

Beneficial influence of polymer-based nanoparticles was demonstrated by a prolonged activity against drosophila melanogaster as insect model.

Prophetic Example

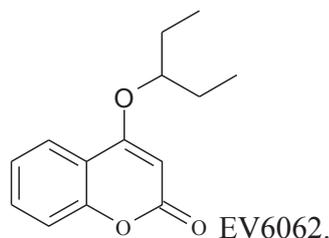
5 Compounds are applied to animals and surroundings to repel pests.

* * *

Having thus described in detail preferred embodiments of the present invention, it is to be understood that the invention defined by the above paragraphs is not to be limited to particular details set forth in the above description as many apparent variations thereof are possible without
10 departing from the spirit or scope of the present invention.

What is claimed is:

1. An arthropod-repellent nanoparticle formulation comprising at least one active ingredient (AI).
2. The formulation of claim 1 wherein the AI is



3. The formulation of claim 1 or 2 wherein the nanoparticles (NP) have a size range of between about 100 nm and 500 nm, and wherein greater than 90% of the NP are within 10% of the average NP size.
4. A method for producing the formulation of claim 1 or 2 comprising the steps of:
 - (a) preparing a liquid phase comprising a solution of an active ingredient (AI) in a solvent or a mixture of solvents comprising one or more surfactant;
 - (b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or the mixture of non solvents for a substance that is miscible with the solvent or the mixture of solvents for the AI;
 - (c) adding one of the liquid phases prepared in (a) to (b) or (b) to (a) with stirring to produce a colloidal suspension of nanoparticles; and
 - (d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents to produce a colloidal suspension of nanoparticles of a desired concentration, thereby producing the formulation.
5. A method for producing a formulations having spherical nanoparticles of matrix type and size less than 500 nm, comprising the steps of:
 - (a) preparing a liquid phase comprising a solution of AI + polymer in a solvent or a mixture of solvents to which one or more surfactants may be added;
 - (b) preparing a second liquid phase comprising a non-solvent or a mixture of non-solvents to which one or more surfactant may be added, wherein the non-solvent or the mixture of non-solvents should be miscible in all proportions with the solvent or mixture of solvents of the AI;
 - (c) adding the liquid phase prepared in (a) to that prepared in (b), or adding the liquid phase

prepared in (b) to that prepared in (a), with moderate agitation to produce a colloidal suspension of nanoparticles;

(d) optionally removing all or part of the solvent or the mixture of solvents and of non-solvent or mixture of non-solvent to make a colloidal nanoparticle suspension of a desired concentration.

6. The formulation of claim 1 or 2 that is in a form suitable for topical application to an animal.
7. The formulation of claim 1 or 2 that is a cream, gel, spray, liquid or spot-on.
8. A method of repelling pests comprising the step of applying the formulation of claim 1, 2, 3, 6, or 7 to animals or a locus, thereby repelling pests.
9. The method of claim 8 wherein the animals are birds or mammals.
10. The method of claim 9 wherein the mammals are humans, equines, felines, canines, bovines, or caprines.
11. The method of 9 wherein the animals are equines or bovines.
12. The method of 9 wherein the animals are humans.

Abstract of the Disclosure

The present invention relates to novel nanoencapsulated compositions, methods for making such compositions, and methods of repelling insects and other arthropod pests away from animals, including humans. The present invention has particular, though not sole, application to repelling insects including flies and mosquitoes. The inventive compositions may be used to repel arthropods from animals, humans, plants, soil, or building structures. The formulations also prevent illness and disease caused by insect/pest-borne vectors, and provide safer, more effective alternatives to existing repellents.

FIG. 1

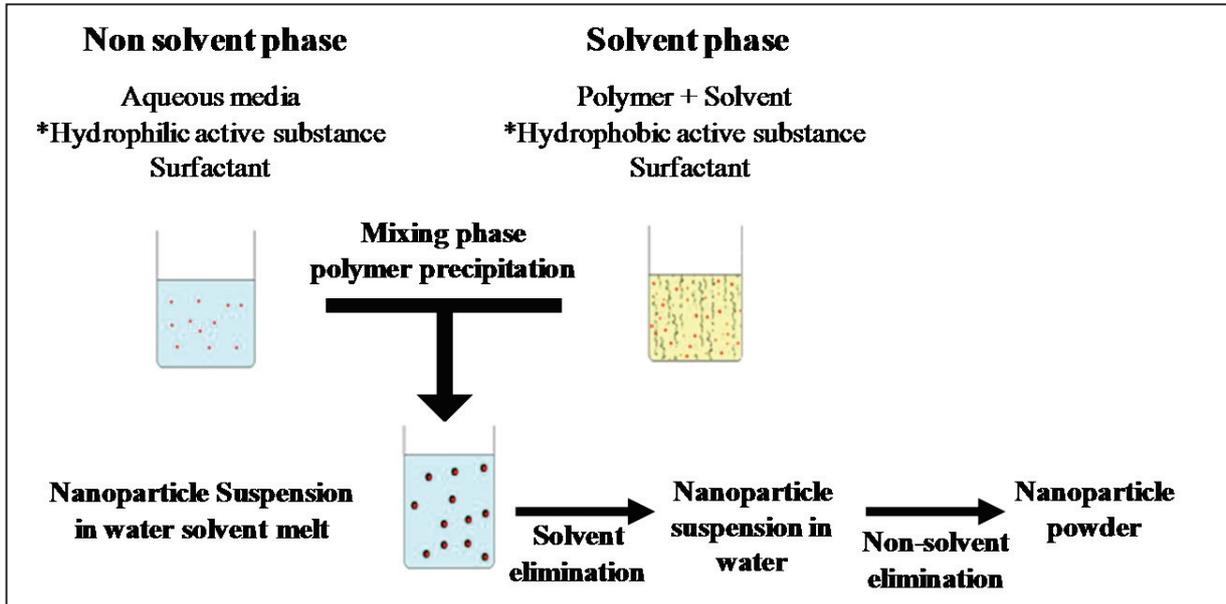


FIG. 2

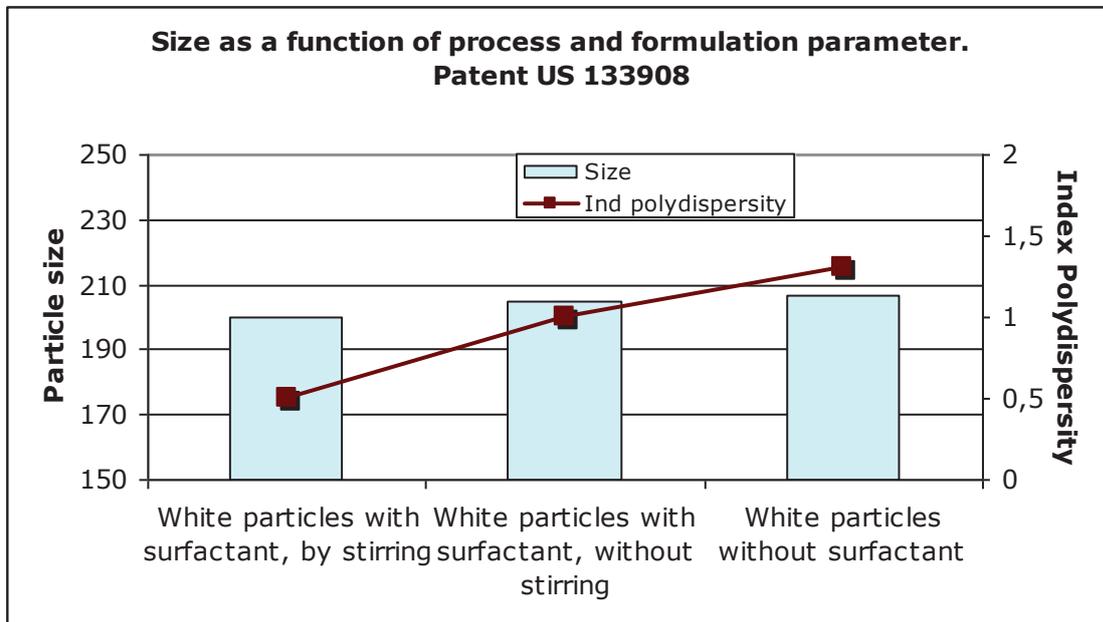


FIG. 3A

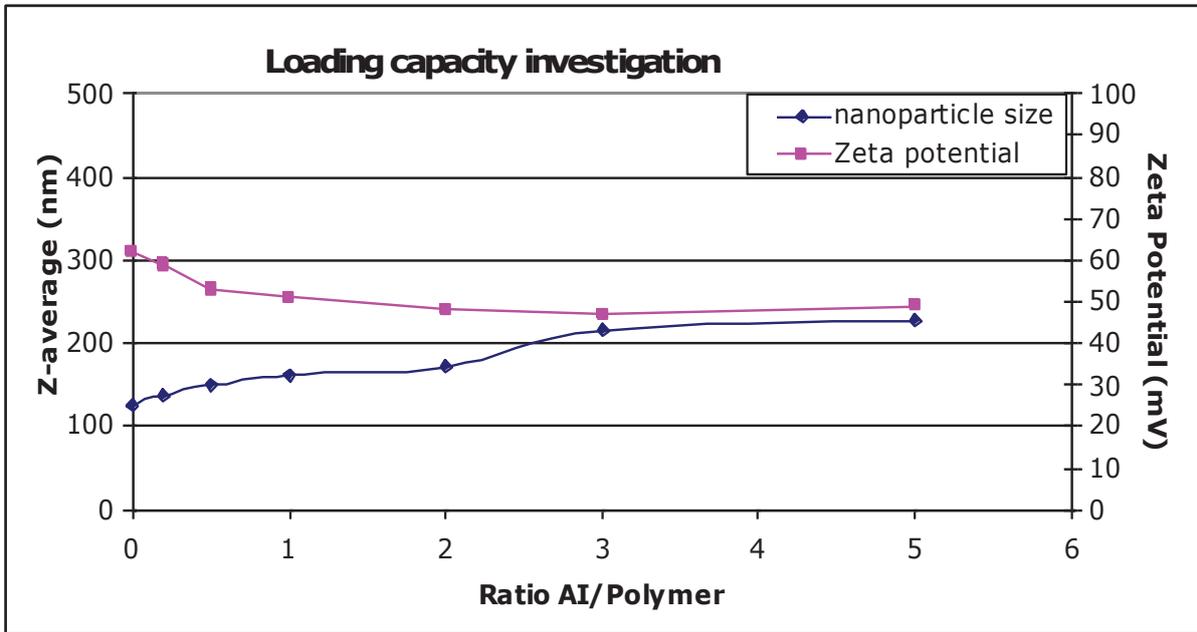


FIG. 3B

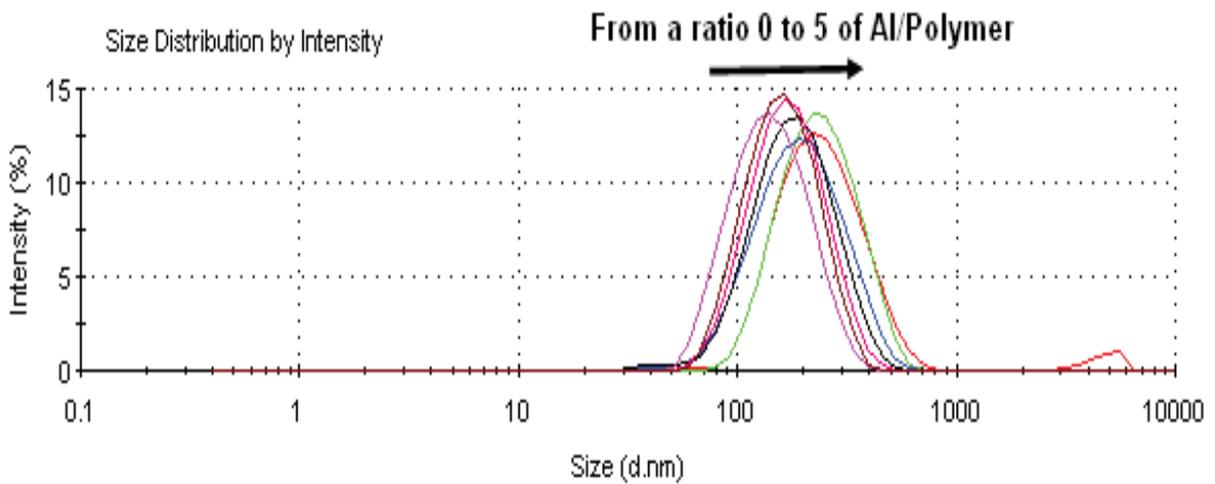


FIG. 4

Size Distribution by Intensity

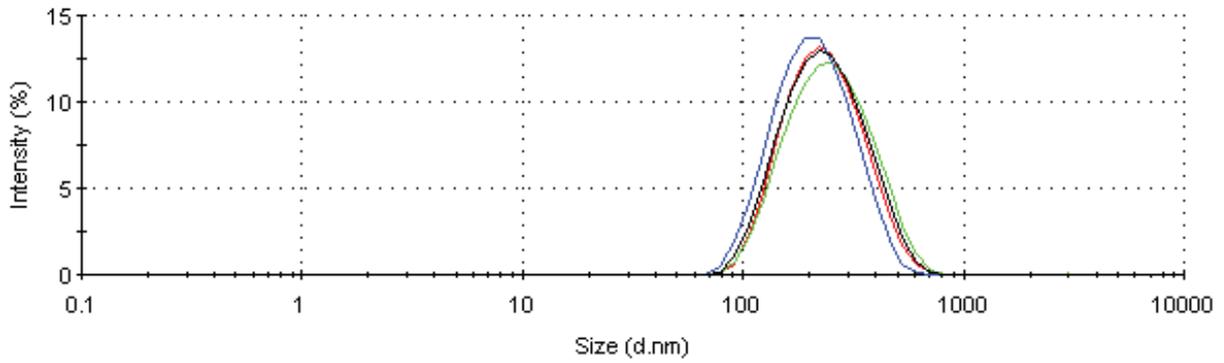


FIG. 5

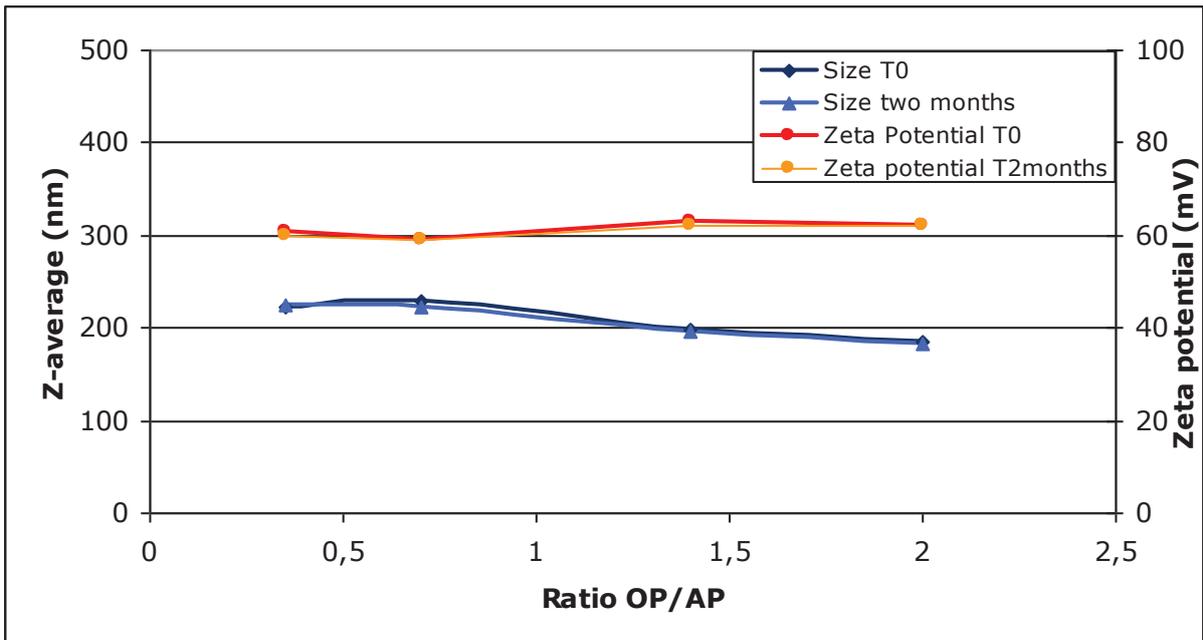


FIG. 6A

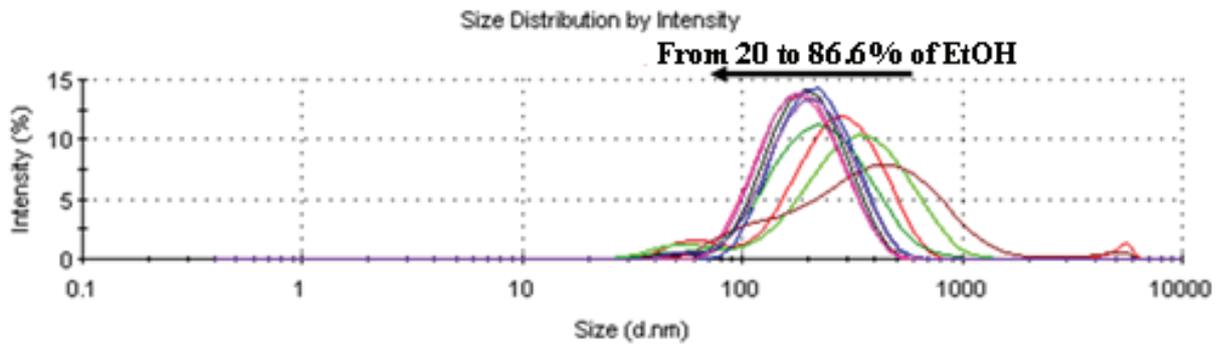


FIG. 6B

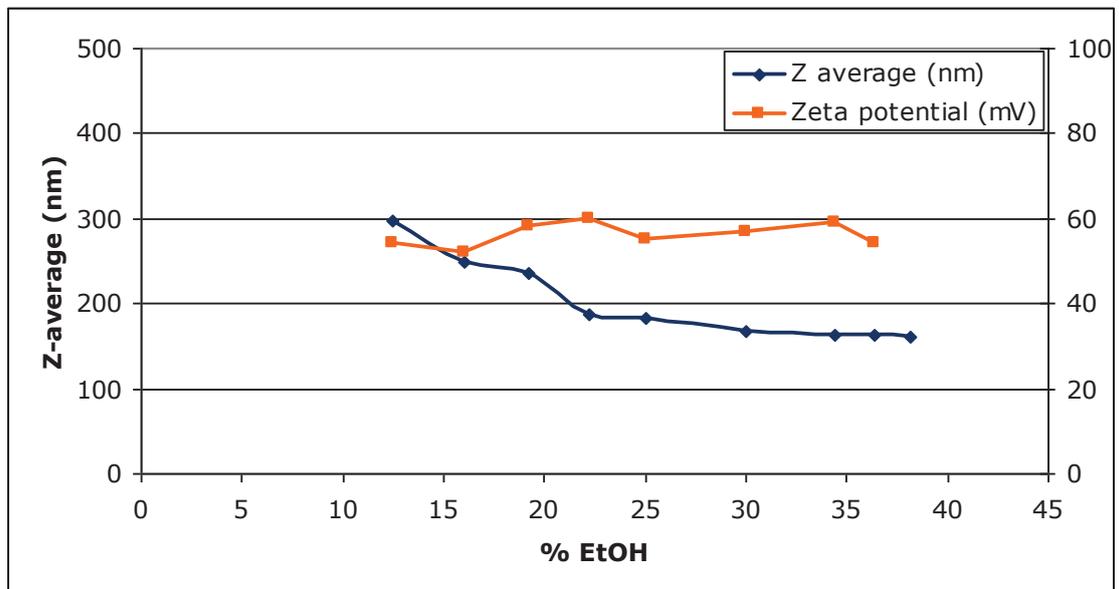


FIG. 7

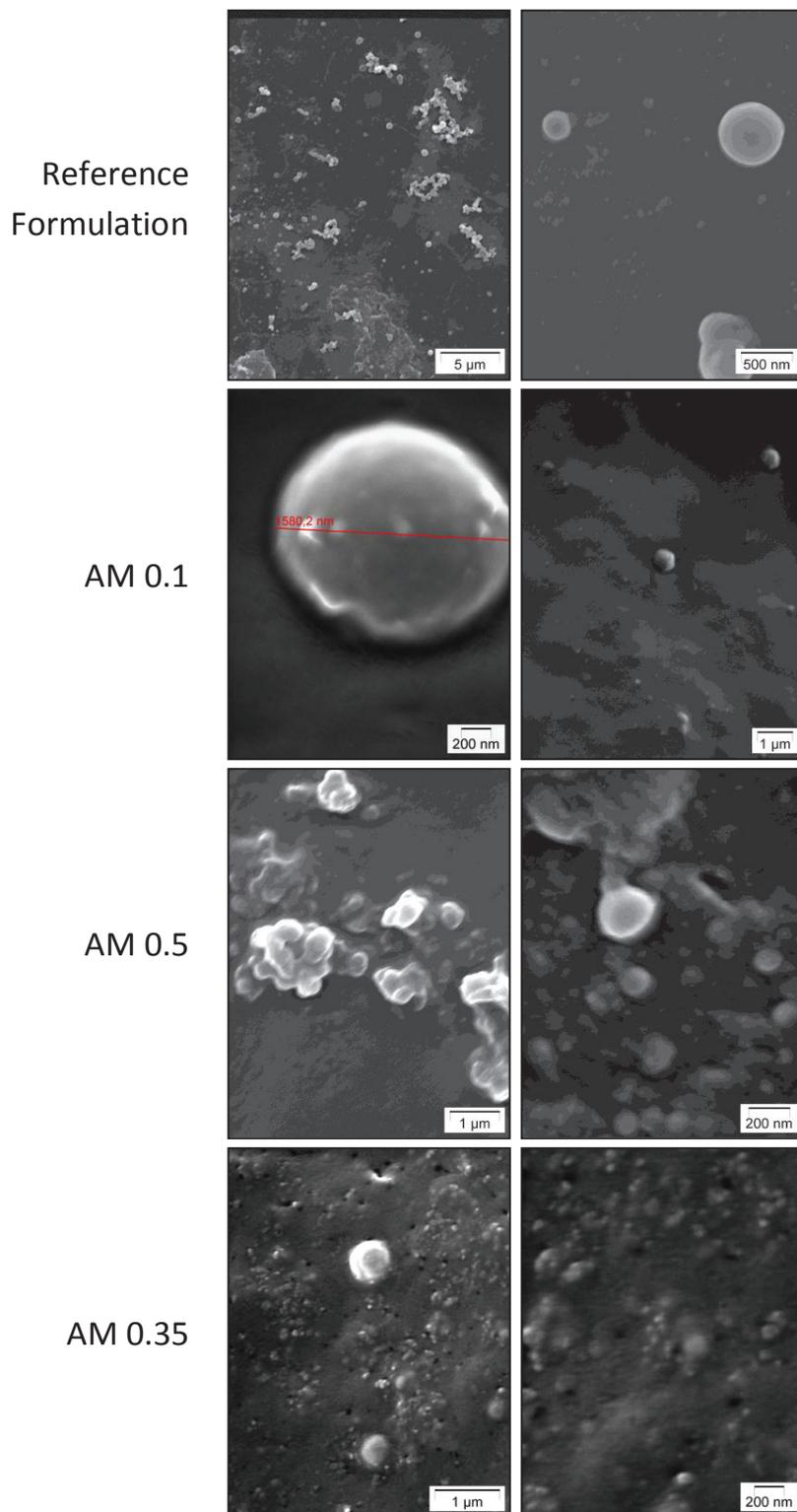


FIG. 8

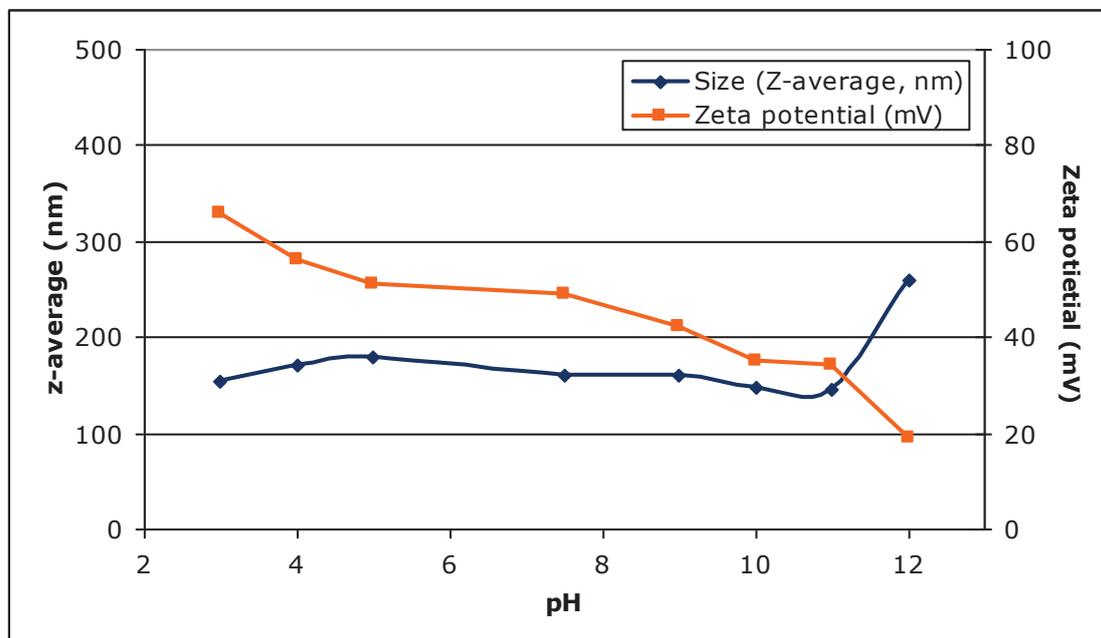


FIG. 9

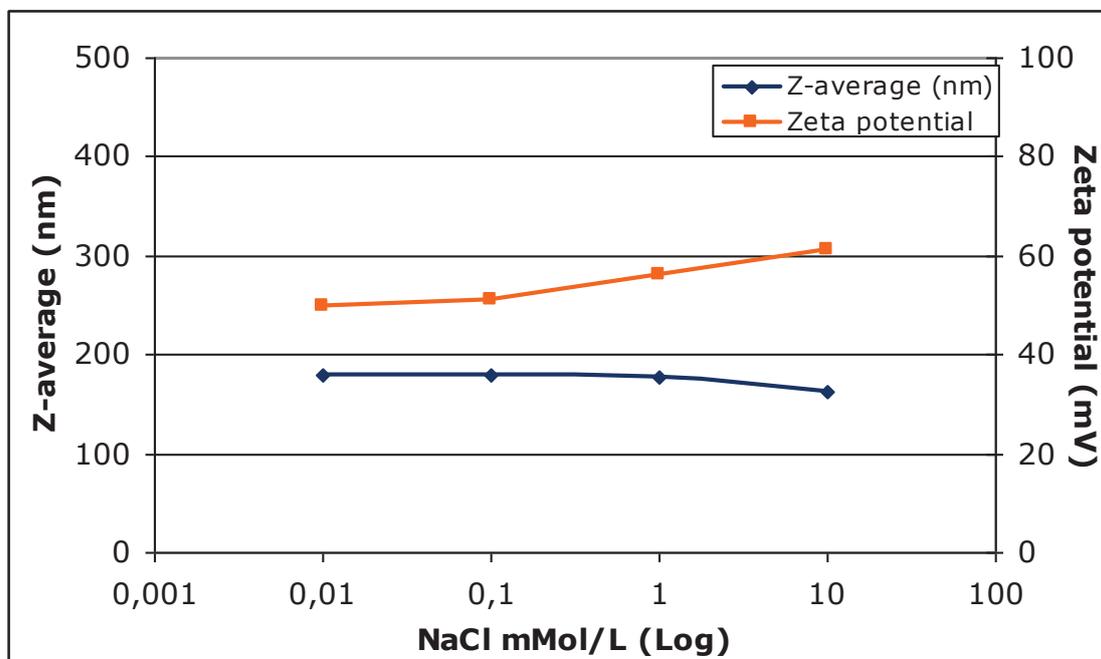


FIG. 10

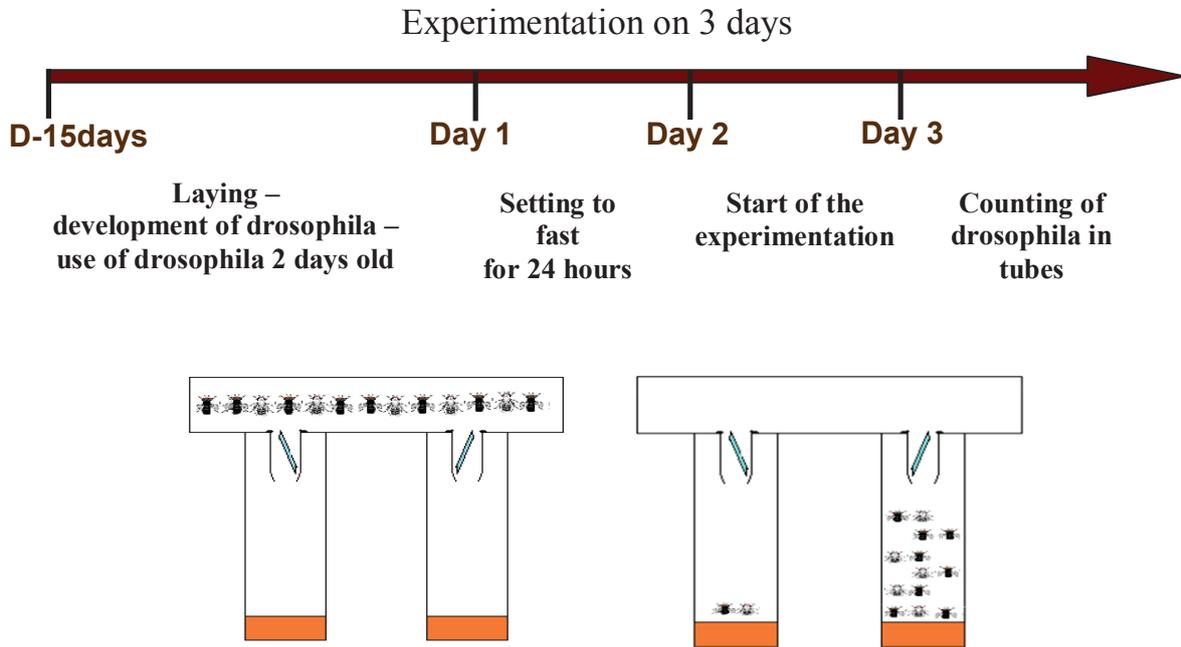
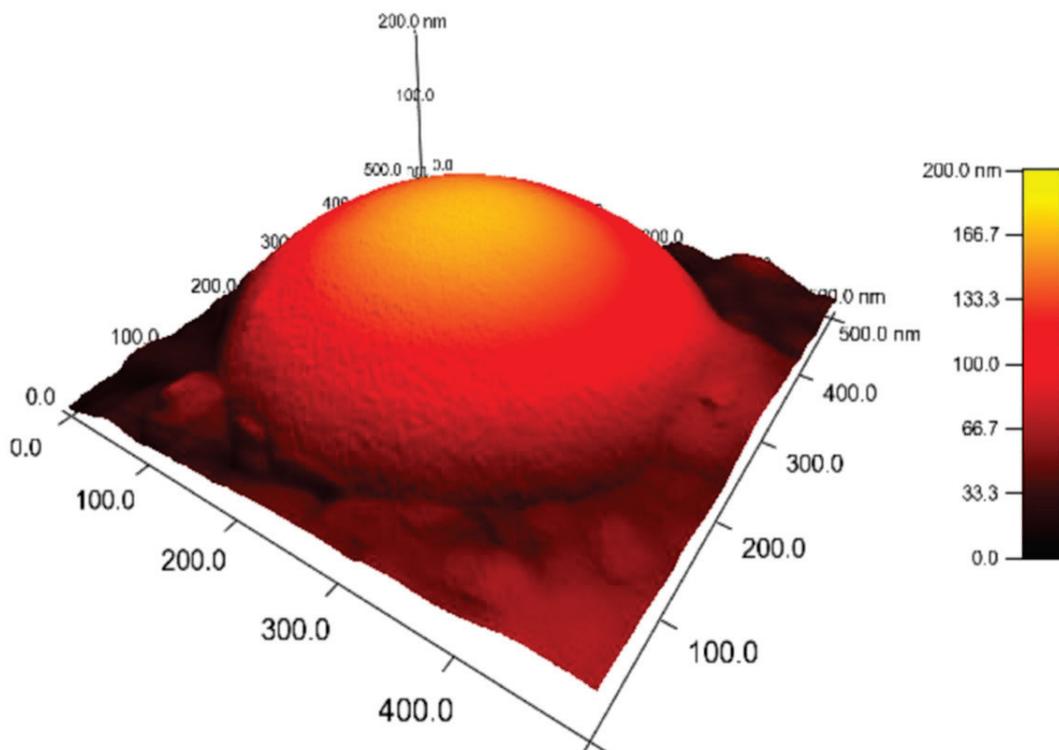
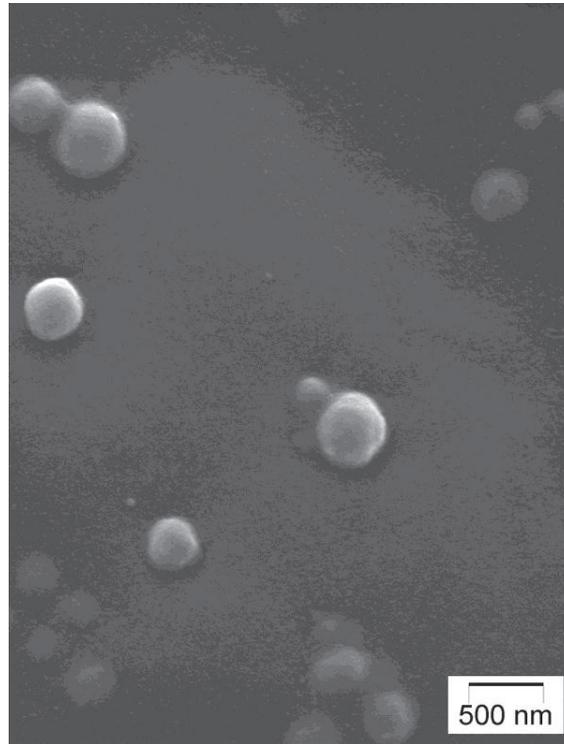


FIG. 11



Annexe 3



Methodology of canine skin treatment for skin layer separation

Abstract

The purpose of this work is to provide a perspective on skin treatment procedure for percutaneous penetration investigation of canine animal skin. From the dog skin region choice to the methodology of skin layer separation, a validated procedure for the *in vitro* investigation on skin was elaborated, with static diffusion cell methodology (incubation 24 hours at 35°C) and without incubation.

Key words : dog skin, biopsy, *stratum corneum*, percutaneous penetration, diffusion cells.

I- Introduction

The skin is a protective layer preserving the integrity of the internal environment against inclusion of foreign body and loss of vital constituents [1]. In veterinary medicine, topical application of a wide range of pharmaceutical agents is a useful alternative to more traditional routes of drug administration thanks to the ease and non-invasiveness of dermal application. Moreover the gastric route is avoided reducing the potential for both degradation of the drug (often along with gastric irritation), and improved owner compliance with drug administration [2-3]. The *stratum corneum* is known to be the major barrier to the transdermal penetration of drugs [4-5]. The permeability of this layer can be reliably estimated with *in vitro* penetration studies using excised skin [6]. The active ingredients introduced in the formulation can be aimed for internalization [7] or aimed to be released at the skin surface (e.g. antiparasitic product [8]). Marked differences have been reported concerning the skin layer structures (e.g. thickness, appendages density) as a function of studied species, these differences probably explain the observed significant variation in drug transdermal penetration. The *stratum corneum* thickness varies in many domestic animal species, with a thinner structures found in small laboratory animals and values approaching those of humans (3–5 μm) in the pig [9].

The skin anatomical differences between species, particularly the thickness and composition of the *stratum corneum* layer results in variable transdermal drug penetration kinetics in normal skin [10]. The effects of some skin preparations, such as shaving [11-12], and skin layer separation procedure such as tape stripping [13-14] were previously described on transdermal drug penetration in humans and some animals have already been investigated.

We present in this paper the methodology optimization of the skin layer separation in the case of canine skin. We have compared the tape stripping and the cyanoacrylate methodology for the extraction of the *stratum corneum* from the canine skin. The viable epidermis was separated to the dermis comparing two methodology, thermal methodology and cyanoacrylate methodology. Finally we applied the final methodology on skin sample after 24 hours on Franz cell disposal, and we quantified the permeation ability of a formulation.

II- Material and methods

II.1. Canine skin sample

Dog skin was harvested from 4 beagles presented for euthanasia with no history or clinical signs of skin disease, obtained from Merial SAS, Lyon (St Vulbas).

Full-thickness canine skins of 4 donor animals on the dorsal zone were carefully scalped. The dorsal surface was selected as reference skin region because it is the most exposed zone for treatment if dogs. Briefly, skin was excised by cutting along the dorsal surface. After a careful removal of the subcutaneous fat and examination for damages, skin pieces were cut with scalpel (mean thicknesses. = $1.5 \pm 0.2\text{mm}$). Skin dimensions were respected ensuring an effective penetration area of 2.54 cm^2 as imposed by the used Franz cell disposals. All skin pieces were stored flat at -20°C until use. These conditions were described to not alter the integrity of the skin [15].

II.2. The Trans Epidermal Water Loss

TEWL was measured using a Tewameter TM300 (Courage and Khazaka, Monaderm, Monaco). This skin integrity function test (SIFT) [16] was performed in triplicate on skin pieces just before skin treatment. The skin samples with TEWL higher than $15\text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ were discarded.

II.3. HPS method for skin observations

Treated skin pieces were optically analysed using specific skin layer coloration followed by microscopic observations. The preparation of skin sample before observation consisted to fix treated tissue equivalents in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. Sections, 5 μm thick, were cut and stained using Hematoxylin-Phloxin-Saffron (HPS). All the tests on skin have lead to skin sample observed by optical microscopy on triplicate.

II.4. Skin surface preparation and Biopsy Method

Experimentations using static diffusion procedure were compared to experimentations that were not submitted to these conditions. In both cases, skin was analyzed by Tewameter in order to guaranty its viability. Biopsy methodology on skin without diffusion cell assembly and after 24 hours at 35°C in Franz cell was compared for the separation of the horny layer and the extraction of viable epidermis.

In the case of static diffusion procedure, the skin pieces were mounted in the two-chamber glass diffusion cell. The receptor compartment was filled with 10ml of 5% oleth-20 aqueous solution in order to respect SINK conditions. The cells were placed in a water bath at 35°C providing a skin surface temperature of 32°C. In a first experimental step, one milliliter of placebo formulation (deionized water) was applied homogeneously onto the dog skin in each cell. The donor compartment was sealed with a lid. After 24 hours exposure time [17], cells were dismantled and skin pieces were treated for observations. In a second step we applied a solution of benzyl benzoate at a dose of 196 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Biopsy methodology was also applied on skin not submitted to 24 hours at 35°C. *Stratum corneum* extraction treatment was directly made, followed by viable epidermis removal techniques.

II.4.1. Surface preparation

The hair over the skin excision sites was coarsely removed by clippers. The shave procedure was tested on dog skin and compared to finer clipped procedure. Comparison was based on observations of the skin layers by microscopy after specific sample preparation. For the sheared skin, the hair was removed carefully using an electric hair clipper, shaved skin was obtained by a soft treatment with a basic razor.

II.4.2. Skin surface biopsy, horny layer extraction

Literature described two useful methodologies [18]. Tape stripping¹⁹ is a soft methodology consisting to the removal of SC by strips, SC cell layer by SC cell layer. Skin submitted to 10 strips, 20 strips, 30 strips and 50 strips were observed after specific coloration. Cyanoacrylate methodology, using specific glue (Super Glue 5 liquid) was processed, consisting to strip a thin layer of horn from the skin and sticks it to a glass slide. Histological images were made on the skin after one glue step and on the glue part in order to verify the SC aspect and quantity. These 2 methodologies were compared in our study on canine skin.

II.4.3. VE extraction

VE removal on skin without diffusion cell assembly and after 24 hours at 35°C in diffusion cell was compared. Two methodologies were processed. The hot water methodology consists to immerse the skin piece in water at 75°C during 45 seconds and remove VE softly with a scalpel. The cyanoacrylate methodology was also investigated.

III. Results and discussions

First experimentation was the visualization of non treated skin permitting the counting of SC cell layers and attest to the skin morphology without any treatment.

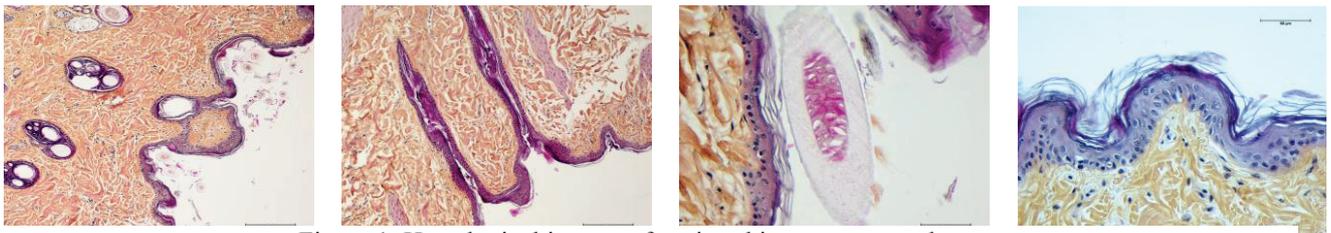


Figure 1: Hystological images of canine skin on transversal cut

The yellow part is the dermis, surrounded to epidermis in violet colour as visible on pictures of figure 2. Epidermis layer gather the viable epidermis represented by nucleated cells and horny layer (stratum Corneum) which appears as non nucleated cell layers at the skin surface.

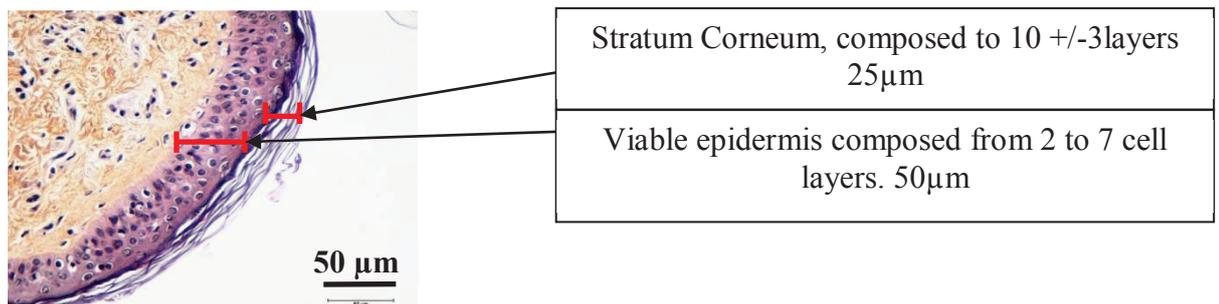


Figure 2: Histological images of skin after specific coloration. SC is at the surface, in form of few cells layers, VE is above, between stratum Corneum and dermis (colored in yellow).

The SC thickness is irregular, particularly comparing the smooth surface and the hair follicles. Horny layer has a tendency to be eliminated more quickly at the smooth surface as a comparison with irregularities as hair follicles that is why SC is present at more important quantity in the skin irregularities.

3.1. Surface skin preparation

As visible on figure 4, the shave methodology leads to alteration of first skin layer integrity. As contrast, shearing methodology does not alter surface skin layers. In order to avoid the elimination of a SC part, shearing methodology was used for the skin preparation procedure for the percutaneous penetration investigation.

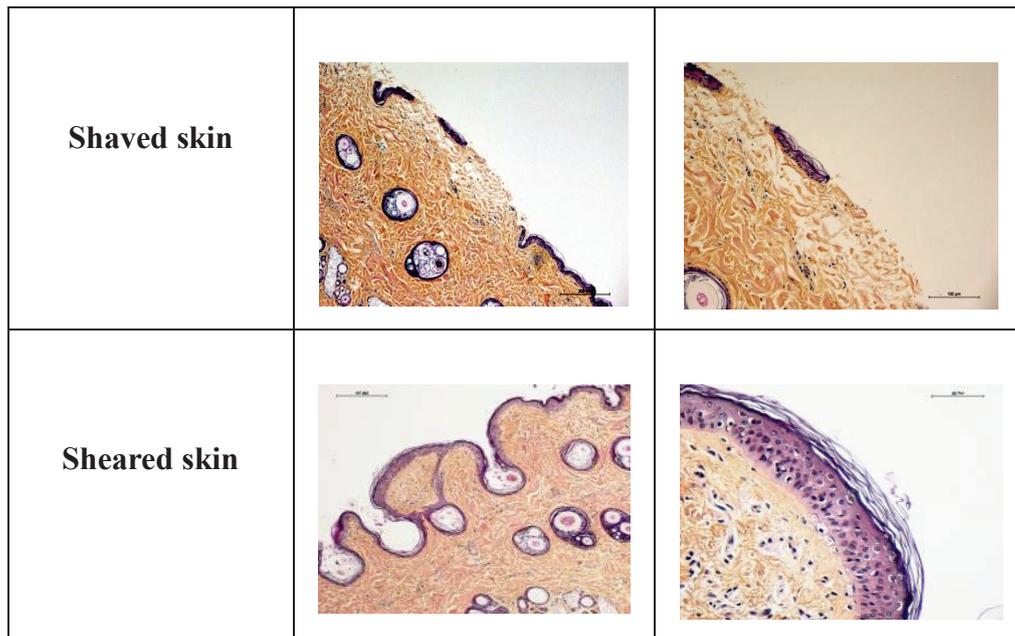


Figure 3 : Skin pictures obtained by optical microscopy, on shaved skin (first line) and on sheared skin (second line).

III.2. Separation of skin layers with and without diffusion cell assembly

III.2.1. Tape stripping methodology for the SC extraction

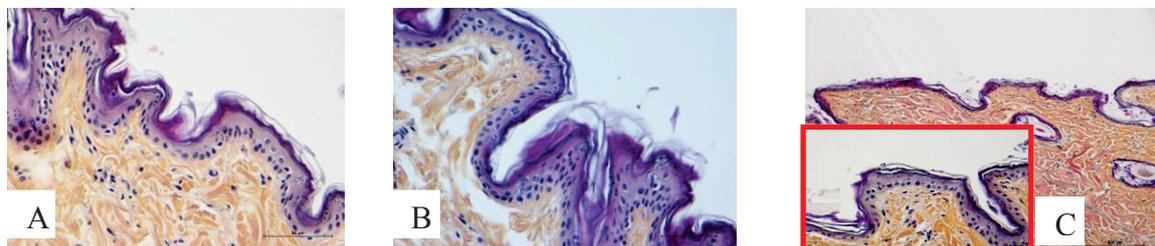


Figure 4: Tape stripping methodology. Optical images of dog skin demonstrating the *in vitro* behavior after tape stripping methodology for the extraction of SC. (A) After 10 strips (B) after 20 strips (C) after 30 strips. Images were focus on the skin surface, with the visible SC at the surface, the VE as intermediate layer and the dermis.

Even after 30 strips SC is always present, closed to the initial SC thickness. Only few cell layers were removed with 20 strips as visible on figure 5 Between 3 and 5 layers are visible on the pictures from 10 strips to 30 strips, no-significant lost of cell layers were obtained by this procedure.

Canine skin treated with 30 strips did not lead to a removal of SC, no notable difference between original skin and treated skin was observed.

III.2.2. Cyanoacrylate glue methodology for the stratum Corneum extraction without diffusion cell

III.2.2.1. Test of the mass of cyanoacrylate

Polymerization time was fixed at 20 minutes.

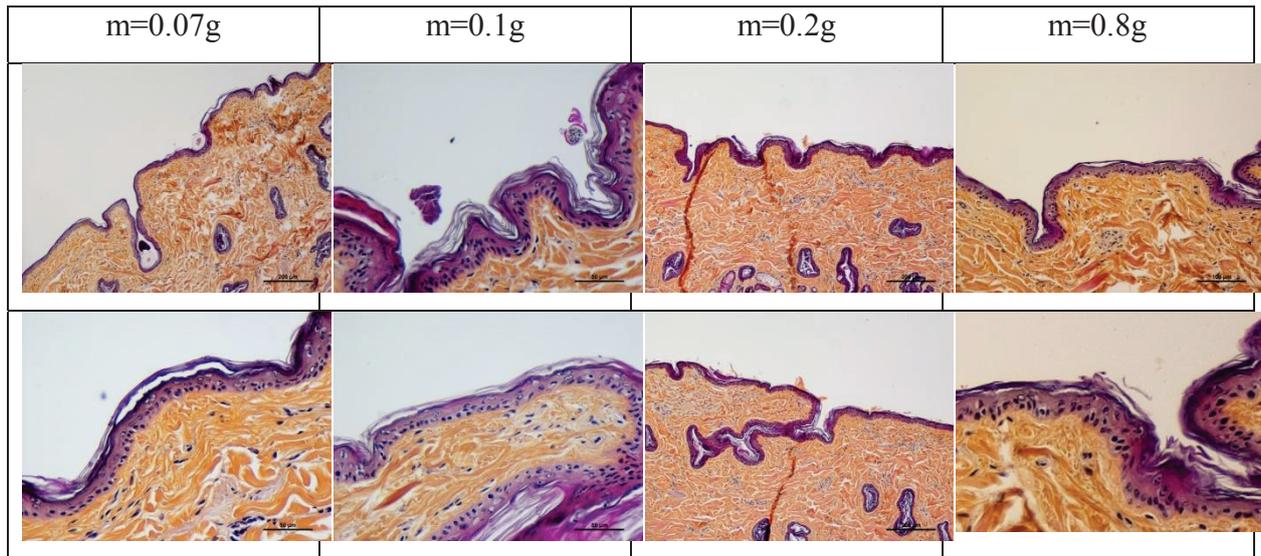


Figure 4: Cyanoacrylate glue methodology, determination of the cyanoacrylate mass applied on the glass plate. Optical images of dog skin demonstrating the in vitro behaviour after 2 cyanoacrylate glue steps for the extraction of SC with different glue mass.

As visible on the pictures, the cyanoacrylate mass do not lead to a significant difference in term of extracted SC quantity. For a more convenient use, 0.1 g of glue was selected as glue quantity to use in the optimized methodology.

III.2.2.2. Test of the polymerization time and strip step number

Cyanoacrylate glue mass was fixed at 0.1g. Two strip steps were performed for the obtaining of the pictures presented in figure 4.

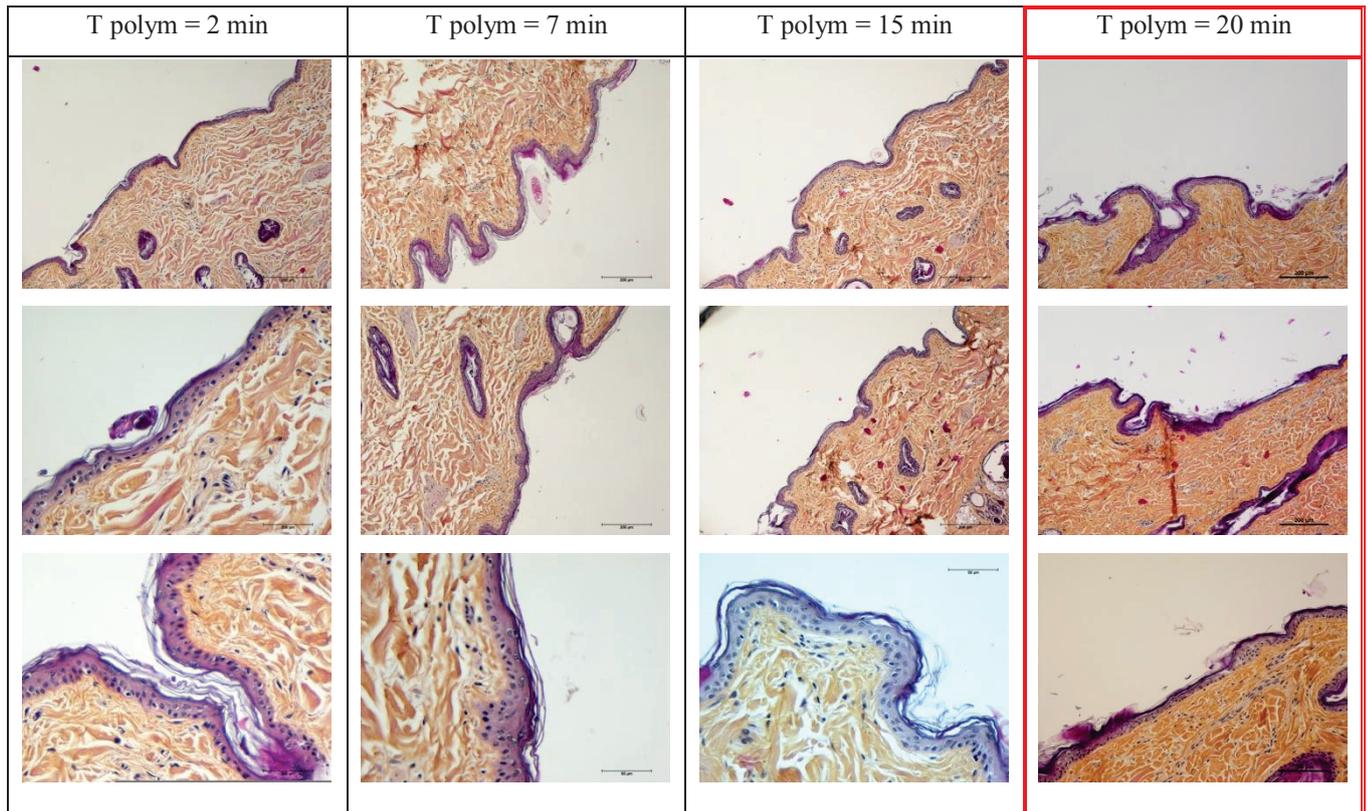
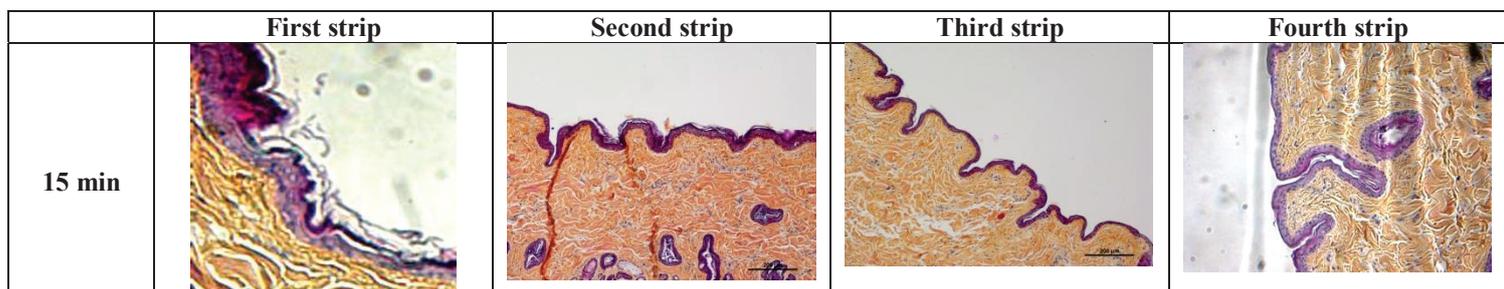


Figure 5: Cyanoacrylate glue methodology, determination of the polymerization time after processing to two glue steps. Optical images of dog skin demonstrating the in vitro behaviour after 2 cyanoacrylate glue steps for the extraction of SC.

As visible on the pictures, the polymerization time has an effect on the sc extraction. It appears that 2 strip steps with a polymerization time of 20 minutes are suitable for the extraction of a quasi totality of SC. Nevertheless few SC layers are present even after 2 strip steps that is why the step number was tested.

One two three four glues, with a comparison between 15 min and 20 min of polymerization time were advanced.

III.2.2.3. Test of the step number



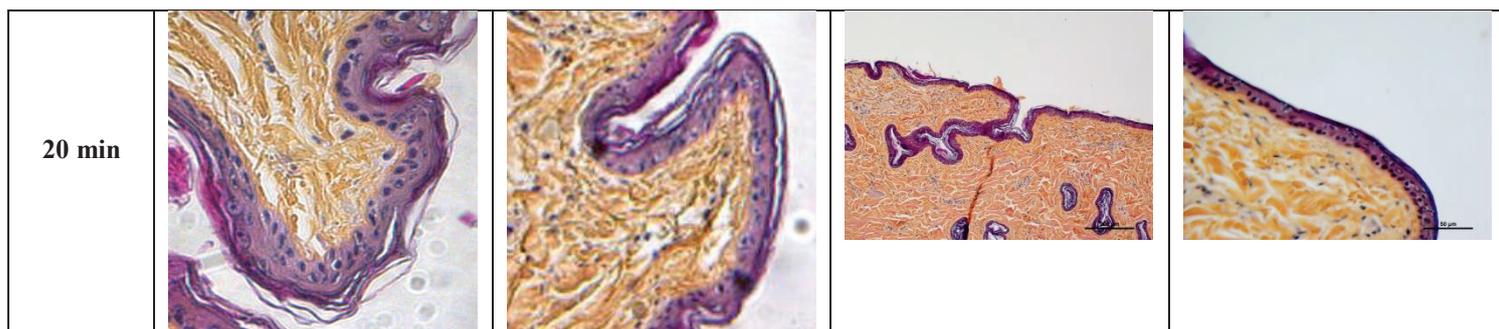


Figure 6: Cyanoacrylate glue methodology, determination of the strip number. Optical images of dog skin demonstrating the in vitro behaviour after 2, 3 and 4 cyanoacrylate glue steps for the extraction of SC

Picture series obtained testing 15 minutes or 20 minutes of polymerization time were comparables. The number of SC layer decrease with the number of glue step. More there are glue steps; more the SC is removed, letting intact the VE up to 4 strip steps.

Obtained images demonstrated a significant difference after two and three glue strip steps. Actually two steps does not lead to a correct removal of SC whereas the third glue step permitted to extract all the SC from the viable epidermis. A fourth glue step does not contribute to a convincing improvement of SC extraction. Then, on a skin directly treated, three cyanoacrylate steps are sufficient for a total removal of SC.

Then the selected methodologies consist on the follow parameters:

→ Three glue steps, using 0.15g of glue, and 15 minutes of polymerization time

- The first glue step permits a remove of primary hair
- The second glue step permits the remove of secondary and tertiary hair and a part of SC
- The third glue step permits the remove of SC.

A fourth glue step, non useful for the SC removal, can be processed with no alteration of VE.

III.2.3. Cyanoacrylate glue methodology for the Stratum Corneum extraction with diffusion cell

Skin submitted to a hot water bath for 24 hours was treated using the pre established methodology (3 strip steps with 20 minutes of polymerization time using 0.1g of glue). Obtained results are highly different; actually all the Epidermis (SC+VE) was removed. A research methodology was then applied in this case.

After dismantling of static diffusion cell, skin was placed on an aluminium paper and a drying time was added in order to obtain a dry skin surface. This additional treatment step was investigated, testing 30 minutes, 60 minutes, 120 minutes of drying time. One glue step was performed and images were acquired.

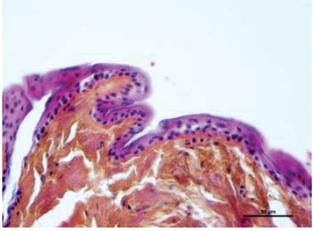
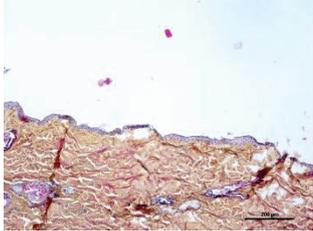
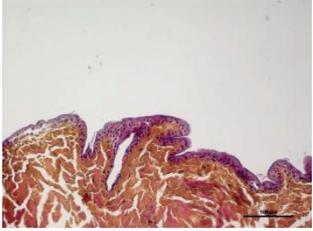
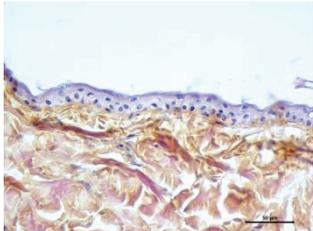
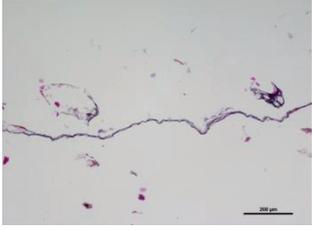
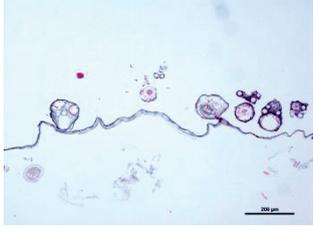
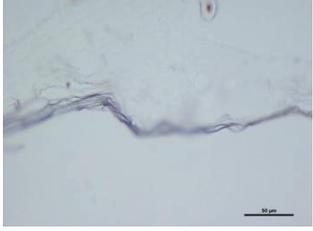
Drying time Glue step	Drying time		
	30 minutes	1 hour	2 hours
1 step, skin			
			
1 step, glue			
			

Figure 7: Cyanoacrylate glue methodology, determination of the drying time before skin layer separation. Optical images of dog skin demonstrating the in vitro behaviour after 30 min, one hour and two hours of drying time

One glue step was processed during 15 minutes with 0.1g of glue on skin after 24 hours of treatment, with 30 minutes of drying time needed because of the hair presence, avoiding the correct contact between the glue and the skin. Skins and glue samples were observed after specific coloration Skin presented a quasi total removal of SC; it was comfort by the observation of glue sample, that present SC in form of cell layers.

Briefly, one glue step lead to a satisfying SC removal result. This extraction gathers hair and horny layer as visible on the picture on figure 8.

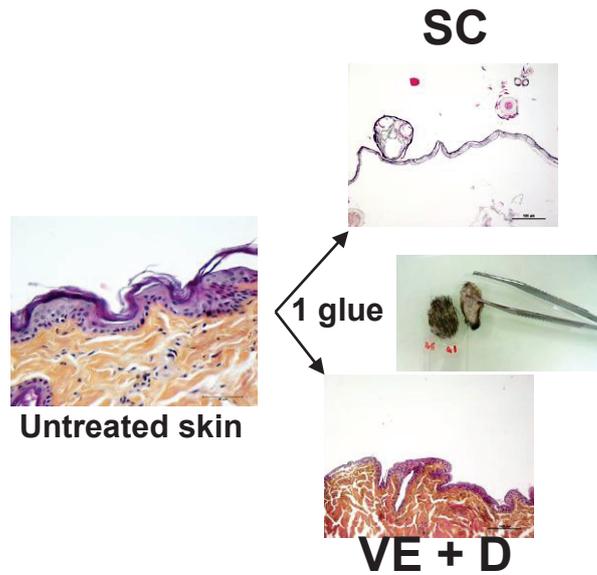


Figure 8 : Dog skin images obtained for the SC removal optimization.

Cyanoacrylate methodology leads to a satisfying result on the SC extraction, without alteration of VE after one glue step, using 0.1g of glue with a polymerization time of 15 min, sufficient for a good SC extraction. This methodology was selected to the SC removal.

3.2.4. Separation of Viable Epidermis and Dermis from SC less skin

The hot water technique and the glue technique were performed. These two techniques led to a total removal of VE to the dermis.

3.2.4.1. By cyanoacrylate methodology

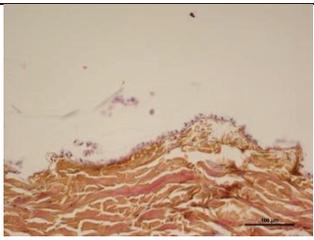
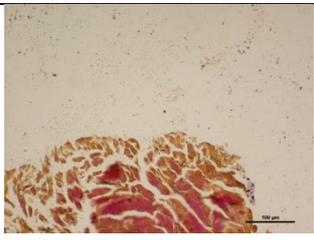
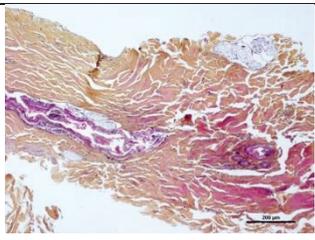
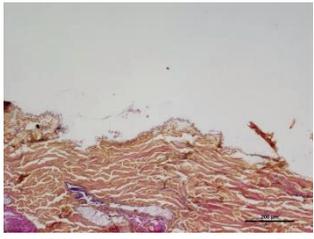
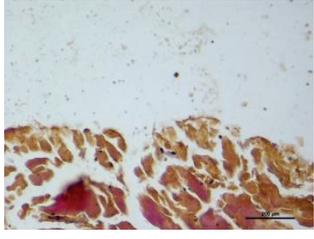
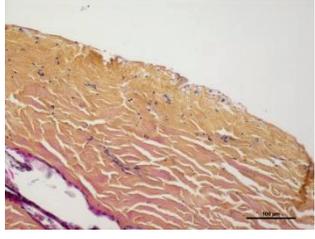
30 min drying time +one cyano step +a second cyano step	60 min drying time +one cyano step +a second cyano step	120 min drying time +one cyano step +a second cyano step
		
		

Figure 9: Cyanoacrylate glue methodology for the VE extraction, comparison of 3 drying time before skin layer separation. Optical images of dog skin demonstrating the in vitro behaviour after 30 min, one hour and two hours of drying time followed by two consecutive cyanoacrylate glue steps.

VE was totally removed on one cyanoacrylate glue step in the case of 24 hours of kinetic at 35°C. As visible on the figure 9 a slight VE cell layer was visible for a drying time of 30 minutes followed by two strip steps. For 60 and 120 minutes of drying time, no differences were noted. Thus, 60 minutes of drying time was judge to be sufficient for a SC extraction and a total VE removal. Also, it was proved the ability to remove the VE using Cyanoacrylate methodology, previously described to remove only the SC. In the case of skin without diffusion cell assembly, the addition of glue step was not performed.

3.2.4.2. By hot water methodology

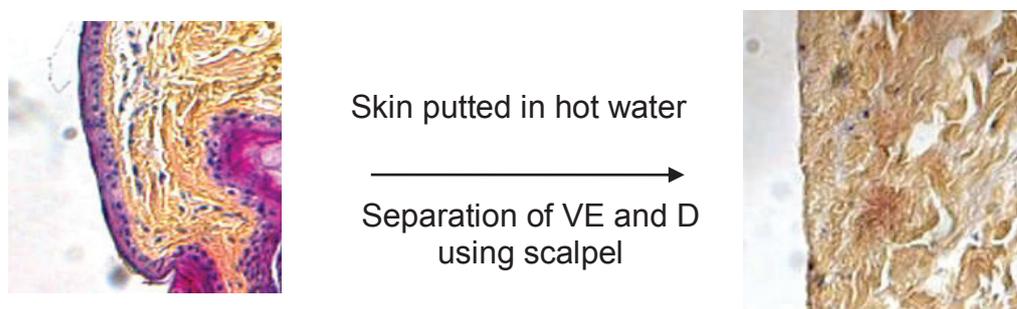


Figure 10: Assay of VE by hot water methodology. Dog skin images obtained by optical microscopy for the VE removal optimization

The hot water methodology tested on skin submitted to a percutaneous diffusion procedure and directly treated without this procedure gave access to the same result in term of VE removal. Pictures on figure 11 are applicable to both of cases. Consequently, an immersion of the skin SC less 45 seconds in water at 70°C followed by a removal using scalpel permitted a total extraction of VE.

Cyanoacrylate methodology was selected because it did not need a step of water immersion, which can act on the active molecule release.

4. Conclusion

The methodology for separating canine skin layers is different from that described for the pig skin and the human skin. An important difference of skin behavior was observed with or without use of percutaneous penetration procedure including a water bath at 35 ° C 24 hours. This long research work permitting the elaboration of an optimized methodology was needed to work on the percutaneous permeation using static diffusion cells (Franz cells) on a skin specie no previously described. The first experiments in diffusion cells using the validated method have led to a validated mass balance, superior to 95%. This method is different from that used for pig skin using cyanoacrylate two steps to complete SC extraction. For the VE, the method hot water methodology or a cyanoacrylate glue step led to a total extraction.

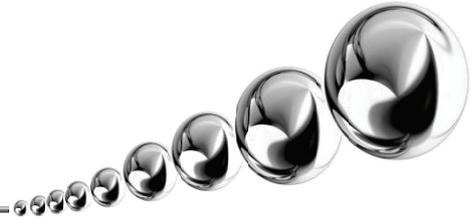
Consequently, a methodology of skin layer separation for canine skin was validated and has the advantage to be modular.

References

- [1] Walters, K.A., Roberts, M.S., 2002. The structure and function of skin. In: Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–40.
- [2] Magnusson, B.M., Walters, K.A., Roberts, M.S., 2001. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, 205–227.
- [3] Roberts, M.S., Cross, S.E., Pellett, M.A., 2002. Skin transport. In: Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*. Marcel Dekker, New York, pp. 89–196
- [4] Barry, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14, 101–114.
- [5] Madison, K.C., 2003. Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 231–241.
- [6] Franz, T.J., 1975. Percutaneous absorption – relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology* 64, 190–195.
- [7] The effects of surface preparation on the penetration of hydrocortisone through canine skin Liisa A. Ahlstrom a,* , Sheree E. Cross b, John M. Morton a, Paul C. Mills a *The Veterinary Journal* 180 (2009) 48–54
- [8] Formulation of topical insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation Hongchun Qiu 1,a, John W. McCall b, H. Won Jun a,* *International Journal of Pharmaceutics* 163 (1998) 167–176
- [9] Monteiro-Riviere, N.A., Bristol, D.G., Manning, T.O., Rogers, R.A., Riviere, J.E., 1990. Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 582–586.
- [10] Reifenrath, W.G., Hawkins, G.S., Kurtz, M.S., 1989. Evaporation and skin penetration characteristics of mosquito repellent formulations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5, 45–51.
- [11] Pelletier, O., Ritter, L., Caron, J., 1990. Effects of skin preapplication treatments and postapplication cleansing agents on dermal absorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine by Fischer-344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 31, 247–260.
- [12] Mills, P.C., Cross, S.E., 2006b. Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian. *The Veterinary Journal* 172, 218–233.
- [13] J. Lademann, U. Jacobi, C. Surber, H.J. Weigmann, J.W. Fluhr, The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 317–323.
- [14] Feldmann, R.J., Maibach, H.I., 1965. Penetration of ¹⁴C hydrocortisone through normal skin: the effect of stripping and occlusion. *Archives of Dermatology* 91, 661–666.
- [15] Assessment of in vitro percutaneous absorption of glycolic acid through human skin sections using a flow-through diffusion cell system M. Jiang, S.A. Qureshi * *Journal of Dermatological Science* 18 (1998) 181- 188

-
- [16] Heylings, J.R., Clowes, H.M., Hughes, L., 2001. Comparison of tissue sources for the skin integrity function test (SIFT). *Toxicol. In Vitro* 15, 597–600.
- [17] Collier, S., Sheikh, N., Sakr, A., Lichtin, J.L., Stewart, R.F., Bronaugh, R.L., 1989. Maintenance of skin viability during in vitro percutaneous absorption/metabolism studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99, 522– 533.
- [18] Förster M, Bolzinger M-A, Rovere MR, Damour O, Montagnac G, Briançon S. Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum skin removal of 3 standard methods. *Skin Pharmacol Physiol*
- [19] Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using in vitro diffusion cell techniques A.R. Eppler a,b,* , M.E.K. Kraeling a, R.R. Wickett b, R.L. Bronaugh *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 2109–2117

Annexe 4



Titre de l'étude : Etude de la distribution du benzoate de benzyle sur beagles en fonction du temps après une application de la formulation BB nanop.

PR&D 0224401 – Analytical investigation – 2010/12/10

A Study to Determine the Haircoat Distribution of a Single
Topical Treatment with BBnanop Spray in Dogs

Study Title: A Study to Determine the Haircoat Distribution of a Single Topical Treatment with *BBnanop* Spray in Dogs.

Step: Exploratory
Purpose: Pharmacokinetics/Pharmacodynamics
Target: Haircoat Distribution

Data Guidelines: Not Applicable.

Sponsor: Merial Limited, 3239 Satellite Blvd. Duluth, GA 30096-4640 USA

Investigator:

		Laboratory	Address
Audrey Minost	PhD student	LAGEP*	Laboratoire d'Automatique et de Genie du Procédé-LAGEP-UMR5007-Bat CPE 43, boulevard du 11 novembre 1918 69633 Villeurbanne Cedex
Pr. H. Fessi	Director of LAGEP* Director of thesis	LAGEP*	
Pr. M.A. Bolzinger	Professor Researcher	LAGEP* Laboratoire de cosmétologie et dermopharmacie	

*LAGEP : Laboratoire d'Automatique et de GEnie du Procédé

Audrey Minost	Contact Tel: +33 4 72 43 18 56 Mail : minost@lagep.univ-lyon1.fr
Pr. H. Fessi	Tel: +33 4 72 43 18 93 Mail : fessi@lagep.univ-lyon1.fr
Pr. M.A. Bolzinger	Tel: +33 4 72 43 18 64 Mail : bolzinger@lagep.univ-lyon1.fr

Investigator's signature

Audrey Minost



TABLE OF CONTENT

I- Introduction	3
II-Material and method	3
1- Formulation	3
2- Treatment of animals	3
3- Benzyl Benzoate dosage optimization	4
Validation of HPLC methodology	4
Extraction of BB from hair samples	4
4- SEM analyze	5
III- Results and discussion	6
1- <i>In vivo</i> drug release profile on hair	6
2- <i>In vivo</i> drug release profile on skin	9
3- Scanning Electron Microscopy analyze	11
III- Conclusions	12
Annex 1- Raw data for hair treatment	13
Annex 2-Measurement of hair density from each investigated sites	21
Annex 3- Raw data-Cotton treatment	22

Abbreviations

BB : Benzyl Benzoate
DRP : Drug Release Profile
MeOH : Methanol
mg : milligram
NP : Nanoparticles
pg : Picogram
SEM : Standard Deviation of the Mean
T : Time

I- Introduction

Drug formulations controlling drug release using various carriers have been widely studied and developed, aimed to reduce the dose and increase the action duration. Interesting approach is to entrap an active ingredient in a matrix that will regulate the release.

Encapsulation of drugs in polymer particles is one of the processes for producing sustained and controllable drug release. Micro- and nanoparticle formulations with various methodologies were described in the literature. The main researched characteristics of the formulated products are a reasonable monodispersity of particles and the size of nanometric order, which could be achieved by optimizing the operational parameters. Random drug loading on polydisperse nanospheres would lead to uncontrollable drug release.

Benzyl benzoate has a known insect repellent activity. This active molecule was formulated in form of polymer-based nanoparticles using Eudragit[®]S100 as polymer matrix. Nanoprecipitation described by Fessi et al.(1992) was the optimized methodology for obtaining polymer-based nanoparticles. The process comprises two main steps: dissolution of the polymer and the active molecule in a water-miscible solvent and dispersion of the obtained solution (polymeric phase) in an aqueous phase consisting of water with or without surfactant. The polymer then precipitates as nanoparticles.

The drug release profile of an active molecule is a key point in the elaboration of a new pharmaceutical product. The *in vivo* drug release profile elaboration will permit to appreciate the persistence of the investigated product in real conditions.

The formulation step and the stability investigation were carried out in the LAGEP laboratory.

II-Material and method

1- Formulation

Benzyl benzoate loaded nanoparticle suspension (BBnanop) was formulated by nanoprecipitation process. Briefly, Eudragit[®]S100 (10%wt) and BB (10%wt) were dissolved in Ethanol (30%wt) under magnetic stirring. The formed organic phase was poured in a volume of water (50%) under magnetic stirring leading to the precipitation of the polymer in form of nanoparticles. 100 g of formulation was prepared and physicochemical characterizations were carried out. Stability is progressing by storage of the formulation in a lightproof FRONTLINE spray pumps bottle, in an oven at 40°C and at 25°C. Data are classified in LAGEP laboratory.

2- Treatment of animals

Healthy dogs were studied. Each dog was appropriately treated by BBnanop product and hair samples were collected during 15 days. In order to know if the product can be stored into the skin, a swab step was added.

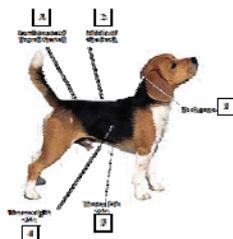


Fig. 1: Dog sampling site

Hair samples were collected from each dog using electric clippers at five different sites on the dog: around the neck (site 1), middle of the back (site 2), lumbar zone (site 3), thorax right side (site 4), thorax left side (site 5). One blade was used per sampling site during the entire study to collect hair samples.

Each blade was rinsed immediately after each sampling with solvent able to remove the totality of active molecule, (e.g., acetone). The hair was transferred directly after collection into an aluminium sheet, and placed in a dry clean labeled container (glass bottles). Each sampling consisted in clipping an area of approximately 1.8 cm². Hair sampling was undertaken within the same order for each dog at each sampling time. Every effort was made to avoid cross-contamination of the samples between dogs and locations on the dogs during the sampling process.

→ On four dogs, on 5 sampling sites, on 7 sampling days → **140 hair samples**

On the middle of the back site (site 2), cotton gauze with 0.5 mL of acetone was swabbed on the skin after clipping. This was repeated 3 times, and each cotton gauze (cotton 1, 2, and 3) will be stored in an aluminium sheet, and placed in a dry clean labeled container (glass bottles).

→ On four dogs, on 1 sampling site, with 3 consecutive swab step, on 7 sampling days → **84 cotton samples**.

The hair samples and cotton gauzes were stored frozen at ca. -18°C until analysis. Hair samples were sent from Merial CRSV to LAGEP for analytical treatment.

3- Benzyl Benzoate dosage optimization

Preliminary optimization study needed for the quantification of the active molecule was elaborated in LAGEP: the validation of the High Performance Liquid Chromatography methodology, the validation of the active molecule extraction step from hair and from cotton and active molecule quantification. Data treatment was performed in LAGEP.

Validation of HPLC methodology

The UV-HPLC method was elaborated and tested in term of repeatability, reproducibility and linearity.

The quantification of benzyl benzoate was optimized using liquid chromatography with a reverse phase column. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 injector, a Waters 600 pump, a reverse phase column XTerra® MS C18 (3.9mm×100mm, 3.5µm) and a Waters 2996 photodiode array UV detector working at 230 nm wavelength. The elution with methanol/water (70:30) solvent at 1.5mL/min flow rate and 25 °C gave a retention time of 3.7 min for Benzyl Benzoate. Injection volume was 5µL. The calibration curve for quantitative analysis was linear up to 40µg/mL and the detection limit for Benzyl Benzoate was 400 pg.

Extraction of BB from hair samples

Step of BB extraction for hair samples (Figure 1) and cotton samples were elaborated and validated following this procedure:



Fig. 2: Hair samples, weight = 200 mg[±]. 50 mg.

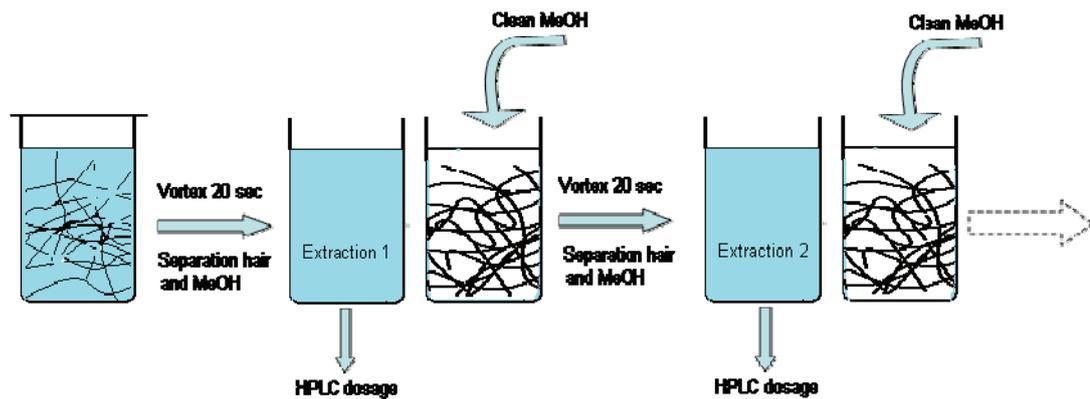


Fig. 3: Methodology for BB extraction from hair sample

Collected hair samples were stored in glass bottle. Hairs were weighted and placed in the initial glass bottle. A preselected methanol volume was added and a step of high stirring using a vortex was performed. The MeOH containing extracted BB was dosed by UV-HPLC and removed from the bottle. Clean MeOH was added and sample stirring step was performed in order to obtain the second extraction.

The BB quantification was performed using the validated calibration curve.

4- SEM analyze

SEM technique (Scanning Electronic Microscopy) using Hitashi S800 microscope (Centre technologique des microstructures, Lyon 1) permitted the obtaining of submicronic-object images. Then nanoparticles stoked on hair were observed for hair sampled at T0 and T15 days.

III- Results and discussion

1- *In vivo* drug release profile on hair

Figure 1 shows an *in vivo* release profile of BB-loaded polymer-based nanoparticles. General tendency was observed. A high lost of BB was observed between T0 and T1 day. The BB lost was more regular from T1 day to the end of the study.

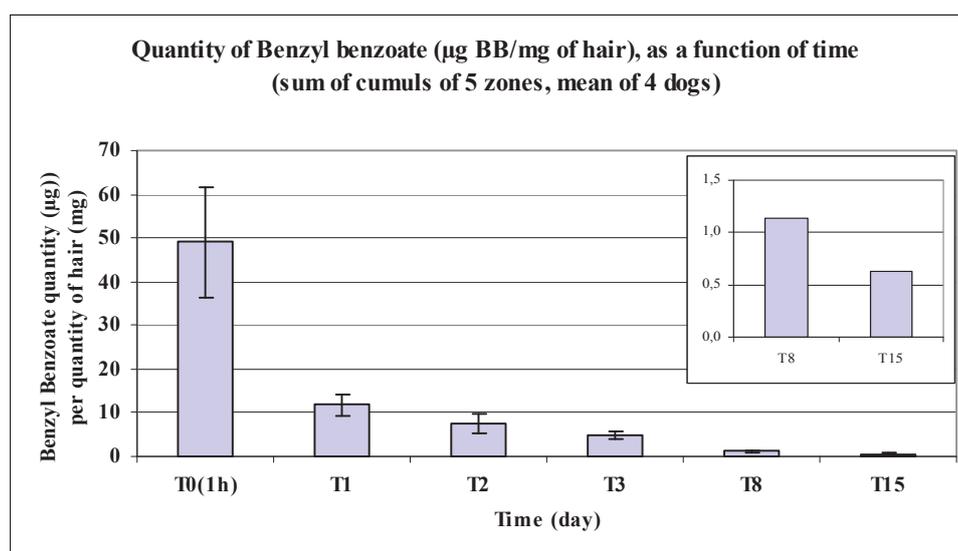


Fig. 4: BB lost evolution per hair quantity as a function of time.

The follow table gathers data of BB quantity found on the hair samples using UV-HPLC methodology. For each sampling sites, a mean of the 4 dogs was performed, with a SEM calculation, corresponding to the Standard Error of the Mean.

Cumul mean	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Neck	2.354	0.930	0.525	0.508	0.163	0.129
Middle of the back	5.500	3.427	1.545	0.640	0.157	0.136
Lumbar zone	24.818	2.469	1.883	0.707	0.253	0.098
Thorax right side	10.392	3.031	2.371	1.125	0.303	0.122
Thorax left side	5.969	2.044	1.193	1.688	0.260	0.141
cumul mean	49.034	11.901	7.517	4.668	1.136	0.626
cumul sem	12.493	2.492	2.018	0.881	0.394	0.193

	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
Percentage of BB found	100.00	24.27	15.33	9.52	2.32	1.28
SEM	-	5.08	4.12	1.80	0.80	0.39

Table 1: Quantity and percentage of Benzyl Benzoate found on hair per days; mean of four dogs.

The drug release profile can be expressed as a percentage of BB lost as a function of time considering the T0 value as 100%. Then Figure 5 was obtained.

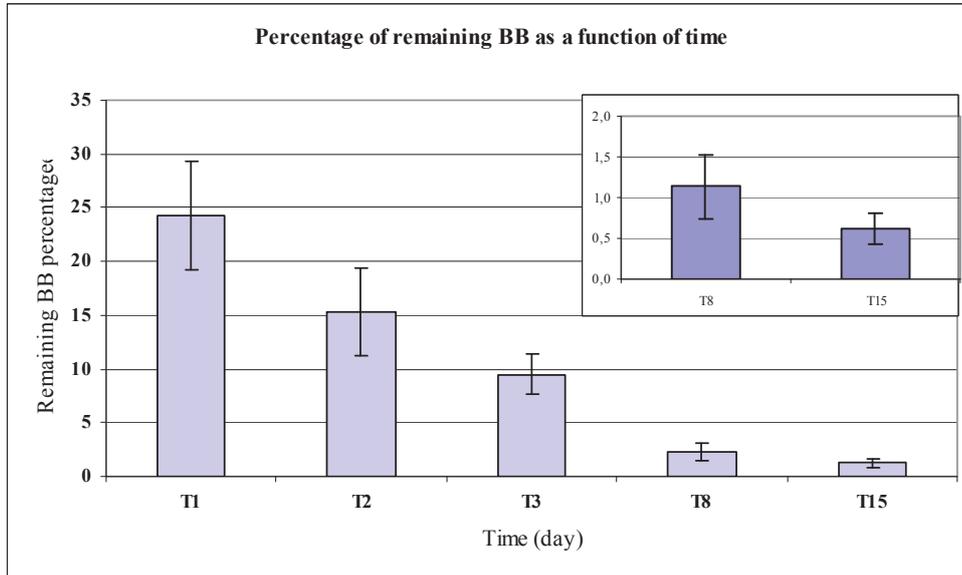


Fig. 5: Remaining BB percentage as a function of time. Results expressed as percentage of BB found on hair, with T0 as reference (100%)

A high lost of BB was observed between T0 and T1day (75% of lost). The follow table gathers the value of BB lost between consecutive sampling days:

T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
	T0-T1	T1-T2	T2-T3	T3-T4	T4-T5
	75,73 %	8,94 %	5,81 %	7,20 %	1,04 %

Table 2: BB % lost between two consecutive sampling days

Because of a high BB lost between T0 and T1day, the BB quantity evolution as a function of time was investigated separating each sampling zone giving access to the figure 6.

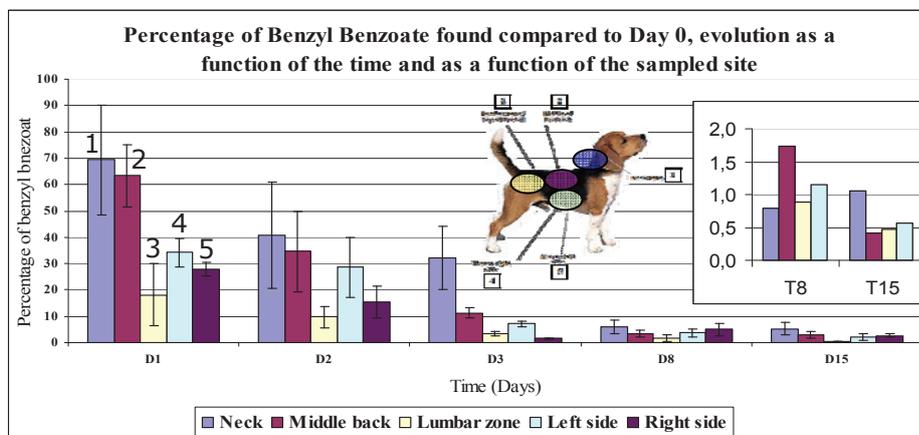


Fig. 6: BB percentage evolution as a function of sampling site and sampling day

Follow table gather numeric data that permitted to compare the influence of the treated zone on the BB lost as a function of time.

Percentage obtained as a function of T0(1h) as reference					
	T1	T2	T3	T8	T15
Neck	%	%	%	%	%
Mean	69,382	40,754	32,106	6,163	5,271
SEM	20,806	20,228	11,900	2,573	2,259
	T1	T2	T3	T8	T15
Middle of the back	%	%	%	%	%
Mean	63,369	34,589	11,340	3,520	2,956
SEM	11,722	15,164	1,767	1,213	1,138
	T1	T2	T3	T8	T15
Lumbar zone	%	%	%	%	%
Mean	18,086	9,793	3,317	1,770	0,339
SEM	11,831	4,006	0,854	1,170	0,089
	T1	T2	T3	T8	T15
Thorax right side	%	%	%	%	%
Mean	34,139	28,563	7,105	3,808	2,179
SEM	5,430	11,314	0,974	1,538	1,438
	T1	T2	T3	T8	T15
Thorax left side	%	%	%	%	%
Mean	27,767	15,386	1,688	4,991	2,720
SEM	2,629	6,156	0,201	2,300	0,758

Table 3: Percentage of Benzyl benzoate found on hair as function of sampling site and sampling day

BB lost was quicker on the lumbar zone and on the thorax left and right side than the middle of the back and the neck.

The figure 6 shows a different evolution upon the sampling site on the BB lost. Neck and middle of the back showed a comparable evolution, whereas lumbar zone and sides shown a different evolution in term of BB lost.

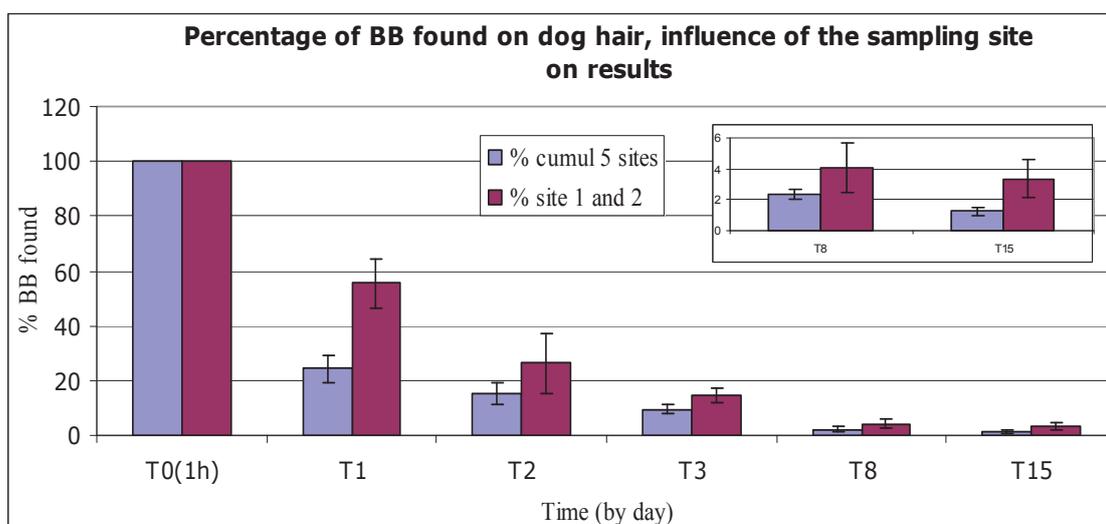


Fig. 7: Evolution of BB percentage found on the hair, comparison of the sum of site 1 and 2 and the sum of sites 3, 4 and 5.

The blue graph represents the BB lost from all the sites. It shows a high decrease between T0 and T1day. The possible reason can be the behavior of the animal; sides and lumbar zone lost a high BB quantity. The seated position lead to a BB lost on lumbar zone and on left and right sides.

As contrast, pink graph show a more regular BB lost, particularly between T0 and T1day. Actually the pink graph corresponds to the BB lost due to physicochemical phenomena, and not to dog behavior.

2- In vivo drug release profile on skin

In vivo drug release profile on skin was performed treating cotton samples. A BB lost quantity per skin area was then obtained (Figure 8).

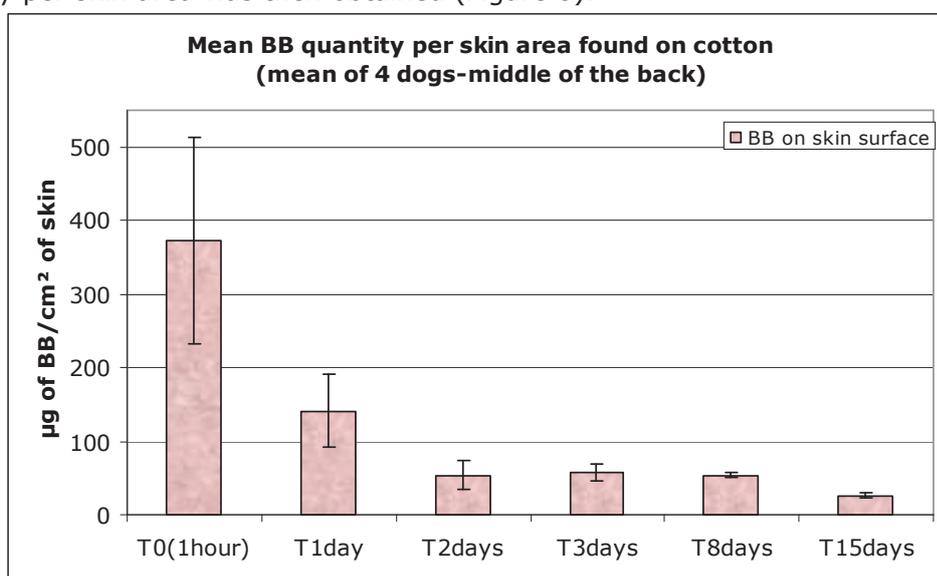


Fig. 8: BB found on cotton samples as a function of time. BB quantity found corresponds to the BB on the skin surface.

Figure 8 prove the presence of BB on the skin surface, which was consequently able to cross the hair coat barrier. The follow up of the BB lost show a hard decrease of the BB quantity between T0 and T1day. From T1 day to T15 days, the BB quantity decrease is more regular. This result permitted to consider a storage effecting the first skin layers.

A comparison of BB found on the hair and at the surface of the skin was performed. (Figure 9). For the BB quantity found on hair, only site 2 was considered.

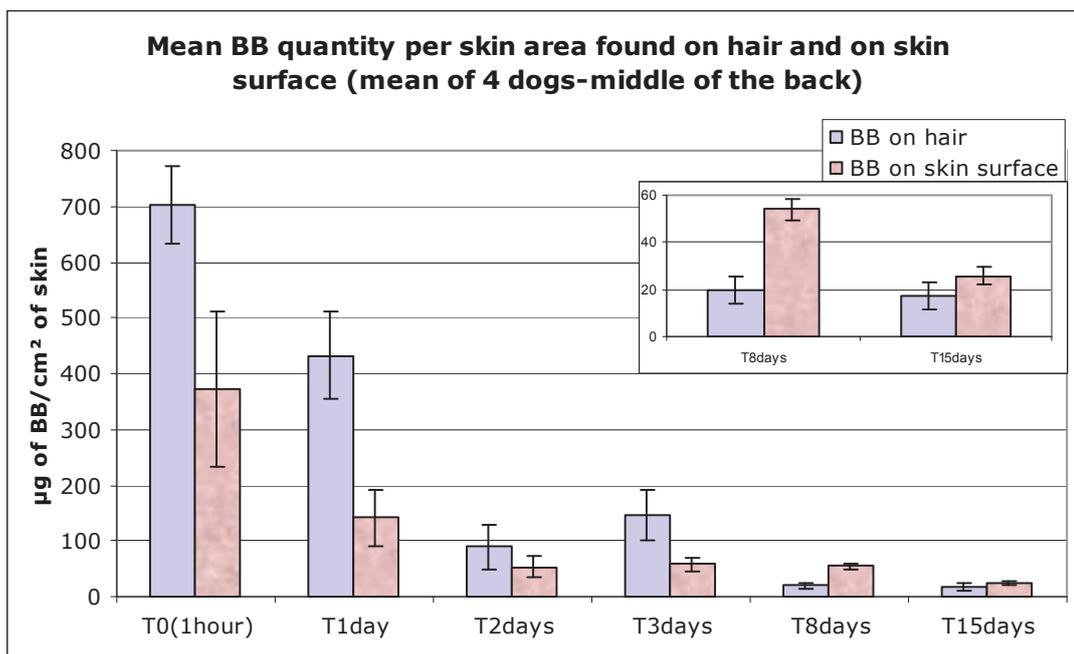
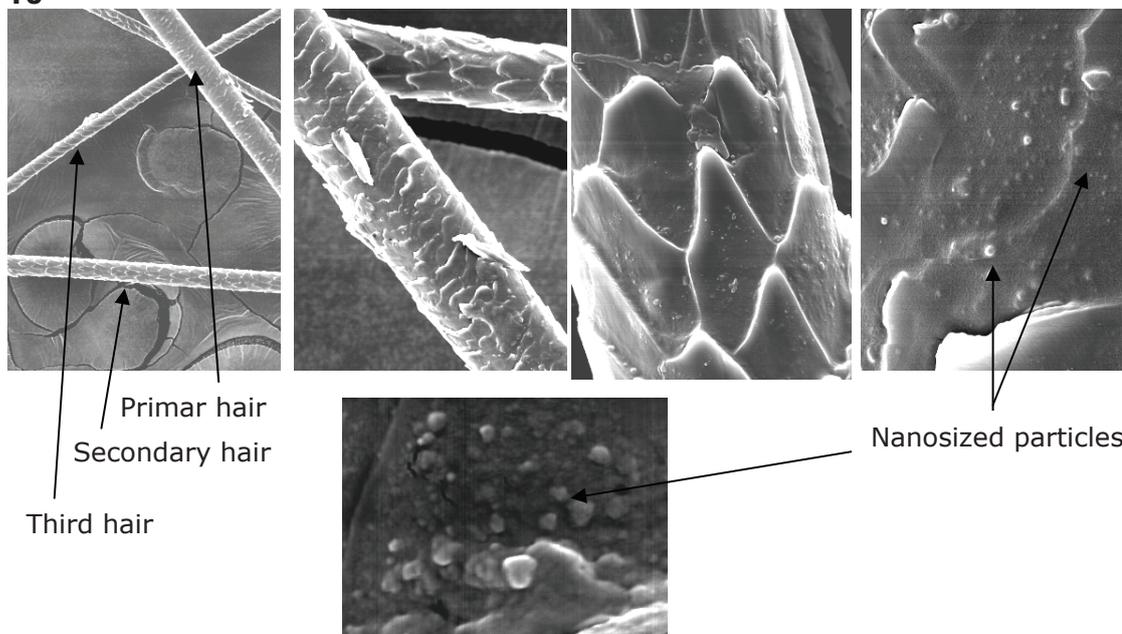


Fig. 9: BB quantity found on neck hair and at the skin surface as a function of time. Blue graph represent the lost of BB from hair at the middle of the back and pink graph represent the lost of BB from the surface of the skin (removed using cotton). The lost of BB from T0 to T3 days is comparable for the hair and the skin. BB quantity found on the hair is superior to BB quantity found on the skin surface, from T0 to T3 days. The tendency reversed for T8 days and T15 days, permitting to confirm a storage effect of the skin. Indeed, there is more BB at the skin surface than on the hair at T8days and T15 days.

3- Scanning Electron Microscopy analyze

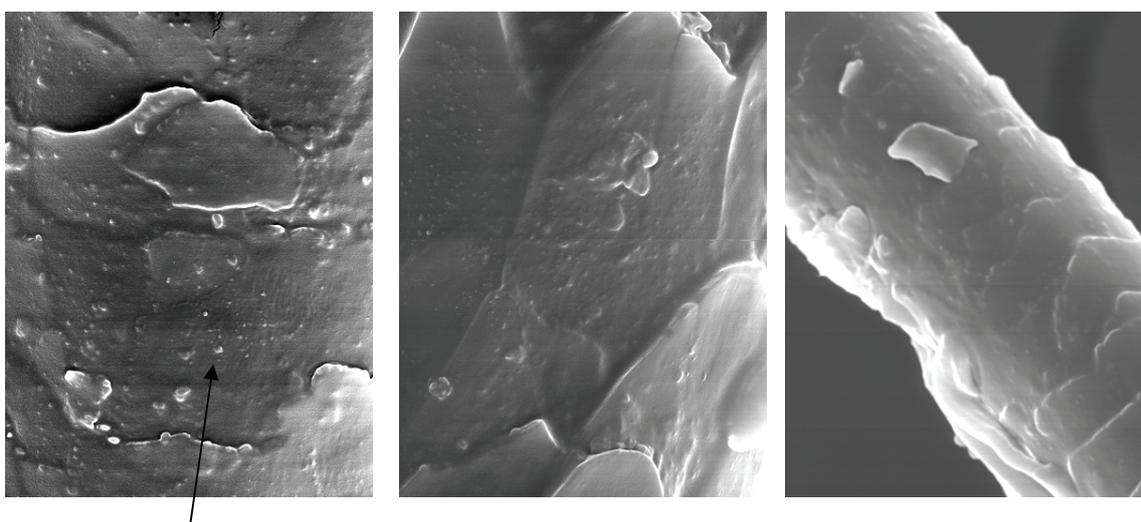
Previous results were confirmed using SEM. Hair sampled the first investigation day and the last investigation day were observed by SEM.

T0



At T0, nanoparticles were visibly stoked on hair, and a large quantity of nanoparticles was visible into the hair scales.

T15 days



Nanosized particles

Pictures obtained from dog hair 15 days after treatment showed the presence of nanoobjects. Comparison between hair at T0 and hair at T15days show a high lost of nanoparticles. Nevertheless, some of them remains up to 15 days.

III- Conclusions

In this work, the *in vivo* release profile of Benzyl Benzoate entrapped in nanoparticles was elaborated in real conditions using four dogs. The drug release profile was followed on hair samples and on skin surface by swab step. Five zones were studied on 15 days.

In the view to the obtained results, we can conclude:

- BB formulation sprayed directly on hair was able to retain a quantity of BB up to 15 days;
- Treated zone has an influence on the remaining of the product due to the behavior of dogs;
- Interesting sites for the determination of BB DRP from nanoparticles are the neck and the middle of back, that permit to judge the BB lost only as a function of physicochemical parameters, avoiding the study artifact due to the animal behavior;
- BB entrapped in nanoparticles was found up to 15 days (5% of the initial dose on neck against 0.3% for the lumbar zone).

Benzyl Benzoate loaded nanoparticles sprayed directly on the dog hair coat are able to cross the hair coat barrier and then they are able to reach the skin surface layers. In this way, we can conclude:

- BB is present not only on the hair but also at the skin surface;
- BB was found on the skin surface after 15 days and the quantity of BB found on the skin surface was superior to the quantity of BB on hair → eventual storage effect of the skin
- In vivo* BB release profile from hair and from skin surface did not present the same profile that predicts a storage ability of the first skin layers.

SEM analyze of the hair permitted to confirm the presence of nanoparticles on hair up to 15 days.

Annex 1- Raw data for hair treatment

Hair Weight

HPLC raw data

Neck	D0(1h)		D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)		D1		D2		D3		D8		D15			
	m hair	mg	m hair	BB	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr3	µg/ml	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr1	µg/ml					
Dog	78							BB	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr3	µg/ml	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr1	µg/ml	
n°			mg	mg	Mg	mg	mg														
56078	108	78	81	49	52	155	61	17,065	2,012	0,600	15,732	4,958	0,602	0,551	0,477	1,553	2,019	2,178	1,756	2,054	
56084	158	108	65	91	44	59	51	67,140	4,046	1,742	0,85	2,431	0,641	1,279	0,905	2,557	6,989	2,051	2,499	1,608	
56082	119	158	187	110	102	114	153	12,230	2,245	0,346	1,527	1,109	0,804	3,025	0,590	1,552	2,986	1,649	1,746	0,582	
55709	60	119	77	68	55	125	93	4,815	1,478	0,000	0,522	1,399	0,726	0,817	0,531	1,354	2,487	2,388	1,215	1,929	
Middle Back																					
Dog	D0(1h)		D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)		D1		D2		D3		D8		D15			
n°	m hair	mg	m hair	BB	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr3	µg/ml	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr1	µg/ml					
56078	214		78	101	61	164	78	62,565	5,057	0,862	17,841	1,718	0,361	2,439	0,344	1,614	3,924	0,606	4,913	3,864	
56084	270		107	136	45	224	144	4,823	0,640	0,827	2,667	0,498	0,322	3,362	1,056	2,033	2,994	2,015	2,269	0,000	
56082	112		61	52	100	138	119	24,153	3,345	0,855	9,269	1,223	1,309	0,503	1,175	1,986	7,488	3,760	1,515	0,960	
55709	127		81	73	74	206	103	39,464	3,222	0,300	10,217	0,936	2,348	2,282	0,642	2,258	18,281	6,722	3,752	2,528	
Bottom Back																					
Dog	D0(1h)		D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)		D1		D2		D3		D8		D15			
n°	m hair	mg	m hair	BB	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr3	µg/ml	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr1	µg/ml					
56078	101		96	62	122	122	56	161,810	13,632	1,484	6,042	4,708	0,962	2,546	1,387	3,252	8,797	3,065	1,902	1,352	
56084	123		165	85	52	46	127	68,207	6,682	1,071	35,699	6,102	8,095	1,144	0,799	0,621	2,176	6,600	2,025	1,776	
56082	129		116	58	86	106	73	6,532	1,088	0,629	0,508	6,022	1,024	0,865	2,291	0,832	3,153	1,549	4,598	1,037	
55709	59		72	41	83	159	141	92,400	6,398	0,576	7,33	2,797	3,483	1,136	3,717	0,709	8,587	5,014	3,740	1,518	
Right side																					
Dog	D0(1h)		D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)		D1		D2		D3		D8		D15			
n°	m hair	mg	m hair	BB	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr3	µg/ml	extr1	µg/ml	extr2	µg/ml	extr1	µg/ml					
56078	60		81	62	115	74	58	10,193	1,784	0,906	5,468	1,579	6,817	0,766	110,279	1,107	2,501	4,710	3,029	2,185	

56084	93	103	62	77	91	132	57,441	3,687	0,529	19,588	4,076	2,963	0,357	1,459	1,432	2,285	16,847	6,830	1,599	0,376					
56082	129	78	45	87	90	97	119,195	9,285	1,265	13,812	1,507	9,757	2,318	4,992	1,871	2,849	3,131	3,080	2,323	2,123					
55709	45	34	62	72	119	86	15,962	1,564	0,186	3,208	1,626	3,040	1,373	2,738	10,742	8,026	3,310	1,750	1,821	1,254					
Left side	D0(1h)	D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)	D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)	D1	D2	D3	D8	D15	D0(1h)	D1	D2	D3	D8	D15	
Dog	m hair	m hair	m hair	m hair	m hair	m hair	BB	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
N°	mg	mg	mg	mg	mg	mg	extr1	extr2	extr3	extr1	extr2	extr1	extr1	extr1	extr1	extr1	extr2	extr3	extr1	extr2	extr1	extr2	extr1	extr2	
56078	95	45	175	88	68	99	25,016	2,519	1,032	2,528	0,419	1,312	0,288	6,159	1,027	2,652	2,872	1,099	2,723	3,993					
56084	115	99	50	69	81	84	43,570	2,752	0,395	9,875	2,112	1,629	0,288	37,144	1,870	7,881	4,625	1,892	1,543	1,343					
56082	94	44	40	86	102	72	117,420	9,902	1,569	6,386	1,24	1,633	1,017	6,363	4,529	4,233	6,164	2,398	1,730	1,354					
55709	64	60	65	68	81	73	15,714	2,203	0,188	4,571	0,676	2,937	0,861	2,065	4,022	51,750	11,738	4,250	3,183	1,648					

Dilution factor, volume of MeOH

Neck	D0(1h)			D1			D2			D3			D8			D15			
	vol.dil.	ml	ml																
Dog n°	extr1	extr2	extr3																
56078	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56084	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56082	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
55709	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Middle Back																			
Dog n°	extr1	extr2	extr3																
56078	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56084	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56082	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
55709	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Lumbar zone																			
Dog n°	extr1	extr2	extr3																
56078	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56084	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
56082	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	20,00	23,00	23,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50

55709	789,28	74,11	-28,50	789,28	204,34	21,53	-5,04	204,34	242,92	54,00	22,42	265,34
Mean	655,03	70,52	-14,64	659,10	199,97	28,39	2,40	203,63	101,52	24,96	11,76	113,38
SEM	244,12	20,94	13,87	242,89	62,14	8,72	2,52	62,46	47,69	11,01	5,88	51,74
Lumbar zone												
Dog n°												
56078	3236,20	313,54	-107,17	3236,20	120,84	22,13	6,42	127,26	94,16	15,30	3,05	97,21
56084	1364,14	153,69	-23,65	1364,14	713,98	140,35	47,53	761,51	161,90	26,31	5,26	167,17
56082	130,64	25,02	8,04	138,68	10,16	138,51	137,19	147,35	20,48	19,90	17,23	37,71
55709	1848,00	147,15	-93,09	1848,00	146,60	64,33	45,27	191,87	69,66	26,13	17,07	86,73
Mean	1644,75	159,85	-53,97	1646,76	247,90	91,33	59,10	307,00	86,55	21,91	10,66	97,21
SEM	641,96	59,16	27,58	640,38	158,16	29,08	27,69	152,10	29,42	2,66	3,78	26,68
Right side												
Dog n°												
56078	203,86	41,03	14,53	218,39	109,36	36,32	22,10	131,46	136,34	17,62	-0,11	136,34
56084	1148,82	84,80	-64,55	1148,82	391,76	93,75	42,82	434,58	59,26	8,21	0,51	59,77
56082	2383,90	213,56	-96,35	2383,90	276,24	34,66	-1,25	276,24	195,14	53,31	27,95	223,09
55709	319,24	35,97	-5,53	319,24	64,16	37,40	29,06	93,22	60,80	31,58	23,68	84,48
Mean	1013,96	93,84	-37,97	1017,59	210,38	50,53	23,18	233,87	112,89	27,68	13,01	125,92
SEM	502,81	41,38	25,70	500,87	75,73	14,42	9,21	77,65	32,79	9,80	7,45	36,11
Left side												
Dog n°												
56078	500,32	57,94	-7,10	500,32	50,56	9,64	3,06	53,62	26,24	6,62	3,21	29,45
56084	871,40	63,30	-49,99	871,40	197,50	48,58	22,90	220,40	32,58	6,62	2,39	34,97
56082	2348,40	227,75	-77,55	2348,40	127,72	28,52	11,92	139,64	32,66	23,39	19,15	51,81
55709	314,28	50,67	9,81	324,09	91,42	15,55	3,66	95,08	58,74	19,80	12,17	70,91
Mean	1008,60	99,91	-31,21	1011,05	116,80	25,57	10,39	127,19	37,56	14,11	9,23	46,78
SEM	461,37	42,69	19,92	460,14	31,18	8,62	4,63	35,69	7,22	4,38	3,98	9,34

	T3days			T8days			T15days			
	BB Quantity extr1	µg extr2	-13%extr1 val cor2	BB Quantity extr1	µg extr2	-13%extr1 val cor2	BB Quantity extr1	µg extr2	-13%extr1 val cor2	
Neck										
Dog n°										
56078	11,02	10,97	9,54	5,05	7,08	6,42	4,39	6,68	6,10	10,49
56084	25,58	20,82	17,49	17,47	6,67	4,39	6,25	5,23	4,41	10,66
56082	60,50	13,57	5,71	7,47	5,36	4,39	4,37	1,89	1,32	5,69
55709	16,34	12,21	10,09	6,22	7,70	6,89	3,04	6,27	5,87	8,91
Mean	28,36	14,39	10,71	9,05	6,70	5,52	4,51	5,02	4,43	8,94
SEM	11,13	2,21	2,46	2,85	0,49	0,66	0,66	1,09	1,10	1,15
Middle of the back										
Dog n°										
56078	48,78	7,91	1,57	9,81	1,97	0,69	12,28	12,56	10,96	23,24
56084	67,24	24,29	15,55	7,49	6,55	5,58	5,67	0,00	-0,74	4,94
56082	10,06	27,03	25,72	18,72	12,22	9,79	3,79	3,12	2,63	6,42
55709	45,64	14,77	8,83	45,70	21,85	15,91	9,38	8,22	7,00	16,38
Mean	42,93	18,50	12,92	20,43	10,65	7,99	7,78	5,97	4,96	12,74
SEM	11,95	4,40	5,13	8,77	4,28	3,23	1,90	2,77	2,55	4,33
Lumbar zone										
Dog n°										
56078	50,92	31,90	25,28	21,99	9,96	7,10	4,76	4,39	3,78	8,53
56084	15,98	14,28	12,21	16,50	6,58	4,44	4,44	1,37	0,79	5,23
56082	45,82	19,14	13,18	3,87	14,94	14,44	8,45	3,37	2,27	10,72
55709	74,34	16,31	6,64	12,54	12,16	10,53	3,01	4,93	4,54	7,55
Mean	46,77	20,41	14,33	13,73	10,91	9,13	5,16	3,52	2,84	8,01
SEM	11,99	3,96	3,92	3,81	1,77	2,17	1,16	0,79	0,83	1,14
Right side										
Dog n°										
56078	2205,58	25,46	-261,26	11,78	9,84	8,31	7,48	7,10	6,13	13,61
56084	29,18	32,94	29,14	42,12	22,20	16,72	4,00	1,22	0,70	4,70
56082	99,84	43,03	30,05	7,83	10,01	8,99	5,81	6,90	6,14	11,95
55709	54,76	247,07	239,95	8,28	5,69	4,61	4,55	4,08	3,48	8,04

Mean	597,34	87,12	9,47	672,13	17,50	11,93	9,66	27,16	4,82	4,11	9,57
SEM	536,28	53,44	102,97	513,54	8,25	3,56	2,54	10,66	1,39	1,30	2,00
Left side											
Dog n°											
56078	123,18	23,62	7,61	130,79	7,18	3,57	2,64	9,82	6,81	12,09	18,90
56084	742,88	43,01	-53,56	689,32	11,56	6,15	4,65	16,21	3,86	3,86	7,72
56082	127,26	104,17	87,62	214,88	15,41	7,79	5,79	21,20	4,33	3,84	8,16
55709	41,30	92,51	87,14	128,44	29,35	13,81	10,00	39,34	7,96	4,32	12,28
Mean	258,66	65,83	32,20	158,04	15,87	7,83	5,77	21,64	5,74	6,03	11,77
SEM	162,62	19,33	34,22	28,43	4,79	2,17	1,55	6,34	2,08	2,02	2,59

Calcul of BB mass per mass of hair

	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
Neck	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Dog n°						
56078	4,400	58,452	2,043	0,395	0,074	0,172
56084	12,433	1,085	0,627	0,979	0,371	0,209
56082	1,674	0,813	0,344	0,649	0,104	0,037
55709	0,990	0,893	0,604	0,481	0,105	0,096
mean	2,354	0,930	0,525	0,508	0,163	0,129
sem	1,042	0,081	0,091	0,075	0,069	0,039
Middle of the back	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Dog n°						
56078	5,847	4,653	0,378	0,825	0,064	0,298
56084	0,365	0,541	0,444	1,840	0,058	0,034
56082	4,439	3,105	1,723	0,358	0,207	0,054
55709	6,215	2,523	3,635	0,736	0,299	0,159
mean	5,500	3,427	1,545	0,640	0,157	0,136
sem	0,541	0,636	0,762	0,143	0,058	0,060

	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
Lumbar zone	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Dog n°						
56078	32,042	1,326	1,568	0,625	0,238	0,152
56084	11,091	4,615	1,967	0,542	0,455	0,041
56082	1,075	1,270	0,650	0,686	0,173	0,147
55709	31,322	2,665	2,115	0,976	0,145	0,054
mean	24,818	2,469	1,883	0,707	0,253	0,098
sem	6,867	0,785	0,163	0,094	0,070	0,030
	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
Thorax right side	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Dog n°						
56078	3,640	1,623	2,199	19,179	0,271	0,235
56084	12,353	4,219	0,964	0,757	0,647	0,036
56082	18,480	3,542	4,957	1,493	0,187	0,123
55709	7,094	2,742	1,363	4,093	0,108	0,093
mean	10,392	3,031	2,371	1,125	0,303	0,122
sem	3,237	0,558	0,900	0,368	0,119	0,042
	T0(1h)	T1	T2	T3	T8	T15
Thorax left side	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair	BB/Hair
	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg	µg/mg
Dog n°						
56078	5,267	1,192	0,168	1,486	0,144	0,191
56084	7,577	2,226	0,699	9,990	0,200	0,092
56082	24,983	3,174	1,295	2,499	0,208	0,113
55709	5,064	1,585	1,091	1,889	0,486	0,168
mean	5,969	2,044	1,193	1,688	0,260	0,141
sem	0,806	0,433	0,102	0,201	0,077	0,023

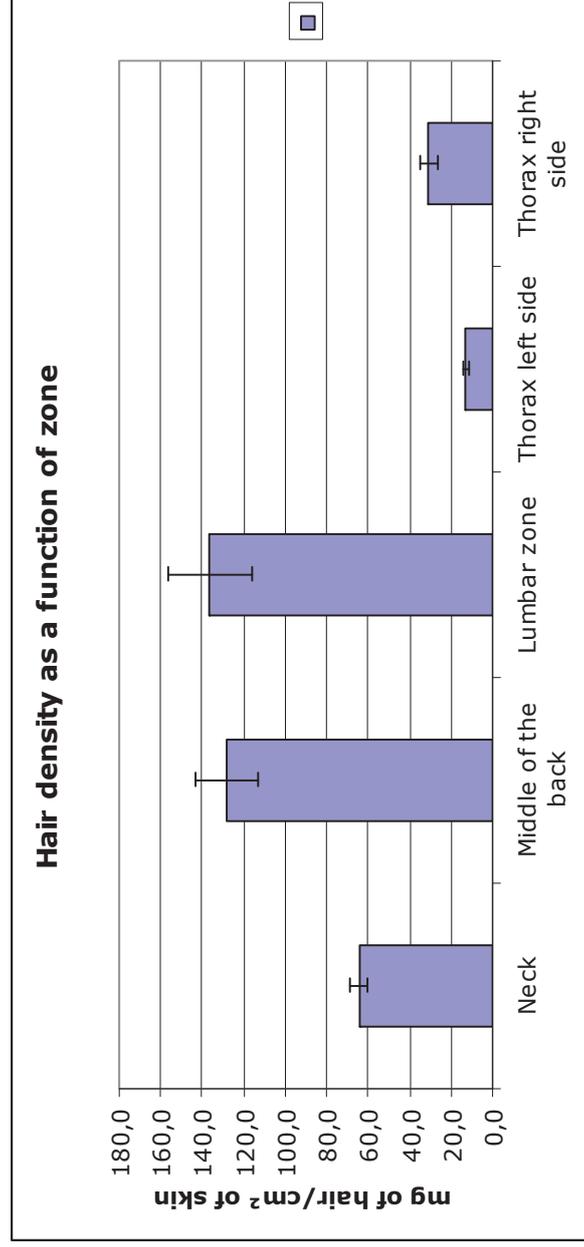
Mass of BB per surface of skin

Hair from site 2, Middle of the back

	T0(1hour) µg/cm²	T1day µg/cm²	T2days µg/cm²	T3days µg/cm²	T8days µg/cm²	T15days µg/cm²
56078	747,954	585,170	43,517	105,585	8,193	38,119
56084	46,732	63,767	56,810	235,329	7,458	4,384
56082	567,855	388,741	168,210	45,765	26,424	6,896
55709	794,977	322,697	425,665	94,162	38,256	20,338
Mean	703,595	432,203	89,512	145,025	20,083	17,434
SEM	69,214	78,824	39,536	45,272	5,793	5,990

Annex 2-Measurement of hair density from each investigated sites

Dog number	6901		40539		Mean of 2 dogs		Standard dev Mg/cm ²
	hair g	surface cm ²	Density mg/cm ²	hair g	surface cm ²	Density mg/cm ²	
Neck	0,174	3	58,0	0,142	2	71,0	4,6
Middle of the back	0,213	2	106,5	0,224	1,5	149,3	15,1
Lumbar zone	0,216	2	108,0	0,247	1,5	164,7	20,0
Thorax left side	0,04	3,75	10,7	0,034	2,25	15,1	1,6
Thorax right side	0,093	2,5	37,2	0,073	3	24,3	4,5



Annex 3- Raw data-Cotton treatment

Cotton (middle back)		T0(1h)		T1		T2		T3		T8		T15	
Dog n°	BB	µg/ml Extr2	µg/ml Extr3	µg/ml Extr1	µg/ml Extr2	µg/ml Extr3	µg/ml Extr1	µg/ml Extr2	µg/ml Extr1	µg/ml Extr2	gaze	coton	coton
56078	4,065	4,379	0,988	3,955	0,369	0,000	0,346	0,000	0,000	1,015	1439	288	231
	2,438	1,104	0,000	2,303	0,324	0,374	0,378	0,000	0,000	0,000	1295	233	346
	3,563	0,837	0,220	1,329	0,344	0,331	0,718	0,000	0,000	0,000	1410	296	257
56084	10,066	6,320	1,208	7,587	1,037	0,705	1,442	0,000	0,000	1,015	1699	171	109
	3,582	0,445	0,311	0,683	0,267	0,223	0,455	0,000	0,326	0,000	1723	474	238
	2,965	0,636	0,000	0,669	0,457	0,205	0,000	0,307	0,315	0,000	1675	519	156
	3,003	0,408	0,284	0,382	0,000	0,381	0,553	0,232	0,448	0,527	1828	148	194
Sum	9,550	1,489	0,595	1,734	0,724	0,809	1,008	0,539	1,089	0,527	1846	152	257

Extraction step was performed by 2 or 3 extraction steps. Obtained HPLC data were the follow ones:

Cotton (middle back)		T0(1h)		T1day		T2days		T3days		T8days		T15days	
Dog n°	BB	µg/ml Extr2	µg/ml Extr3	BB	µg/ml Extr2	µg/ml Extr3	BB	µg/ml Extr1	BB	µg/ml Extr2	BB	µg/ml Extr1	BB
56078	4,065	4,379	0,988	3,955	0,369	0,000	0,346	0,000	0,000	1,015	2,347	2,368	1,914
	2,438	1,104	0,000	2,303	0,324	0,374	0,378	0,000	0,000	0,000	2,330	2,329	1,898
	3,563	0,837	0,220	1,329	0,344	0,331	0,718	0,000	0,000	0,000	2,759	2,638	1,583
Sum	10,066	6,320	1,208	7,587	1,037	0,705	1,442	0,000	0,000	1,015	7,436	7,335	5,395
56084	3,582	0,445	0,311	0,683	0,267	0,223	0,455	0,000	0,326	0,000	5,661	2,358	1,767
	2,965	0,636	0,000	0,669	0,457	0,205	0,000	0,307	0,315	0,000	3,685	2,394	1,740
	3,003	0,408	0,284	0,382	0,000	0,381	0,553	0,232	0,448	0,527	5,179	5,255	1,635
Sum	9,550	1,489	0,595	1,734	0,724	0,809	1,008	0,539	1,089	0,527	14,525	10,01	5,142

56082	19,000	2,242	0,328	1,465	0,658	0,666	1,191	0,000	0,552	0,383	3,257	2,761	4,383
	3,001	1,284	0,392	0,915	0,561	0,391	1,069	0,000	1,638	0,542	3,755	2,875	1,628
	6,218	0,547	0,000	1,681	0,521	0,000	0,870	0,000	0,334	0,376	2,819	2,598	1,710
Sum	28,219	4,073	0,720	4,061	1,740	1,057	3,130	0,000	2,524	1,301	9,831	8,234	7,721
55709	13,938	2,391	0,452	9,82	1,264	0,464	0,651	0,000	0,426	1,372	3,221	2,948	2,406
	3,42	0,61	0,44	10,81	1,10	0,406	0,810	0,000	0,288	0,000	3,554	4,251	1,984
	3,81	0,73	0,34	4,83	1,51	0,783	0,931	0,000	1,366	0,549	3,534	2,160	1,780
Sum	21,169	3,725	1,226	25,453	3,870	1,653	2,392	0,000	2,080	1,921	10,309	9,359	6,170

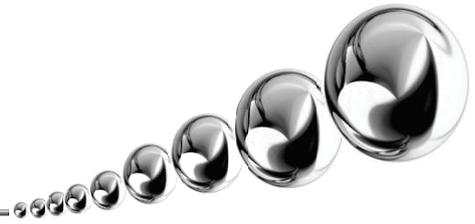
Dilution volume for HPLC analysis were the follow ones

Cotton (middle back)	T0(1h)			T1		T2		T3		T8		T15	
	vol.dil.	ml	ml	Vol.dil.	ml	vol.dil.	ml	vol.dil.	ml	vol.dil.	ml	Vol.dil.	ml
Dog n°	extr1	extr2	extr3	extr1	extr2	extr1	extr2	extr1	extr2	extr1	extr2	extr1	extr2
56078	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
Sum										11,250		11,250	
56084	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
Sum										11,250		11,250	
55709	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
	20,00	21,00	21,00	15,00	16,00	15,00	16,00	15,00	16,00	3,75	4,50	3,75	4,50
Sum										11,250		11,250	

Cotton (middle back)	T3		T3		T8		T8		T15		T15	
	Qty BB	µg extr1	6.2%extr1 val cor2	µg cumul	Qty BB	µg Extr2	6.2%extr1 Val cor2	µg cumul	Qty BB	µg extr1	6.2%extr1 val cor2	µg cumul
56078	81,30	91,959	88,057	169,4	59,325	5,904	2,226	61,551	5,190	0,000	-0,322	4,868
	48,76	23,184	20,844	69,6	34,545	5,184	3,042	37,587	5,670	0,000	-0,352	5,318
	71,26	17,577	14,157	85,4	19,935	5,504	4,268	24,203	10,770	0,000	-0,668	10,102
Sum	201,320	132,720	123,057	324,377	113,805	16,592	9,536	123,341	21,630	0,000	-1,341	20,289
56084	71,64	9,345	5,906	77,5	10,245	4,272	3,637	13,882	6,825	0,000	-0,423	6,402
	59,30	13,356	10,510	69,8	10,035	7,312	6,690	16,725	0,000	4,912	4,912	4,912
	60,06	8,568	5,685	65,7	5,730	0,000	-0,355	5,375	8,295	3,712	3,198	11,493
Sum	191,000	31,269	22,101	213,101	26,010	11,584	9,971	35,981	15,120	8,624	7,687	22,807
56082	380,00	47,082	28,842	408,8	21,975	10,528	9,166	31,141	17,865	0,000	-1,108	16,757
	60,02	26,964	24,083	84,1	13,725	8,976	8,125	21,850	16,035	0,000	-0,994	15,041
	124,36	11,487	5,518	129,9	25,215	8,336	6,773	31,988	13,050	0,000	-0,809	12,241
Sum	564,380	85,533	58,443	622,823	60,915	27,840	24,063	84,978	46,950	0,000	-2,911	44,039
55709	278,76	50,211	36,831	315,6	147,300	20,224	11,091	158,391	9,765	0,000	-0,605	9,160
	68,42	12,789	9,505	77,9	162,075	17,536	7,487	169,562	12,150	0,000	-0,753	11,397
	76,20	15,225	11,567	87,8	72,420	24,160	19,670	92,090	13,965	0,000	-0,866	13,099
Sum	423,380	78,225	57,903	481,283	381,795	61,920	38,249	420,044	35,880	0,000	-2,225	33,655

Cotton (middle back)	T3		T8		T3		T8		T8		T15		T15			
	Qty BB	µg extr2	6.2%extr1 val cor2	µg cumul	Qty BB	µg extr2	6.2%extr1 val cor2	µg cumul	Qty BB	µg extr1	6.2%extr1 val cor2	µg extr2	Qty BB	µg extr1	6.2%extr1 val cor2	µg Cumul
56078	0,000	16,240	16,240	16,240	8,801	10,656	10,110	18,912	7,178	0,000	-0,445	0,000	7,178	0,000	-0,445	6,732
	0,000	0,000	0,000	0,000	8,738	10,481	9,939	18,676	7,118	0,000	-0,441	0,000	7,118	0,000	-0,441	6,676
	0,000	0,000	0,000	0,000	10,346	11,871	11,230	21,576	5,936	0,000	-0,368	0,000	5,936	0,000	-0,368	5,568
Sum	0,000	16,240	16,240	16,240	27,885	33,008	31,279	59,164	20,231	0,000	-1,254	0,000	20,231	0,000	-1,254	18,977
56084	4,890	0,000	-0,303	4,587	21,229	10,611	9,295	30,524	6,626	0,000	-0,411	0,000	6,626	0,000	-0,411	6,215
	4,725	0,000	-0,293	4,432	13,819	10,773	9,916	23,735	6,525	0,000	-0,405	0,000	6,525	0,000	-0,405	6,120
	6,720	8,432	8,015	14,735	19,421	23,648	22,443	41,865	6,131	0,000	-0,380	0,000	6,131	0,000	-0,380	5,751
Sum	16,335	8,432	7,419	23,754	54,469	45,032	41,654	96,123	19,283	0,000	-1,196	0,000	19,283	0,000	-1,196	18,087
56082	8,280	6,128	5,615	13,895	12,214	12,425	11,667	23,881	16,436	0,000	-1,019	0,000	16,436	0,000	-1,019	15,417
	24,570	8,672	7,149	31,719	14,081	12,938	12,064	26,146	6,105	0,000	-0,379	0,000	6,105	0,000	-0,379	5,726
	5,010	6,016	5,705	10,715	10,571	11,691	11,036	21,607	6,413	0,000	-0,398	0,000	6,413	0,000	-0,398	6,015
Sum	37,860	20,816	18,469	56,329	36,866	37,053	34,767	71,634	28,954	0,000	-1,795	0,000	28,954	0,000	-1,795	27,159
55709	6,390	21,952	21,556	27,946	12,079	13,266	12,517	24,596	9,023	0,000	-0,559	0,000	9,023	0,000	-0,559	8,463
	4,320	0,000	-0,268	4,052	13,328	19,130	18,303	31,631	7,440	0,000	-0,461	0,000	7,440	0,000	-0,461	6,979
	20,490	8,784	7,514	28,004	13,253	9,720	8,898	22,151	6,675	0,000	-0,414	0,000	6,675	0,000	-0,414	6,261
Sum	31,200	30,736	28,802	60,002	38,659	42,116	39,719	78,377	23,138	0,000	-1,435	0,000	23,138	0,000	-1,435	21,703

Annexe 5



Titre : Étude de l'aspect cosmétique d'une application de la formulation Pica-NP sur chiens.

PR&D 0250801

A Study to Assess the Cosmetic Aspect of a Single Topical Treatment
with Pica-NP Spray in Dogs

DOCUMENT APPROVAL

Document Type: Report

PR&D Protocol Number: 02508

Date of Document: 22 June 2011

Version: NA
(Protocol Only)

1. 

Test Facility Management

Date 22 June 2011

STUDY REPORT PR&D 0250801

Study Title: A Study to Assess the Cosmetic Aspects of a Single Topical Treatment with *Pica-NP* Spray in Dogs

Step: Exploratory
Purpose: Acceptability
Target: Cosmetics

Data Guidelines: Not Applicable

Test Facility:
Merial SAS, PIPA, CRSV, Building 108
1 allée des Cyprès, 01150 Saint Vulbas, France

Sponsor: Merial Limited, 3239 Satellite Blvd. Duluth, GA 30096-4640 USA

Date Report Prepared: 22 June 2011

Date Study Completed:

Investigator:

Signature:  Date: 23 JUN 2011
Catherine Ollagnier, DVM

STUDY REPORT PR&D 0250801

TABLE OF CONTENTS

Statement of Data Confidentiality Claims 3
Compliance Statement..... 4
Responsible Personnel 5
Summary..... 6
Materials and Methods 7
 1. Study Dates, Personnel and Location..... 7
 2. Investigational material..... 7
 3. Study Design..... 8
 4. Schedule of Operations 9
 5. Animals 9
 6. Experimental model..... 9
 7. Study outcome evaluations..... 10
 8. Animal management..... 11
 9. Sample management..... 12
 10. Data Records..... 12
Results and Discussion..... 13

Table 1. Animal details..... 14
Table 2. Treatment details..... 14
Table 3. Results of the cosmetic assessment at 1 hour post treatment 15
Table 4. Results of the cosmetic assessment at 4 hours post treatment..... 15
Table 5. Results of the cosmetic assessment at 24 hours post treatment 15

STUDY REPORT PR&D 0250801

STATEMENT OF DATA CONFIDENTIALITY CLAIMS

Study Title: A Study to Assess the Cosmetic Aspects of a Single Topical Treatment with *Pica-NP* Spray in Dogs

These data are the property of Merial Limited and as such are considered to be confidential.

Company: Merial Limited
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096-4640, USA

STUDY REPORT PR&D 0250801

COMPLIANCE STATEMENT

Study Title: A Study to Assess the Cosmetic Aspects of a Single Topical Treatment with Pica-NP Spray in Dogs

This study complied with good scientific practices.

These study data have been reviewed by the Investigator who certifies that the results reported herein are consistent with and supported by the study raw data.

Investigator:

Signature:  Date: 23 JUN 2011
Catherine Ollagnier, DVM

STUDY REPORT PR&D 0250801

RESPONSIBLE PERSONNEL

Study Title: A Study to Assess the Cosmetic Aspects of a Single Topical Treatment with Pica-NP Spray in Dogs

The following personnel were responsible for key elements of the study:

Study Personnel at Merial CRSV:

Role/Responsibility

Catherine Ollagnier, DVM
Emilie Artaud, MSc
Guillaume Echene, MSc
Noemie Rives, PL¹
Jonathan Vial, PL
Marion Deschamps, PL
Thierry Badin, BTS²

Investigator, cosmetic observer
Clinical Research Associate
Technician, cosmetic observer
Technician, cosmetic observer
Technician, cosmetic observer
Technician
Technician

Personnel at Merial

Role/Responsibility

Kristina Holmes, MS

Global Clinical Research Specialist

¹ PL = Professional license

² BTS = Superior Technical Diploma

SUMMARY

The objective of this study was to assess the acceptability of the cosmetic aspects of a single topical treatment of *Pica-NP* in dogs. Six male beagle dogs weighing 4.7 to 10.5 kg and aged from 3 to 4 months on Day 0 were included and studied in this single site pilot study.

On Day 0, four dogs (2 from Treatment Group 2 and 2 from Treatment Group 3) were treated with 0.63 g/kg of *Pica-NP*. Treatment was applied by spraying to the animal's back, sides, stomach, shoulders, and neck. Dogs from Treatment Group 3 were treated while petting the hair coat against the nap. Two dogs were not treated and served as negative control (Treatment Group 1).

To ensure their fitness for this study, all dogs had a physical examination on Day -5 and were observed daily for health starting that day.

The cosmetic aspect of the dogs was assessed independently by 4 different observers at approximately 1, 4 and 24 hours post treatment. At each assessment time point, the visual aspect of each dog's hair coat, and then the appreciation when touched were evaluated using a scoring system. The global acceptability of the visual aspect was first assessed, and then the main characteristic of the appearance of the hair coat was described. The dog was petted and the global acceptability of the appreciation when touched was assessed. The sensation when touched was described. After these two appreciations, a global assessment of the cosmetic acceptability of the treatment was performed using a Visual Analog Scale.

All the observers considered acceptable the visual aspect and the appreciation when touched of the hair coat for all dogs at all time points. Appearance, Sensation and VAS assessments showed important variability between operators and within treatment groups. There was no clear trend at 1 hour post-treatment between Treatment Groups. At 4 hours post-treatment, dogs' coat was more seen as 'dry' and felt as 'sticky' in Treatment Groups 2 and 3, compare to the control group. Treatment Groups 2 and 3 were considered less acceptable than the control group with VAS of 12.3 and 17.4 on average compared to 3.3 in the control group. At 24 hours post-treatment, Treatment Groups 2 was still considered less acceptable than the control group with VAS of 11.5 on average compared to 1.9 in the control group, while the Treatment Group 3 showed a VAS of 2.1.

STUDY REPORT PR&D 0250801

OBJECTIVE

To assess the acceptability of the cosmetic aspects of a single topical treatment of *Pica-NP* in dogs.

JUSTIFICATION

The dog was the target animal for this product and the clinical route of administration was topical. This study was required to determine the acceptability of the cosmetic aspects of this product.

COMPLIANCE

This exploratory study was conducted in accordance with Good Scientific Practices.

MATERIALS AND METHODS

1. STUDY DATES, PERSONNEL AND LOCATION

Dates:	Experimental Start Date: First day of acclimation 06 May 2011	Experimental Completion Date: Last day of in-life 12 May 2011
---------------	---	---

Study Personnel:

Investigator:	Catherine Ollagnier, DVM	Phone #: +33-4-74465878
Address:	Merial SAS, CRSV PIPA, allée des Cyprès F-01150 Saint Vulbas France	Fax #: +33-4-74465860 e-mail: <i>catherine.ollagnier@merial.com</i>

The Sponsor assured that the Investigator was, by training and experience, capable of performing the procedures called for in this protocol. Any other personnel involved with the study were documented.

Site Location: Merial SAS
PIPA, CRSV, Building 108
1, allée des Cyprès
01150 Saint Vulbas
France

2. INVESTIGATIONAL MATERIAL

A. Formulation

The Investigational Veterinary Product (IVP) was a topical solution formulated as detailed in the table below. The IVP was manufactured by LAGEP laboratory (Villeurbanne, France) on May 09, 2011. No retest date was available.

STUDY REPORT PR&D 0250801

Generic Name: *Pica-NP* Spray ID#: AM305
Trade Name: Not Applicable
Formulation: Topical solution:
Picaridin 10%w/v
Eudragit RS 100 10% w/w
Ethanol 30% w/w
Water 50% w/w

B. Management

- Source

The IVP was supplied by Laboratoire LAGEP (Villeurbanne, France) and brought to the Investigator. A retain sample from the batch used for the study was stored by Laboratoire LAGEP (Villeurbanne, France).

- Storage/Stability

The IVP was supplied on the day of treatment and returned to LAGEP laboratory the same day. There was no true storage at animal phase facility. Laboratoire LAGEP (Villeurbanne, France) retained all records on the stability of the test substance and may provide these records as necessary.

- Safety

An SDS of the most hazardous ingredient(s) (generally the active ingredients) was supplied. Personnel handling the IVP should follow appropriate safety precautions.

- Accountability

The accountability of all IVP distributed, received, used, disposed of and/or returned to Laboratoire LAGEP (Lyon, France) was documented.

3. STUDY DESIGN

A. Study Design

This study was a negative controlled, randomized, single-site, acceptability study.

Trt. Group	Investigational Veterinary Product (IVP)	Dose (g/kg bw)	Route	Trt. Days	Total No. Animals
1	untreated	NA	NA	NA	2
2	<i>Pica-NP</i> spray method 1	0.63	Topical	0	2
3	<i>Pica-NP</i> spray method 2	0.63	Topical	0	2

Trt. = Treatment, No. = Number, bw = bodyweight, NA = Not Applicable

Method 1 being spraying dog classically; Method 2 being spraying while petting the dog against the nap of the hair coat.

The topical route was used due to the product being formulated as a spray. Six dogs were studied in an attempt to have an acceptable level of data.

B. Experimental Unit

The experimental unit was the individual dog, which was identified and assessed for the study variables on an individual basis.

STUDY REPORT PR&D 0250801

4. SCHEDULE OF OPERATIONS

Day 0 was the same calendar day for all animals.

Study Days	Event
From Day -5 to end of in-life phase	<ul style="list-style-type: none">Daily health observation
Day -5	<ul style="list-style-type: none">Acclimation startedPhysical examination
Day 0	<ul style="list-style-type: none">Dogs weighed and treatedHourly post treatment health observationsCosmetic assessment at approximately 1 and 4 hours post treatment
Days 1	<ul style="list-style-type: none">Cosmetic assessment at approximately 24 hours post treatment

5. ANIMALS

A. Animal Characteristics/Inclusion Criteria

Species:	Canine
Breed / Strain:	Beagle
Source:	Charles Rivers ¹ , and Harlan ²
Number:	6
Sex:	Male
Weight Range:	4.5 to 10.5kg
Age Range:	3 to 4 months (on Day 0)
Physiological Status:	Healthy

¹Charles Rivers= Charles River Laboratories, Les Oncins, 69210 Saint Germain sur l'Arbresle, France

²Harlan= Harlan France SARL, 15 avenue Portes Occitanes, 03800 Gannat, France

B. Exclusion Criteria

No animal was excluded.

C. Removal Criteria

No animal was removed.

6. EXPERIMENTAL MODEL

A. Study Model

Healthy dogs were studied as confirmed by the physical examination performed on Day-5. Dogs belonging to Treatment Groups 2 and 3 were treated on Day 0. Cosmetic assessments were performed by 4 different observers according to the Schedule of Operations.

STUDY REPORT PR&D 0250801

B. Allocation to Treatment Groups

Dogs were allocated to treatment groups by lottery. For that purpose, a random number was attributed to each dog. Then, the 2 dogs with the higher and lower random number were allocated to Treatment Group 1, then the 2 other dogs with the second higher and lower random number were allocated to Treatment Group 2. The remaining dogs were allocated to Treatment Group 3.

C. Blinding

Personnel involved with the cosmetic assessment were unaware as to treatment. Treatment assignments were revealed after completion of the last cosmetic assessment on Day 1. Personnel with access to the treatment assignments were identified prior to the first treatment being administered. The treatment administrator was blinded as to treatment and maintained the treatment and allocation records in a separate location until blinding was revealed.

D. Treatment Administration

The IVP was administered once on Day 0 to dogs in Treatment Groups 2 and 3, which were weighed on Day 0.

Spray treatment was administered at the rate of approximately 0.63 g/kg. Treatment was applied by spraying to the animal's back, sides, stomach, shoulders, and neck. For head and eye area, treatment was sprayed with a glove covering the eyes and mouth. For Treatment Group 3, dogs were sprayed while petting the hair coat against the nap. After treatment, each dog returned to its cage and was allowed to move freely.

7. STUDY OUTCOME EVALUATIONS

A. Specification of Study Variables

The cosmetic aspect of the dogs was assessed independently by 4 different observers at approximately 1, 4 and 24 hours post treatment. At each assessment time point, the visual aspect of each dog's hair coat, and then the appreciation when touched were evaluated using a scoring system. The global acceptability was first assessed (0= acceptable; 1= non acceptable), and then the main characteristic of the appearance of the hair coat was described (0=Normal, 1= Lackluster/dry; 2= Oily/wet). The dog was then petted and the global acceptability of the appreciation when touched was assessed (0= acceptable; 1= non acceptable). The sensation when touched was then described (N= normal; W= wet; S= sticky; Oi= Oily; O= other (describe)). After these two appreciations, a global assessment of the cosmetic acceptability of the treatment was performed using a Visual Analog Scale. A mark was made on a 100-mm scale such that the far left endpoint corresponds to full acceptability and the far right endpoint equates to a not acceptability. All measurements of distance along the line in millimeters from left to right were performed afterwards.

B. Data Analysis

The results of each category were tabulated. Descriptive statistics were performed on the results of the VAS.

STUDY REPORT PR&D 0250801

8. ANIMAL MANAGEMENT

Animals were managed similarly and with due regard for their well being. Animals were handled in compliance with the relevant Meriel Animal Care and Use/Ethics Committee approvals, and/or any other, *e.g.*, national or local, applicable regulations and requirements.

A. Animal Identification

The animals were identified by means of unique alpha-numeric implanted transponders. Only the 5 last digits of their transponder were used as Animal ID.

B. Acclimation

Acclimation of the animals to the animal facility started on Day -5.

C. Animal Health

A physical examination was performed on each included dog by a veterinarian on Day -5. The animals were observed at least once daily for general health from the first day of acclimation to the end of the experimental phase. Following IVP treatment, animals were observed hourly at 1, 2, 3, 4 hours \pm 30 minutes (following the last treatment time) for adverse reactions to treatment.

D. Disease Control

Animals did not receive any vaccinations or other disease control measures after the start of acclimation.

E. Concurrent Medication

No concurrent medication was administered.

F. Euthanasia

No animal was euthanized.

G. Mortality/Post Mortem Collection

No animal died during the study.

H. Housing

Animals were group housed by 3 from Day-5 to Day-1 in pen of approximately 6m², and individually housed in pen of approximately 2 m² on Day 0 and 1 within Box B002 in the 108 building. Pens were cleaned with water everyday. During cleaning of pens on Day 0 and 1, each dog was interacted with and allowed to run in the mid corridor. The lighting was 12h light /12h dark.

When individually housed, dogs did not have contact with each other and all equipment used for an individual dog, *e.g.*, bowls, was reserved to that dog. All animals were housed approximately in the same manner.

I. Facility Diagram

A diagram of the housing facilities was included in the Raw Data.

J. Feed and Water

STUDY REPORT PR&D 0250801

Drinkable water was available *ad libitum* using nipple lickers. The source was the public supply from "nappe d'accompagnement de la rivière d'Ain" and was managed by Veolia (Genas, France). Feed (Eukanuba, Large Breed Puppy) was given once a day in amount calculated to maintain the animals in healthy physical state, as per Internal CRSV procedure.

K. Animal Disposition

All animal returned to CRSV colony following study completion.

9. SAMPLE MANAGEMENT

NA

10. DATA RECORDS

A. Raw Data

All original Raw Data pages were signed or initialed and dated by the responsible person(s), paginated, and identified with the PR&D study number. All original Raw Data are the property of Merial and will be retained and archived at Merial, 115 Transtech Drive, Room 337, Athens, GA 30601-1649, USA. An exact copy of the raw data was retained by Investigator at Merial SAS, CRSV, Building 010, PIPA, 1, allée des Cyprès, 01150 Saint-Vulbas, France.

B. Communication Logs

No contacts or communications occurred that resulted in a change in the documentation, design, conduct, or reporting of the study.

RESULTS AND DISCUSSION

Animal data are summarized in Table 1, treatment details are shown in Table 2. Cosmetic assessments are detailed in Tables 3, 4 and 5, respectively.

All the observers considered acceptable the visual aspect and the appreciation when touched of the hair coat for all dogs at all time points.

Appearance, Sensation and VAS assessments showed important variability between operators and within treatment groups.

There was no clear trend at 1 hour post-treatment between Treatment Groups.

At 4 hours post-treatment, dogs' coat was more seen as 'dry' and felt as 'sticky' in Treatment Groups 2 and 3, compare to the control group. Treatment Groups 2 and 3 were considered less acceptable than the control group with VAS of 12.3 and 17.4 on average compared to 3.3 in the control group.

At 24 hours post-treatment, Treatment Groups 2 was still considered less acceptable than the control group with VAS of 11.5 on average compared to 1.9 in the control group, while the Treatment Group 3 showed a VAS of 2.1.

No abnormal health observations were detected throughout the study including during hourly observations conducted for 4 hours immediately after treatment.

STUDY REPORT PR&D 0250801

Table 1. Animal details

Animal ID	Sex ¹	Bodyweight (kg) ²	Age (months) ³	Breed	Source
38775	M	10.5	3.8	Beagle	CRL ⁴
38789	M	8.2	3.8	Beagle	CRL
39421	M	7.6	3.1	Beagle	CRL
39488	M	7.7	3.1	Beagle	CRL
84576	M	6.2	3.2	Beagle	Harlan ⁵
84628	M	7.5	3.2	Beagle	Harlan

¹ M=male

² on Day 0, except for dogs ID 84576 and 38775, on Day1.

³ on Day 0

⁴ Charles Rivers= Charles River Laboratories, Les Oncins, 69210 Saint Germain sur l'Arbresle, France

⁵ Harlan= Harlan France SARL, 15 avenue Portes Occitanes, 03800 Gannat, France

Table 2. Treatment details

Animal ID	BW ¹ (kg)	Calc. dose ² (g)	Bottle weight (g) before trt ³	Bottle weight (g) after trt ³	Weight of product sprayed (g)	Dose (mg/kg)
38789	8.2	5.17	123.68	118.03	5.65	0.69
84628	7.5	4.72	118.03	112.18	5.85	0.78
39421	7.6	4.79	112.18	106.46	5.72	0.75
39488	7.7	4.85	106.46	101.33	5.13	0.67

¹ BW = Body weights from Day 0.

² Calc. dose = Calculated dose to be sprayed (BW*0.63).

³ Trt = treatment

STUDY REPORT PR&D 0250801

Table 3. Results of the cosmetic assessment at 1 hour post treatment

Animal ID	Trt Grp ¹	Obs. ²	Visual aspect ³				Appreciation when touched ³				VAS				
			Appearance ⁴				Sensation ⁵								Mean
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
38775	1		2	1	1	0	N	N	S	N	0	0	10	0	2.5
84576 ⁶	1		0	0	1	0	N	N	S	N	0	0	12	7	4.8
38789	2		0	0	0	0	N	N	N	N	0	0	3	0	0.8
84628 ⁶	2		2	1	0	2	N	S	N	S	0	15	2	30	11.8
39421	3		0	0	0	0	N	N	N	N	0	0	4	0	1.0
39488	3		0	0	0	0	O	S	N	N	0	16	5	0	5.3

¹Trt Grp= Treatment Group

²Obs= Observer ID (1, 2, 3, 4)

³for acceptability: all scores were 0 (i.e., acceptable)

⁴Appearance: 0=Normal, 1= Lackluster/dry; 2= Oily/wet

⁵Sensation: sensation when touched. N= normal; W= wet; S= sticky; Oi= Oily; O= other (hairs stuck together)

⁶One observer commented: hairs stuck together

Table 4. Results of the cosmetic assessment at 4 hours post treatment

Animal ID	Trt Grp ¹	Obs. ²	Visual aspect ³				Appreciation when touched ³				VAS				
			Appearance ⁴				Sensation ⁵								Mean
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
38775	1		0	0	0	1	O	N	N	S	0	0	4	17	5.3
84576	1		0	0	0	0	N	N	N	N	0	0	5	0	1.3
38789	2		0	1	0	1	O	S	N	S	9	25	3	36	18.3
84628	2		0	1	0	0	N	Oi	N	N	0	24	4	1	7.3
39421	3		0	1	0	1	N	S	N	S	5	25	4	36	17.5
39488	3		0	1	0	1	O	S	S	S	12	24	6	27	17.3

¹Trt Grp= Treatment Group

²Obs= Observer ID

³for acceptability: all scores were 0 (i.e., acceptable)

⁴Appearance: 0=Normal, 1= Lackluster/dry; 2= Oily/wet

⁵Sensation: sensation when touched. N= normal; W= wet; S= sticky; Oi= Oily; O= other (hairs stuck together)

Table 5. Results of the cosmetic assessment at 24 hours post treatment

Animal ID	Trt Grp ¹	Obs. ²	Visual aspect ³				Appreciation when touched ³				VAS				
			Appearance ⁴				Sensation ⁵								Mean
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
38775	1		0	0	0	0	O	S	N	N	0	10	2	2	3.5
84576	1		0	0	0	0	N	N	N	N	0	0	0	1	0.3
38789	2		0	0	0	1	O	S	N	S	10	21	1	30	15.5
84628	2		0	0	0	0	O	S	N	N	17	10	2	1	7.5
39421	3		0	0	0	0	O	N	N	N	6	0	1	6	3.3
39488	3		0	0	0	0	N	N	N	N	0	0	2	2	1.0

¹Trt Grp= Treatment Group

²Obs= Observer ID

³for acceptability: all scores were 0 (i.e., acceptable)

⁴Appearance: 0=Normal, 1= Lackluster/dry; 2= Oily/wet

⁵Sensation: sensation when touched. N= normal; W= wet; S= sticky; Oi= Oily; O= other (hairs stuck together)

Références bibliographiques



- [Abbot, 1978] M.M. Abbot & H.C. Van Ness. Théorie et application de la thermodynamique. Série Schaum, Mc Grawhill (1978).
- [Adamczyk, 2010] Z. Adamczyk, K. Sadlej, E. Wajnryb, M. Nattich, M. Ekiel-Jezewska, J. Blawdziewicz. Streaming potential studies of colloid, polyelectrolyte and protein deposition. *Advances in Colloid and interfaces* 153 (2010) 1-29.
- [Alvarez-Romàn, 2004] R. Alvarez-Romàn, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 99 (2004) 53–62.
- [Alyokhin, 2008] A. Alyokhin, M. Baker, D. Mota-Sanchez, G. Dively, and E. Grafius. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research* 85 (2008) 395–413.
- [Amonkar, 1970] S.V. Amonkar, E.L. Reeves. Mosquito Control with Active Principle of Garlic, *Allium sativum*. *Journal of Economic Entomology* 63 (1970)1173-1175.
- [Anadón, 2009] A. Anadón, M.R. Martínez-Larrañaga, M.A. Martínez. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 182 (2009) 7-20.
- [Antwi, 2008] F.B. Antwi, L.M. Shama, R.K.D. Peterson. Risk assessments for the insect repellents DEET and Picaridin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 51 (2008) 31-36.
- [Ansari, 1998] M.A. Ansari, N. Kapoor, V.P. Sharma. Relative efficacy of synthetic pyrethroid-impregnated fabric against mosquitoes under laboratory conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14 (1998) 406–409.
- [Aubry, 2009] J. Aubry, F. Ganachaud, J. P. C. Addad and B. Cabane, *Langmuir* 25 (2009) 1970-1979.
- [Asua, 2004] J.M. Asua. Emulsion polymerization: from fundamental mechanisms to process developments. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42 (2004) 1025–41.
- [Badolo, 2004] A. Badolo, E. Sanogo-Ilboudo, A.P. Ouédraogo, C. Costantini. Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop. Med. Int. Health* 9 (2004) 330-334.
- [Bangham, 1965] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13 (1965) 238-252.
- [Baroli, 2010] B. Baroli, Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 21–50.

- [Bismarck, 2000] A. Bismarck, J. Spinger, A.K. Mohanti, G. Hinrichsen, M.A. Khan. Characterization of several modified jute fibers using zeta-potential measurement. *Colloid and Polymer Science* 278 (2000) 229:235.
- [Bissinger, 2010] B.W. Bissinger, R.M. Roe. Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96 (2010) 63-79.
- [Blaney, 1986] W.M. Blaney, L.M. Schoonhoven, M.S.J. Simmonds. Sensitivity variations in insect chemoreceptors ; a review. *Cellular and Molecular Life Sciences* 42 (1986) 13-19.
- [Bodmeier, 1989] R. Bodmeier, H. Chen. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin ibuprofen, and ketoprofen. *Journal of Controlled Release* 10 (1989) 167–175.
- [le Bolay, 2009] N. Le Bolay, V. Santran, G. Dechambre, C. Combes, C. Drouet, A. Lamure, C. Rey. Production, by co-grinding in a media mill, of porous biodegradable polylactic acid-apatite composite materials for bone tissue engineering. *Powder Technology* 190 (2009) 89-94.
- [Brazel, 2004] C.S. Brazel, X. Huang. The Cost of Optimal Drug Delivery: Reducing and Preventing the Burst Effect in Matrix Systems. *Carrier-Based Drug Delivery*. Chapter 1, 267–282 Chapter DOI: 10.1021/bk-2004
- [Bolzinger, 2008] M.A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, H. Fessi, Y. Chevalier. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68 (2008) 446-451.
- [Boury, 2010]. M. Gonnet, L. Lethuaut, F. Boury. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release* 146 (2010) 276–290
- [Briançon, 1999] S. Briançon, H. Fessi, F. Lecomte. J. Lieto. Study of an original production process of nanoparticles by precipitation. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 13 (1999) 157-64.
- [Bronaugh, 1989] Bronaugh, Maibach. *Percutaneous absorption: mechanism methodology – drug delivery*. eds, Marcel Dekker, Inc (New York) 1989.
- [Bucolo, 2004] C. Bucolo, A. Maltese, F. Maugeri, B. Busà, G. Puglisi, R. Pignatello. Eudragit RL100 nanoparticle system for the ophthalmic delivery of cloricromene. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (2004) 841-846.
- [Cachero, 2008] S. Cachero, G. Jefferis. *Drosophila* olfaction: the end of stereotypy? *Neuron* 59 (2008) 843-845
- [Caroll, 2006] S.P. Carroll, J. Loye. PMD, a Registered Botanical Mosquito Repellent with Deet-Like Efficacy. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (2006) 507-514.
- [Caroll, 2008] J.F. Carroll, J.P. Benante, J.A. Klun, C.E. White, M. Debboun, J.M. Pound, W. Dheranetra. Twelve-hour duration testing of cream formulations of three repellents against *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology* 22 (2008) 144-151.

- [Charcosset, 2004] C. Charcosset, H. Fessi. Nouveau procédé de préparation de particules dont au moins la surface périphérique est de nature polymérique, mettant en œuvre un réacteur membranaire. WO 2006/067307.
- [Charcosset, 2006] C. Charcosset, A. El-Harati, H. Fessi. A membrane contactor for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Desalination* 200 (2006) 570-571.
- [Cheng, 1998] Y.H. Cheng, L. Illum, S.S. Davis. A poly(,-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *Journal of Controlled Release* 55 (1998) 203-212.
- [Choochote, 2007] W. Choochote, U. Chaithong, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, B. Tuetun, D. Champakaew, B. Pitasawat. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 78 (2007) 359-364.
- [Cilek, 2004] J.E. Cilek, J.L. Petersen, C.E. Hallmon. Comparative efficacy of IR3535 and deet as repellents against adult *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of American Mosquitoes Control Association* 20 (2004) 299–304.
- [Couvreur, 1993] P. Couvreur, F. Puisieux. Nanoparticles and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Deliv. Rev.* 10 (1993) 141–162.
- [Couvreur, 1995] P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux. Controlled drug-delivery with nanoparticles – current possibilities and future-trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 2–13
- [Cosimi, 2009] S. Cosimi, E. Rossi, P.L. Cioni, A. Canale. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research* 45 (2009) 125-132.
- [Costantini, 2004] C. Costantini, A. Badolo, E. Ilboudo-Sanogo. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 98 (2004) 644-652.
- [Cullander, 1992] C. Cullander, R.H. Guy. Visualization of iontophoretic pathway with confocal microscopy and the vibration probe electrode. *Solid State ionics* 53-56 (1992) 197-206.
- [Daniel, 2006] J.C. Daniel. In *Les latex Synthétiques : Elaboration, Propriétés, Applications*; Lavoisier, Ed., 2006.
- [Davis, 1985] E.E. Davis, Insect repellents : concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 22 (1985) 237-243.

- [Debboun, 2007] M. Debboun, S.P. Frances, D. Strickman. (2007) *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses*. CRC Press, Boca Raton, FL. M. Debboun, S.P. Frances, D. Strickman. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [Dekker, 2005] T. Dekker, M. Geier, R.T. Cardé. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *Journal of Experimental Biology* 208 (2005) 2963-2972.
- [Delgado, 2005] A.V. Delgado, F. Gonzales-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1753-1805.
- [Deparis, 2004] X. Deparis, B. Frere, M. Lamizana. Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellents for protection of French military troops in Côte d'Ivoire. *Journal of Medical Entomology* 41 (2004) 914-21.
- [de Filippis, 1995] P. De Filippis, G. Zingone, M. Gibellini, F. Rubessa, P. Rupena. Dissolution rates of different drugs from solid dispersions with Eudragit RS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 3 (1995) 5;265-271.
- [Derjaguin, 1934] B. Derjaguin. Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion. *Kolloid Z* 69 (1934)155-164.
- [Derjaguin, 1941] B.V. Derjaguin, L.D. Landau. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Acta physicochimica URSS* 14 (1941) 633-662.
- [Desai, 1966] S.J. Desai, P. Singh, A.P. Simonelli, W.I. Higuchi. Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in wax matrices III. Quantitative studies involving polyethylene plastic matrix. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55 (1966) 1230-1234.
- [Dick, 1997] I.P. Dick, P.J. Hunter, P.G. Blain, F.M. Williams. Usefulness of animal models in predicting human skin permeability for a series of chemicals of different lipophilicities. *Perspectives in Percutaneous Penetration* 5B (1997) 73-76.
- [Ditzen, 2008] M. Ditzen, M. Pellegrino L.B. Vossahl. Insect Odorant Receptors Are Molecular Targets of the Insect Repellent DEET. *Science* 28 (2008) 1838-1842.
- [Doak, 1999] R. Doak, R. Grisenti, S. Rehbein, G. Schmahl, J. Toennies. Towards Realization of an Atomic de Broglie Microscope: Helium Atom Focusing Using Fresnel Zone Plates. *Physical Review Letters* 83 (1999) 4229.
- [Domb, 1993] A.J. Domb. Sustained release formulations of insect repellent. US005221535 (1993).
- [Duane, 2006] T. Duane. *Insect ecology: an ecosystem approach*. Schowalter Academic Press. 2006.
- [Duchêne, 1998] D. Duchêne. *Cyclodextrines and their industrial uses*. Editions de santé (1987) Paris.

- [Dupuis, 1984] D. Dupuis, A. Rougier, R. Roguet, C. Lotte, G. Kalopissis. In vivo relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat. *Journal of Investigative Dermatology* 82 (1984) 353-356.
- [Eckersley, 1990] S.T. Eckersley, A. Rudin. *Journal of Coatings Technology* 62 (1990) 89-100.
- [EKA Application note] Application note EKA ElectroKinetic Analyzer. Anton Paar. Electrokinetic Properties of Natural Fibres. www.anton-paar.com
- [Egbaria, 1991] K. Egbaria, C. Ramachandran, N. Weiner, Topical application of liposomally entrapped cyclosporin evaluated by in vitro diffusion studies with human skin. *Skin Pharmacology* 4 (1991) 21– 28.
- [EPA, 2005] EPA 737-F-96-005 ; New Pesticide Fact Sheet – Picaridin ; United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2005.
- [Eshuis, 1991] A. Eshuis, H. J. Leendertse, D. Thoenes. Surfactant-free emulsion polymerization of styrene using crosslinked seed particles. *Colloid and Polymer Science* 269:1086-1089 (1991)
- [Eversole, 1941] W.G. Eversole, W.W. Boarman. *Journal of Chemical Physics* 9 (1941) 798.
- [Faulde, 2008] M. Faulde, J. Scharninghausen, M. Tisch. Preventive effect of permethrin-impregnated clothing to *Ixodes ricinus* ticks and associated *Borrelia burgdorferi* s.l. in Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 298 (2008) 321-324.
- [Feng, 2009] Y. Feng, S. Huang, F. Teng. Controlled Particle Size and Synthesizing Mechanism of Microsphere of Poly(MMA-BuMA) Prepared by Emulsion Polymerization. *Polymer Journal* 41 (2009) 266–271.
- [Fessi, 1989] H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55 (1989) R1-R4.
- [Fessi, 1992] H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. US Patent 593 522. 1992.
- [Fradin, 1998] M.S. Fradin. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. *Annals of Internal Medicine* 128 (1998) 931–940.
- [Franc, 2012] M. Franc, C. Genchi, E. Bouhsira, S. Warin, V. Kaltsatos, L. Baduel, M. Genchi. Efficacy of dinotefuran, permethrin, and pyriproxyfen combination spot-on for dogs against mosquitoes (*Aedes aegypti*). In press. *Veterinary Parasitology* (2012).
- [Frances, 2002] S.P. Frances, R.D. Cooper. Personal protection measures against mosquitoes: A brief history and current use of repellents by the Australian Defence Forces. *ADF Health* 3 (2002) 58-63.

- [Franz, 1975] T.J. Franz. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64 (1975) 190-195.
- [Franz, 1978] T.J. Franz. Finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr Prob Dermatol* 7 (1978) 58-68.
- [Gan, 2007] Q. Gan, T. Wang. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59 (2007) 24–34.
- [Ganachaud, 1998] F. Ganachaud, B. Bouali, L. Veron, P. Lanteri, A. Elaissari, C. Pichot. Surface characterization of amine-containing latexes by charge titration and contact angle measurement. *Colloids and surfaces. A Physicochemical and engineering aspects*. 137 (1998) 141-154.
- [Gardiner, 1988] C.H. Gardiner, R. Fayer, J.P. Dubey. *An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues*. Washington, DC: USDA/ARS, Agriculture Handbook 651 p.3.
- [Gao, 2002] J. Gao, A. Penlidis. Mathematical modeling and computer simulator/database for emulsion polymerizations. *Progress in Polymer Science* 27 (2002) 403-535.
- [Garson, 1968] L.R. Garson, M.E. Winnike. Relationships between insect repellency and chemical and physical parameters-a review. *Journal of Medical Entomology* 3 (1968) 339–352.
- [Gillij, 2008] Y.J. Gillij, R.M. Gleiser, J.A. Zygadlo. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (2008) 2507-2515.
- [Glenn, 1996] D.W. Glenn, J.A. Pickett, D.W.M. Smiley. The aphid sex pheromone cyclopentanoids: Synthesis in the elucidation of structure and biosynthetic pathways. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1996) 351-361.
- [Goodwin, 1979] J.W. Goodwin, J. Hearn, C.C. Ho, R.H. Ottewill. *Colloid Polym Sci* 257 (1979) 61-69.
- [Grazú, 2012] V. Grazú, M. Moros, C. Sánchez-Espinel Chapter 14 - Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances. *Frontiers of Nanoscience* 4 (2012) 337-440.
- [Gubler, 1998] D.J. Gubler Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging Infections* 4 (1998) 442-450.
- [Hadani, 1977] A. Hadani, M. Ziv, Y. Rechav. A laboratory study of tick repellents. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 22 (1977) 53–59.
- [Harkins, 1947] W.D. Harkins. A general theory of the mechanism of emulsion polymerization. *Journal of the American Chemical Society* 69 (1947) 1428-1444.
- [Haznedar, 2004] S. Haznedar, B. Dortunç. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 269 (2004) 131-140.

- [Hebeish, 2008] A. Hebeish, M.M.G. Fouda, I.A. Hamdy, S.M. El-Sawy, F.A. Abdel-Mohdy. Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymer* 74 (2008) 268–273.
- [Hekmat-Safe, 1997] D.S. Hekmat-Safe, R.A. Steinbrecht, J.R. Carlson. Coexpression of two Odorant-binding protein homologs in *Drosophila*: implications for olfactory coding. *Journal of Neuroscience* 17 (1997) 1616-1624.
- [Higuchi, 1963] T. Higuchi. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52 (1963) 1145-1149.
- [Hixson, 1931] A.W. Hixson, J.H. Crowell. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation (I) theoretical consideration. *Industrial and Engineering Chemistry* 23 (1931) 923-931.
- [Holl, 2006] Y. Holl, Y. In *Les Latex Synthétiques : Elaboration, Propriétés, Applications*, 2006
- [Holt, 2002] R.A. Holt, M.G. Subramanian, A. Halpern. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298 (2002) 129-149.
- [Honeywell-Nguyen, 2004] P.L. Honeywell-Nguyen, G.S. Gooris, J.A. Bouwstra. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 123 (2004) 902-910.
- [Hunter, 1981] Hunter, R.J., 1981. *Zeta potential in colloid science*. Academic Press, London.
- [Iskan, 2005] Y. Iskan, S.A. Wissing, S. Hekimoglu, S.H. Müller. Solid lipid nanoparticles (SLN) for topical drug delivery: incorporation of the lipophilic drugs *N,N*-diethyl-*m*-toluamide and vitamin K. *Pharmazie* 60 (2005) 905–909.
- [Islam, 1995] A.M. Islam, B.Z. Chowdhry, M.J. Snowden. Heteroaggregation in colloidal dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science* 62 (1995) 109-136.
- [ISO13321, 1996] International Standard ISO13321 (1996) Methods for determination of particle size distribution part 8: photon correlation spectroscopy. International Organization for Standardization (ISO)
- [Jacobasch, 1984] H.J. Jacobasch, *Oberflächenchemie Faserbildender Polymerer*, Akademie-Verlag, Berlin, 1984.
- [Jacobasch, 1985] H. Jacobasch, G. Baubck, J. Schurz. Problems and results of Zeta-potential measurements on fibers. *Colloid and polymer science* 263 (1985) 3-24.
- [Jacobi, 2003] U. Jacobi, N. Meykadeh, W. Sterry, J. Lademann. Effect of the vehicle on the amount of stratum corneum removed by tape stripping. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 1 (2003) 884–889.

- [Jalon, 2001] E.G. de Jalon, M.J. Blanco-Prieto, P. Ygartua, S. Santoyo, PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 226 (2001) 181–184.
- [Jefferis, 2005] G.S. Jefferis. Insect olfaction: a map of smell in the brain. *Current Biology* 15 (2005) 668-670.
- [Kalimuthu, 2009] S. Kalimuthu, A.V. Yadav. Formulation and Evaluation of Carvedilol loaded Eudragit e 100 Nanoparticles. *International Journal of PharmTech Research* 1 (2009) 179-183.
- [Kaliyaperumal, 2009] K. Kaliyaperumal, S. Sabesan. Relative efficacy of repellent-treated wristbands against three major mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of disease, under laboratory conditions. *International Health* 1 (2009) 173-177.
- [Kanamaru, 1960] K. Kanamaru, *Kolloid-Z.* 168 (1960) 115.
- [Kapoor, 2003] N. Kapoor, M.A. Ansari. Laboratory evaluation of synthetic pyrethroid treated cotton fabric against mosquitoes and other domestic pests. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology* 26 (2003) 20–25.
- [Karunamoorthi, 2009] K. Karunamoorthi, S. Sabesan. Field trials on the efficacy of DEET-impregnated anklets, wristbands, shoulder, and pocket strips against mosquito vectors of disease. *Parasitology Research* 105 (2009) 641-645.
- [Kasting, 2008] G.B. Kasting, D.V. Bhatt, Tycho J. Microencapsulation decreases the skin absorption of N,N-diethyl-*m*-toluamide (DEET). *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 548–552.
- [Katahira, 1999] N. Katahira, T. Murakami, S. Kugai, N. Yata, M. Takano, Enhancement of topical delivery of a lipophilic drug from charged multilamellar liposomes. *Journal of Drug Targeting* 6 (1999) 405–414.
- [Katritzky, 2006] A.R. Katritzky, D.A. Dobchev, I. Tulp, M. Karelson, D.A. Carlson. QSAR study of mosquito repellents using Codessa Pro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 (2006) 2306-2311.
- [Kawashima, 1989] Y. Kawashima, T. Niwa, T. Handa, H. Takeuchi, T. Iwamoto, K. Itoh. Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *Journal of Pharmaceutical Science* 78 (1989) 68-72.
- [Kligman, 1963] A.M. Kligman, E. Christophers. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Archives of Dermatology* 88 (1963) 702-705.
- [Klun, 2006] J.A. Klun, A. Khirman, E. Rowton, M. Kramer, M. Debboun. Biting deterrent activity of a deet analog, two DEPA analogs, and SS220 applied topically to human volunteers compared with deet against three species of blood-feeding flies. *J Med Entomol.* 6 (2006) 1248-51.
- [Knox, 1972] P.C. Knox, H.L. Hays. Attraction of *Tabanus* spp. (Diptera: Tabanidae) to Traps Baited with Carbon Dioxide and Other Chemicals. *Environmental Entomology* 1 (1972) 323-326.

- [Kohli, 2004] A.K. Kohli, H.O. Alpar. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *International journal of pharmaceutics* 275 (2004) 13-17.
- [Kuehn, 1986] N. Kuehn, H.J. Jacobasch, K. Lunkenheimer. Zum Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkd zwischen Wassen und festen Polymeren und ihrem Zeta-potential gegenüber wäbrigen Lösungen. *Acta Polymerica* 37 (1986) 394-396.
- [Lademann, 2004] J. Lademann, H. Schaefer, N. Otberg, A. Teichmann, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, Penetration of microparticles into human skin. *Hautarzt* 55 (2004) 1117–1119.
- [Lademann, 2006] J. Lademann, H. Richter, U.F. Schaefer, U. Blume-Peytavi, A. Teichmann, N. Otberg, W. Sterry. Hair follicles – a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology* 19 (2006) 232–236.
- [Lademann, 2007] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, R. Wepf, W. Sterry. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (2007) 159-64.
- [Lademann, 2008] J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, C. Antoniou, W. Sterry, A. Patzelt. Hair follicles-an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. *Skin Pharmacology and Physiology* 21 (2008) 150-155.
- [Lademann, 2009] J. Lademann, U. Jacobi, C. Surber, H.J. Weigmann, J.W. Fluhr. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2009) 317-323.
- [Lademann, 2011] J. Lademann, H. Richter, S. Schanzer, F. Knorr, M. Meinke, W. Sterry, A. Patzelt. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77 (2011) 465-468.
- [Langer, 1998] R. Langer, Drug delivery and targeting. *Nature* 392 (1998) 5-10.
- [Lasch, 1991] J. Lasch, R. Laub, W. Wohlrab, How deep intact liposomes penetrate into human skin? *Journal of Controlled Release* 18 (1991) 55- 58
- [lecrat.org, 2012] Centre de Référence sur les agents thératogènes. Protection contre les piqûres de moustiques et de tiques chez la femme enceinte. www.lecrat.org consulté le 29 mai 2012.
- [Liu, 2004] J. Liu, Y. Xiao and C. Allen, Polymer–drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004), pp. 132–143.
- [Lockman, 2002] P.R. Lockman, R.J. Mumper, M.A. Khan, D.D. Allen. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28 (2002) 1-13.

- [Lopez, 2000] R.F. Lopez, J.H. Collett, M.V. Bentley. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *International Journal of Pharmaceutics* 200 (2000) 127-32.
- [Lotte, 1997] C. Lotte, R.S. Hinz, A. Rougier, R.H. Guy. A reconstructed skin model (Testskin LSE) for permeation studies. In Brain KR, V.J. James, K.A. Walters, eds. *Perspectives in Percutaneous Penetration*. Vol. 5a. Cardiff:STS Publishing, p61, 1997.
- [Machida, 2008] H. Machida, T. Kondo, K. Kanehira, I. Hagimori, T. Kamio. The inhibitory effect of a combination of imidacloprid and permethrin on blood feeding by mosquitoes in dogs raised under outdoor conditions. *Veterinary Parasitology* 154 (2008) 318-324.
- [Maguranyi, 2009]. S.K. Maguranyi, C.E. Webb, S. Mansfield, R.C. Russell. Are Commercially Available Essential Oils from Australian Native Plants Repellent to Mosquitoes? *Journal of the American Mosquito Control Association* 25 (2009) 292-300.
- [Maji, 2007] T.K. Maji, I. Baruah, S. Dube, M.R. Hussain. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application *Bioresource Technology* 98 (2007) 840–844.
- [Mark, 2002] S. Mark. M.D. Fradin, F. John. Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. *The New England Journal of Medicine* 347 (2002)13-18.
- [Marks, 1971] R. Marks, R.P. Dawber. Skin surface biopsy: an improved technique for the examination of the horny layer. *British Journal of Dermatology* 84 (1971) 117-123.
- [Medvedev, 1959] S.S. Medvedev. *International Symposium on Macromolecular Chemistry*, 174-190. Pergamon Press, New York, 1959.
- [Meidan, 2005] V.M. Meidan, M.C. Bonner, B.B. Michniak. Transfollicular drug delivery-is it a reality? *International Journal of Pharmaceutics* 306 (2005) 1-14
- [Mendonça, 2005] F.A.C. de Mendonça, K.F.S. da Silva, K.K. dos Santos, K.A.L.R. Júnior, A.E.G. Sant’An. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76 (2005) 629-636.
- [Mogens, 2005] J. Mogens, A.M. Pretorius, F. Clarke, B. Myrvang. Repellent efficacy of four commercial DEET lotions against *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), the principal vector of *Rickettsia africae* in southern Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99 (2005) 708-711.
- [Moinard-Checot, 2006] D. Moinard-Checot, Y. Chevalier, S. Briançon, H. Fessi, S. Guinebrière. Nanoparticles for drug delivery: review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. *J Nanosci Nanotechnol.* 6 (2006) 2664-81.

- [Mombaerts, 1999] P. Mombaerts. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286 (1999) 707-711.
- [Monterio-Riviere, 2010] N.A. Monteiro-Riviere, B. Baroli, Nanomaterial penetration, in: N.A. Monteiro-Riviere (Ed.), *Toxicology of the Skin*, Informa Healthcare USA, Inc., New York, NY, 2010, pp. 333–346.
- [Montenegro, 1996] L. Montenegro, J. Ademola, F. Bonina, H. Maibach, Effect of application time of betamethasone-17-valerate 0.1% cream on skin blanching and stratum corneum drug concentration. *International Journal of Pharmaceutics* 1140 (1996) 51-60.
- [Mora-Huertas, 2010] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385 (2010) 113-142
- [Mora-Huertas, 2011] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science* 163 (2011) 90-122
- [Mora-Huertas, 2012] C. E. Mora-Huertas, O. Garrigues, H. Fessi, A. Elaissari. Nanocapsules prepared *via* nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80 (2012) 235-239.
- [Müller, 2000] R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 161-177.
- [Najib, 1985] N. Najib, Suleiman. The kinetics of drug release from ethyl cellulose solid dispersions. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 11(1985) 2169-2189.
- [Naucke, 2006] T.J.. Naucke, S. Lorentz, H.W. Grunewald. Laboratory testing of the insect repellents IR3535® and DEET against *Phlebotomus mascittii* and *P. duboscqi* (Diptera: Psychodidae) *International Journal of Medical Microbiology* 296 (2006) 230-232.
- [Nestorović, 2010] J. Nestorović, J. Mišić, B. Šiler, M. Soković, J. Glamočlija, A. Ćirić, V. Maksimović, D. Grubišić. Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 81 (2010) 621–626.
- [Niemiec, 1997] S.M. Niemiec, J.M. Latta, C. Ramachandran, N.D. Weiner, B.J. Roessler, Perifollicular transgenic expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein following topical application of novel liposome-plasmid DNA formulations in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (1997) 701– 708.
- [Nuchuchua, 2009] O. Nuchuchua, U. Sakulku, N. Uawongyart, N. Puttipipatkachorn, A. Soottitantawat, U. Ruktanonchai. In Vitro Characterization and Mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent Activity of Essential-Oils-Loaded Nanoemulsions. *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 1234-1242.

- [OMS, 2007] OMS, 2007. Lutte contre la leishmaniose. Rapport du secrétariat, soixantième assemblée mondiale de la santé. -Genève : OMS : 1-5
- [Otranto, 2009] D. Otranto, F. Dantas-Torres, E. B. Breitschwerdt. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Parasitology* 25 (2009) 228-235.
- [Ouzineb, 2005] K. Ouzineb, C. Graillat, T.F. McKenna, High-solid-content emulsions. V. Applications of miniemulsions to high solids and viscosity control. *Journal of Applied Polymer Science*. 97 (2005) 745–752
- [Pandey, 1989] R. Pandey, A. Zahoor, S. Sharma, G.K. Khuller. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis* 83 (2003) 6; 373–378.
- [Park, 2005] B.S. Park, W.S. Choi, J.H. Kim, K.H. Kim, S.E. Lee. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21 (2005) 80-83.
- [Paulini, 1954] E. Paulini, I. Ricciardi. The repellent effect of pyrethrin vapour to *Culex fatigans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 48 (1954) 276-277.
- [Pellegrino, 2011] M. Pellegrino, N. Steinbach, M. C. Stensmyr, B. S. Hansson, L. B. Vosshall. A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. *Nature* 478 (2011) 511-514.
- [Peppas, 1985] N.A. Peppas. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 60 (1985) 110-111.
- [Peppas, 1996] N. A. Peppas, L. Brannon-Peppas. Controlled release of fragrances from polymers : I. Thermodynamic analysis. *Journal of Controlled Release* 40 (1996) 245-250.
- [Peppas, 2004] N.A. Peppas. Intelligent therapeutics: biomimetic systems and nanotechnology in drug delivery. *Adv Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1529–1531.
- [Pichot, 2006] C. Pichot. In *Les latex synthétiques : Elaboration, Propriétés, Applications*; Lavoisier, Ed., 2006.
- [Pignatello, 2002] R. Pignatello, C. Bucolo, P. Ferrara, A. Maltese, A. Puleo, G. Puglisi. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16 (2002) 53-61.
- [Polakoviča, 1999] M. Polakoviča, T. Görnerb, R. Greffb, E. Dellacherieb. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres: II. Modelling of drugrelease *Journal of Controlled Release* 60 (1999) 169-177.
- [Pollmeier, 2004] M. Pollmeier, G. Pengo, M. Longob, P. Jeannin. Effective treatment and control of biting lice *Felicola subrostratus* (Nitzsch in Burmeister, 1838), on cats using fipronil formulations. *Veterinary Parasitology* 121 (2004) 157-165.
- [Potts, 1992] R. Potts, R. Guy. Predicting Skin Permeability. *Pharmaceutical Research* 9 (1992) 663-669.

- [Pretorius, 2003] A.M. Pretorius, M. Jensenius, F. Clarke, S.H. Ringertz. Repellent efficacy of DEET and KBR 3023 against *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 40 (2003) 245-248.
- [Prow, 2011] T. W. Prow, J. E. Grice, L. L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E. M.T. Wurm, C. Yoong, T. A. Robertson, H. P. Soyer, M. S. Roberts. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 470-491
- [Pushpanatha, 2006] T. Pushpanathan, A. Jebanesan, M. Govindarajan. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae). *Tropical biomedicine* 23 (2006) 208-212.
- [Quintanar-Guerrero, 1996] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allémann, E. Doelker. Influence of stabilizing agents and preparatives variables on the formation of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 143 (1996) 133-141.
- [Quintanar-Guerrero, 1999] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International Journal of Pharmaceutics* 188 (1999) 155-64.
- [Qiu, 1998] H. Qiu, J.W. McCall, H. Won Jun. Formulation of topical insect repellent N,N-diethyl-*m*-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation *International Journal of Pharmaceutics* 163 (1998) 167-176.
- [Routh, 1999] A.F. Routh, W.B. Russel. A process model for latex film formation: Limiting regimes for individual driving forces. *Langmuir* 15(1999) 7762-7773.
- [Ranaldo, 2006] A.M. Ranaldo, S. Nesti, L. Corsi. Inclusion complex between a cyclodextrin derivative and a repellent substance towards harmful and/or bothering insects, formulations and uses thereof. WO2006077604.
- [Ranstam, 2001] J. Ranstam. Garlic as a tick repellent. *Journal of the American Medical Association* 285 (2001) 1-42.
- [Ribitsch, 1988] V. Ribitsch, C. Jorde, J. Schurz, H.J. Jacobasch. Measuring the zeta potential of fibers, films and granulates. *Progress in Colloid & Polymer Science* 77 (1988) 49-54.
- [Ritger, 1987] P.L. Ritger, N.A. Peppas. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 5 (1987) 37-42.
- [Robbins, 2012] C.R. Robbins. Chemical Composition of Different Hair Types. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* (2012) 105-176.

- [Roberts, 2002] M.S. Roberts, S.E. Cross, M.A. Pellett, Skin transport, in: K.A. Walters (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 2002, pp. 89–195
- [Rolland, 1993] A. Rolland, N. Wagner, A. Chatelus, B. Shroot, H. Schaefer, Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research* 10 (1993) 1738–1744.
- [Romi, 2005] R. Romi, P. Lo Nostro, E. Bocci, F. Ridi, P. Baglioni. Bioengineering of a Cellulosic Fabric for Insecticide Delivery via Grafted Cyclodextrin. *Biotechnology Progress* 6 (2005) 1724-1730.
- [Rowe, 2006] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, fifth ed., Pharmaceutical Press, Great Britain, 2006.
- [Runkel, 2003] Runkel F. Insect Repellent. US20036576223 (2003).
- [Sakamoto, 2010] J.H. Sakamoto, A.L. van de Ven, B. Godin, E. Blanco, R.E. Serda, A. Grattoni, A. Ziemys, A. Bouamrani, T. Hu, S.I. Ranganathan, E. De Rosa, J.O. Martinez, C.A. Smid, R.M. Buchanan, S.Y. Lee, S. Srinivasan, M. Landry, A. Meyn, E. Tasciotti, X. Liu, P. Decuzzi, M. Ferrari. Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmaceutical Research* 62 (2010) 57-89.
- [Sakulku, 2009] U. Sakulku, O. Nuchuchua, N. Uawongyart, S. Puttipipatkachorn, A. Soottitantawat, U. Ruktanonchai. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 372 (2009) 105-111.
- [Salafsky, 1999] B. Salafsky, K. Ramaswamy, Y.X. He, J. Li, T. Shibuya. Development and evaluation of lipodeet, a new long-acting formulation of N,N-diethyl-*m*-toluamide (DEET) for the prevention of schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61 (1999) 743-750.
- [Sangha, 2010] G.K. Sangha. Chapter 101 - Toxicology and Safety Evaluation of the New Insect Repellent Picaridin (Saltidin) *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* (2010) 2219-2230.
- [Sant, 2005] S. Sant, V. Nadeau. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 107 (2005) 203-214.
- [Sbaï, 2004] M. Sbaï. Détermination du potentiel électrocinétique demembranes poreuses: mesure tangentielle et transmembranaires. Université de Franche-Comté (France). Thèse soutenue en 2004.
- [Schaefer, 1990] H. Schaefer, F. Watts, J. Brod, B. Illel. Follicular penetration. In: Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J. (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration. Methods, Measurements, Modelling*, 163. IBC Technical Services, London (1990) p. 732.
- [Schaefer, 2001] H. Schaefer, J. Lademann, The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14 (2001) 23-27.

- [Schoenig, 2001] G.P. Schoenig, T.G. Osimitz. DEET, second ed., Krieger RI. Handbook of pesticide toxicology, San Diego: Academic Press (2001) 1439–1459.
- [Schnieder, 2007] T. Schnieder, A. Jansson, K.A. Jensen, V. Kristjansson, M. Luotamo, O. Nygren, K. Savolainen, V. Skaug, Y. Thomassen, A. Tossavainen, T. Tuomi, H. Wallin. Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, TemaNord 581 (2007).
- [Schneider, 2009] M. Schneider, F. Stracke, S. Hansen, U.F. Schaefer. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier, *Dermatoendocrinology* 1 (2009) 197-206
- [Schreck, 1977] C.E. Schreck. Techniques for the evaluation of insect repellents: a critical review, *Annual Review of Entomology* 22 (1977) 101-119.
- [Schreck, 1995] C.E. Schreck, D. Fish, T.P. McGovern. Activity of repellents applied to skin for protection against *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of American Mosquito Control Association* 11(1995) 136-140.
- [Schwarb, 1999] F.P. Schwarb, B. Gabard, T. Rufli, C. Surber. Percutaneous absorption of salicylic acid in man after topical administration of three different formulations. *Dermatology* 198 (1999) 44-51.
- [Shim, 2004] J. Shim, H.S. Kang, W. Park, S. Han, J. Kim, I. Chang. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 97 (2004) 477–84.
- [Siepmann, 2000] J. Siepmann, N.A. Peppas. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the sequential layer model). *Pharmaceutical Research* 17 (2000) 1290-1298.
- [Smith, 1954] C.N. Smith, M.M. Cole, I.H. Gilbert, H.K. Gouck. Field tests tick repellents-1949, 1950 and 1952. *Journal of Economic Entomology* 47 (1954) 13-19.
- [Smoluchowski, 1921] M. Smoluchowski. *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus*, Band II, Barth-Verlag, Leipzig, 1921.
- [Solomon, 2012] B. Solomon, F.F. Sahle, T. Gebre-Mariam, K. Asres, R.H.H. Neubert. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80 (2012) 61-66.
- [Song, 2006] J.S. Song, F. Tronc, M. A. Winnik. Monodisperse, controlled micron-size dye-labeled polystyrene particles by two-stage dispersion polymerization. *Polymer* 47 (2006) 817–825.
- [Sood, 2004] A. Sood, Particle size distribution control in emulsion polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* 92 (2004) 2884–2902.
- [Sood, 2010] A. Sood. Increasing PVAc emulsion polymerization productivity – an industrial application. *Indian journal of chemical technology* 17 (2010) 34-42.

- [Specos, 2010] M.M.M. Specos, J.J. García, J. Tornesello, P. Marino, M.D. Vecchia, M.V.D. Tesoriero, L.G. Hermida. Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104 (2010) 653-658.
- [Stinecipher, 1998] J. Stinecipher, J. Shah. Percutaneous. Permeation of the *meta*, *ortho* and *para* isomers of N,N-diethyltoluamide. *International Journal of Pharmaceutics* 160 (1998) 31-41.
- [Stjernberg, 2000] L. Stjernberg, J. Berglund. Garlic as an Insect Repellent. *Journal of the American Medical Association* (2000) 284-831.
- [Strauss, 1989] G. Strauss. Liposomes: from theoretical model to cosmetic tool. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 40 (1989) 51-60.
- [Sugimoto, 2000] T. Sugimoto. In *Fine particles Synthesis, characterization and mechanisms of growth*; Inc., M. D., Ed.: New-York, 2000; Vol. 92.
- [Surber, 2001] C. Surber, F. Schwarb, E. Smith. Tape-stripping technique. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 20 (2001) 461-474.
- [Suryanarayana, 1991] M.V.S. Suryanarayana, K.S. Pandey, S. Prakash, C.D. Raghuvveran, R.S. Dangi, R.V. Swamy, K.M. Rao. Structure-activity relationship studies with mosquito repellent amides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 80 (1991) 1055-1057.
- [Szjetli, 1998] J. Szjetli. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* 98 (1998) 1743-1753.
- [Szymczyk, 2002] A. Szymczyk, P. Fievet. Characterization of electrical properties of membrane pore walls, in *Récent developments in colloids and interface research*. *Comptes Rendus Chimie* 5 (2002). 493-505.
- [Tang, 2011] J. Tang, N. Xu, H. Ji, H. Liu, Z. Wang, L. Wu. Eudragit nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *International Journal of Nanomedicine* 6 (2011) 2429-2435.
- [Teichmann, 2005] A. Teichmann, U. Jacobi, M. Ossadnik, H. Richter, S. Koch, W. Sterry, J. Lademann. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 125 (2005) 264-269.
- [Tiagy, 1998] B.K. Tyagi, A.K. Shahi, B.L. Kaul, Evaluation of repellent activities of *Cymbopogon* essential oils against mosquito vectors of Malaria, Filariasis and Dengue Fever in India. *Phytomedicine* 5 (1998) 324-329.
- [Tiawsirisup, 2007] S. Tiawsirisup, S. Nithiuthai, M. Kaewthamasorn. Repellent and adulticide efficacy of a combination containing 10% imidacloprid and 50% permethrin against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Parasitology Research* 101 (2007) 527-531.
- [Trigg, 1996] J.K. Trigg. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. *Journal of the American Mosquito Control Association* 12 (1996) 243-246.
- [Trongtokit, 2005] Y. Trongtokit, R. Yupha, K. Narumon, A. Chamnarn. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research* 19 (2005) 303-309.

- [Ubrich, 2005] N. Ubrich, C. Schmidt, R. Bodmeier, M. Hoffman, P. Maincent. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 288 (2005) 169-175.
- [van den Bergh, 1999] B.A. van den Bergh, J. Vroom, H. Gerritsen, H.E. Junginger, J.A. Bouwstra. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461 (1999) 155-173.
- [Vemuris, 1995] S. Vemuris, C.T. Rhodes. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70 (1995) 95-111.
- [Verma, 2009] M. Verma, S. Satyawati, P. Rajendra. Biological alternatives for termite control: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (2009) 959-972.
- [Verrecchia, 1995] T. Verrecchia, G. Spenlehauer, D.V. Bazile, A. Murry-Brelier, Y. Archimbaud, M. Veillard. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *Journal of Controlled Release* 36 (1995) 49-61.
- [Verwey, 1947] E.J.W. Verwey, J. Overbeek. Th. G. (1947): "Theory of the stability of lyophobic colloids", Elsevier Publishing Company.
- [Villier, 2009] M.M. de Villiers, P. Aramwit; G.S. Kwon. Nanotechnology in Drug Delivery, *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*. (2009) 662 p. 180 illus., 29 in color.
- [Vogt, 2006] A. Vogt, B. Combadiere, S. Hadam, K.M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer *et al.* 40 nm, but not 750 or 1500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 126 (2006) 1316-1322.
- [Wayland, 1991] J. Wayland, J. Hayes, R. Edward. *Handbook of pesticide Toxicology*. 1991.
- [Ware, 1978] G.W. Ware. *The pesticide book*. San Fransisco, Freeman, 1978
- [Wertz, 1989] P.W. Wertz, D.T. Downing. Integral lipids of mammalian hair. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 92 (1989) 759-761
- [Whang, 2008] H.S. Whang, A. Tonelli. Release characteristics of the non-toxic insect repellent 2-undecanone from its crystalline inclusion compound with α -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 62 (2008) 127–134.
- [WHO, 1981] World Health Organization Instructions for the bioassay of insecticidal deposits on wall surfaces. WHO/VBC/81.5, 1981.
- [WHO, 1998] WHO - Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, (1998). Bioefficacy and persistency of insecticides on treated surfaces. Report of the WHO informal consultation, September 28–30, 1998. Geneva, World health Organization.

- [Winnik, 1992] M.A. Winnik, Y.C. Wang. Haley, F. *Journal of Coatings Technology* 1992, 64, 51-61.
- [Xia, 2006] Y. Xia, L.J. Zwiebel. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile Virus mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (2006) 169-176.
- [Yoo, 2011] J.W. Yoo, N. Giri, C.H. Lee. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 403 (2011) 262-267.
- [Young, 1998] G.D. Young, S. Evans. Safety and efficacy of DEET and permethrin in the prevention of arthropod attack. *Military Medicine* 163 (1998) 324–330.
- [Thickett, 2007] S.C. Thickett, R.G. Gilbert. Emulsion polymerization: state of the art in kinetics and mechanisms. *Polymer* 48 (2007) 6965-6991.
- [WHO, 2009] World Health Organization. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. (2009) WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4
- [Wiese, 1970] G.R. Wiese, T.W. Healy. Effect of particle size on colloid stability. *The Royal Society of Chemistry* 66 (1970) 490:499.
- [Wolf, 1940] J. Wolf. Das Oberfiachenrelief der menschlichen Haut. *Zeitschr. f. mikr.-anat. Forschung* 47 (1940) 351-400.
- [Wu, 2006] K.S. Wu, W.W. Van Osdol, R.H. Dauskardt. Mechanical properties of human stratum corneum: effects of temperature, hydration, and chemical treatment. *Biomaterials* 27 (2006) 785-795.
- [Zambaux, 1998] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release* 50 (1998)31-40.
- [Zhang, 2004] J. Zhang, Y. Cao, Y. He. Ultrasonically irradiated emulsion polymerization of styrene in the presence of a polymeric surfactant. *Journal of Applied Polymer Science* 94 (2004) 763-768.
- [Zhang, 2007] L. Zhang, C. Zhang, G.M. Li. Synthesis and properties of copolymer microemulsions of siloxane and acrylate with a high solid content. *Journal of Applied Polymer Science* 104 (2007) 851–857.

Exposition Thèse's art



40 ans de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (Mai 2011)

« These's art - 40 jours d'exposition pour les 40 ans de Lyon 1 : nos thésards, notre avenir »



Photo réalisée par Marie Noëlle Taine et exposée sur le domaine de Rockefeller, Lyon.

These's
art



<http://40ans.univ-lyon1.fr/>





Répulsifs d'arthropodes à durée d'action prolongée pour l'industrie vétérinaire Étude Pharmacotechnique, Devenir *in situ* et Efficacité

Résumé : Les répulsifs sont des molécules naturelles ou synthétiques dont le but est d'empêcher l'approche des arthropodes afin de prévenir la transmission de maladies vectorisées. Un exemple type est celui de la transmission de *Leishmania infantum* responsable de la Leishmaniose canine, qui est contractée après la piqûre d'un chien par un phlébotome. Divers répulsifs d'arthropodes sont commercialisés pour une application topique, ils ont tous une durée d'action courte, imposant des applications répétées de formulations basiques de type solution. La formulation de molécules actives à propriétés répulsives incorporées dans des systèmes nanoparticulaires et présentant une action prolongée dans le temps a été retenue. Les nanoparticules sont des vecteurs colloïdaux intéressants dans le domaine de la technologie pharmaceutique vu leur capacité à former des complexes avec des molécules hydrophobes, telles que la plupart des molécules répulsives (DEET, Picaridin[®], IR3535[®]...). Le ciblage, la protection contre la dégradation et le contrôle de la libération sont les avantages principaux apportés par les nanoparticules contenant une matière active. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (taille et potentiel zêta) permettant leur stockage dans les couches supérieures de la peau et une accroche le long des fibres pileuses ont été déterminées. Ainsi des nanoparticules cationiques de 200 nm de diamètre ont été formulées. Cette formulation originale inspirée du procédé de nanoprécipitation a permis l'obtention en une seule étape de suspensions concentrées en matière active (concentration supérieure à 10%) et sans ajout d'agents stabilisants. Une corrélation entre les profils de libération et l'efficacité sur insecte modèle (la drosophile) a été vérifiée. De ce fait, le pourcentage en polymère régule la libération de la molécule active encapsulée. Une efficacité répulsive de formulations nanoparticulaires supérieure à 15 jours a été validée expérimentalement. La transposition d'échelle du procédé de nanoprécipitation permet d'envisager un développement industriel pour la formulation d'un répulsif d'arthropode innovant à longue durée d'action.

Mots clés : Répulsif d'arthropode, espèce canine, maladies vectorielles, nanoparticule polymérique, nanoprécipitation, industrialisation.

Arthropod repellent having a long lasting effect for the veterinary industry Pharmacotechnic investigation, *In situ* fate and Effectiveness

Abstract: The repellents are natural or synthetic molecules whose aim is to prevent the approach of arthropods to avoid transmission of vector-borne diseases. A typical example is the transmission of *Leishmania infantum* responsible for canine Leishmaniasis, which is contracted after a sandfly bite on a dog. The arthropod repellents marketed for topical application have all a short action duration, requiring repeated applications of basic formulations (solution). The formulation of active molecules having repellent properties, incorporated into nanoparticle systems and having a prolonged action in time was selected. Nanoparticles are colloidal carriers interesting in the pharmaceutical technology field due to their ability to form complexes with hydrophobic molecules, such as repellent molecules (DEET, Picaridin[®], IR3535[®]...). Targeting, protection against degradation and control of the release are the main advantages provided by the nanoparticles containing an active ingredient. The nanoparticle physicochemical characteristics (size and zeta potential) permitting their storage in the upper dog skin layers and a along the hairs were determined. For that reason cationic nanoparticles of 200 nm in diameter were formulated. This original formulation inspired from the nanoprecipitation process has allowed us to obtain one single step concentrated suspensions (above 10% of active molecules in the final product) and without stabilizer addition. A correlation between the release profiles and the effectiveness of model insect (*Drosophila*) has been verified. Therefore the percentage of polymer regulates the release of encapsulated active molecules. Repellent efficacy of nanoparticulate formulation greater than 15 days has been validated experimentally. The scale transposition of the nanoprecipitation process makes conceivable an industrial development for the formulation of an innovative arthropod repellent having a long lasting effect.

Key words: Arthropod repellent, canine species, vector-borne diseases, polymeric nanoparticle, nanoprecipitation, industrialization.

