



HAL
open science

Microparticules hybrides à base d'huiles végétales réticulées par procédé sol-gel : synthèse et évaluation de leur capacité de libération contrôlée de principes actifs peu hydrosolubles

Koceïla Doufene

► To cite this version:

Koceïla Doufene. Microparticules hybrides à base d'huiles végétales réticulées par procédé sol-gel : synthèse et évaluation de leur capacité de libération contrôlée de principes actifs peu hydrosolubles. Matériaux. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTTS043 . tel-03191610

HAL Id: tel-03191610

<https://theses.hal.science/tel-03191610v1>

Submitted on 7 Apr 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-chimie des Matériaux
pour la Santé

École doctorale 459 - Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche - UMR 5253
Institut Charles Gerhardt Montpellier

Microparticules Hybrides à base d'Huiles Végétales réticulées par Procédé Sol-Gel : Synthèse et Evaluation de leur Capacité de Libération Contrôlée de Principes Actifs Peu Hydrosolubles

Présentée par Koceïla DOUFENE
Le 29 Octobre 2020

Sous la direction de Anne AUBERT-POUESSEL

Devant le jury composé de

M. Xavier GARRIC, PU, Université de Montpellier
Mme Odile CHAMBIN, PU, Université de Bourgogne
M. Éric BEYSSAC, PU, Université Clermont Auvergne
M. Jean-Marie DEVOISSELLE, PU, Université de Montpellier
M. Frédéric BOUYER, MCU, Université de Bourgogne
Mme Anne AUBERT-POUESSEL, MCU, Université de Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-chimie des Matériaux
pour la Santé

École doctorale 459 - Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche - UMR 5253
Institut Charles Gerhardt Montpellier

Microparticules Hybrides à base d'Huiles Végétales réticulées par Procédé Sol-Gel : Synthèse et Evaluation de leur Capacité de Libération Contrôlée de Principes Actifs Peu Hydrosolubles

Présentée par Koceïla DOUFENE
Le 29 Octobre 2020

Sous la direction de Anne AUBERT-POUESSEL

Devant le jury composé de

M. Xavier GARRIC, PU, Université de Montpellier

Mme Odile CHAMBIN, PU, Université de Bourgogne

M. Éric BEYSSAC, PU, Université Clermont Auvergne

M. Jean-Marie DEVOISSELLE, PU, Université de Montpellier

M. Frédéric BOUYER, MCU, Université de Bourgogne

Mme Anne AUBERT-POUESSEL, MCU, Université de Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Résumé de Thèse

Les huiles végétales sont devenues des excipients majeurs en industrie pharmaceutique grâce à leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur pouvoir de solubilisation. En effet, elles trouvent des applications via de nombreuses voies d'administration, répondent à des contraintes environnementales de plus en plus exigeantes et offrent des stratégies efficaces de solubilisation de principes actifs très peu hydrosolubles. Ces huiles végétales peuvent être aussi modifiées chimiquement afin de leur conférer des propriétés supplémentaires.

Le sujet de cette thèse porte sur la fonctionnalisation d'huiles végétales à l'aide de composés à base de silice, afin de rendre possible leur solidification sous forme de microparticules par procédé sol-gel. Les microparticules hybrides huile végétale/silice obtenues ouvrent des perspectives intéressantes pour l'encapsulation de principes actifs peu hydrosolubles, permettant la modulation de leurs cinétiques de libération, et élargissant leur champ d'application.

Le premier axe de recherche de ce projet a été de développer ces microparticules par une technique d'émulsion thermostabilisée en respectant un cahier des charges pharmaceutique, ayant pour contrainte principale l'utilisation exclusive d'excipients biocompatibles. La synthèse de ces microparticules optimisées a été explorée en modulant les ratios de silylation et en encapsulant un principe actif modèle (l'ibuprofène) afin de mettre en évidence leur potentiel comme réservoir de principes actifs peu hydrosolubles. Par ailleurs, la cytocompatibilité et la biodégradabilité de ces microparticules ont été évaluées. Afin de valoriser ces microparticules hybrides pour des applications pharmaceutiques, deux études ont été menées avec des principes actifs d'intérêt thérapeutique : d'une part une molécule anticancéreuse développée contre le mélanome (le JMV5038) et d'autre part une hormone stéroïde (l'estradiol). Des particules hybrides submicroniques encapsulant avec succès le JMV5038 ont été développées, et ont permis la libération progressive et prolongée de ce dernier. Les microparticules chargées en estradiol ont été développées, quant à elles, pour une administration par voie sous-cutanée. Pour ce faire, la chimie de silylation a été revue afin de garantir un procédé « 100 % green » et produire des particules qui ont par la suite démontré une excellente biocompatibilité *in vivo* sur un modèle de souris.

Le second axe de recherche de ce projet a consisté à élaborer une nouvelle approche de synthèse des microparticules hybrides par procédé microfluidique. L'intérêt principal de ce procédé réside dans le contrôle parfait de la taille et de la distribution des particules, mais sa mise en œuvre nécessite de lever un nombre conséquent de verrous. Premièrement, la chimie de réticulation sol-gel a dû être adaptée au nouveau procédé, et pour ce faire un catalyseur a été utilisé en phase continue aqueuse afin d'optimiser le temps de réticulation tout en réduisant ses résidus au sein des particules. Deuxièmement, les paramètres microfluidiques (i.e. géométrie des canaux, viscosité des phases circulantes, tensions interfaciales) ont été optimisés au sein de dispositifs en polydiméthylsiloxane ayant subi au laboratoire différents traitements hydrophiles, vu que les microparticules sont issues d'une émulsion qui possède une phase continue aqueuse. Enfin, un dispositif microfluidique innovant a été conçu et sa réalisation par photolithographie avec une résine hydrophile est en cours d'achèvement, le contexte de crise sanitaire liée au Covid-19 ayant ralenti nos avancées.

En conclusion, ce projet a démontré qu'il était possible de synthétiser des microparticules hybrides à base d'huile végétale et de silice en respectant des exigences pharmaceutiques, et que ces particules constituent une plateforme innovante et polyvalente dédiée à la formulation de diverses molécules thérapeutiques.

Dissertation abstract

Vegetable oils are key excipients in the pharmaceutical field thanks to their biocompatibility, biodegradability and solubilizing properties. Indeed, they can be used through numerous routes of administration, they meet growing environmental constraints, and they provide effective solutions for the solubilization of poorly water-soluble active pharmaceutical ingredients. These vegetable oils can also be chemically engineered to provide further properties.

The aim of this dissertation is to functionalize vegetable oils using silica-based molecules in order to enable their solidification into microparticles through a sol-gel process. The obtained vegetable oil/silica hybrid microparticles offer interesting insights for the encapsulation of poorly water-soluble active ingredients, allowing the modulation of their release kinetics, and broadening their field of application. The first step in this project was to develop such microparticles using a thermostabilized emulsion process in compliance with pharmaceutical specifications, mainly the exclusive use of biocompatible excipients. The synthesis of such optimized microparticles was explored by modulating silylation ratios and by entrapping a model active pharmaceutical ingredient (ibuprofen) in order to highlight their potential as a reservoir of poorly water-soluble active pharmaceutical ingredients. Besides, the cytocompatibility and biodegradability of these microparticles were evaluated. In order to promote these hybrid microparticles for pharmaceutical applications, two studies were conducted with therapeutically relevant active pharmaceutical ingredients. First, an anti-cancer molecule developed against melanoma (JMV5038) was successfully entrapped into submicron hybrid particles and the latter have allowed the constant and sustained release of JMV5038. Second, a steroid hormone (estradiol) was successfully loaded into microparticles for subcutaneous administration. To achieve that, the chemistry of silylation was redesigned in order to ensure a "100 % green" process and to produce particles that have subsequently demonstrated excellent biocompatibility in a mouse model.

The second step of this project was to develop a novel approach for the synthesis of hybrid microparticles by microfluidics. The main advantage of this process lies in the control of particle size and distribution, but its implementation requires overcoming a significant number of constraints. Firstly, the chemistry of sol-gel crosslinking was adapted to the new process, and to do that a catalyst was dissolved in the aqueous continuous phase instead of the oily phase in order to optimize the cross-linking time while reducing the residues within the particles. Secondly, the microfluidic settings (i.e. channel geometry, viscosity of the flowing phases, interfacial tensions) were optimized using polydimethylsiloxane devices that have undergone various hydrophilic treatments in the laboratory, considering that the microparticles are based on an oil-in-water emulsion. Finally, an original microfluidic device was designed, and its manufacturing with photolithography technology on a hydrophilic resin is being finalized, as the context of Covid-19 has slowed down our progress.

In conclusion, the project demonstrated the feasibility of synthesizing vegetable oil/silica hybrid microparticles in compliance with the pharmaceutical requirements, and it highlighted the potential of these particles as an innovative and versatile platform dedicated to the formulation of various therapeutic molecules.

D'emblée, les mots manquent pour exprimer toute ma gratitude envers Anne AUBERT-POUESSEL, ma directrice de thèse, tant pour son appui infailible à mes travaux de recherche que pour sa présence humaine constante tout au long de ce parcours. *Tanemirt* Anne !

Je tiens à remercier Odile CHAMBIN (Professeur à l'Université de Bourgogne) et Éric BEYSSAC (Professeur à l'Université Clermont Auvergne) pour avoir aimablement accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Mes remerciements sincères vont vers Xavier GARRIC (Professeur à l'Université de Montpellier) et Frédéric BOUYER (Maître de conférences à l'Université de Bourgogne) pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. Par ailleurs, je suis particulièrement reconnaissant envers Jean-Marie DEVOISSELLE (Professeur à l'Université de Montpellier, directeur de l'Institut Charles Gerhardt Montpellier) pour son implication dans le programme d'Excellence m'ayant conduit au sein de l'ICGM, et pour son soutien tout au long de ma thèse ; c'est un honneur pour moi de vous savoir examiner ma thèse à son aboutissement. Je ne manquerai pas de remercier d'ailleurs mon cher pays, l'Algérie, derrière ce programme de bourses d'Excellence.

Au fil de cette thèse, plusieurs collaborations se sont tissées et m'ont amené à côtoyer des personnes sans qui mes travaux n'auraient pu connaître l'accomplissement escompté. J'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes ayant participé, de loin comme de près, un peu comme beaucoup, à mener à bien le projet de ma thèse. Je ne peux passer sans citer en particulier Ilaria BASILE (PharmD-PhD chez NanoMedSyn) et Nadir BETTACHE (Chargé de recherche à l'Université de Montpellier) sans qui notre projet d'expérimentation animale n'aurait pu se poursuivre en période de Covid-19, ainsi que le Vincent LAPINTE (Maître de conférences à l'Université de Montpellier) et Jean-Jacques ROBIN (Professeur à l'Université de Montpellier) pour leur soutien indéfectible au projet depuis sa genèse.

A tous les membres de mon équipe « Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé », je tiens à vous montrer ma gratitude pour m'avoir accueilli le long de ces trois riches années. Et à mes deux stagiaires, Sara Aibeche et Léa Medjber, merci d'avoir apporté votre touche au projet et puisse la réussite être votre alliée !

À mes parents,

À ma sœur, à mon frère,

À mes amis, d'ici et de là-bas.

*Puisse Dieu nous guider vers de meilleures
œuvres et nous ouvrir les portes du succès en
toutes circonstances... Amen.*

*Ukiy-d sbeḥ tafejrit, nniy-as ad sefruy,
Ad it-ṭraḡu tewriqt, turḡa d acu ad as-ḥkuḡ,
Ugadey ad bduy tira, wissen allay ma ad yeṭekki,
Ahat yessarem tejra, yer lḡedra-s ad yetekki,

Tawriqt tacebḥant tesbek, leqlam yugi ad ṭ-yessebrek,
Iereq ad d-nini, ass-agi yenkeṭ idelli,
Iereq ad d-nini, ass-a yenkeṭ-it yidelli,*

*Mi d-telḥeq ṭnaṣfa n wass, ddmey-d leqlam dayni,
Walay tawriqt d snitra, ma d tira ney d ayenni,
Ugin ad d-netqen lexyud, s ṣṣut-nni i saramey,
D acu id-iyi-d-rran lehyud, siwa ṣṣut aqdim i sney,*

*Tawriqt tacebḥant tesbek, leqlam yugi ad-ṭ-yessebrek,
Iereq ad naru, leqlam iḥeznen yeṭru,
Di snitra i cennun, lexyud iḥeznen la ṭrun,*

*Tameddit mi uyaley, yer tewriqt id-iyi-yurḡan,
La ṭnadiy anda ara afey, imeslayen id-iyi-yeḡḡan,
Sawley-asen s snitra, saewezgen ugin-iyi,
Id fell-i tura i yebda, s eawaz yeggun-iyi,*

*Tawriqt tacebḥant tesbek, leqlam yugi ad -ṭ-yessebrek,
Aewaz iwumi, isefra yunzan imi,
D uewaz ad nennay, isefra yunzan allay,*

*Waqila fehmeḡ tura, tamsalt anida teewweq,
Mi ruḥey ad bduy tira, allay-iw ad isewweq,
Yeṭsewiq s ayen it-yewwin, iḥulfa s teḡjurt mi txuṣ,
Yewæer ma yehlek meskin, yiwen seg yidudan ufus,*

*Tawriqt tacebḥant tesbek, leqlam yugi ad ṭ-yessebrek,
Iyder-ik lḥal, a yimi ig yunza wawal,
Iyder-ik zman, arḡu ma ad ṣegmen wussan*

*Krey ad fyey dayen, allay yegguma ad d-yini,
Ula akken eawdey dayen, rziḡ yeṭ tewriqt-nni,
Ufiy deg-s segment tira, kra id-ḥkiy yers-d fell-as,
Amzun yer lxiḍ tcuba, yeṭrsent tfirellas,*

*Tawriqt tacebḥant tecbek, s leqlam tuli-ṭ tebrek.
Mi yeereq ad d-nini, asefru ad ay-d-yesmekti,
Mi nruḥ ad neṭu, ad ay-d-yenbec usefru.*

*Lounis Ait Menguellet
« Tawriqt tacebḥant »*

*À l'aube je m'étais levé, que j'aille écrire un poème,
La feuille m'attendait, attendait ce que j'allais conter,
Mais la crainte m'a pris, que l'esprit ne suive mon envie,
Que son envie soit plénitude, que repos s'en suive,

Et la feuille blanche, figée, la plume ne voulait la noircir,
Il m'était dur de voir, qu'aujourd'hui renie les jours passés,
Il m'était dur de croire, que ce jour est renié par ceux passés,*

*Soleil à son Zénith, j'ai repris ma plume et mon encrier,
J'ai vu la feuille adossée à ma guitare, chant ou poème ?
Mais même la guitare, de ses cordes, ne voulait me plaire,
L'écho de ses ondes n'était que sons passés,*

*Et la feuille blanche, figée, la plume ne voulait la noircir,
L'inspiration s'en allait, la plume mélancolique pleurait,
Et les cordes de la guitare, de tristesse vibraient,*

*Au soir je revins, la feuille m'attendait,
En vain cherchais-je les mots m'ayant laissé,
À la guitare, même sourds, je les draguais,
Car à la nuit tombée, je pressentais la veillée,*

*Et la feuille blanche, figée, la plume ne voulait la noircir,
A quoi bon veiller, quand le poème ne voulait venir,
Qu'ai-je donc à veiller, les mots n'allaient pas venir,*

*Peut-être ai-je enfin commencé à comprendre,
N'ai-je pas encore commencé que mon esprit vagabonde,
Il vaque à ses soucis, il compte ses parts parties en cendres,
Est-ce donc aisé pour une main de voir un de ses doigts
souffrant ?*

*Et la feuille blanche, figée, la plume ne voulait la noircir,
Le temps t'a eu, ô langue dépourvue de mots
Le temps t'a eu, espère donc des jours plus beaux*

*L'abandon me guettait, l'esprit ne voulant rien dire,
Mais un dernier regard posé sur la feuille blanche
Laisse s'éparpiller mes paroles telle une avalanche,
Les mots, telles des hirondelles s'agençant sur des fils,

Et la feuille blanche, maillée, la plume l'avait noircie.
Quand on perd les mots, le poème nous les rappelle,
Quand l'oubli nous guette, le poème rallume l'étincelle.*

*Essai de traduction
« La feuille blanche »*

Sommaire du manuscrit

Introduction générale.....	1
Première Partie.....	7
Les Microparticules Hybrides : Du Concept à l'Application	
Chapitre I – Etat de L'art	9
Chapitre II – Les Microparticules Hybrides : Synthèse et Caractérisation	57
Chapitre III – Les Microparticules Hybrides : Applications Thérapeutiques.....	119
Deuxième Partie.....	171
Les Microparticules Hybrides : Approches de Synthèse par Microfluidique	
Chapitre IV – La Microfluidique, les Microgouttelettes et les Phases Continues Aqueuses	173
Chapitre V – La Microfluidique Appliquée à la Formulation des Microparticules Hybrides.....	213
Discussion générale et conclusion	253

Abbreviations

- **API**: active pharmaceutical ingredient = drug
- **ASD**: amorphous solid dispersion
- **BCRP**: breast cancer resistance protein
- **BCS**: biopharmaceutics classification system
- **BDDCS**: biopharmaceutics drug disposition classification system
- **CD**: condensation degree
- **CMC** : carboxyméthyl cellulose
- **CO**: castor oil (huile de ricin)
- **COSY**: correlation spectroscopy
- **CV**: coefficient of variation
- **CY**: condensation yield
- **DABCO**: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
- **E₂**: 17 β -estradiol
- **EC₅₀**: half-maximal effective concentration
- **EDX**: energy dispersive X-ray
- **ER α** : estrogen receptor alpha
- **(F)FA**: (free) fatty acid
- **FITC**: fluorescein isothiocyanate
- **FTIR**: fourier transform infrared
- **HELN**: HeLa Estrogen Response Element (**ERE**)-luciferase
- **HES**: hematoxylin-eosin-saffron
- **HMBC**: heteronuclear multiple bond connectivity
- **HME**: hot melt extrusion
- **HMP (e) or (m)**: hybrid microparticle (made with ICOe) or (made with ICOM)
- **HNP**: hybrid submicron particle
- **HPLC**: high pressure liquid chromatography
- **HPC** : hydroxypropyl cellulose
- **HPMC**: hydroxypropylméthyl cellulose
- **HSQC**: heteronuclear single quantum correlation
- **ICO (e) or (m)**: silylated castor oil (by means of IPTES) or (by means of IPTMS)
- **IM**: intramusculaire
- **IP**: imidazopyridine
- **IPCO**: polyéthylène glycol-35 castor oil silylé
- **IPTES**: (3-Isocyanatopropyl) triethoxysilane
- **IPTMS**: (3-Isocyanatopropyl) trimethoxysilane
- **IR**: infrared (infrarouge)
- **IV**: intraveineux
- **LBDDS**: lipid-based drug delivery system
- **LDC**: lipid-drug conjugate
- **MAPK/ERK**: mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases
- **MEMS**: microelectromechanical systems
- **MRP**: multi-drug resistance proteins
- **MW**: molecular weight
- **MWCO**: molecular weight cut-off
- **NLC**: nanostructured lipid carrier

- **NMR**: nuclear magnetic resonance
- **ORALD**: open-ring and alanine-loss derivative
- **ORD**: open-ring derivative
- **O/W**: oil-in-water
- **O/W/W**: oil-in-water-in-water
- **PA**: principe actif = API = drug
- **PBS**: phosphate buffer saline
- **PCO**: polyéthylène glycol-35 Castor oil
- **PDMS**: poly(dimethylsiloxane)
- **PDMS-b-PEG**: poly(dimethylsiloxane)-b-poly(ethylene glycol) diblock copolymer
- **PDI**: index de polydispersité
- **PEG**: polyéthylène glycol
- **PLGA**: poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer
- **PNIPAAm**: poly(N-isopropylacrylamide)
- **PTSA**: acide paratoluènesulfonique
- **PVA**: poly(vinyl alcohol)
- **PVP**: polyvinylpyrrolidone
- **RMN**: résonance magnétique nucléaire
- **RS**: red sirius
- **RT**: retention time
- **SC**: subcutaneous (sous-cutané)
- **SD**: standard deviation
(dans chapitre I, SD: spray drying)
- **SDS**: sodium dodecyl sulfate
- **SEDDS**: self-emulsifying drug delivery systems
- **SEM**: scanning electronic microscopy
- **SGF**: simulated gastric fluid
- **SIF**: simulated intestinal fluid
- **SLN**: solid lipid nanoparticles
- **SnOct**: tin(II) octoate (octanoate d'étain II)
- **TBAF**: fluorure de tétra-butylammonium
- **TEOS**: tetraethyl orthosilicate
- **TG**: triglyceride
- **TGA**: thermogravimetric analysis
- **TSE**: thermostabilized emulsion
- **UPLC (/ MS)**: ultra performance liquid chromatography (coupled with mass spectrometry)
- **UV**: ultraviolet
- **W/O/W**: water-in-oil-in-water
- **W/W**: water-in-water
- **wt. %**: weight percentage

Glossaire

Angle de contact	<p>L'angle de contact d'un liquide sur un solide permet de caractériser les propriétés hydro/lipophile d'un matériau à l'aide de la loi de Young-Dupré. Ainsi le matériau est qualifié d'hydrophobe quand une goutte d'eau sur ce matériau forme un angle $> 90^\circ$. A l'inverse, il est qualifié d'hydrophile lorsque l'angle est $< 90^\circ$.</p> <p>La mesure repose sur l'utilisation d'une caméra qui permet de relever le profil de la goutte posée sur le matériau au moyen d'une seringue et d'une plateforme mobile. Un logiciel d'exploitation permet l'extraction automatique de l'angle de contact, en utilisant différents algorithmes.</p>
Angle magique et Polarisation croisée en RMN solide	<p>La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) appliquée aux solides est une analyse importante dans le domaine des matériaux pour étudier leur structure. Afin d'augmenter la résolution et la sensibilité de cette technique, il existe deux différentes stratégies : travailler avec un axe de rotation du solide incliné sur un « angle magique = $54,74^\circ$ » (MAS), et/ou travailler en polarisation croisée (CP) pour augmenter la sensibilité des noyaux rares tel que le ^{29}Si.</p>
Criblage à haut débit	<p>Dénoté également <i>High-throughput screening</i>, il désigne les techniques visant à étudier et à identifier dans les chimiothèques et ciblothèques, des molécules aux propriétés nouvelles, biologiquement actives à l'aide de la robotique, de l'informatique et de la bio-informatique.</p>
Excipient	<p>Il désigne toute substance associée au principe actif d'un médicament et dont la fonction est de faciliter l'administration, la conservation et le transport de ce principe actif jusqu'à son site d'absorption.</p>
LogP	<p>Le LogP est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants (octanol/eau). Il est égal au logarithme du rapport des concentrations d'une molécule étudiée dans l'octanol et dans l'eau. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une molécule. Le LogP est un paramètre important dans la prédiction de l'absorption des principes actifs, il est admis qu'il doit être de l'ordre de ces valeurs selon les voies d'administration d'un médicament :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absorption orale : 1,8 - Absorption percutanée : 2,6 - Absorption sub-linguale : 5,5
MAPK (Voie de signalisation MAPK/ERK)	<p>Les <i>Mitogen-activated protein kinases</i> (MAPK ou MAP kinases) sont un ensemble de protéines kinases impliquées dans un certain nombre d'événements de la vie de la cellule, comme la mitose, mais aussi très liées à des phénomènes apoptotiques, la différenciation ou encore la survie cellulaire. Ceci se fait via des voies de signalisation (parmi lesquelles la voie MAPK/ERK) en réponse à divers signaux externes : des facteurs mitogènes, le stress osmotique cellulaire, le choc thermique ou encore un certain nombre de cytokines.</p>
Pharmacocinétique	<p>Science qui étudie le devenir du médicament dans l'organisme. Elle regroupe les étapes de libération du principe actif, son absorption, sa distribution dans les fluides et tissus, sa métabolisation par les enzymes endogènes, ainsi que son élimination de l'organisme.</p>

Photolithographie	La photolithographie consiste en l'insolation d'un substrat recouvert d'une couche de résine photosensible afin de structurer cette dernière. La résine, composée généralement de polymères thermoplastiques, est déposée par centrifugation en un film mince uniforme. Elle est ensuite soumise à un rayonnement laser afin de structurer certaines parties de la couche. Dans le cas de résines dites négatives, la polymérisation se produit sur les zones exposées. Au contraire, dans le cas de résines dites positives, l'exposition au laser provoque une rupture des macromolécules de la couche et entraîne une solubilité accrue des zones exposées.
Pickering	Une émulsion est dite de Pickering quand les globules de phase discontinue sont stabilisés par des particules solides colloïdales à la place des tensioactifs.
Plasma O ₂	Le plasma est un gaz partiellement ionisé. Il est formé d'atomes, de molécules neutres ou excitées (métastables), d'ions, d'électrons, de radicaux et de photons de plusieurs énergies allant des UV jusqu'aux IR. Ces espèces réagissent entre elles et avec les surfaces en contact. Le plasma est notamment utilisé pour les traitements de surface (ex. décapage, activation chimique). Le plasma O ₂ est plus répandu car peu cher, il est dédié aux surfaces non métalliques et a un pouvoir oxydant important.
Span	Paramètre qui reflète la distribution des tailles de particules, et qui est égal au rapport $(D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, D _x étant la taille pour laquelle la fonction cumulative est égale à x %.
Technologie « top-down » et « bottom-up »	Technologie qui permet l'obtention d'objets (ex. nanocristaux), soit par une méthode descendante « top-down » utilisant des techniques de réduction de taille (ex. broyage) soit par une méthode ascendante « bottom-up » se basant sur la synthèse chimique ou l'assemblage de nanocristaux.
Voie topique	Voie d'administration d'un médicament sur un point externe du corps, sur une surface du corps telle que la peau ou les muqueuses pour traiter localement.
XLOGP3	Le XLOGP3 est un algorithme développé au sein de l'institut de chimie organique de Shanghai, permettant de calculer le LogP d'une molécule par addition des partitions de sa composante atomique.

Introduction générale

Les huiles végétales ont su s'imposer en tant qu'excipients incontournables dans le domaine pharmaceutique, à commencer par le cérat de Galien développé au II^e siècle et composé à 50 % d'huile végétale d'amande douce. Les huiles d'olive, de sésame, de soja, de ricin, de palme... etc. ont la particularité d'être biodégradables, biocompatibles et non allergisantes, et sont notamment utilisées pour leurs propriétés de solubilisation, d'amélioration de la pénétration, et de modification de la libération du principe actif (PA) contenu dans la forme pharmaceutique. Au fil du temps, ces huiles ont été soumises à des modifications chimiques telles que des hydrogénations, des estérifications, des transestérifications et des éthoxylations à l'aide d'alcools ou de polymères afin de leur conférer des propriétés tensioactives ou épaississantes. Actuellement, une multitude de formes pharmaceutiques (classiques : ex. émulsions, comprimés, capsules, ou plus élaborées : ex. nanocapsules lipidiques, systèmes auto-émulsifiants) comportent des huiles végétales et sont destinées à une administration par différentes voies (ex. orale, parentérale, muqueuse, cutanée).

Le projet de cette thèse repose sur la modification chimique d'une huile végétale afin de lui conférer une aptitude à la structuration en microparticules solides par le biais d'une réticulation par procédé sol-gel. Son objectif principal est de valoriser les propriétés de solubilisation de l'huile de ricin afin d'assurer la biodisponibilité de PAs peu hydrosolubles, et de répondre ainsi à un problème de formulation crucial rencontré lors du développement de la plupart des PAs. L'huile est fonctionnalisée à l'aide d'un agent silylant porteur de groupements silanol capables de réticuler en milieu aqueux dans des conditions définies, formant un matériau hybride organique/inorganique. Le choix de cette chimie de réticulation a été motivé par le fait que la réticulation s'effectue en conditions douces et vertes (communément appelée « green chemistry »), contrairement aux méthodes classiquement utilisées (ex. glutaraldéhyde toxique utilisé pour les gels de protéines ou de polyosides, températures élevées nécessaires dans la plupart des procédés de fabrication). La première originalité de notre projet réside dans l'exploration des propriétés du couple triglycérides/silice pour la conception de matériaux hybrides, ce qui est très peu répandu dans la recherche appliquée en santé. Cette originalité est le fruit d'une collaboration datant de 2014 avec nos collègues Vincent Lapinte et Jean-Jacques Robin de l'équipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires (IAM) de l'Institut Charles Gerhardt. Dans leur laboratoire, des recherches sont menées sur la synthèse de résines biosourcées à base d'huiles végétales pour des applications en industrie automobile notamment. Dans la littérature, ces matériaux hybrides sont plutôt appliqués dans le domaine des revêtements.

La seconde originalité de ce projet réside dans le façonnage du matériau hybride en microparticules, à la différence de ce qui est couramment présenté dans la littérature (i.e. films et matériaux moulés). Ainsi, les microparticules obtenues à partir d'émulsions huile/eau offrent une grande polyvalence car elles permettent d'encapsuler des PAs avec une haute capacité de chargement et d'envisager différentes voies d'administration. Le procédé d'émulsification peut être réalisé avec de multiples appareillages des plus simples (ex. émulsification mécanique) aux plus élaborés (ex. homogénéisateur haute pression, microfluidique).

Ce projet avait débuté par une première thèse exploratoire, au cours de laquelle Gilmory Gallon (2014-2017) a établi la preuve de concept quant à la synthèse de microparticules hybrides à base d'huile végétale. Un criblage des différentes chimies de fonctionnalisation sur un ensemble d'huiles végétales a permis de retenir la silylation par voie hydroxy-isocyanate sur huile ricin comme la méthode la plus facile, la plus verte (i.e. sans solvant ni catalyseur) et la plus robuste pour l'obtention d'une huile végétale silylée apte à réticuler par procédé sol-gel. Gallon a ensuite développé le procédé d'émulsion thermostabilisée en milieu neutre, nécessaire au façonnage des microparticules. Ce procédé nécessitait toutefois l'utilisation d'un catalyseur métallique (le dibutyltin dilaurate, DBTDL) qui a constitué un obstacle à une probable application en santé. Enfin, il a mis en évidence la composition et la structure de ces microparticules hybrides ainsi que leur capacité à encapsuler et libérer un PA modèle, l'ibuprofène.

La suite du projet a eu pour ambition de valoriser ces microparticules innovantes dans des applications pharmaceutiques, et c'est dans ce contexte que ma thèse a pris forme, avec deux défis majeurs à relever. Le premier consistait à répondre à un cahier des charges pharmaceutique, et il a fallu pour cela affiner la chimie adoptée afin de substituer le DBTDL avec d'autres catalyseurs biocompatibles, voire de s'en affranchir. Il a fallu ensuite évaluer l'aptitude de ces microparticules à encapsuler des PAs d'intérêt thérapeutique peu hydrosolubles, étudier leurs profils de libération, et s'assurer de leur biocompatibilité *in vivo*. Le second défi consistait à développer un nouveau procédé microfluidique de formulation afin de maîtriser la taille et la distribution des microparticules synthétisées et de permettre une transposition facile de leur production à l'échelle industrielle.

Le présent manuscrit repose sur deux grandes parties, chacune dédiée à relever l'un des défis précités. Chaque partie est divisée en chapitres et subdivisée en volets. La **première partie** est consacrée aux microparticules hybrides de leur concept à leurs applications. Le **chapitre I** fait un état des lieux bibliographique des stratégies adoptées pour relever le challenge de la formulation des PAs peu hydrosolubles, notamment avec le développement des dispersions

solides amorphes (dits « amorphous solid dispersions ») et des systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (dits « lipid-based drug delivery systems »). Des généralités sur la chimie sol-gel et sur les matériaux hybrides sont également abordées afin de mieux appréhender la suite du manuscrit. Le **chapitre II**, quant à lui, expose les résultats expérimentaux issus de la synthèse et la caractérisation de différents types de microparticules hybrides, avec l'ibuprofène comme PA modèle encapsulé. Il y est question également d'essais visant à ralentir les cinétiques de libération du PA encapsulé, et d'autres essais afin d'améliorer la capacité de l'huile silylée à solubiliser le PA modèle. Le **chapitre III** présente deux études avec des particules hybrides destinées à des applications thérapeutiques. La première repose sur la conception d'une formulation stable et efficace d'un PA cytotoxique sur le mélanome, développé au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) par le Professeur Nicolas Masurier et son doctorant Yohan Malki. La seconde étude est axée sur le développement d'un système sous-cutané de délivrance de PA à partir des microparticules hybrides. Cela a nécessité une révision de la chimie de silylation afin d'améliorer l'innocuité du matériau final. L'étude s'est ainsi étendue jusqu'à l'implantation *in vivo* sur des souris (norme ISO 10933-6), en collaboration avec les Docteurs Ilaria Basile et Nadir Bettache de l'IBMM.

La **seconde partie** de ce manuscrit aborde des approches nouvelles de synthèse des microparticules hybrides par procédé microfluidique. Le **chapitre IV** expose à travers une revue bibliographique les différentes stratégies pour développer des émulsions en phase continue aqueuse par microfluidique, sujet très peu abordé dans la littérature à cause des nombreux verrous techniques à franchir. La nature des dispositifs microfluidiques et les différents traitements destinés à les rendre compatibles avec les phases continues aqueuses y sont décrits et expliqués. Le **chapitre V** est dédié à la mise en pratique des stratégies exposées précédemment afin de produire des microparticules hybrides par procédé microfluidique. Ce changement de procédé a nécessité non seulement l'adaptation de la chimie de réticulation sol-gel de l'huile silylée en microparticules hybrides, mais également l'optimisation des paramètres techniques microfluidiques en terme de géométrie des canaux, de viscosité des phases circulantes, et de propriétés interfaciales entre les phases et le dispositif. Les essais préliminaires ont été effectués en collaboration avec les Docteurs Corine Tourné-Peteilh de l'ICGM et Benoît Charlot de l'Institut d'Electronique et des Systèmes (IES), tandis que la suite de l'étude a nécessité la mise en place d'une seconde collaboration avec le Professeur Pascal Etienne et son ingénieur Sami Bouzid du laboratoire Charles Coulomb (L2C) pour concevoir un dispositif microfluidique apte à générer des microparticules hybrides de façon stable et continue. Le dispositif final est en voie de concrétisation et des résultats encourageants sont

présentés, mais le contexte de crise sanitaire liée au Covid-19 n'a pas permis d'aller au bout de ces expériences.

Enfin, ce manuscrit s'achève par une discussion générale des axes principaux que nous avons développés, associée à une conclusion. Nos choix techniques les plus cruciaux y sont justifiés, certaines études futures nous paraissant pertinentes y sont proposées, et des perspectives y sont envisagées afin de développer une plateforme de matériaux hybrides dédiée à la formulation d'une multitude de PAs.

Première Partie

Les Microparticules Hybrides

Du Concept à l'Application

❖ **Chapitre I – État de l'art** **p. 9**

Ce chapitre retrace l'état de l'art quant à la recherche et au développement des formulations nécessaires pour la conception de médicaments à base de principes actifs peu hydrosolubles. Il aborde par ailleurs des notions de base nécessaires à la compréhension de la chimie sol-gel et des matériaux hybrides. En somme, ce chapitre se veut être la première pierre de l'édifice de ce manuscrit et les prémices logiques de nos travaux de recherche.

❖ **Chapitre II – Les Microparticules Hybrides : Synthèse et Caractérisation** **p. 57**

Ce chapitre relate nos premiers travaux de recherche expérimentale, axés sur la synthèse et la caractérisation approfondie de différents types de microparticules hybrides et de leurs précurseurs.

❖ **Chapitre III – Les Microparticules Hybrides : Applications Thérapeutiques** **p. 119**

Ce chapitre se penche sur la question de l'application thérapeutique envisagée pour nos microparticules hybrides. La formulation de deux principes actifs peu hydrosolubles y est décrite : une hormone stéroïde d'une part, et un agent anti-cancéreux de l'autre.

Chapitre I

État de l'art

1^{er} volet

Du Principe Actif Peu Hydrosoluble au Médicament

Sommaire

1. Les principes actifs peu hydrosolubles : un défi pour la formulation pharmaceutique	13
2. Les dispersions solides amorphes (ASD)	16
2.1. Définitions	16
2.2. Intérêt des ASD	17
2.3. Techniques de formulation des ASD	18
2.4. Application des ASD	21
3. Les systèmes à base de lipides pour la délivrance de principes actifs (LBDDS).....	22
3.1. Définitions	22
3.2. LBDDS destinés à l'administration par voie orale	23
3.3. LBDDS destinés à l'administration par voie parentérale	29
3.4. Techniques de formulation des LBDDS.....	33
4. Conclusion	35
5. Références bibliographiques	36

Figures

Fig. 1. Le « Biopharmaceutics Classification System » & le « Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System ».....	14
Fig. 2. Principes thermodynamiques de la dissolution.....	15
Fig. 3. Les trois structures possibles d'une dispersion solide « principe actif/dispersant ».....	16
Fig. 4. Illustration du phénomène du « <i>spring and parachute</i> »	18
Fig. 5. Préparation des « Amorphous Solid Dispersions » (ASD)	18
Fig. 6. Schéma représentatif des parties composantes d'un « spray dryer »	20
Fig. 7. Schéma d'une coupe longitudinale sur une extrudeuse	21
Fig. 8. Schéma récapitulatif des systèmes à base de lipides pour la délivrance de principes actifs (LBDDS)	23
Fig. 9. Schéma représentatif de l'absorption des principes actifs dans l'intestin après administration orale	24
Fig. 10. Schéma représentatif des NLC (a) imparfaits, (b) multiples et (c) amorphes.....	31

Tableaux

Tableau 1. Spécialités pharmaceutiques commercialisées utilisant la technologie des dispersions solides	22
Tableau 2. Classification des systèmes à base de lipides pour la délivrance de principes actifs destinés à l’administration par voie orale	25
Tableau 3. Liste exhaustive des LBDDS destinés à l’administration par voie orale approuvés par la Food and Drug Administration jusqu’en 2017	26
Tableau 4. Récapitulatif des différents systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (LBDDS) administrables par voie IV	32
Tableau 5. Exemples d’huiles végétales incorporées dans les LBDDS destinés à la voie IM	33

1. Les principes actifs peu hydrosolubles : un défi pour la formulation pharmaceutique

De la préhistoire à nos jours, l'Homme a de tout temps cherché à soigner ses pathologies.¹ Chaque civilisation a connu son lot de « praticiens de santé », à l'image d'Hippocrate et Galien en Grèce, d'Averroes en Andalousie ou d'Avicenne en Perse. A mesure que les pathologies prenaient de l'ampleur au fil du temps, aussi bien celles liées à la précarité dans les zones appauvries (ex. les maladies infectieuses) que celles dites de « civilisation » de par le monde (ex. les maladies neurodégénératives), des solutions médicales concrètes ont dû être mises en place. La médecine traditionnelle ayant montré ses limites, l'Homme s'est tourné vers une approche plus rationnelle dans la recherche de traitements jusqu'à isoler les molécules responsables de l'activité thérapeutique : les principes actifs (PA)s. La recherche et le développement de nouveaux PA sont alors devenus des impératifs de notre ère. Au début des années 1970, la recherche pharmaceutique était davantage axée sur une analyse empirique de cette activité thérapeutique tant *in vivo* qu'*in vitro*.² Cette approche était mise en place sans comporter d'objectifs prédéfinis quant à l'activité recherchée, et était donc peu propice à faire émerger de nouvelles molécules. Néanmoins, elle avait pour avantage majeur d'assurer une bonne connaissance pharmacocinétique et biologique des PA développés. A partir de la fin des années 1980, une rationalisation de la recherche pharmacologique, l'émergence du « Drug design » ainsi que l'amélioration des techniques analytiques ont fait du criblage à haut débit l'une des approches les plus adoptées, notamment par les « Big pharma » tel le laboratoire Pfizer.³ On décrit alors une tendance à l'augmentation de la masse moléculaire ainsi que de la lipophilie des nouveaux PA découverts, inhérente à cette approche. En effet, le screening à haut débit se focalise sur l'amélioration de l'affinité avec la cible pharmacologique *in vitro* sans prendre en considération les étapes pharmacocinétiques, en particulier celle d'absorption.^{4,5} Il était dès lors essentiel, selon Lipinski, de mettre en place quatre limites physicochimiques afin de garantir par la suite aux molécules nouvellement synthétisées une bonne solubilité *in vivo* et une perméabilité accrue des barrières physiologiques (notamment la barrière intestinale). Les quatre règles, énoncées dans son célèbre papier « rule-of-5 »,³ sont :

- Une masse moléculaire inférieure à 500 Daltons ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ;
- Un LogP calculé, inférieur ou égal à 5 ;
- Une limite haute de 5 groupements donneurs de liaison hydrogène par molécule ;
- Une limite haute de 10 groupements accepteurs de liaison hydrogène par molécule.

Toutefois, l’exploration de nouvelles cibles pharmacologiques a mené indéniablement à sortir de ces restrictions. Bergström et al.⁶ citent l’exemple des récepteurs intracellulaires et en particulier intranucléaires, qui ne peuvent être atteints que par des PA très lipophiles. Ainsi, sur les 1620 molécules nouvellement brevetées qui ont été étudiées, 20 % présentaient un LogP supérieur à 5 et 50 % avaient un LogP supérieur à 4. Le concept du « beyond-rule-of-5 compounds » est dès lors né, amenant avec lui de nouvelles perspectives de stratégies à adopter afin de formuler ces PA peu hydrosolubles et renforcer l’arsenal galénique déjà en place.

Par ailleurs, plus de 60 % des PA formulés sont destinés à une administration par voie orale, et subiront donc une absorption au niveau du tractus digestif. Dans ce sens, une classification simplifiée dite « Biopharmaceutics Classification System » ou BCS a été proposée par Amidon⁷ en 1995 (Figure 1). Elle fait ressortir deux classes de PA dont la formulation reste délicate : les BCS II peu hydrosolubles, et les BCS IV peu hydrosolubles et peu perméables à la barrière intestinale. En 2005, Wu et Benet^{8,9} ont enrichi cette classification en mettant en évidence une corrélation entre la bonne perméabilité intestinale et la métabolisation rapide des PA administrés : le « Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System » ou BDDCS était né (Figure 1). En outre ils ont rapporté, comme Haus¹⁰ deux années plus tard, que 70 % des PA en développement appartiennent à la classe des BCS II. De plus, 20 % des molécules présentent non seulement une faible solubilité aqueuse mais également une perméabilité intestinale insuffisante (classe des BCS IV).¹¹

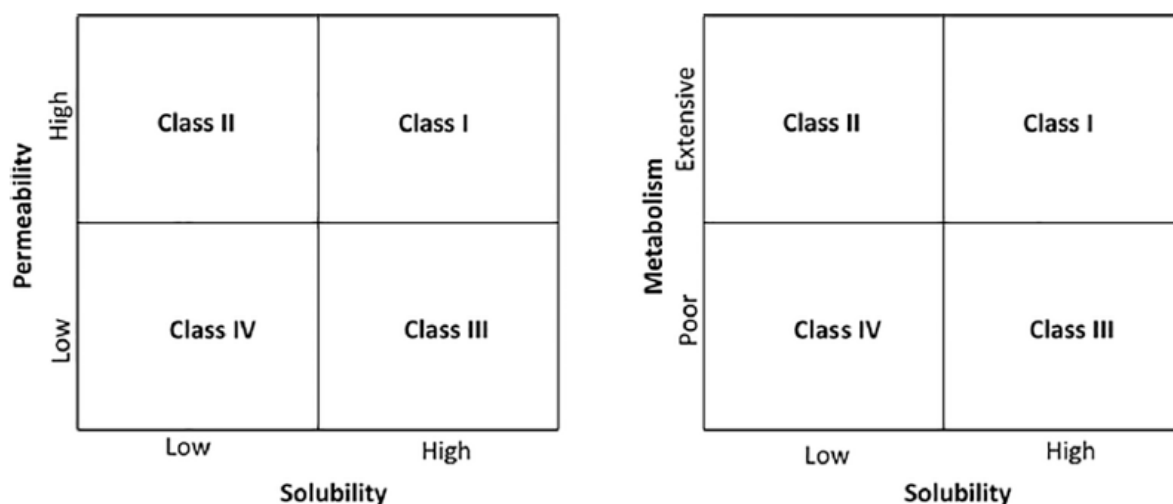


Fig. 1. A gauche, le « Biopharmaceutics Classification System » basé sur la solubilité et la perméabilité intestinale des PA. A droite, le « Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System » basé sur la solubilité et la métabolisation des PA. Adapté à partir de la réf. 12

De son côté, Bergström^{13,14} a distingué deux sous types de PA posant des problèmes de solubilité et nécessitant des formulations avancées (Figure 2) : d’un côté, les PA avec une forte

énergie de liaison cristalline et dont la température de fusion avoisine ou dépasse les 200 °C ; ces PA ont pour facteur limitant la vitesse de dissolution. De l'autre, les PA avec peu d'affinité pour les milieux aqueux, dont le LogP dépasse 3 ; dans ce second cas le facteur limitant est le taux de solubilité en lui-même. Cependant, les deux caractéristiques peuvent être réunies au sein d'une même molécule.

De cette distinction sont nées deux familles de formes pharmaceutiques destinées à la formulation des PA peu hydrosolubles : (a) les dispersions solides amorphes (ou Amorphous Solid Dispersions « ASD ») dont l'intérêt majeur réside dans la rupture préalable des liaisons cristallines des PA à forte énergie de liaison, et (b) les systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (ou Lipid-based Drug delivery Systems « LBDDS ») qui améliorent sensiblement la disponibilité physiologique des PA hydrophobes. Ces deux stratégies essentielles en formulation galénique seront développées tout au long de ce chapitre. Il est à noter que d'autres stratégies non exposées ici ont été adoptées au fil du temps, telles l'utilisation des formes ionisées des PA (formation de sels), la formation de co-cristaux et de complexes, l'utilisation de co-solvants ainsi que des stratégies de réduction de taille (production de nanocristaux par des technologies « top-down » ou « bottom-up »). L'ensemble de ces approches sont détaillées dans la revue intitulée « Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development ». ¹⁵

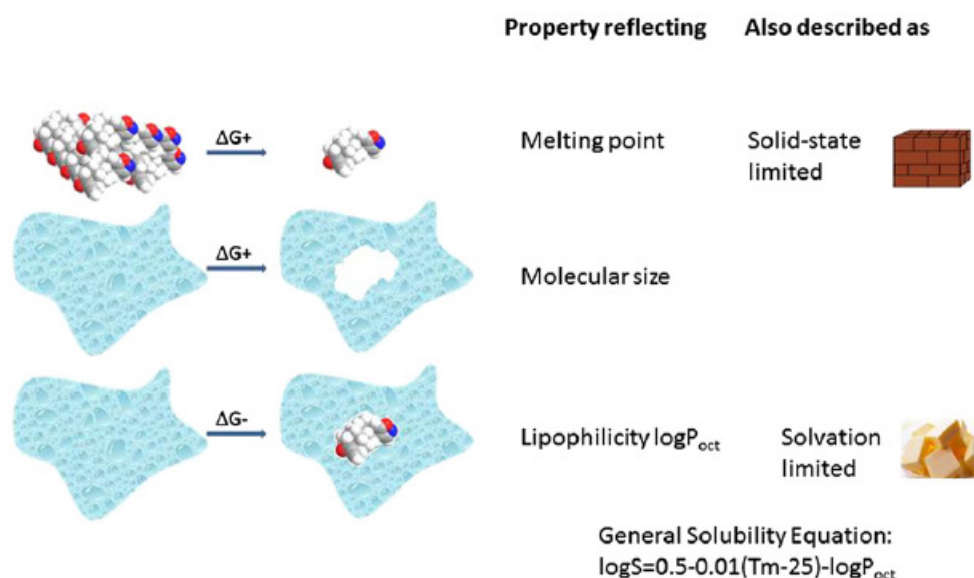


Fig. 2. Principes thermodynamiques de la dissolution : pour qu'une molécule sous forme cristalline soit dissoute, elle devra se séparer du réseau cristallin en consommant de l'énergie (équivalente à celle nécessaire pour la fusion cristalline) tandis que le solvant consommera de l'énergie dite de cavitation (i.e. énergie nécessaire pour créer l'espace qui va loger la molécule), les deux processus sont suivis par le phénomène de solvation qui libère de l'énergie. Chacune des étapes précédentes peut être limitante dans la dissolution d'un PA. Adapté à partir de la réf. 6

2. Les dispersions solides amorphes (ASD)

2.1. Définitions

Les dispersions solides amorphes (ou Amorphous Solid Dispersions « ASD ») font partie de la grande famille des dispersions solides. Ces dernières sont définies en galénique comme étant des formulations dans lesquelles un PA est mélangé avec au moins un composant solide inerte (ou dispersant) qui représente la phase continue et dont le but est d'améliorer la biodisponibilité du PA.¹⁶ Le PA est de préférence dissous à l'état moléculaire en phase solide ou dispersé à un état amorphe (cas des ASD), mais il peut parfois s'y retrouver sous forme microcristalline, ce dernier cas étant généralement indésirable en formulation. En somme, la figure 3 récapitule les différents types de dispersions solides selon l'état du PA.

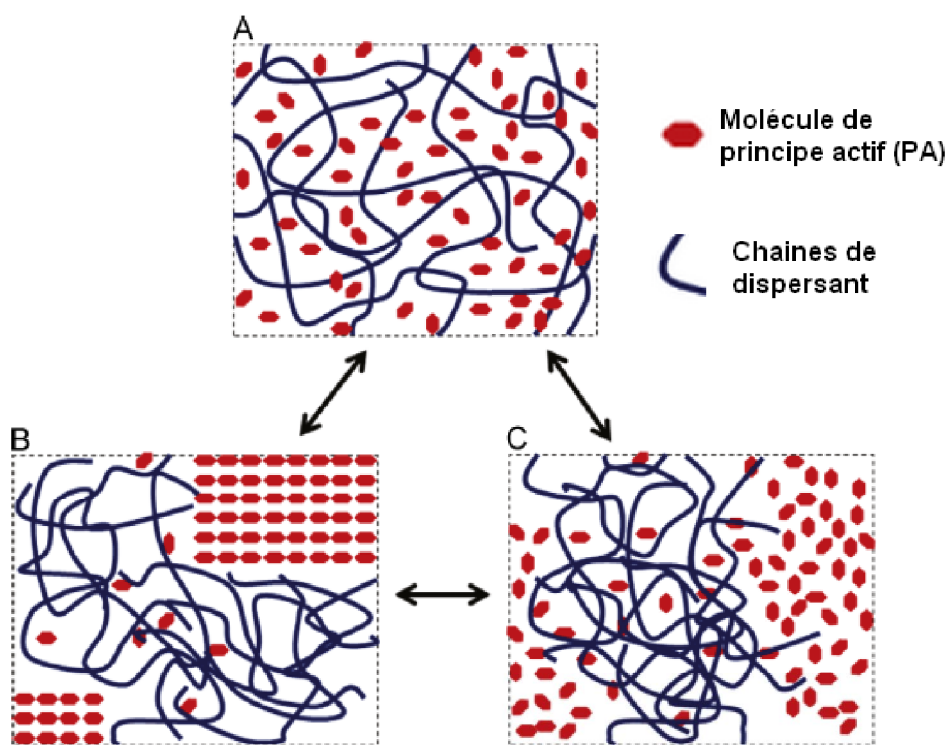


Fig. 3. Les trois structures possibles d'une dispersion solide « PA/dispersant » : (A) La structure idéale d'une dispersion solide où le PA est dispersé moléculairement dans la matrice; (B) un système PA/dispersant dans lequel une formation cristalline de PA s'est produite et (C) un système PA/dispersant contenant des domaines amorphes riches en PA dispersé dans la matrice. Adapté de la réf. 17

Plusieurs familles de dispersants sont décrites dans la littérature¹⁴ (voir Figure 5, p. 18), dont les plus importantes sont les dérivés vinyliques (ex. la polyvinylpyrrolidone (PVP)), les dérivés cellulosiques (ex. l'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)), les polyéthylène glycols (ex. PEG 6000) et les méthacrylates (ex. le poly(2-hydroxyethyl methacrylate)). Des tensioactifs, des sucres et des alginates peuvent également jouer ce rôle. Dans ce sens, Williams et ses

collègues¹⁵ ont proposé une classification qui tient compte de l'état physique du dispersant ; une distinction est ainsi faite entre les dispersions solides proprement dites dans lesquelles le dispersant est à l'état cristallin, et les dispersions vitreuses où le dispersant est à l'état amorphe.

2.2. Intérêt des ASD

Par définition, les ASD trouvent leur intérêt majeur dans la formulation des PA à forte énergie de liaison cristalline (dont la température de fusion avoisine ou dépasse 200 °C). Cependant, quand le dispersant est hydrophile ou amphiphile la solubilité des PA hydrophobes peut également être améliorée par appel d'eau vers l'intérieur des matrices.¹⁸ D'un point de vue thermodynamique, ces dispersants jouent un double rôle vis-à-vis du PA. D'un côté, la stabilité physique de ce dernier doit être assurée dans des configurations à énergie libre élevée (dispersion moléculaire et/ou amorphe), et ce par différents mécanismes physicochimiques : réduction de la mobilité moléculaire par augmentation de la viscosité locale, génération d'interactions moléculaires stabilisantes entre le dispersant et le PA, et inhibition du phénomène de nucléation cristalline (i.e. amorce de la cristallisation) à l'intérieur des ASD.¹⁵ De l'autre côté, les dispersants doivent assurer une supersaturation en PA durant sa libération vers le milieu biologique environnant (milieu intestinal le plus souvent, après administration orale), augmentant ainsi la quantité de PA absorbable. Guzman et al.¹⁹ ont décrit le modèle original du « *spring and parachute* » afin d'expliquer ce phénomène. Le modèle a été largement adopté par la suite afin de sélectionner les ASD de choix^{15,20-22} : le schéma en Figure 4 illustre un profil de dissolution d'un PA existant sous une forme hautement énergétique au cours du temps. La ligne noire représente la dissolution rapide du PA (le « *spring* »), l'obtention de concentrations supérieures à la solubilité maximale suivies de la sursaturation. La ligne rouge en pointillés montre la diminution rapide de la concentration du PA dissous en réponse à la nucléation et à la croissance des cristaux. Une ASD de choix devrait démontrer par contre une seconde phase, dite « *parachute* », dont le profil est indiqué par la ligne verte en pointillés où les périodes de sursaturation sont plus soutenues, reflétant un taux plus lent de nucléation et donc de recristallisation du PA. Dans ce contexte, un screening *in vitro* des dispersants réalisé par Yamashita et ses collègues²³ a permis de classer trois dispersants majeurs selon la robustesse de l'effet « *parachute* » dans l'ordre suivant : HPMC > PVP > PEG 6000 (Figure 4). Des tests ultérieurs *in vivo* ont également permis de mettre en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques d'un facteur 10 en administrant une dispersion de tacrolimus (immunosuppresseur) dans l'HPMC comparativement au tacrolimus cristallin.

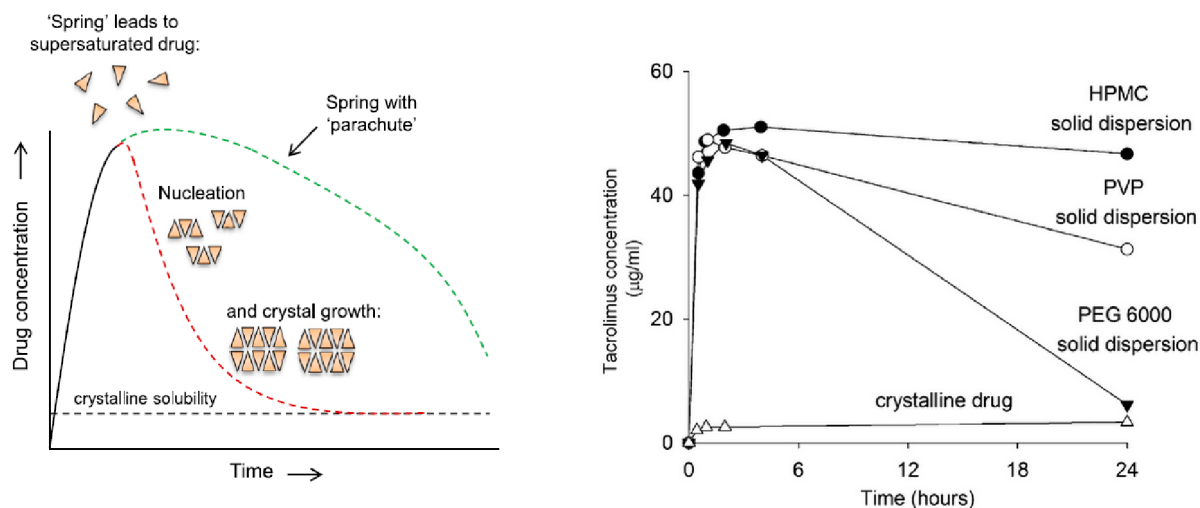


Fig. 4. Illustration du phénomène du « *spring and parachute* » : à gauche, un schéma illustrant un profil de dissolution hypothétique d'un PA libéré à partir d'une forme ASD, au cours du temps (pour les légendes, se référer au texte).¹⁵ A droite, des profils de dissolution en milieu gastrique simulé (pH = 1.2) du tacrolimus cristallin ou formulé avec différents dispersants.²³

Adaptés à partir des réfs. 15 et 23.

HPMC : hydroxypropyl methylcellulose ; PVP : polyvinylpyrrolidone ; PEG : polyéthylène glycol.

2.3. Techniques de formulation des ASD

Différentes techniques pour la formulation d'ASD ont été décrites dans la littérature. Elles peuvent être classées en trois catégories : les solvant-dépendantes, les température-dépendantes et les techniques mécaniques (Figure 5).¹⁴ Récemment, des techniques d'impression en 3D ont également fait leur apparition.²⁴

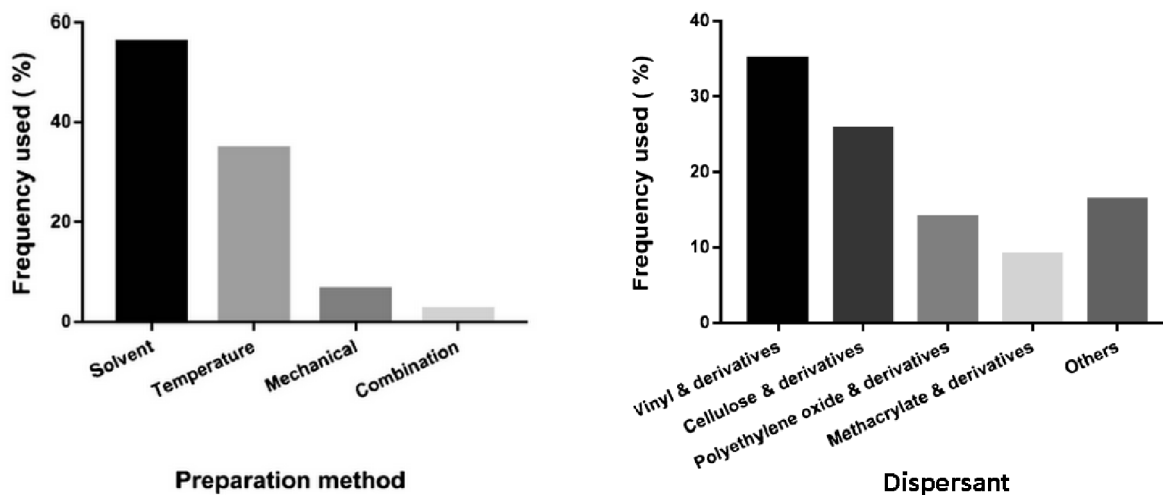


Fig. 5. Préparation des ASD. A gauche, les méthodes de préparation et à droite, les familles de dispersants, rencontrées dans la littérature. Adapté à partir de la réf. 14

Les techniques solvant-dépendantes représentent environ 56 % des méthodes utilisées dans la littérature et comprennent le séchage par pulvérisation (ou « *spray drying* »), la lyophilisation, la précipitation, l'utilisation de réacteurs à jet confiné, les méthodes impliquant des fluides supercritiques et différents types d'électro-pulvérisation. Ces techniques ont pour étapes

principales : (a) la dissolution (ou mise en suspension) du PA et du dispersant dans un solvant volatil, (b) l'élimination d'une grande partie du solvant pour produire des solides/semi-solides stables, et (c) l'élimination poussée du solvant résiduel.²⁵ Cependant, l'utilisation de solvants organiques, les difficultés liées à leur élimination complète ainsi que le coût élevé de la préparation constituent des inconvénients majeurs à ces techniques.

Les techniques température-dépendantes représentent 35 % des méthodes utilisées dans la littérature et comprennent les méthodes de fusion par trempage chaud/froid et l'extrusion à chaud (ou « hot melt extrusion »). Ces techniques incluent deux étapes principales durant leurs procédés : (a) la fusion du PA dans un dispersant fondu puis (b) le refroidissement plus ou moins rapide de la formulation.²⁶ Cependant, La limitation majeure de ces techniques reste le traitement thermique des PA à l'origine de potentielles dégradations, quand bien même des essais d'optimisation des températures ont été rapportés.^{27,28}

Les techniques mécaniques reposent, quant à elles, sur le broyage des composés en conditions sèches ou humides (eau).^{14,29} Minoritaires, elles présentent toutefois l'intérêt de ne pas utiliser de solvant et de ne pas appliquer de hautes températures. Des ASD ont été réalisées avec ces techniques pour des antiviraux³⁰ (ex. télaprévir) par co-milling, des antifongiques³¹ (ex. itraconazole) par wet-milling, et des antihypertenseurs³² (ex. telmisartan) par dry-milling.

Ceci étant, la plupart des techniques rapportées ont été utilisées à l'échelle du laboratoire à des fins de recherche. Le « spray drying » et l'extrusion à chaud restent les méthodes de préparation les plus courantes dans l'industrie pharmaceutique car robustes et facilement transposables ; elles seront décrites ci-après.

2.3.1. Le Spray Drying (SD)

Le « spray drying » est l'un des procédés solvant-dépendants les plus couramment utilisés dans la formulation d'ASD. Un « spray dryer » classique comporte trois éléments principaux : (a) le système d'alimentation composé d'une pompe et d'une buse de pulvérisation, (b) la chambre de séchage et (c) le système de collecte. Si des solvants organiques sont utilisés, un système de condensation est également nécessaire (Figure 6).³³ Durant le processus, on dissout premièrement le PA et le dispersant dans un solvant volatil (ex. éthanol, chloroforme, acétone ou un mélange de solvants). La solution est ensuite pompée dans la chambre de séchage à travers une buse de pulvérisation, formant des gouttelettes atomisées après contact avec le gaz chaud (air ou azote). Enfin, la matière séchée est séparée par un système de cyclone et récupérée dans le collecteur. Selon le solvant et les conditions de traitement utilisés, un séchage secondaire peut être nécessaire pour éliminer davantage le solvant résiduel dans l'ASD.²⁸ Cette dernière

étape reste la plus délicate, car sa vitesse influe grandement sur la structure interne de la formulation ainsi que sur la stabilité du PA présent à des états thermodynamiquement instables (dispersion moléculaire et/ou amorphe).¹⁵ Aussi, les propriétés physicochimiques propres à chaque PA influent grandement sur l'état final de la préparation. Ainsi les ASD d'indométacine (anti-inflammatoire), ou d'itraconazole (anti-fongique) obtenues par SD conduisent à des préparations amorphes, tandis que celles de naproxène (anti-inflammatoire) tendent à recristalliser durant la formulation.³⁴

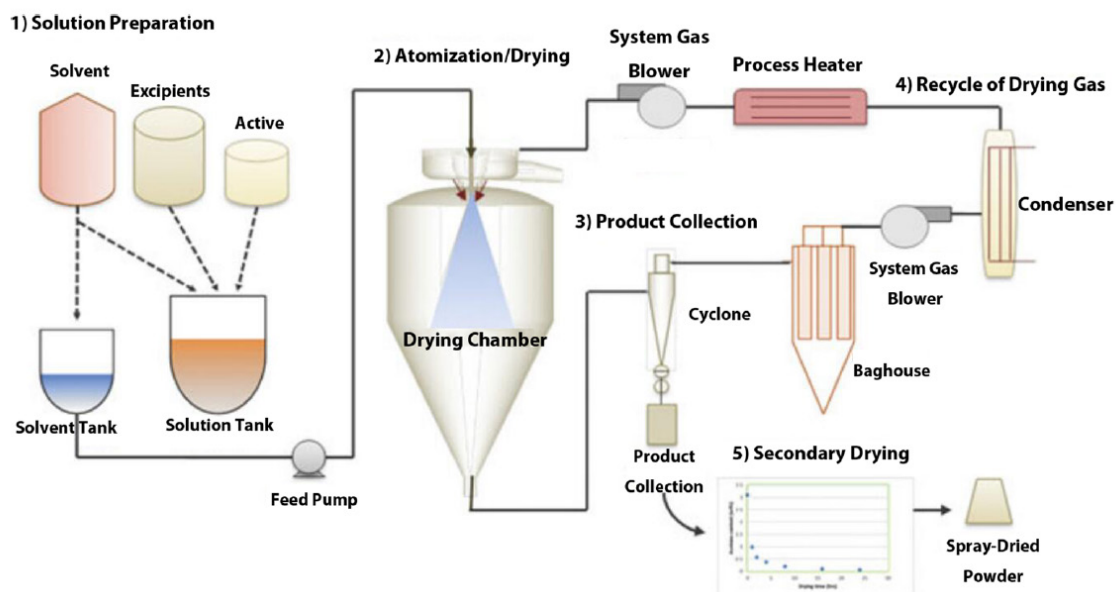


Fig. 6. Schéma représentatif des parties composantes d'un « spray dryer ». Adapté à partir de la réf. 33

2.3.2. La Hot Melt Extrusion (HME)

La technologie HME est née au sein de l'industrie du plastique avant de se généraliser à d'autres domaines, dont le pharmaceutique. D'un point de vue technique, une extrudeuse se compose d'un alimentateur, d'un cylindre d'extrusion dans lequel est inséré un arbre à vis, d'une buse d'extrusion et éventuellement d'un équipement de traitement en aval (Figure 7). Au cours du procédé HME, un mélange physique du PA et du dispersant est introduit de façon constante ou fractionnée dans l'extrudeuse, et la machine effectue les opérations de transport, de fusion thermique et de mélange. Le matériau fondu est ensuite mis en forme à travers une buse et collecté pour le refroidissement et le traitement en aval. Un mélange homogène est ainsi formé aboutissant à une dispersion moléculaire ou amorphe, à condition que le processus de refroidissement soit plus rapide que le processus de nucléation cristalline du PA.³⁵ Des antirétroviraux (ritonavir, lopinavir), et anti-fongiques (itraconazole) ont été formulés par cette technique et sont commercialisés, tandis que d'autres PA sont à l'étude comme des antihypertenseurs³⁶ (carvedilol), des anti-inflammatoires^{37,38} (diflunisal et meloxicam) et des

inhibiteurs de la phosphodiesterase³⁹ (tadalafil). Il faut noter également qu'à l'inverse, les PA avec des températures de fusion très hautes ($> 210^{\circ}\text{C}$) nécessitent l'utilisation de dispersants hautement thermo-résistants, bien que leur nombre soit limité.⁴⁰

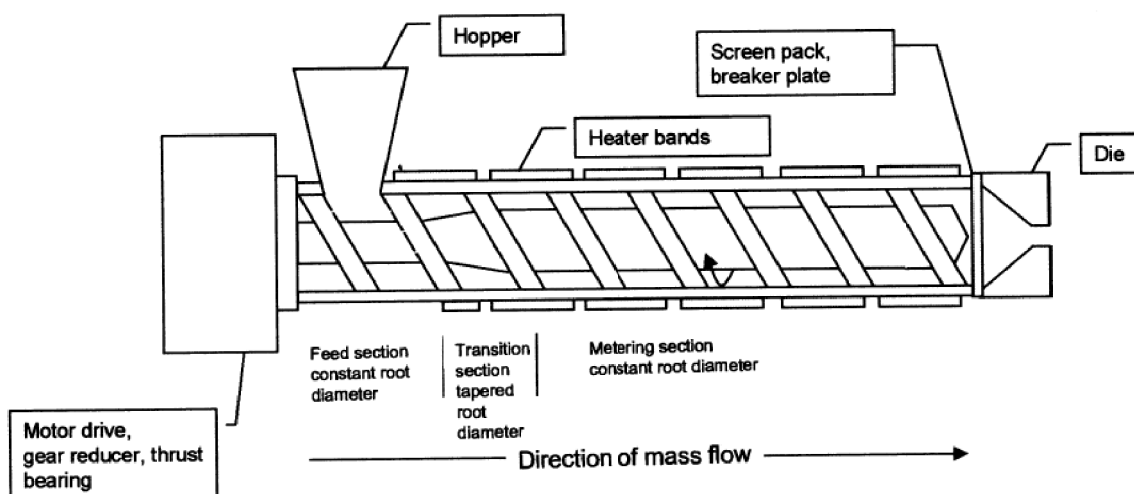


Fig. 7. Schéma d'une coupe longitudinale sur une extrudeuse. Adapté à partir de la réf. 35

Récemment, des techniques dérivées de l'HME ont vu le jour telles que la « Meltrex[®] » développée par SOLIQS (filiale des laboratoires Abbott), ou la technologie de dispersion « KinetiSol[®] » développée à l'Université du Texas puis rachetée par DisperSol Technologies LLC (Austin, Texas).¹⁵ La technologie KinetiSol[®] permet de faire un mélange des matières premières et de procéder à leur fusion par chauffage thermocinétique sans apport thermique externe. Ceci a pour avantage de réduire la durée pendant laquelle le PA est exposé à des températures élevées (inférieure à 5 secondes) le préservant d'une possible dégradation.⁴¹

2.4. Application des ASD

Les ASD ont longtemps été négligées en formulation galénique car ce sont des formes thermodynamiquement métastables, difficiles à manier et capables dans certaines conditions d'engendrer une recristallisation du PA formulé.¹² Cependant, un regain d'intérêt a été observé vis-à-vis de ces formes depuis les années 2000,¹⁴ et ce dans la perspective d'apporter des solutions concrètes à la problématique des PA peu hydrosolubles. Plusieurs spécialités pharmaceutiques sous forme d'ASD destinées à la voie orale ont été commercialisées depuis (Tableau 1).

Tableau 1. Spécialités pharmaceutiques commercialisées utilisant la technologie des dispersions solides. HPC : hydroxypropyl cellulose; HPMC : hydroxypropyl methylcellulose; HPMCAS :

HPMC acetate succinate; PEG : polyethylene glycol; PVP : polyvinylpyrrolidone; PVPVA : PVP vinylacetate copolymer. Adapté à partir de la réf. 15

Spécialité pharmaceutique (®)	Principe actif (point de fusion °C)	Dispersant	Laboratoire
Sporanox	Itraconazole (170)	HPMC	Janssen Pharmaceuticals
Intelence	Etravirine (257)	HPMC	Tibotec
Prograf	Tacrolimus (129)	HPMC	Astellas Pharma US, Inc
Nivadil	Nilvadipine (153)	HPMC	Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd
Certican / Zortress	Everolimus (-)	HPMC	Novartis Pharmaceuticals
Isoptin-SRE	Verapamil (142)	HPC/HPMC	Abbott Laboratories
Zelboraf	Vemurafenib (268)	HPMCAS	Roche
Incivek	Telaprevir (248)	HPMCAS	Vertex Pharmaceuticals
Gris-PEG	Griseofulvine (220)	PEG	Pedinol Pharmacal, Inc
Cesamet	Nabilone (156)	PVP	Valeant Pharmaceuticals
Rezulin	Troglitazone (186)	PVP	Parke-Davis
Kaletra	Lopinavir (127) et ritonavir (132)	PVPVA	Abbott Laboratories
Norvir tablets	Ritonavir (132)	PVPVA	Abbott Laboratories

3. Les systèmes à base de lipides pour la délivrance de principes actifs (LBDDS)

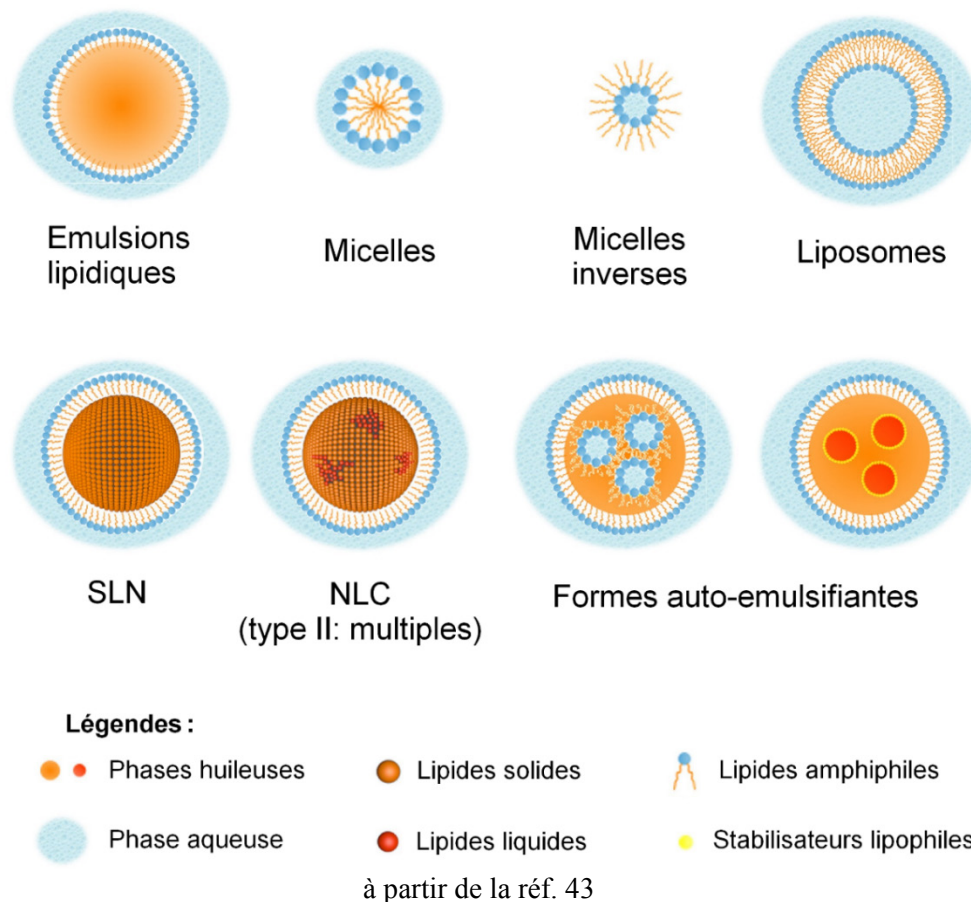
3.1. Définitions

Sont regroupés sous le nom de lipides toutes substances d’origine organique, insolubles dans l’eau, solubles dans la plupart des solvants organiques, et comportant au moins une chaîne grasse ou un acide gras.⁴² Le caractère hydrophobe des lipides leur confère une excellente capacité de solvatation sur les PA hydrophobes. De plus, bon nombre de lipides ont servi à la synthèse de composés à caractère amphiphile : les tensioactifs, nous citerons l’exemple des polyéthylène glycol-castor oil (PCO, nom déposé : Kolliphor[®] EL/ELP et RH, chez BASF), des polyéthylène glycol-hydroxystéarate (nom déposé : Kolliphor[®] HS, chez BASF), des polysorbates (noms déposés : Tween[®], chez Croda ; Montanox[®], chez Seppic) et des esters de sorbitane (noms déposés : Span[®], chez Croda ; Montane[®], chez Seppic).

Les systèmes à base de lipides pour la délivrance de principes actifs (ou Lipid-based Drug delivery Systems « LBDDS ») mettent donc à profit les propriétés particulières des lipides afin d’améliorer la délivrance des PA. Ces systèmes comprennent une large panoplie de formes galéniques telles que les solutions lipidiques, les émulsions y compris les micro- et nano-émulsions, les solutions micellaires, les liposomes, les nanoparticules lipidiques et les formes auto-émulsifiantes (ou Self-Emulsifying Drug Delivery Systems « SEDDS ») (Figure 8). Les LBDDS peuvent être liquides, semi-solides ou solides à température ambiante. Aussi, ils peuvent être destinés à l’administration par différentes voies telles que les voies orale,

parentérale, rectale ou topique. Les deux premières citées étant les plus importantes dans la délivrance de PA, elles seront traitées dans la suite de ce chapitre.

Fig. 8. Schéma récapitulatif des systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (LBDDS). Adapté



3.2. LBDDS destinés à l'administration par voie orale

L'appareil digestif est naturellement disposé à la digestion et à l'absorption des lipides. Il secrète des sels biliaires qui émulsifient les lipides, et des lipases qui les hydrolysent afin d'optimiser la résorption intestinale (i.e. passage de la barrière digestive vers la circulation générale). A l'image des lipides exogènes consommés par l'Homme, les LBDDS administrés par voie orale subissent le même processus physiologique dans le tractus digestif et en tirent profit afin de véhiculer les PA hydrophobes jusqu'au site de résorption. De plus, certains LBDDS (notamment les formes auto-émulsifiantes) peuvent passer tels quels dans la circulation et continuent ainsi d'assurer leur rôle solubilisant du PA dans le sang. En somme, les LBDDS présentent un intérêt quadruple dans la formulation de ces PA hydrophobes :

- Ils améliorent la solubilisation du PA et permettent sa dissolution *in vivo*¹⁵ ;
- Ils stimulent les voies endogènes d'absorption des lipides (et donc du PA formulé)¹⁵ ;
- Ils peuvent stimuler le transport lymphatique intestinal des PA très lipophiles évitant l'effet du premier passage hépatique⁴⁴ (Figure 9) ;

- Certains d’entre eux (LBDDS composés de surfactants, ex. les polyéthylène glycol-hydroxystéarate et les polyéthylène glycol-castor oil) ont un rôle potentiel dans l’inhibition de l’efflux intestinal par la glycoprotéine P, les MRP (multi-drug resistance proteins) et la BCRP (breast cancer resistance protein), ce qui présente un intérêt certain dans la formulation des BCS III et IV.^{15,45}

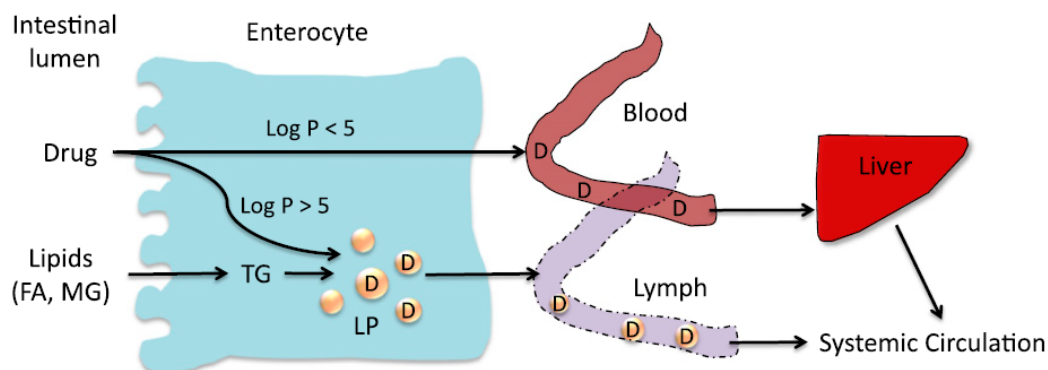


Fig. 9. Schéma représentatif de l’absorption des principes actifs dans l’intestin après administration orale. Les PA à forte lipophilie peuvent s’intégrer aux édifices lipoprotéiques synthétisés dans l’entérocyte et rejoindre la circulation par voie lymphatique, évitant ainsi l’effet du premier passage hépatique. FA= Fatty acids (acides gras) ; LP=Lipoprotéines ; MG=Monoglycérides ; DG=Diglycérides. Adapté à partir de la réf. 15

En 2000, Pouton⁴⁶ publia une classification des LBDDS destinés à l’administration par voie orale. Cette classification, complétée en 2006 et décrite dans le tableau 2,⁴⁷ est basée sur la composition des LBDDS en glycérides, surfactants et cosolvants. Elle constitue à ce jour la référence en la matière et permet d’anticiper le type de formulation (classé de I à IV) à utiliser en fonction des propriétés physicochimiques du PA.⁴⁸ Un exemple édifiant est apporté par l’étude de Mohsin et al.⁴⁹ concernant la re-précipitation d’un PA, le fénofibrate, dans différents types de LBDDS (types II, IIIa, IIIb, IV) après redilution dans de l’eau afin de simuler son comportement en milieu intestinal. Il a été rapporté qu’après une heure, 55 % et 80 % de PA avaient re-précipité dans les formulations de type IIIb et IV respectivement, tandis que moins de 5 % avait re-précipité dans les formulations de type II et IIIa. A contrario, les formulations de type IIIb et IV avaient assuré des supersaturations initiales de 900 % et 600 % respectivement (i.e. 9 et 6 fois la solubilité maximale respectivement) tandis que des saturations proches de 100 % ont été enregistrées pour les types II et IIIa. Il en résulte que les formulations de types II et IIIa présentent un grand intérêt pour la formulation des PA classés BCS II et IV, mais que les types IV et IIIb ne semblent intéressants que pour la formulation des PA classés BCS II dont la résorption intestinale n’est pas un facteur limitant.

Tableau 2. Classification des LBDDS destinés à l'administration par voie orale. Adapté à partir des réfs. 15,48

Type de formulation	Composition (% approximatif)				Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
	Glycérides	Surfactants hydrophobes (HLB < 12)	Surfactants hydrophiles (HLB > 12)	Cosolvants hydrophiles			
Type I	100	-	-	-	Inapte à la dispersion, requiert une digestion	Simple et naturellement biocompatible	Capacité de solvation limitée
Type II	40-80	20-60	-	-	SEDDS formés dans le tractus sans composés hydrophiles	Peu propice à perdre sa capacité de solvation	Formulations turbides
Type III	40-80	-	20-40	0-40	SEDDS et SMEDDS formés dans le tractus intégrant des composés hydrophiles	Absorption du PA formulé sans digestion	Propice à perdre sa capacité de solvation <i>in vivo</i> ; Peu digestible
Type III B	<20	-	20-50	20-50			
Type IV	-	0-20	30-80	0-50	Formation d'une solution micellaire	Excellente capacité de solvation vis-à-vis des PA	Très propice à perdre sa capacité de solvation <i>in vivo</i> ; Très peu digestible

Contrairement aux ASD (cf. §2), les LBDDS destinés à l'administration par voie orale ont vu le jour assez tôt dès le début des années 1940 avec la commercialisation de Drisdol[®], une formulation lipidique de l'ergocalciférol prescrite pour parer aux déficits en vitamine D. Pourtant, le nombre de LBDDS commercialisés n'a commencé à augmenter qu'à la fin des années 1970 faisant logiquement suite au développement croissant de PA hydrophobes (cf. §1). Le tableau 3 récapitule les spécialités pharmaceutiques à base de formulations lipidiques destinées à la voie orale, commercialisées aux Etats-Unis jusqu'en 2017. Il est intéressant de constater que la plupart des formulations contiennent des huiles végétales, et sont présentées sous forme de capsules molles.

Tableau 3. Liste exhaustive des LBDDS destinés à l'administration par voie orale approuvés par la Food and Drug Administration jusqu'en 2017 (bases de données : DailyMed, DrugBank, et Drugs@FDA). Adapté à partir de la réf. 50

Spécialité pharmaceutique ^(®)	Principe actif (Log P)	Année d'autorisation par la FDA	Type de formulation LBDDS (forme galénique)	Excipients principaux
Drisdol	Ergocalciferol (8,9)	1941	I (gélules)	Huile de soja
Rocatrol	Calcitriol (5)	1978	I (capsules molles)	Tri-glycérides fractionnés d'huile de coco
Depakene	Acide valproïque (2,7)	1978	I (capsules molles)	Huile de maïs
Sandimmune	Cyclosporine A (2,9)	1983	II (solution buvable)	Huile d'olive, glycérides d'acide oléique polyoxyéthylés, éthanol (12,5 %)
Marinol	Dronabinol (5,6)	1985	I (capsules molles)	Huile de sésame
Sandimmune	Cyclosporine A (2,9)	1990	II (capsules molles)	Huile de maïs, macroglycérides d'acide linoléique, éthanol (12,7 %)
Zantac	Ranitidine (1,9)	1994	II (capsules molles)	Triglycérides à chaînes moyennes, Gelucire [®] 33/01

Spécialité pharmaceutique ^(®)	Principe actif (Log P)	Année d'autorisation par la FDA	Type de formulation LBDDS (forme galénique)	Excipients principaux
Neoral	Cyclosporine A (2,9)	1995	III (capsules molles ou solution buvable)	Mono- et di-glycérides d'huile de maïs, polyéthylène glycol-40 castor oil hydrogéné, glycérol, propylène glycol, éthanol (11,9 %)
Norvir	Ritonavir (3,9)	1996	IIIa (capsules molles)	Acide oleique, polyethylene glycol-35 castor oil, ethanol.
Prometrium	Progestérone (3,9)	1998	I (capsules molles)	Huile d'arachide.
Targretin	Bexarotène (6,9)	1999	IV (capsules molles)	Polysorbate 20, polyéthylène glycol 400
Hectorol	Doxercalciferol (6,3)	1999	I (capsules molles)	Huile de coco, éthanol.
Rapamune	Sirolimus (4,3)	1999	III (solution orale)	Phosphatidylcholine, mono- et di-glycérides, acides gras de soja, palmitate d'ascorbyle, polysorbate 80, propylène glycol, éthanol.
Gengraf	Cyclosporine A (2,9)	2000	IV (gélules ou solution buvable)	Polysorbate 80, propylène glycol, polyéthylène glycol 35-castor oil pour la forme « gélule » ou polyéthylène glycol 40-castor oil hydrogéné pour la forme « solution buvable », éthanol pour la forme « gélule ».
Avodart	Dutastéride (6,8)	2001	I (capsules molles)	Mono- et di-glycérides d'acides caprique et caprylique
Claravis	Isotrétinoïne (XLogP3=6,3)	2003	III (gélules)	Huile végétale hydrogénée, huile de soja, cire blanche.
Lovaza	ethylesters d'acides Omega-3	2004	I (capsules molles)	Huile de soja.

Spécialité pharmaceutique ^(®)	Principe actif (Log P)	Année d'autorisation par la FDA	Type de formulation LBDDS (forme galénique)	Excipients principaux
Aptivus	Tipranavir (6,9)	2005	IIIa (capsules molles)	Mono- et di-glycérides d'acides caprique et caprylique, polyéthylène glycol 35-castor oil, propylène glycol, éthanol.
Aptivus	Tipranavir (6,9)	2005	IV (solution buvable)	Vitamine E TPGS, Polyéthylène glycol 400, eau, éthanol.
Zemplar	Paricalcitol (4,5)	2005	I (capsules molles)	Triglycérides à chaînes moyennes fractionnés à partir de l'huile de coco ou de l'huile de palme.
Amitiza	Lubiprostone (4,3)	2006	I (capsules molles)	Triglycérides à chaînes moyennes.
Lipofen	Fenofibrate (5,2)	2006	III (capsules)	Gelucire [®] 44/14.
Hycamtin	Topotecan (0,8)	2007	I (gélules)	Huile végétale hydrogénée, glycéryl monostéarate.
Claritin	Loratadine (5,2)	2008	III (capsules molles)	Glycérides d'acides caprique et caprylique, polysorbate 80.
Absorica	Isotrétinoïne (XLogP3=6,3)	2012	II (Gélules)	Huile de soja, polyoxyglycérides d'acide stéarique, Monooléate de sorbitane.
Xtandi	Enzalutamide (XLogP3=3,6)	2012	I (capsules molles)	Polyoxyglycérides d'acides caprique et caprylique.
Ofev	Nintedanib (3)	2014	II (capsules molles)	Triglycérides à chaînes moyennes, graisse solide.
Royaldee	Calcifédiol (6)	2016	II / III (capsules molles)	Mélange de surfactants hydrophiles (HLB < 7) et hydrophobes (13 < HLB < 18) avec un véhicule huileux (huile minérale, paraffine liquide ou squalène).

3.3. LBDDS destinés à l'administration par voie parentérale

La voie parentérale (de *para* = à côté de, et *Enteros* = tractus digestif) désigne en réalité différentes voies d'administration de médicaments par effraction cutanée. Elle englobe les voies intraveineuse (IV), intramusculaire (IM) et sous cutanée (SC) à visée systémique, et plus rarement des voies locales telles l'intraoculaire ou l'intra-articulaire. L'évidence de l'administration parentérale des LBDDS repose grandement sur la très faible immunogénicité des lipides, qui sont des constituants naturels de l'organisme humain. L'idée avait d'ailleurs germé suite au développement dans les années 1960 de l'Intralipide[®], émulsion lipidique à base d'huile de soja et de phospholipides d'œuf, destinée à la nutrition par IV.⁵¹ Des recherches menées sur cette émulsion ont abouti à la formulation de PA hydrophobes à l'intérieur des gouttelettes d'huile comme c'était le cas du Diazemuls[®] (diazepam) ou du Diprivan[®] (propofol).

3.3.1. LBDDS destinés à l'administration par voie IV

Les premiers LBDDS destinés à la voie IV étaient des **émulsions lipidiques** et avaient pour unique rôle la solubilisation des PA hydrophobes (exemples ci-dessus). Le développement des **liposomes**⁵² (i.e. vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux) et les observations consécutives quant à leur captation par le système réticuloendothélial ont par la suite ouvert le champ de la « vectorisation ».⁵³ Ainsi donc, les liposomes conventionnels constituent la 1^{re} génération de vecteurs pharmaceutiques. Ils présentent un tropisme hépatosplénique tout en permettant une réduction des effets secondaires liés aux PA. Nous citerons l'exemple de l'Amphotéricine B (antifongique) dont la forme liposomale formulée en 1998 sous le nom de spécialité Ambisome[®] (phosphatidylcholine de soja hydrogénée, cholestérol, distéaroylphosphatidylglycérol, sel de sodium et alpha-tocophérol), présente une toxicité dix fois moindre aux mêmes doses thérapeutiques que lorsqu'elle est formulée en sel de désoxycholate (Fungizone[®]).⁵⁴ Les vecteurs de 2^e génération dits « furtifs » ont ensuite fait leur apparition : il s'agit de liposomes comportant des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) à nombre de motifs variable, dont la surface échappe à l'opsonisation (i.e. recouvrement par des protéines immunitaires) et ainsi à la phagocytose (i.e. ingestion et lyse par les macrophages).⁵⁵ Ces vecteurs ont donc la particularité d'avoir un temps de résidence vasculaire prolongé, et comme conséquence directe un effet thérapeutique durable. Le meilleur exemple fut le développement d'une formulation liposomale furtive de doxorubicine⁵⁶ (Doxil[®] / Caelyx[®]) qui est actuellement indiquée en seconde intention dans les traitements du myélome multiple, du

cancer de l’ovaire ainsi que dans le traitement du sarcome de Kaposi chez les sidéens. Un autre type de vecteurs de 2^e génération est également en plein développement : les **micelles phospholipidiques** PEGylées.⁵⁷ Il a été démontré que leur temps de résidence vasculaire était directement proportionnel à la taille des chaînes de PEG, et que leur pénétrance tumorale sur modèle murin était quant à elle inversement proportionnelle à la taille de ces mêmes chaînes. De plus, des anticancéreux tels que le tamoxifène ou le paclitaxel ont pu y être incorporés avec succès.⁵⁸

A côté des vecteurs cités, une 3^e génération a émergé. Elle englobe toutes les formes dites « actives » dont la libération ciblée du PA se fait par liaison ligand-récepteur. Les LBDDS concernés englobent principalement les liposomes décorés par des macromolécules (ex. les anticorps monoclonaux et la transferrine) ou par de plus petites molécules (ex. les folates et les lectines).⁵⁹ En outre, des essais de vectorisation d’émulsions vers le foie ont été effectués, différentes glycosylations à l’aide d’ancres cholestérol ont permis aux globules lipidiques chargés en PA d’atteindre efficacement les hépatocytes, de façon significativement plus importante que des liposomes nus.^{61,62}

Enfin, de nouveaux LBDDS atypiques destinées entre autres à la voie IV ont commencé à susciter l’intérêt des formulateurs pharmaceutiques. Les nanoparticules basées sur les lipides solides en sont le meilleur exemple : les premières développées dès le début des années 1990 sont les **nanoparticules lipidiques solides (ou Solid Lipid Nanoparticles « SLN »)**, définies comme étant des particules nanométriques composées de lipides solides à température corporelle et de surfactants stabilisant la structure.⁶³

En plus des avantages communs aux LBDDS, les SLN présentent (a) une bonne stabilité physique, (b) une protection optimale des PA formulés, (c) une aptitude à la vectorisation (2^e ou 3^e génération) et (d) une excellente biocompatibilité.⁶⁴ Cavalli et son équipe ont, par exemple, travaillé sur l’incorporation de doxorubicine et d’idarubicine⁶⁵ ainsi que de paclitaxel⁶⁶ dans des SLN composées d’acide stéarique et de lécithine d’œuf pour les premiers, et de tripalmitine et de phosphatidylcholine pour le second. Cependant, deux inconvénients ont été rapportés dans la littérature à l’encontre des SLN : (a) une capacité limitée d’encapsulation de PA (généralement aux alentours de 25 %) et (b) une expulsion possible du PA durant le stockage suite à des transitions de phases et une cristallisation des lipides de la matrice.⁶³ Ce constat a conduit, à la fin des années 1990, au développement des **véhicules lipidiques nanostructurés**⁶⁷ (ou **Nanostructured Lipid Carriers « NLC »**) et des **lipides conjugués aux PA**⁶⁸ (ou **Lipid-Drug Conjugate « LDC »**).

Les NLC (Figure 10) sont des véhicules composés de lipides dont la nanostructure maîtrisée augmente les capacités d'encapsulation de PA et évite son expulsion, et ce de différentes façons à l'origine de la classification suivante^{63,69,70} :

- *Les NLC imparfaits* composés de lipides solides avec des chaînes de tailles variables, et plus ou moins de lipides liquides. L'hétérogénéité des nanostructures crée ainsi plus d'espace pour accueillir le PA tout en évitant la cristallisation des lipides de la matrice ;
- *Les NLC multiples* composés de plus grandes quantités de lipides liquides aux côtés des lipides solides, à l'origine d'une rupture de phase suivie de la formation de vésicules liquides au cœur de la matrice solide. Les capacités d'encapsulation en sont nettement augmentées ;
- *Les NLC amorphes* dont certains composés lipidiques (ex. l'hydroxyoctacosanyl-hydroxystearate et l'isopropylmyristate) inhibent la recristallisation de la matrice et préviennent l'expulsion consécutive du PA.

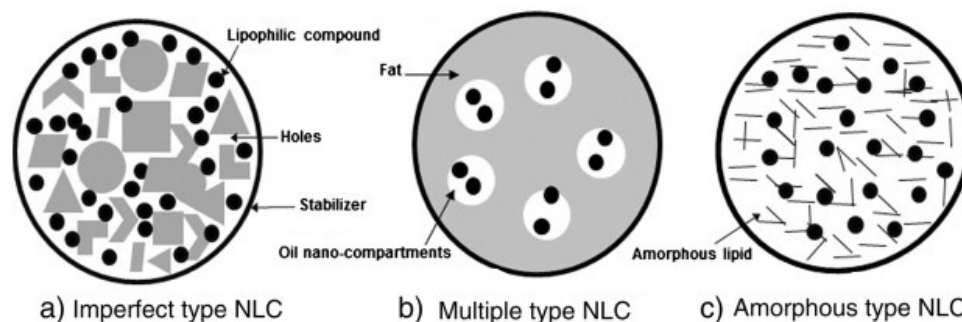


Fig. 10. Schéma représentatif des NLC (a) imparfaits, (b) multiples et (c) amorphes. Adapté à partir de la réf. 67.

Les LDC sont définis comme étant des lipides (acides gras, phospholipides, stéroïdes, glycérides, phospholipides) liés chimiquement aux PA par formation de sels gras (ex. le diminazène, un antiparasitaire formulé en distéarate et dioléate de diminazène)⁷¹ ou par l'intermédiaire d'une liaison covalente.⁶⁸ Dans ce dernier cas, plusieurs entités chimiques peuvent être synthétisées : (a) les esters (ex. le paclitaxel conjugué avec l'acide oléique),⁷² (b) les amides (ex. la gemcitabine conjuguée avec l'acide stéarique),⁷³ (c) les hydrazones (ex. la doxorubicine conjuguée à l'acide palmitique),⁷⁴ ou (d) les disulfures (ex. la mitomycine C conjuguée à l'acide 2,3-bis(distearoyloxy) propane-1-dithio-4'-benzyloxycarbonique). Aussi, les LDC covalents peuvent aussi bien s'autoassembler pour former des nanoparticules à l'image des sels gras,⁷⁵ ou bien être formulés en émulsions, liposomes et micelles classiques.⁶⁸ Quant à leur intérêt, il réside dans la conception de prodrogues, l'amélioration du passage de la barrière hématoencéphalique,⁶⁸ ainsi que la formulation des PA hydrophiles dans les LBDDS à des taux d'encapsulation élevés (ex. le diacéturate de diminazène encapsulé à 33 wt.%).^{63,71}

En somme, les LBDDS destinés à l’administration par voie IV sont récapitulés dans le tableau 4.

Tableau. 4. Récapitulatif des différents systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (LBDDS) administrables par voie IV.

LBDDS destiné à la voie IV	Intérêt	Application
Emulsions lipidiques	➤ Solubilisation des PA hydrophobes	Intralipide®
Liposomes	➤ Solubilisation des PA hydrophobes ➤ Diminution des effets secondaires systémiques ➤ Aptitude à la vectorisation.	Ambisome® ; (Doxil® / Caelyx®)
Micelles phospholipidiques	➤ Solubilisation des PA hydrophobes ➤ Aptitude à la vectorisation (PEGylation) ➤ Pénétrance tumorale.	En développement
Nanoparticules lipidiques solides (SLN) et véhicules lipidiques nanostructurés (NLC)	➤ Solubilisation des PA hydrophobes ➤ Bonne stabilité physique et protection optimale du PA ➤ Aptitude à la vectorisation.	En développement
Lipides Liés aux PA (LDC)	➤ Aptitude à formulation de PA +/- hydrophiles par conjugaison ➤ Aptitude à la conception de prodrogues par conjugaison.	En développement

3.3.2. LBDDS destinés à l’administration par les voies IM et SC

Les voies IM et SC sont intéressantes car moins contraignantes que la voie IV, elles rendent également possible l’utilisation d’une plus grande variété d’excipients lipidiques (huiles végétales de ricin, de coton ou de sésame – tableau 5).⁷⁶ Les premières formulations destinées aux voies IM et SC se présentaient sous forme de **solutions** ou d’**émulsions lipidiques** et servaient principalement de réservoirs pour une libération prolongée de PA ; les antipsychotiques furent les premiers formulés de la sorte.⁷⁷ On citera notamment l’exemple des solutions d’éthanolate et de décanoate de fluphénazine formulés dans l’huile de sésame (Prolixin®) et celui du décanoate de flupentixol (Depixol®) formulé dans de l’huile de coco hydrogénée.⁷⁸ Les formulations ont par la suite évolué vers des **systèmes microparticulaires injectables** mais ne sont pour le moment qu’en développement préclinique. L’avantage majeur visé reste l’effet « réservoir », qui est d’autant plus marqué pour les systèmes micro- que pour les nano-particulaires. Dans ce contexte, Del Curto et ses collègues⁷⁹ ont synthétisé des microparticules lipidiques solides, composées de monobéhénate et de monostéarate de glycérol,

pour une libération prolongée d'un antagoniste de l'hormone GnRH. Umeyor et ses collègues⁸⁰ ont synthétisé des microparticules lipidiques solides, composées de Phospholipon[®] 90G (phosphatidylcholine additionnée de 0.1 % de palmitate d'ascorbyle) et de Softisan[®] 154 (Huile de palme hydrogénée), pour une libération prolongée de gentamicine (antibiotique). Pour leur part, Scalia et ses collègues⁸¹ ont pointé du doigt l'intérêt des microparticules lipidiques solides pour la délivrance de peptides thérapeutiques, et ce en reprenant des travaux antérieurs faits sur l'encapsulation et la libération prolongée de somatostatine,⁸² d'insuline⁸³ et de thymocartine.⁸⁴

Tableau. 5. Exemples d'huiles végétales incorporées dans les LBDDS destinés à la voie IM. Adapté de la réf. 76

Huile	% dans la formulation	PA formulé
Huile de ricin	Mélange d'huile de ricin /éthanol /alcool benzylique	Fulverstrat
Huile de coton	100	Cypionate de testostérone
Huile de sésame	100	Décanoate d'halopéridol Décanoate de fluphénazine

3.4. Techniques de formulation des LBDDS

Les méthodes de préparation des LBDDS sont généralement propres à chacun des différents types de formulation décrits précédemment. Toutefois, le fait que les lipides soient pour la plupart immiscibles à l'eau a grandement influé les procédés de fabrication conduisant à l'utilisation de dispersions liquides et/ou de solvants organiques. L'exception confirmant la règle, **les formulations destinées à la voie orale** et classifiées par Pouton sont obtenues par simple mélange des différents composants à température ambiante ou à chaud, bien qu'un cosolvant soit souvent retrouvé dans la formulation. Il est utile de noter que pour ce genre de formulations, les tests effectués en amont sur la compatibilité des différents excipients entre eux et avec le PA ainsi que sur le comportement des phases mélangées, sont d'une importance capitale pour assurer la stabilité de la formulation finale et la capacité de cette dernière à délivrer le PA de façon optimale.⁴⁸

S'agissant des **émulsions lipidiques parentérales**, les deux phases qui les constituent sont préparées séparément. Les additifs (ex. surfactants) lipophiles sont ajoutés dans l'huile tandis que ceux hydrophiles sont dissous dans la phase aqueuse, avant que la phase huileuse n'y soit dispersée.⁸⁵ La taille des gouttelettes est ensuite ramenée aux exigences de la pharmacopée (ex. USP : une taille inférieure ou égale à 500 nm, avec une taille pondérée en volume $\geq 5 \mu\text{m}$ qui soit inférieure ou égale à 0,05 %)⁸⁶ et ce par homogénéisation à haute pression⁸⁷ ou par

microfluidisation.⁸⁸ Durant le processus, le PA peut être incorporé directement dans la formulation, soit avant formation de l'émulsion (cas des PA fortement liposolubles) ou après sa formation (cas des PA hydrophobes liquides). Un cosolvant peut également servir d'accélérateur de solubilisation pour le PA avant d'être éliminé par évaporation.⁸⁹ Les exigences particulières de stérilité des formulations destinées à la voie parentérale nécessitent la mise en place soit d'une chaîne de procédés aseptique, ou d'une stérilisation finale de la formulation que ce soit par filtration stérilisante si la taille des gouttelettes est inférieure à 200 nm ou par stérilisation thermique si la stabilité du PA et de sa formulation le permettent.⁵⁹

Concernant la préparation des **liposomes**, elle fait intervenir deux techniques majeures : par formation d'un film de phospholipides (méthode de Bangham) ou par inversion de phase. La première consiste à solubiliser des phospholipides dans un solvant, avant de faire évaporer ce dernier pour former un film. Celui-ci est hydraté afin d'obtenir une suspension de vésicules multilamellaires (Multi Lamellar Vesicles « MLV »), qui après une étape d'ultrasonication⁹⁰ ou d'extrusion à travers des membranes poreuses conduisent à la formation de petites vésicules unilamellaires (ou Small Unilamellar Vesicles « SUV »).⁹¹ La seconde repose sur l'injection d'une phase organique chargée en phospholipides dans une phase aqueuse, après quoi le solvant organique se retrouve dilué dans la phase aqueuse (ex. éthanol)⁹² ou s'évapore spontanément (ex. éther).⁵² Des techniques de microfluidique tendent également à être appliquées pour les formulations liposomales,⁹³ certains exemples sont cités dans la deuxième partie de ce manuscrit.

La préparation des **nanoparticules (SLN, NLC, LDC) et des microparticules basées sur les lipides solides** doit tenir compte d'une contrainte supplémentaire liée à l'état solide des lipides à température ambiante. Les techniques mises en jeu font intervenir soit un apport thermique afin de faire fondre les lipides, ou une dissolution transitoire dans un solvant organique adéquat. Les SLN, NLC sont le plus souvent préparées par homogénéisation à haute pression, par microémulsification, par émulsification suivie d'une élimination de solvant, ou par ultrasonication.⁶³ L'homogénéisation à haute pression⁹⁴ est effectuée de préférence à chaud : elle consiste en la dissolution du PA dans les lipides fondus, suivie d'une émulsification dans une phase aqueuse réchauffée contenant un tensioactif. L'émulsion ainsi formée est passée dans un homogénéisateur à haute pression, et les nanogouttelettes obtenues sont par la suite refroidies. Ces procédés sont également retrouvés dans la formulation des LDC après conjugaison chimique du PA avec la partie lipidique. Pour ce qui est de la production des microparticules lipidiques solides, Del Curto⁹⁵ a breveté un procédé de micronisation cryogénique (à -80 °C) d'une matrice lipidique contenant le PA. Cette matrice peut être

préalablement obtenue aussi bien par une méthode température-dépendante (fusion du PA et des lipides) ou par une méthode solvant-dépendante (dissolution du PA et des lipides dans un solvant organique, suivie d'une évaporation sous vide). Une autre méthode originale basée sur des solutions micellaires inversées a été adoptée pour la préparation des microparticules lipidiques solides. Elle est notamment employée pour l'encapsulation des PA plus ou moins hydrophiles dans des LBDDS et élargit ainsi le champ d'intérêt de ces dernières.⁸⁰ De plus, elle permet la formation d'une mésophase lamellaire au contact des milieux aqueux après administration, phase pour laquelle le coefficient de diffusion du PA est 100 fois inférieur à celui dans la solution huileuse correspondante, assurant ainsi une libération prolongée du PA.⁹⁶ Pour conclure, nous citerons une méthode originale destinée à l'obtention de nanocapsules lipidiques (i.e. nanoparticules avec un cœur lipidique liquide) à base de triglycérides, de Polyéthylène glycol-15-hydroxystéarate et de phospholipides, et ce par inversion de phase d'une émulsion Huile/ Eau en émulsion Eau/Huile.⁹⁷ Cette méthode ne requiert aucun appareillage spécifique, et permet d'obtenir des tailles nanométriques avec une excellente distribution. Toutefois, les cycles d'inversion de phase ne sont pas facilement transposables à l'échelle industrielle.

4. Conclusion

Le premier volet de ce chapitre retrace le chemin menant du principe actif (PA) à la forme médicamenteuse administrable, d'autant plus complexe que le PA présente une faible hydrosolubilité. De multiples stratégies ont été élaborées au fil du temps, s'appuyant sur les différentes caractéristiques physicochimiques qui procurent au PA une faible solubilité en milieu aqueux. Ainsi, l'une des stratégies pour formuler les PA qui présentent de fortes énergies de liaison cristalline est celle des dispersions solides amorphes (ASD) : elles assurent une rupture préalable de ces liaisons et augmentent par ce fait la vitesse de solubilisation du PA en milieu physiologique. Concernant les PA hydrophobes, les systèmes à base de lipides pour la délivrance de PA (LBDDS) font office de véhicules galéniques capables de solvater ces PA en milieu physiologique.

Néanmoins, les inconvénients majeurs inhérents aux procédés de formulation des ASD et des LBDDS restent leur consommation excessive en énergie et/ou l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques.

5. Références bibliographiques

1. Cayotte, J. La médecine aux temps préhistoriques. *Mémoires de l'Académie nationale de Metz* (1976).
2. Kubinyi, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. *Pharmazie* **50**, 647–662 (1995).
3. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **23**, 3–25 (1997).
4. Keserü, G. M. & Makara, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 203–212 (2009).
5. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**, 235–249 (2000).
6. Bergström, C. A. S., Charman, W. N. & Porter, C. J. H. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews* **101**, 6–21 (2016).
7. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P. & Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research* **12**, 413–420 (1995).
8. Benet, L. Z. *et al.* The Use of BDDCS in Classifying the Permeability of Marketed Drugs. *Pharm Res* **25**, 483–488 (2008).
9. Wu, C.-Y. & Benet, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res* **22**, 11–23 (2005).
10. Hauss, D. J. Oral lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 667–676 (2007).
11. Benet, L. Z., Broccatelli, F. & Oprea, T. I. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. *AAPS J* **13**, 519–547 (2011).
12. Charalabidis, A., Sfouni, M., Bergström, C. & Macheras, Panos. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics* **566**, 264–281 (2019).
13. Bergström, C. A. S., Wassvik, C. M., Johansson, K. & Hubatsch, I. Poorly Soluble Marketed Drugs Display Solvation Limited Solubility. *J. Med. Chem.* **50**, 5858–5862 (2007).
14. Edueng, K., Mahlin, D. & Bergström, C. A. S. The Need for Restructuring the Disordered Science of Amorphous Drug Formulations. *Pharm Res* **34**, 1754–1772 (2017).
15. Williams, H. D. *et al.* Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol Rev* **65**, 315–499 (2013).
16. Meere, M., McGinty, S. & Pontrelli, G. Mathematically modelling the dissolution of solid dispersions. Proceedings, in Equadiff 2017 (2017).
17. Huang, Y. & Dai, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **4**, 18–25 (2014).

18. Jog, R. *et al.* Formulation design and evaluation of amorphous ABT-102 nanoparticles. *Int J Pharm* **498**, 153–169 (2016).
19. Guzmán, H. R. *et al.* Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 2686–2702 (2007).
20. Brough, C. & Williams, R. O. Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **453**, 157–166 (2013).
21. Brouwers, J., Brewster, M. E. & Augustijns, P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *J Pharm Sci* **98**, 2549–2572 (2009).
22. Siepmann, J. *et al.* Lipids and polymers in pharmaceutical technology: Lifelong companions. *International Journal of Pharmaceutics* **558**, 128–142 (2019).
23. Yamashita, K. *et al.* Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *Int J Pharm* **267**, 79–91 (2003).
24. Kyobula, M. *et al.* 3D inkjet printing of tablets exploiting bespoke complex geometries for controlled and tuneable drug release. *Journal of Controlled Release* **261**, 207–215 (2017).
25. Paudel, A., Worku, Z. A., Meeus, J., Guns, S. & Van den Mooter, G. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *International Journal of Pharmaceutics* **453**, 253–284 (2013).
26. Vippagunta, S. R., Wang, Z., Hornung, S. & Krill, S. L. Factors Affecting the Formation of Eutectic Solid Dispersions and Their Dissolution Behavior. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 294–304 (2007).
27. Craig, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **231**, 131–144 (2002).
28. Huang, S. & Williams, R. O. Effects of the Preparation Process on the Properties of Amorphous Solid Dispersions. *AAPS PharmSciTech* **19**, 1971–1984 (2018).
29. Allesø, M. *et al.* Enhanced dissolution rate and synchronized release of drugs in binary systems through formulation: Amorphous naproxen–cimetidine mixtures prepared by mechanical activation. *Journal of Controlled Release* **136**, 45–53 (2009).
30. Xiong, X. *et al.* Solid dispersions of telaprevir with improved solubility prepared by co-milling: formulation, physicochemical characterization, and cytotoxicity evaluation. *Materials Science and Engineering: C* **105**, 110012 (2019).
31. Kadota, K. *et al.* Emergent composite structures following the amorphization of itraconazole with α -glucosyl rutin by over-grinding. *Powder Technology* **323**, 69–75 (2018).
32. Isaac, J., Ganguly, S. & Ghosh, A. Co-milling of telmisartan with poly(vinyl alcohol) – An alkalizer free green approach to ensure its bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **101**, 43–52 (2016).
33. Lowinger M, Baumann J, Vodak DT & Moser J. Practical considerations for spray dried formulation and process development. in *Discovering and developing molecules with optimal drug-like properties* 383–435 (AAPS Press, Springer, 2014).

34. Mahlin, D., Ponnambalam, S., Heidarian Höckerfelt, M. & Bergström, C. A. S. Toward *In Silico* Prediction of Glass-Forming Ability from Molecular Structure Alone: A Screening Tool in Early Drug Development. *Mol. Pharmaceutics* **8**, 498–506 (2011).
35. Breitenbach, J. Melt extrusion: from process to drug delivery technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **54**, 107–117 (2002).
36. Vasoya, J. M. *et al.* Development of Solid Dispersion by Hot Melt Extrusion Using Mixtures of Polyoxylglycerides With Polymers as Carriers for Increasing Dissolution Rate of a Poorly Soluble Drug Model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **108**, 888–896 (2019).
37. Guo, Z. *et al.* The utilization of drug-polymer interactions for improving the chemical stability of hot-melt extruded solid dispersions: Improve chemical stability in HME. *J Pharm Pharmacol* **66**, 285–296 (2014).
38. Haser, A., Huang, S., Listro, T., White, D. & Zhang, F. An approach for chemical stability during melt extrusion of a drug substance with a high melting point. *International Journal of Pharmaceutics* **524**, 55–64 (2017).
39. Huang, D. *et al.* Hot melt extrusion of heat-sensitive and high melting point drug: Inhibit the recrystallization of the prepared amorphous drug during extrusion to improve the bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics* **565**, 316–324 (2019).
40. LaFontaine, J. S., McGinity, J. W. & Williams, R. O. Challenges and Strategies in Thermal Processing of Amorphous Solid Dispersions: A Review. *AAPS PharmSciTech* **17**, 43–55 (2016).
41. Miller DA & Keen JM. KinetiSol®-based amorphous solid dispersions. in *Amorphous solid dispersions: theory and practice* 699 (Springer : Controlled Release Society, 2014).
42. Polonovski, J., Mandel, P., Biserte, G. & Tayeau, F. *Les Constituants des organismes vivants.* (Masson, 1977).
43. Soares, T. B. *et al.* Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases? *Progress in Neurobiology* **168**, 21–41 (2018).
44. Trevaskis, N. L., Charman, W. N. & Porter, C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 702–716 (2008).
45. Constantinides, P. P. & Wasan, K. M. Lipid Formulation Strategies for Enhancing Intestinal Transport and Absorption of P-Glycoprotein (P-gp) Substrate Drugs: In vitro/In vivo Case Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 235–248 (2007).
46. Pouton, C. W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci* **11 Suppl 2**, S93-98 (2000).
47. Pouton, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **29**, 278–287 (2006).
48. Pouton, C. W. & Porter, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 625–637 (2008).

49. Mohsin, K., Long, M. A. & Pouton, C. W. Design of Lipid-Based Formulations for Oral Administration of Poorly Water-Soluble Drugs: Precipitation of Drug after Dispersion of Formulations in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **98**, 3582–3595 (2009).
50. Savla, R., Browne, J., Plassat, V., Wasan, K. M. & Wasan, E. K. Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **43**, 1743–1758 (2017).
51. Wretling, A. Development of fat emulsions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **5**, 230–235 (1981).
52. Deamer, D. & Bangham, A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **443**, 629–634 (1976).
53. Souhami, R. L., Patel, H. M. & Ryman, B. E. The effect of reticuloendothelial blockade on the blood clearance and tissue distribution of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **674**, 354–371 (1981).
54. Adler-Moore, J. P. & Proffitt, R. T. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences? *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 4**, 25–36 (2008).
55. Davis, S. S. Coming of age of lipid-based drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1241–1242 (2004).
56. James, N. D. *et al.* Liposomal doxorubicin (Doxil): An effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clinical Oncology* **6**, 294–296 (1994).
57. Constantinides, P. P., Chaubal, M. V. & Shorr, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 757–767 (2008).
58. Lukyanov, A. N. & Torchilin, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1273–1289 (2004).
59. Chen, D. & Yazdi, S. Polymer- and Lipid-Based Systems for Parenteral Drug Delivery. in *Sterile Product Development* (eds. Kolhe, P., Shah, M. & Rathore, N.) vol. 6 47–60 (Springer New York, 2013).
60. Milone, M. C. & O'Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* **32**, 1529–1541 (2018).
61. Ishida, E. *et al.* Biodistribution Characteristics of Galactosylated Emulsions and Incorporated Probucol for Hepatocyte-Selective Targeting of Lipophilic Drugs in Mice. *Pharm Res* **21**, 932–939 (2004).
62. Yeeprae, W., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F. & Hashida, M. Biodistribution characteristics of mannosylated and fucosylated O/W emulsions in mice. *J Drug Target* **13**, 479–487 (2005).
63. Wissing, S. A., Kayser, O. & Müller, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1257–1272 (2004).
64. Doktorovová, S., Kovačević, A. B., Garcia, M. L. & Souto, E. B. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **108**, 235–252 (2016).
65. Cavalli, R., Caputo, O. & Gasco, M. R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *International Journal of Pharmaceutics* **89**, R9–R12 (1993).

66. Cavalli, R., Caputo, O. & Gasco, M. R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* **10**, 305–309 (2000).
67. Müller, R. H., Radtke, M. & Wissing, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **242**, 121–128 (2002).
68. Irby, D., Du, C. & Li, F. Lipid–Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **14**, 1325–1338 (2017).
69. Selvamuthukumar, S. & Velmurugan, R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis* **11**, 159 (2012).
70. Westesen, K., Bunjes, H. & Koch, M. H. J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release* **48**, 223–236 (1997).
71. Olbrich, C., Gessner, A., Kayser, O. & Müller, R. H. Lipid-Drug-Conjugate (LDC) Nanoparticles as Novel Carrier System for the Hydrophilic Antitrypanosomal Drug Diminazenediacetate. *Journal of Drug Targeting* **10**, 387–396 (2002).
72. Lundberg, B. B., Risovic, V., Ramaswamy, M. & Wasan, K. M. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J Control Release* **86**, 93–100 (2003).
73. Wang, Y. *et al.* Enhanced tumor delivery of gemcitabine via PEG-DSPE/TPGS mixed micelles. *Mol. Pharm.* **11**, 1140–1150 (2014).
74. Li, F. *et al.* Preparation and Characterization of Lipophilic Doxorubicin Pro-drug Micelles. *J Vis Exp* (2016) doi:10.3791/54338.
75. Couvreur, P. *et al.* Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue. *Small* **4**, 247–253 (2008).
76. Strickley, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharm Res* **21**, 201–230 (2004).
77. Davis, J. M., Matalon, L., Watanabe, M. D. & Blake, L. Depot antipsychotic drugs. Place in therapy. *Drugs* **47**, 741–773 (1994).
78. Brissos, S., Veguilla, M. R., Taylor, D. & Balanzá-Martinez, V. The role of long-acting injectable antipsychotics in schizophrenia: a critical appraisal. *Ther Adv Psychopharmacol* **4**, 198–219 (2014).
79. Del Curto, M. D. *et al.* Lipid microparticles as sustained release system for a GnRH antagonist (Antide). *Journal of Controlled Release* **89**, 297–310 (2003).
80. Umeyor, E. C., Kenechukwu, F. C., Ogbonna, J. D., Chime, S. A. & Attama, A. Preparation of novel solid lipid microparticles loaded with gentamicin and its evaluation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Microencapsulation* **29**, 296–307 (2012).
81. Scalia, S., Young, P. M. & Traini, D. Solid lipid microparticles as an approach to drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **12**, 583–599 (2015).
82. Reithmeier, H., Herrmann, J. & Göpferich, A. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *International Journal of Pharmaceutics* **218**, 133–143 (2001).

83. Wu, C., van de Weert, M., Baldursdottir, S. G., Yang, M. & Mu, H. Effect of excipients on encapsulation and release of insulin from spray-dried solid lipid microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **550**, 439–446 (2018).
84. Reithmeier, H., Herrmann, J. & Göpferich, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *Journal of Controlled Release* **73**, 339–350 (2001).
85. Floyd, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharmaceutical Science & Technology Today* **2**, 134–143 (1999).
86. Driscoll, D. F. Globule-size distribution in injectable 20 % lipid emulsions: Compliance with USP requirements. *American Journal of Health-System Pharmacy* **64**, 2032–2036 (2007).
87. Peng, J. *et al.* Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. *Journal of Food and Drug Analysis* **23**, 828–835 (2015).
88. Washington, C. & Davis, S. S. The production of parenteral feeding emulsions by Microfluidizer. *International Journal of Pharmaceutics* **44**, 169–176 (1988).
89. Hippalgaonkar, K., Majumdar, S. & Kansara, V. Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech* **11**, 1526–1540 (2010).
90. Huang, C.-H. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**, 344–352 (1969).
91. MacDonald, R. C. *et al.* Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1061**, 297–303 (1991).
92. Lasic, D. D. Mechanisms of Liposome Formation. *Journal of Liposome Research* **5**, 431–441 (1995).
93. Patil, Y. P. & Jadhav, S. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* **177**, 8–18 (2014).
94. Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J. S. & Müller, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release* **30**, 83–96 (1994).
95. Del Curto, M. D., Chicco, D. & Esposito, P. Lipid Microparticles By Cryogenic Micronization. (2004).
96. Mueller-Goymann, C. C. & Hamann, H.-J. Sustained release from reverse micellar solutions by phase transformations into lamellar liquid crystals. *Journal of Controlled Release* **23**, 165–174 (1993).
97. Heurtault, B. *et al.* The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **18**, 55–61 (2003).

2^e volet

Un Mot sur Le Sol-gel et les Matériaux Hybrides

Sommaire

1. Le sol-gel.....	44
1.1. Définitions	44
1.2. Aspects chimiques de la réactivité sol-gel.....	44
1.3. Applications du sol-gel.....	46
2. Les matériaux hybrides.....	47
2.1. Définitions	48
2.2. Matériaux hybrides à base de lipides et de silice.....	49
3. Conclusion.....	52
4. Références bibliographiques	53

Figures

Fig. 1. Synthèse de différentes formes de gel à partir d'un alkoxyde métallique	45
Fig. 2. Evolution de la vitesse d'hydrolyse sol-gel en fonction du pH de la solution gélifiante.....	46
Fig. 3. Aperçu des différentes applications que puissent offrir les matériaux mésoporeux à base de silice.....	47
Fig. 4. Observations en microscopie à balayage à différents grossissements de fibres hybrides silice-gélatine de classe I et de classe II	49

Tableau

Tableau 1. Matériaux hybrides huile de ricin/silice destinés à des applications non médicales	51
--	----

1. Le sol-gel

1.1. Définitions

Le sol-gel (diminutif de solution-gélification) est un procédé chimique faisant intervenir des précurseurs sous forme d’oxydes en solution qui, par réaction de polymérisation, se gélifient pour former un réseau tridimensionnel. La première polymérisation sol-gel a été décrite par Ebelmen en 1845, ses travaux portaient sur la conversion en verre solide de l’acide silicique exposé à l’air humide. Néanmoins, il aura fallu attendre près d’un siècle pour que cette idée soit reprise par l’industrie verrière. Dans les années 1930, la firme allemande Schott utilise pour la première fois le procédé pour la fabrication de récipients en verre, avant de déposer le premier brevet sol-gel en 1939.¹ Depuis, le procédé a été largement repris dans la synthèse de verres, de céramiques et de composés hybrides organo-minéraux pour diverses applications. Cet intérêt grandissant est notamment dû au fait que le procédé sol-gel adhère aux principes de la chimie verte,² car il est particulièrement peu énergivore (les réactions sont thermodynamiquement permises à température ambiante) et a lieu généralement en milieu aqueux limitant ainsi l’utilisation de solvants organiques. Aussi, il permet une maîtrise essentielle des phénomènes physicochimiques impliqués durant la polymérisation,³ ce qui ouvre le champ à l’approche « *bottom-up* » pour la confection d’objet nano-, micro- ou macroscopiques.⁴

1.2. Aspects chimiques de la réactivité sol-gel

Deux voies de synthèse sol-gel sont décrites dans la littérature :

- **La voie inorganique ou colloïdale** : obtenue à partir de sels métalliques (ex. chlorures, nitrates) en solution aqueuse. Cette voie est peu couteuse mais difficile à contrôler, c’est pour cela qu’elle est encore très peu utilisée. Elle est notamment privilégiée dans la synthèse des céramiques⁵ ;
- **La voie métallo-organique ou polymérique** : impliquant des alcoxydes métalliques en solution. Cette voie est privilégiée car sa cinétique est facilement maîtrisable,¹ ce qui permet de concevoir une panoplie de matériaux à propriétés modulables (Figure 1).

La voie métallo-organique est permise grâce à deux réactions successives :

- a) L’hydrolyse des alcoxydes métalliques selon la réaction-bilan suivante :



Où : M est un métalloïde ou métal de transition ;

- b) La condensation pour former un réseau de métalloxanes liés via des liaisons M-O-M. Elle est obtenue soit :

- Par *oxolation*, c'est-à-dire par réaction entre deux hydroxydes métalliques obtenus après hydrolyse :



- Ou par *alcoxolation*, c'est-à-dire par réaction entre un hydroxyde métallique obtenu après hydrolyse et un alcoxyde métallique non encore hydrolysé :

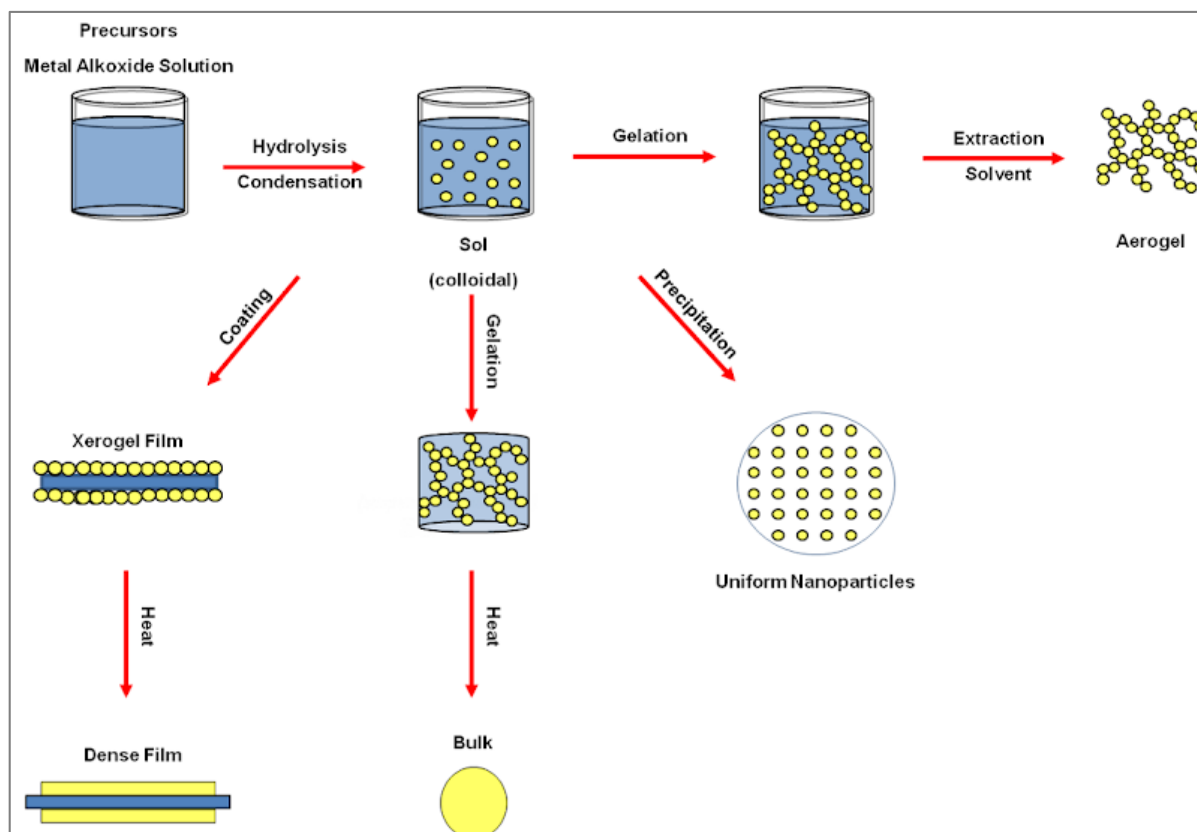


Fig. 1. Synthèse de différentes formes de gel à partir d'un alkoxyde métallique.

Les xerogels diffèrent des aérogels par leurs densités beaucoup plus importantes que celles de ces dernières. Adapté à partir de la réf. 6.

Les alcoxydes de silicium sont de loin les précurseurs les plus utilisés en synthèse sol-gel. Ils ont pour formule chimique : $\text{R}'_{4-n}\text{Si}(\text{OR})_n$ où R et R' sont des chaînes alkyles. Le silicium étant tétravalent, le « n » est compris entre 1 et 4, et on parlera selon les cas d'entité chimique mono-, bi-, tri-, ou tétra-fonctionnelle (symbolisées respectivement M, B, T et Q). Cependant, la faible électropositivité de l'atome de Silicium comparée aux autres métaux de transition le rend moins susceptible à une attaque nucléophile (et donc à une libération des groupements protecteurs alcoxydes), d'où l'intérêt d'incorporer des catalyseurs pour accélérer la réaction d'hydrolyse et, optionnellement, celle de condensation.^{1,7}

La réaction d'hydrolyse est le plus souvent catalysée par variation de pH. Comme le montre la Figure 2, la vitesse d'hydrolyse des alcoxysilanes est particulièrement accélérée en s'éloignant de la neutralité. L'hydrolyse acide est souvent assurée par ajout d'acides forts (ex. HCl, H₂SO₄, PTSA) dont les protons H⁺ libérés en solution attaquent les doublets électroniques de l'oxygène, et forment ensemble un bon groupement partant. Quant à l'hydrolyse basique, elle est le plus souvent permise par ajout de base forte (ex. NaOH, KOH) ou d'ammoniaque (NH₄OH) dont les hydroxydes OH⁻ libérés en solution attaquent le centre silicique et facilitent le départ de l'alcoyle. A l'image de ce dernier cas, l'ion fluorure contenu dans le HF ou dans ses sels (KF, NaF, TBAF) peut jouer un rôle analogue aux hydroxydes et ainsi catalyser de façon prononcée la réaction d'hydrolyse.^{7,8} Un autre cas atypique est celui de la catalyse par l'acide acétique : il a été rapporté qu'une substitution anionique de l'alcoxy- par l'acétate (CH₃COO⁻) a lieu, suivie d'une attaque nucléophile de l'alcoyle partant sur l'acétate qui est fixé sur le centre silicique. Au final, un acétate d'alkyle est formé comme co-produit de réaction et la réaction est accélérée tout autant qu'en présence d'acide fort.⁹

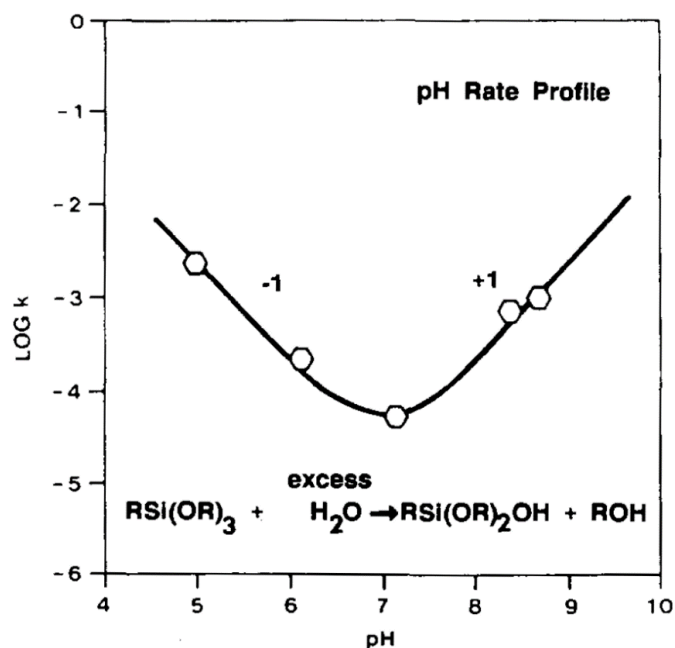


Fig. 2. Evolution de la vitesse d'hydrolyse sol-gel en fonction du pH de la solution gélifiante. La molécule étudiée est le γ -glycidoxypropyltrialcoxysilane. Adapté de la réf. 10.

1.3. Applications du sol-gel

Du fait qu'il épouse parfaitement les principes de la chimie verte, le procédé sol-gel a su conquérir une multitude de domaines et ainsi être appliqué à différentes technologies parmi lesquelles les revêtements de surface,¹¹ la microencapsulation⁴ et les nanotechnologies¹² sont des plus importantes.

Dans le domaine médical, le sol-gel a grandement contribué à l'élaboration de revêtements capables d'optimiser la biocompatibilité des biomatériaux, de favoriser la régénérescence des tissus endommagés, et d'offrir une protection vis-à-vis des germes susceptibles d'infecter les sites d'implantation.^{13,14} D'autre part, les technologies de micro- et nano-encapsulation basées sur des procédés sol-gel et destinés à la délivrance de PA ont connu un essor remarquable ces dernières années. Nous citerons notamment l'exemple des silices mésoporeuses appliquées à la délivrance de PA peu hydrosolubles.^{15,16} Leur avantage majeur provient de la grande surface de contact qu'elles offrent ainsi que du volume conséquent de leurs pores. Ces propriétés permettent aux matériaux d'accueillir de grandes quantités de PA, de le protéger contre une dégradation prématurée et de favoriser sa libération contrôlée et rapide. En outre, les matériaux mésoporeux à base de silice sont connus pour être résorbables car ils se dégradent ou se dissolvent complètement dans des solutions aqueuses en acide silicique non toxique, la principale forme de silicium dans le corps humain. En somme, la Figure 3 résume les différentes applications des matériaux mésoporeux à base de silice.

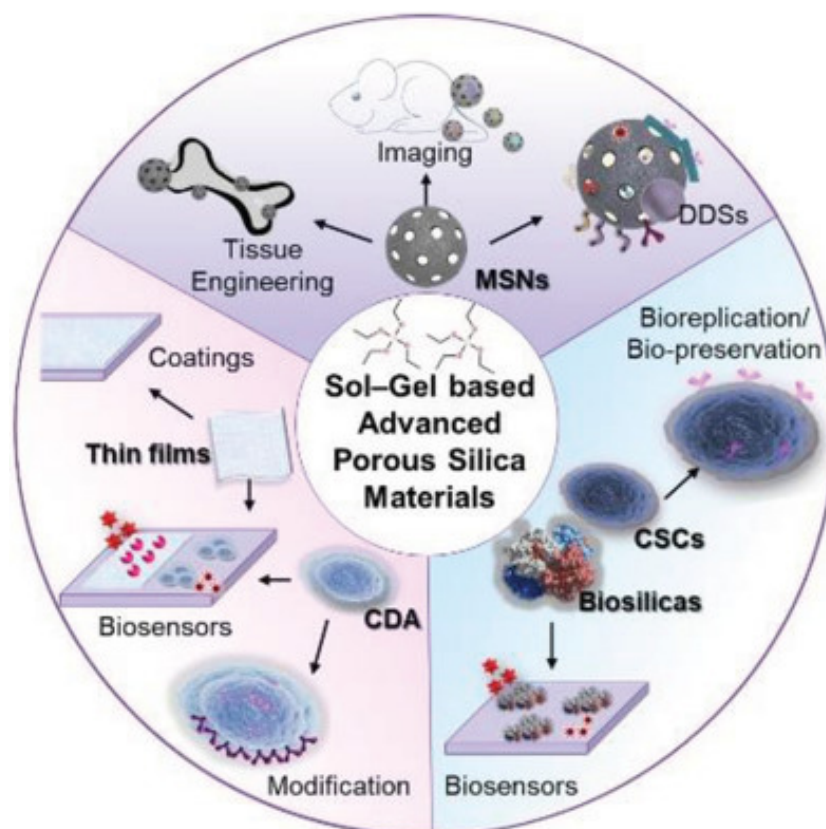


Fig. 3. Aperçu des différentes applications que peuvent offrir les matériaux mésoporeux à base de silice. Adapté à partir de la réf. 14.

2. Les matériaux hybrides

2.1. Définitions

La chimie sol-gel étant compatible avec les réactions de la chimie organique, il devient possible d'associer au sein d'un même matériau des espèces minérales et organiques et de former ainsi des matériaux hybrides aux propriétés combinées et nouvelles.¹⁷ Selon la nature des liaisons entre la partie organique et inorganique au sein du matériau hybride, on distingue deux classes⁷ :

- **Les matériaux hybrides de classe I**, dits « hôte-invité », dont la fraction organique n'est qu'emprisonnée dans le réseau minéral formé par sol-gel, sans liaisons fortes entre les deux parties. Des petites molécules (ex. colorants azoïques) aussi bien que des macromolécules, des enzymes ou des cellules vivantes peuvent être incorporées dans les réseaux minéraux, pour peu que la taille des mailles le permette.
- **Les matériaux hybrides de classe II**, dont la fraction organique est liée de façon covalente au réseau minéral. Ces matériaux sont généralement obtenus à partir de précurseurs mixtes tels que les organo-alcoxysilanes $R'_{(4-n)}Si(OR)_n$ avec $n < 4$ (c.-à-d., comportant au moins une chaîne alkyle rattachée directement au centre silicique). Ces molécules comportent simultanément des fonctions hydrolysables (Si-OR) qui donnent naissance à un réseau siloxane et des fonctions organiques (Si-R') qui restent fixées sur le squelette de silice. Selon sa nature, le groupement organique jouera soit un rôle de modificateur structural ou de formateur de réseau. Dans le premier cas, il confère au réseau minéral des propriétés optiques, électriques, ou chimiques particulières. Dans le second cas, le groupement organique est fonctionnel et polymérisable (vinyl, époxy, méthacrylate, isocyanate) et une double réticulation, simultanée ou successive, a lieu conduisant à des réseaux interpénétrés de polymères organiques et d'alcoxydes.

La figure 4 illustre les deux classes d'hybrides, issus de mêmes matières premières (silice et gélatine) mais dont l'enchevêtrement à l'état moléculaire est différent.

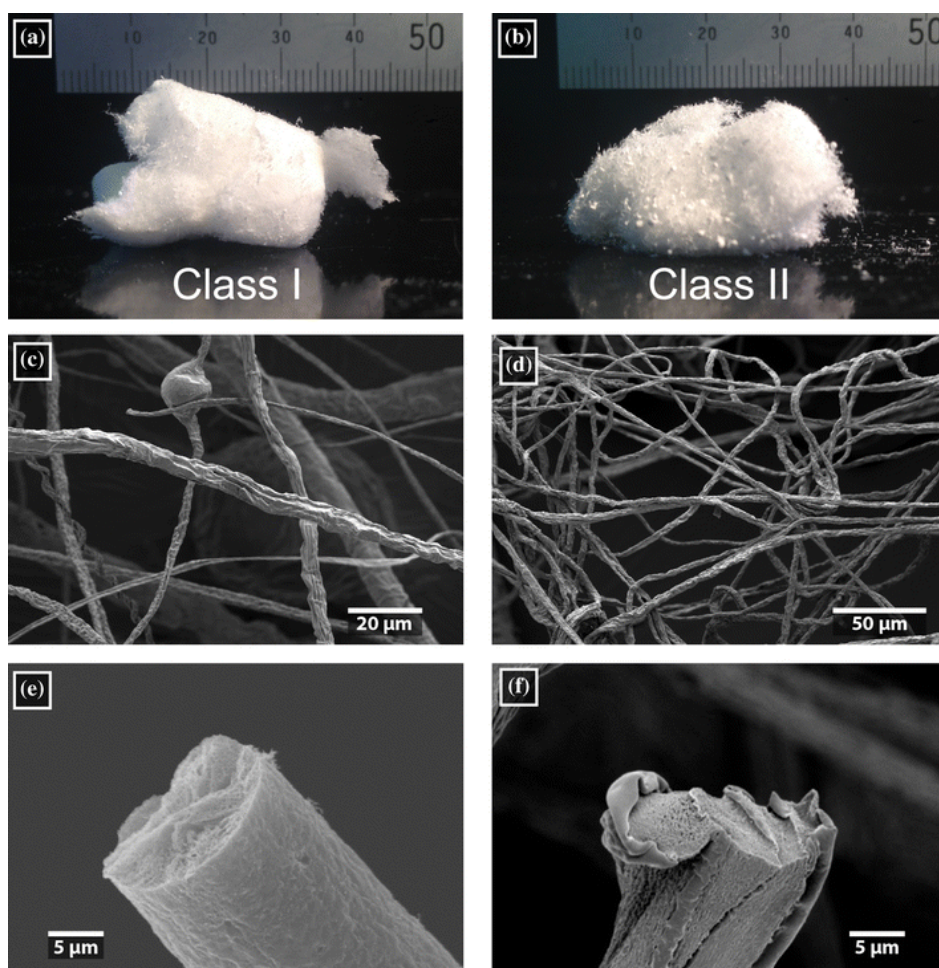


Fig. 4. Observations en microscopie à balayage à différents grossissements de fibres hybrides silice-gélatine de classe I (à gauche) et de classe II (à droite). Adapté à partir de la réf. 18.

2.2. Matériaux hybrides à base de lipides et de silice

Nous avons répertorié différentes études portant sur les matériaux hybrides qui comportent de la silice et des lipides, plus particulièrement celles basées sur des huiles végétales. La grande majorité de ces études s'intéressent à l'incorporation de l'huile de ricin dans des réseaux hybrides, car cette huile (a) possède naturellement un groupe hydroxyle et une insaturation (double liaison), tous deux fonctionnalisables par une multitude d'agents de silylation, (b) est peu chère et (c) n'est pas destinée à l'alimentation. Ces hybrides peuvent être dédiés à la confection de revêtements, ou bien moins fréquemment à des applications médicales avec quelques exemples de pansements et de systèmes de libération de PA.

2.2.1. Applications non médicales

L'élaboration de ces matériaux hybrides a pour but non seulement de valoriser des matières premières biosourcées renouvelables, mais également de développer des matériaux performants avec des stabilités thermiques, chimiques et des propriétés mécaniques inédites (Tableau 1). Ainsi, Bhosale et *al.*¹⁹ ont modifié de l'huile de ricin avec un anhydride maléique pour permettre le greffage d'un précurseur silylé, le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate. Des films hybrides ont été formés et présentaient une résistance accrue à la température, au gonflement et à la corrosion. Xia et Larock²⁰ ont proposé la modification de l'huile par un diisocyanate et l'acide diméthylol propionique, constituant un pré-polymère de polyuréthane qui a été ensuite fonctionnalisé puis réticulé en utilisant l'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane) comme précurseur silylé. Ils ont obtenu un polymère à base d'huile renfermant des nanoparticules de silice capable de former des revêtements avec une haute résistance thermique et mécanique. Allaudin et *al.*²¹ quant à eux ont modifié l'huile de ricin par de l'anhydride succinique puis du GPTMS (3-glycidyloxypropyltriméthoxysilane) dans le but de consolider des revêtements polyuréthanes. Meera et *al.*²² ont proposé la même stratégie pour le développement de surfaces hydrophobes. De Luca et *al.*²³ décrivent l'obtention de films en utilisant de l'huile de ricin modifiée (GPTMS) additionnée de différents pourcentages de TEOS (tetraéthoxysilane). Cette équipe a également travaillé à l'amélioration des propriétés des revêtements en utilisant différents agents de silylation et d'oxyde de titane.^{24,25} Plus récemment, Meng et *al.*²⁶ ont développé des revêtements à base d'huile de ricin réticulée à la fois par chimie sol-gel avec du MPTMS (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane) et par réaction thiol-ène.

L'huile de ricin peut aussi être utilisée comme additif. Mülazim et *al.*²⁷ décrivent l'obtention de polymères hybrides photo-réticulables où l'ajout d'huile de ricin fonctionnalisée par l'IPTES (3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate)) permet de rendre très hydrophobes les revêtements développés.^{27,28}

D'autres huiles végétales ont été utilisées pour l'élaboration de matériaux hybrides, comme l'huile de soja à l'aide de TEOS pour développer des films rigides et adhérents,²⁹ ou à l'aide de GPTMS pour réaliser des revêtements souples et résistants.³⁰ L'huile de lin, quant à elle, a été exploitée par Lligadas et ses collègues³¹ en compagnie de différents précurseurs silylés comme le 4-triméthylesilylstyrène ou le 3-glycidylpropylheptaisobutyl-T8-polyhédrique silsesquioxane afin de préparer des nanocomposites.

Tableau 1. Matériaux hybrides huile de ricin/silice destinés à des applications non médicales

Matériau	Précurseur silylé	Propriétés	Réfs
Films	3-(triméthoxysilyl)propyl-méthacrylate	Résistance thermique, au gonflement et à la corrosion	19
	γ -glycidoxypropyltriméthoxysilane et tétraéthoxysilane.	Résistance mécanique, au gonflement, bonne adhésion.	23
Revêtement	3-aminopropyltriéthoxysilane	Résistance thermique et mécanique	20
	3-glycidylxypropyl-triméthoxysilane	Résistance mécanique. Hydrophobie	21,22
	3-aminopropyltriéthoxysilane et tétraéthoxysilane	Résistance mécanique, au gonflement, bonne adhésion.	24
	3-aminopropyltriéthoxysilane ou tétraéthoxysilane	Résistance mécanique, à la corrosion	25
	3-mercaptopropyl)triméthoxysilane	Résistance thermique et mécanique	26
	3-isocyanatopropyl-triéthoxysilane	Hydrophobie	27,28

2.2.2. Applications médicales

Les quelques hybrides silice/huile que l'on peut trouver pour des applications en santé, concernent principalement la réalisation de pansements. Ainsi, Díez-Pascual *et al.*³² ont préparé des membranes antibactériennes en utilisant l'huile de ricin comme source de polyols pour former un polyuréthane renforcé par des nanoparticules de zinc elles-mêmes greffées avec du chitosane. Gharibi *et al.*³³ ont développé des pansements antibactériens à base d'huile de ricin, de polyisocyanates et d'APES ou de GPTMS en tant que précurseurs siliciques. Leurs propriétés mécaniques et imperméables ont favorisé des cicatrifications mises en évidence *in vitro* et *in vivo*.

Enfin pour ce qui est des systèmes de libération de PA, nous n'avons pas trouvé de littérature impliquant des hybrides, mais nous pouvons tout de même citer les « *Silica – Lipids Hybrids* », qui sont des systèmes composites utilisant des lipides stabilisés grâce à des nano- ou microparticules de silice par *pickering*. Cependant ces systèmes ne sont pas des hybrides par définition du fait de la non cohésion moléculaire entre les réseaux organiques et inorganiques.³⁴⁻

36

Dans le contexte de la raréfaction des produits pétroliers, la synthèse de matériaux biosourcés semblent donc très intéressantes du point de vue environnemental. Toutefois, moins d'une dizaine d'équipes dans le monde travaillent sur ces hybrides silice/huile décrits précédemment.

3. Conclusion

En conclusion, la chimie sol-gel, en sa qualité de procédé peu énergivore et compatible avec non seulement la chimie organique, mais également les contraintes de la formulation pharmaceutique, offre des perspectives intéressantes.

En définitive, le développement de formulations alliant les propriétés de dispersion des ASD, les propriétés de solvation des LBDDS, les propriétés de structuration de la silice, et la chimie sol-gel durant son procédé de fabrication, serait alors des plus intéressants. Si, de surcroît, les excipients utilisés étaient biosourcés et renouvelables contrairement à ceux issus de la pétrochimie, le procédé s'inscrirait dans une démarche de développement durable et d'éco-responsabilité ; c'est avec ce cahier des charges que notre projet a pris forme.

4. Références bibliographiques

1. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. *Sol-Gel Science: the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. (Elsevier Science, 1990).
2. Anastas, P. & Eghbali, N. Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews* **39**, 301–312 (2010).
3. Hench, L. L. & West, J. K. The sol-gel process. *Chem. Rev.* **90**, 33–72 (1990).
4. Ciriminna, R., Sciortino, M., Alonzo, G., Schrijver, A. de & Pagliaro, M. From Molecules to Systems: Sol–Gel Microencapsulation in Silica-Based Materials. *Chem. Rev.* **111**, 765–789 (2011).
5. Roy, R. Ceramics by the Solution-Sol-Gel Route. *Science* **238**, 1664–1669 (1987).
6. Istituto di Fotonica e Nanotecnologie. Sol-Gel Principles. <http://www.tn.ifn.cnr.it/facilities/sol-gel-room/sol-gel-principles>.
7. Audebert Pierre & Miomandre Fabien. Procédé sol-gel de polymérisation. *Techniques de l'ingénieur base documentaire : TIB329DUO*, (2005).
8. Pope, E. J. A. & Mackenzie, J. D. Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst. *Journal of Non-Crystalline Solids* **87**, 185–198 (1986).
9. Andrianov, K. A. *Metalorganic Polymers*. (John Wiley & Sons Inc, 1965).
10. Brinker, C. J. Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. *Journal of Non-Crystalline Solids* **100**, 31–50 (1988).
11. Figueira, R. B., Silva, C. J. R. & Pereira, E. V. Organic–inorganic hybrid sol–gel coatings for metal corrosion protection: a review of recent progress. *J Coat Technol Res* **12**, 1–35 (2015).
12. Kuroda, K. *et al.* Utilization of Alkoxysilyl Groups for the Creation of Structurally Controlled Siloxane-Based Nanomaterials. *Chem. Mater.* **26**, 211–220 (2014).
13. Pilliar, R. M. Sol–gel surface modification of biomaterials. in *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials* 185–217 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-1-78242-303-4.00006-5.
14. Lei, Q. *et al.* Sol-Gel-Based Advanced Porous Silica Materials for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* 1909539 (2020) doi:10.1002/adfm.201909539.
15. Xu, W., Riikonen, J. & Lehto, V.-P. Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **453**, 181–197 (2013).
16. Riikonen, J., Xu, W. & Lehto, V.-P. Mesoporous systems for poorly soluble drugs – recent trends. *International Journal of Pharmaceutics* **536**, 178–186 (2018).
17. Wen, J. & Wilkes, G. L. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol–Gel Approach. *Chem. Mater.* **8**, 1667–1681 (1996).
18. Greenhalgh, R. D. *et al.* Hybrid sol–gel inorganic/gelatin porous fibres via solution blow spinning. *J Mater Sci* **52**, 9066–9081 (2017).
19. Bhosale, N., Shaik, A. & Mandal, S. K. Synthesis and characterization of castor oil based hybrid polymers and their polyurethane–urea/silica coatings. *RSC Adv.* **5**, 103625–103635 (2015).

20. Xia, Y. & Larock, R. C. Preparation and Properties of Aqueous Castor Oil-based Polyurethane-Silica Nanocomposite Dispersions through a Sol-Gel Process: Preparation and Properties of Aqueous Castor Oil-based *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 1331–1337 (2011).
21. Allauddin, S., Narayan, R. & Raju, K. V. S. N. Synthesis and Properties of Alkoxysilane Castor Oil and Their Polyurethane/Urea–Silica Hybrid Coating Films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **1**, 910–918 (2013).
22. Seeni Meera, K. M., Murali Sankar, R., Jaisankar, S. N. & Mandal, A. B. Physicochemical Studies on Polyurethane/Siloxane Cross-Linked Films for Hydrophobic Surfaces by the Sol–Gel Process. *The Journal of Physical Chemistry B* **117**, 2682–2694 (2013).
23. de Luca, M. A., Martinelli, M. & Barbieri, C. C. T. Hybrid films synthesised from epoxidised castor oil, γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane and tetraethoxysilane. *Progress in Organic Coatings* **65**, 375–380 (2009).
24. de Luca, M. A., Martinelli, M., Jacobi, M. M., Becker, P. L. & Ferrão, M. F. Ceramer coatings from castor oil or epoxidized castor oil and tetraethoxysilane. *J Amer Oil Chem Soc* **83**, 147–151 (2006).
25. Bechi, D. M., Luca, M. A. de, Martinelli, M. & Mitidieri, S. Organic–inorganic coatings based on epoxidized castor oil with APTES/TIP and TEOS/TIP. *Progress in Organic Coatings* **76**, 736–742 (2013).
26. Meng, L. *et al.* Castor-oil-based waterborne acrylate/SiO₂ hybrid coatings prepared via sol–gel and thiol-ene reactions. *Progress in Organic Coatings* **140**, 105492 (2020).
27. Mülazim, Y., Çakmakçı, E. & Kahraman, M. V. Preparation of photo curable highly hydrophobic coatings using a modified castor oil derivative as a sol–gel component. *Progress in Organic Coatings* **72**, 394–401 (2011).
28. Mülazim, Y., Çakmakçı, E. & Kahraman, M. V. Photo-curable highly water-repellent nanocomposite coatings. *J Vinyl Addit Technol* **19**, 31–38 (2013).
29. Brasil, M. C., Gerbase, A. E., de Luca, M. A. & Gregório, J. R. Organic–Inorganic Hybrid Films Based on Hydroxylated Soybean Oils. *J Amer Oil Chem Soc* **84**, 289–295 (2007).
30. Tsujimoto, T., Uyama, H. & Kobayashi, S. Green Nanocomposites from Renewable Resources: Biodegradable Plant Oil–Silica Hybrid Coatings. *Macromol. Rapid Commun.* **24**, 711–714 (2003).
31. Lligadas, G., Ronda, J. C., Galià, M. & Cádiz, V. Bionanocomposites from Renewable Resources: Epoxidized Linseed Oil–Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes Hybrid Materials. *Biomacromolecules* **7**, 3521–3526 (2006).
32. Díez-Pascual, A. M. & Díez-Vicente, A. L. Wound Healing Bionanocomposites Based on Castor Oil Polymeric Films Reinforced with Chitosan-Modified ZnO Nanoparticles. *Biomacromolecules* **16**, 2631–2644 (2015).
33. Gharibi, R., Yeganeh, H., Rezapour-Lactoe, A. & Hassan, Z. M. Stimulation of Wound Healing by Electroactive, Antibacterial, and Antioxidant Polyurethane/Siloxane Dressing Membranes: In Vitro and in Vivo Evaluations. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 24296–24311 (2015).
34. Tan, A., Simovic, S., Davey, A. K., Rades, T. & Prestidge, C. A. Silica-lipid hybrid (SLH) microcapsules: A novel oral delivery system for poorly soluble drugs. *Journal of Controlled Release* **134**, 62–70 (2009).

35. Simovic, S. *et al.* Dry Hybrid Lipid–Silica Microcapsules Engineered from Submicron Lipid Droplets and Nanoparticles as a Novel Delivery System for Poorly Soluble Drugs. *Molecular Pharmaceutics* **6**, 861–872 (2009).
36. Rao, S. *et al.* Pluronic-Functionalized Silica–Lipid Hybrid Microparticles: Improving the Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Weak Bases. *Molecular Pharmaceutics* **12**, 4424–4433 (2015).

Chapitre II

Les Microparticules Hybrides

Synthèse et Caractérisation

Le but de notre projet a été d'associer les propriétés solubilisantes d'une huile végétale vis-à-vis de molécules thérapeutiques hydrophobes, aux propriétés de réticulation de la silice par voie sol-gel, afin d'obtenir un excipient pharmaceutique hybride multifonctionnel. Cet excipient assurerait également une dispersion moléculaire ou amorphe du PA afin d'en faciliter la libération en milieu physiologique, et de s'affranchir des limites de solubilité liées aux formes cristallines de ce PA. Nous avons choisi de développer des microparticules comme forme galénique polyvalente, compatible avec une administration aussi bien par voie orale, topique que parentérale.

Dans ce second chapitre, divisé en deux volets, nous allons exposer le procédé de synthèse que nous avons développé au laboratoire ainsi que la caractérisation fine et complète de différents types de microparticules hybrides obtenues. Dans ce 1^{er} volet, édité sous forme d'un article publié dans *International Journal of Pharmaceutics*, nous détaillerons la chimie de fonctionnalisation qui a permis de lier chimiquement la silice inorganique à l'huile de ricin organique, l'incorporation d'un PA modèle (i.e. l'ibuprofène) dans l'huile fonctionnalisée, ainsi que le procédé de préparation des microparticules réservoir de PA. Il sera également question de la caractérisation physicochimique, pharmaceutique et biologique de ces microparticules hybrides innovantes.

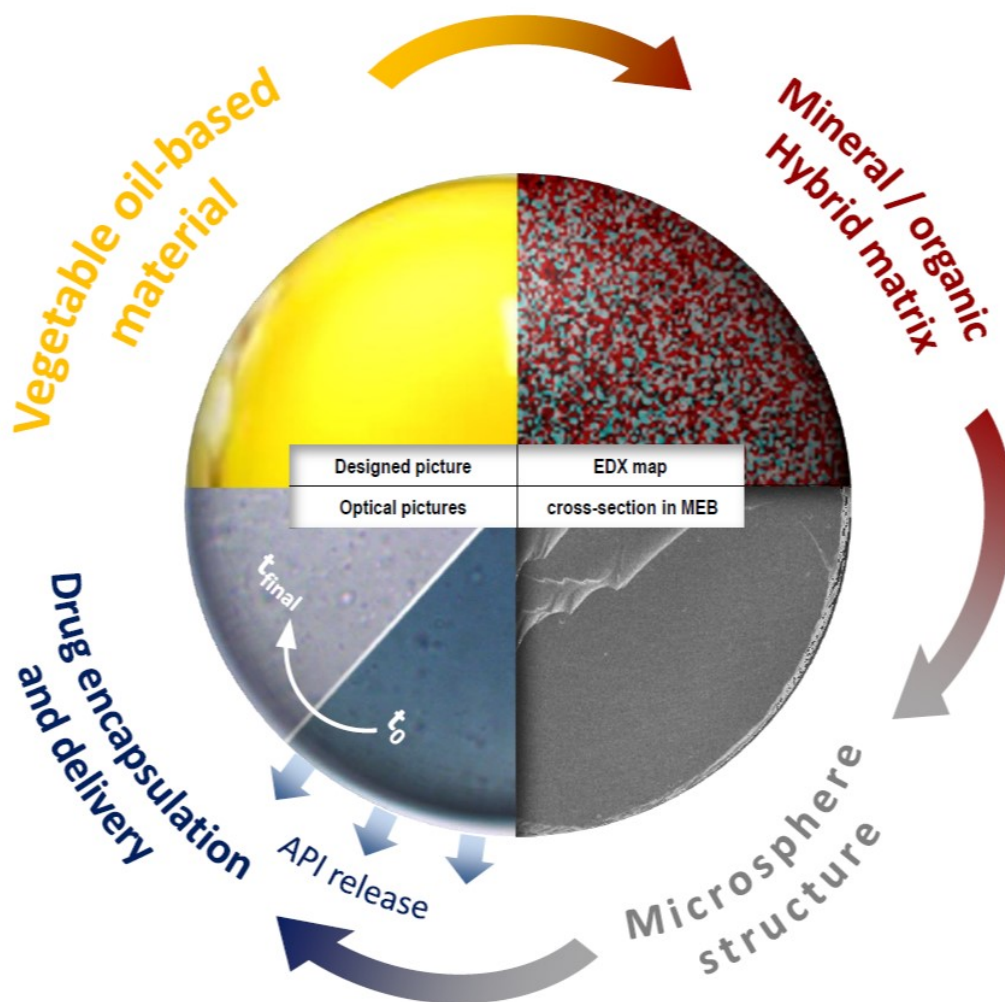
1^{er} volet

Tunable Vegetable oil / Silica Hybrid Microparticles for Poorly Water-soluble Drug Delivery

Doufène, K., Lapinte, V., Gaveau, P., Félix, G., Cacciaguerra, T., Chopineau, J., Robin, J-J., Devoisselle, J-M., and Aubert-Pouëssel, A.

International Journal of Pharmaceutics, 118478 (2019).

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118478



Summary

1. Introduction	61
2. Materials and methods.....	64
2.1. Materials.....	64
2.2. Silylation of the castor oil.....	65
2.3. Formulation of the hybrid microparticles.....	65
2.4. Characterization of the hybrid microparticles	66
3. Results and discussion.....	70
3.1. Castor oil functionalization and hybrid microparticles formulation.....	70
3.2. Physicochemical characterization of hybrid microparticles	72
3.3. Pharmaceutical characterization of hybrid microparticles	78
3.4. Biological characterization of hybrid microparticles	84
4. Conclusion.....	86
5. Appendix A: Supporting Data.....	87
6. Appendix B: Mathematical Modeling	90
7. References	92

Figures

Fig. 1. The silylation process of castor oil by means of IPTES + Chemical structure of silica species in various condensation states.....	65
Fig. 2. Formulation of the HMPs by an optimized Thermo-Stabilized oil-in-water Emulsion (TSE) process	66
Fig. 3. FTIR monitoring of the castor oil silylation at various X_R	71
Fig. 4. Scanning electronic microscopy observations of: a) HMPs 1.05 b) HMPs 0.8 c) HMPs 0.6 d) HMPs 0.4	72
Fig. 5. Volume size distributions of the HMPs with four X_R	73
Fig. 6. IR-ATR spectra of silylated castor oil (ICO) and hybrid microparticles formulated in acetic buffer (HMPa) or in deionised water (HMPw).....	74
Fig. 7. TGA curves and mineral residues of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs formulated with multiple ICOs (from 0.4 to 1.05)	76
Fig. 8. EDX spectra (sp.) recorded on cross-section of 8 wt.% flurbiprofen-loaded HMPs	77
Fig. 9. EDX analysis of HMP 1.05: a) SEM image b) carbon / silicium map c) carbon map d) silicium map	78
Fig. 10. Encapsulation yields of ibuprofen-loaded HMPs	79
Fig. 11. X-ray powder diffractograms and differential scanning calorimetry of ibuprofen-loaded HMPs at: a) 4 wt.% b) 8 wt.% c) 12 wt.% d) 16 wt.% and of e) pure ibuprofen	80

Fig. 12. Release kinetics from 4 wt.% ibuprofen -loaded HMPs in simulated intestinal fluid (pH=6.8).	81
Fig. 13. Experimental and mathematical modeling release kinetics of ibuprofen from HMPs	82
Fig. 14. Release kinetics of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMP 1.05 in PBS (pH=7.4).....	83
Fig. 15. pH drop versus time of digestion media containing ICO or HMPs	84
Fig. 16. Sudan Black B-loaded HMP a) before and b) after 2 hours in a simulated digestion medium containing lipases.....	85
Fig. 17. Cytotoxicity studies of HMPs conducted on Caco-2/TC7 enterocytes and NIH-3T3 fibroblasts	85

Tables

Table 1. Physicochemical properties of ICOs	70
Table 2. Preparation yields of HMPs synthesized with the corresponding ICO.....	72
Table 3. Volume Median Diameters (VMD)s, spans and deduced parameters (volume and surface area moment means) of HMPs.....	73
Table 4. Condensation yields and degrees of HMPs	75
Table 5. Mass percentage of fluorine obtained from EDX spectra on a cross-section of 8 % flurbiprofen-loaded HMP.....	77
Table 6. Diffusion coefficients (D) deduced from the mathematical model	82

1. Introduction

The continuous improvement of health conditions over the last decades increased the incidence of so-called "ageing" and "civilization" diseases such as diabetes, hypertension, neurological degenerations and cancers. The pharmaceutical research and the development of Active Pharmaceutical Ingredients (API)s are therefore in great demand. However, the vast majority of these APIs have solubility issues and their "drug-like" profiles are compromised during early stages of the development.¹ Several formulations have been studied to overcome this limit. Lipid-based drug delivery systems (LBDDS) dominated these formulations owing to their high solvation capacity on poorly water-soluble APIs. The composition of LBDDS varied according widely to its use, ranging from simple lipids such as fatty acids (FA)s and triglycerides (TG)s to more complex systems like self micro- and nano-emulsifying LBDDS that contain phospholipids, surfactants, co-surfactants and co-solvents in addition to FA and TG. Liposomes were predominant as LBDDS for the parenteral administration and many formulations were commercialized such as Ambisome[®] (amphotericin B) or Doxil[®] (doxorubicin).² In addition, solid lipid particles showed a high potential of drug entrapment and delivery via parenteral route. Indeed, a wide variety of chemotoxics (paclitaxel, camptothecin), corticoids (hydrocortisone, prednisolone) and anesthetics (tetracaine, etomidate) was loaded into solid lipid nanoparticles and their preclinical trials were promising.³ For the oral administration, the Lipid Formulation Classification System divided the LBDDS into four types depending on their composition and their behavior in the gastrointestinal tract.⁴ The type I consists of digestible oils without surfactants whereas the type II contains water-insoluble ones. The type III is made of oils, surfactants and cosolvents. It is subdivided into IIIA, which is predominantly made of oil, and IIIB, which contains more water-soluble components. The type IV is free of oils and contains only self-assembling surfactants and cosolvents, which makes it unlikely digestible. Despite the interest of LBDDS, they require large quantities of organic solvents that represent a non-valuable industrial input and require additional purification of the final product. On the other hand, many complex approaches were considered to solidify these LBDDS in order to improve their pharmacotechnical properties and enhance their stability.⁵ For example, the spray-congealing consists in a molten lipid sprayed into a cooling chamber to form cooled solid particles (e.g., diclofenac in stearylpolyoxyglycerides "Gelucire[®] 50/13") whereas the spray-drying consists in a solution of drug and lipid excipients sprayed inside an atomizing chamber (e.g., glibenclamide in silicon dioxide and Gelucire[®]), to form spherical solid particles in both cases. Carbon dioxide in supercritical physical state was also involved in the solubilization and reprecipitation of lipid excipients for drug coatings (e.g.,

carbamazepine in vitamin E, TPGS and Gelucire[®] 44/14). Unfortunately, these processes remain highly energy-intensive and require complex equipments.

To circumvent the use of organic solvents and complex manufacturing processes, an original approach combining vegetable oil recovery, eco-friendly chemistry and simple pharmacotechnology process was investigated. As firstly demonstrated by Gallon et al.,⁶ bio-based hybrid microparticles for drug delivery have already been synthesized by this technology coupling castor oil silylation and a thermostabilized emulsion (TSE) process. Resulting microdroplets of silylated castor oil (ICO) were cross-linked by a sol-gel reaction inducing the solidification of the organic / inorganic hybrid microparticles (HMP)s at ambient temperature. Preliminary tests were carried out on the microparticles to optimize their preparation process, to characterize their structure and to assess their ability to entrap ibuprofen as a model of poorly water-soluble API.

Herein, the HMP drug delivery kinetics were investigated using several castor oil-based formulations that differ either in the organic/inorganic ratio of the ICO or the ibuprofen loading rate. The TSE process was optimized to improve the biocompatibility of the HMPs for a pharmaceutical application using a catalyst approved by the US Food and Drug Administration (US-FDA). Comprehensive and multi-scale physicochemical studies were achieved on the synthesized particles regarding to their shape and size, condensation degree, organic/inorganic composition and atomic distribution. We designed several types of ibuprofen-loaded HMPs, and monitored their release kinetics in various simulated media. The drug release kinetics were characterized by mathematical modeling to prove the influence of the matrices on the API diffusion. To conclude this screening, the hybrid microparticle degradability in simulated digestion medium was studied and their biocompatibility assessed on NIH-3T3 (fibroblasts) and Caco-2 cells (enterocytes-like cells).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pharmaceutical grade castor oil (CO; 934 g·mol⁻¹) was purchased from Cooper Pharmaceutique. (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilane (IPTES; 247.3 g·mol⁻¹), stannous octoate (SnOct; 405.1 g·mol⁻¹), κ -carrageenan, ibuprofen (206.3 g·mol⁻¹) and flurbiprofen (244.3 g·mol⁻¹), bile extract porcine, pancreatin from porcine pancreas (4 × USP specifications) and polysorbate 80 (PS80; Tween[®] 80) were purchased from Sigma-Aldrich and soybean phospholipids (S100) from Lipoid. Solvents such as acetonitrile HPLC plus Gradient (ACN), acetic acid, methanol (MeOH) and salts such as sodium chloride (NaCl), sodium phosphate

dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$) and potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) were also supplied by Sigma-Aldrich, while potassium chloride (KCl) was provided by Panreac Quimica, calcium chloride ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) by Merck and sodium acetate ($\text{CH}_3\text{COONa}, 3\text{H}_2\text{O}$) by VWR chemicals.

2.2. Silylation of the castor oil

Castor oil, which contains 90 % of ricinoleic acid, was functionalized with IPTES for 72 hours at 60 °C under nitrogen atmosphere, following a solvent- and catalyst-free process (Fig. 1). Four ratios of silylation, referred to as X_R , between IPTES and CO were established: 1.05, 0.8, 0.6 and 0.4. These X_R corresponded to the percentage of CO hydroxyl groups related to the isocyanate groups of IPTES (1.05 = 100 % with 5 % excess of free IPTES; 0.8 = 80 %; 0.6 = 60 % and 0.4 = 40 %). The silylated castor oils (ICO)s were aimed to synthesize several types of HMPs, referred to with the same X_R . The completion of the reaction was checked by ATR-IR spectroscopy with a Spectrum 100 from Perkin Elmer.⁷

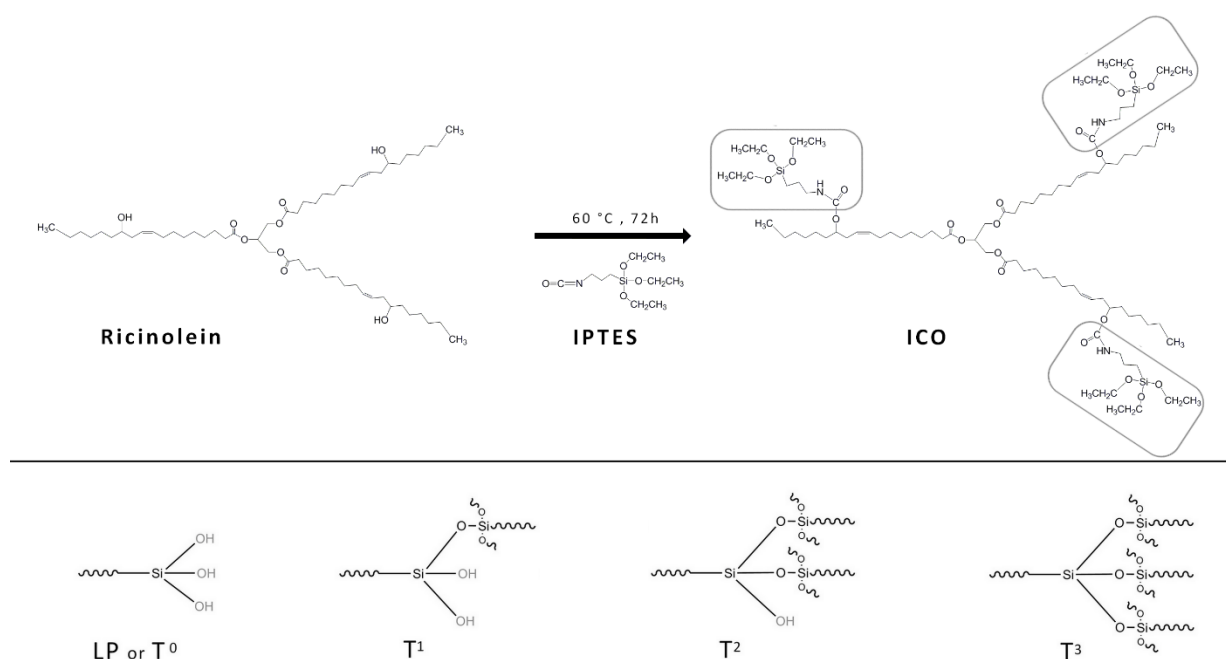


Fig. 1. At the top: the silylation process of castor oil by means of IPTES, the ICO 1.05 (fully silylated) is represented. At the bottom: chemical structure of silica species in various condensation states.

2.3. Formulation of the hybrid microparticles

As described in our previous paper,⁶ HMPs were formulated according to an original process (Fig. 2) based on a thermostabilized oil-in-water emulsion (TSE). The TSE process was optimized for a pharmaceutical application by the use of SnOct, a US-FDA approved catalyst

for food packaging⁸ and biomedical devices,⁹ instead of dibutyltin dilaurate (DBTDL). The oil phase was composed of ICO with 1 % of SnOct ± ibuprofen dissolved at several rates ranging from 4 wt.% up to 16 wt.% into the ICO, prior to its formulation. Thus each formulation differed either by the ICO amount (0.4, 0.6, 0.8, 1.05) or by the rate of ibuprofen dissolved (4, 8, 12 and 16 wt.%). The aqueous phase consisted of an acetate aqueous buffer (2N) at pH = 2.8 with 0.5 wt.% of κ -carrageenan (thermogelling agent) and 0.3 wt.% of KCl (thermogel stabilizer¹⁰). The O/W emulsion was formed at 60 °C with a T 18 digital Ultraturrax® (IKA) at 9000 rpm for 2 min, then a thermal shift (from 60 °C to 4 °C) was applied in order to gel the aqueous phase and stabilize the oil droplets in which the sol-gel reaction occurred at 25 °C. The acetic acid within the acetate buffer leads to a better hydrolysis of ethoxysilanes while SnOct improves the network condensation.^{11,12} This combination of catalyst (SnOct) and co-catalyst (acetic acid) permitted to accelerate the sol-gel reaction down to 8 days. Once HMPs were solidified, the gel was disrupted by heating to 60 °C. The HMPs were washed with distilled water, separated by centrifugation at 4000 rpm for 6 min and freeze-dried (Heto Powerdry® LL3000, Thermo Fisher Scientific). After recovery, preparation yields η were calculated by dividing the weight of dried particles by the initial mixture weight (ICO + catalyst ± API) (eq. 1)

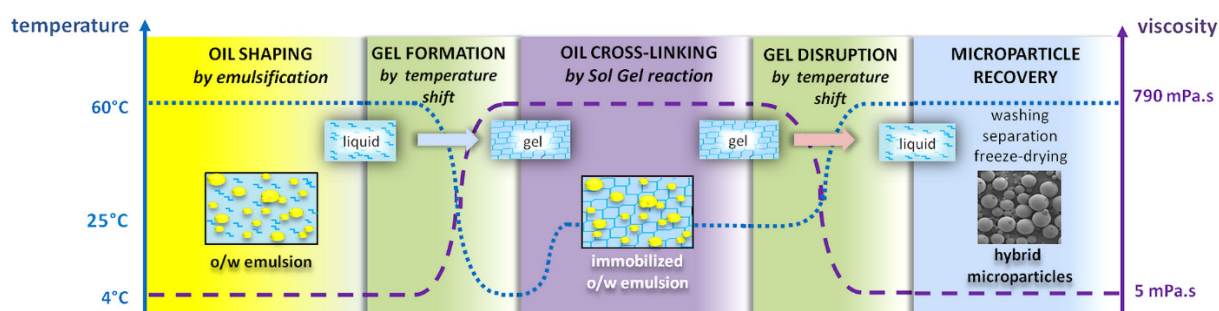


Fig. 2. Formulation of the HMPs by an optimized Thermo-Stabilized oil-in-water Emulsion (TSE) process. The blue dots and the purple dashes describe the evolution of the system temperature and the viscosity of the water phase, respectively.

$$\eta = \frac{\text{Weight of recovered particles}}{\text{initial oil phase weight}} \quad (1)$$

2.4. Characterization of the hybrid microparticles

2.4.1. Physicochemical characterization

Firstly, the HMP morphology was analyzed both by optical microscopy (Axiolab® equipped with AxioCam® ERc 5s model, Zeiss) and scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S4800 high resolution). HMP size measurements were assessed by laser diffraction (Mastersizer®

2000, Malvern instruments) in a Hydro 2000SM dispersion unit with absolute ethanol as a dispersion medium. This technique allowed to draw volume size distributions of the HMPs, to determine Volume Median Diameters* (VMD) and to deduce Moment means.¹³ The volume moment mean $D[4,3]$ † was interesting in our case because it takes into account the spherical volume of HMPs. For the entrapped API, the distance to reach the surface depends indeed on this volume. As well, surface area moment mean $D[3,2]$ ‡ is even of interest considering that API release is modulated by the extent of HMPs surface area. A Kruskal-Wallis test in Anastats® software was used to compare the results and $P < 0.05$ value was considered statistically significant.

The sol-gel cross-linking (hydrolysis and condensation) was monitored with IR-ATR spectroscopy (Spectrum 100, Perkin Elmer) and the condensation was quantified by solid-state ²⁹Si NMR (Varian VNMRS 400 MHz [9.4T] NMR spectrometer, with a 7.5 mm Varian T3 HX MAS probe spinning at 5 kHz). Two sequences of NMR at Magic Angle Spinning (MAS) were assessed: a Cross Polarization (CP-MAS) and a Single Pulse sequence (SP-MAS) with ¹H decoupling. CP-MAS experiments were performed with a 1.5 ms contact time and a recycle delay of 5 s in order to measure chemical shifts corresponding to silica fraction units present in each sample. For the quantitative determination of identified silica fraction units, SP-MAS experiments were carried out using a 2 μs 30° pulse and a recycle delay of 60 seconds. Spectra were accumulated overnight in order to increase the signal-to-noise ratio. Dmfit program¹⁴ was used to fit peaks and areas under curves were integrated for each unit and expressed in percent.

In order to determine the atomic composition and the API disposition within particles, flurbiprofen-loaded HMPs were studied by energy dispersive X-ray (EDX, FEI Quanta 200 FEG SEM). One micrometer cube was analyzed at each dot and backscattered-electrons were recorded (Oxford Instruments, X-Max^N Silicon Drift Detector). Flurbiprofen as well as ibuprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug belonging to aryl carboxylic family (Fig. A.1). It was selected for its fluorine atom that can be mapped by EDX within HMPs. The mineral part of HMPs was also estimated by thermogravimetric analysis (TGA; STA 6000, PerkinElmer) from 25 to 900 °C at 10 °C.min⁻¹ under airflow.

* The Volume Median Diameter refers to the midpoint particle size where half of the total volume is in HMP smaller, and half in HMP larger.

† $D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$

‡ $D[3,2] = \frac{\sum d^3}{\sum d^2}$

2.4.2. Pharmaceutical characterization

The loading efficiency of ibuprofen-loaded HMPs at 4, 8, 12 and 16 wt.% was determined by dispersing 50 mg of each formulation in 10 mL of methanol overnight, prior to an HPLC dosage (LC-2010HT Shimadzu, static phase: C18 Protonsil[®] column from Bischoff, mobile phase: acetonitrile / 0.5 % acetic acid solution, 65/35 v/v). Encapsulation yields were calculated using eq. 2:

$$\text{Encapsulation Yield} = \text{Loading rate after formulation} \times \eta' \quad (2)$$

Where η' is the corrected preparation yield (taking into account the hydroxyethyl loss – see results).

The crystalline state of the entrapped ibuprofen was also checked. Two analyses were done: X-Ray powder Diffraction (XRD; Bruker D8 advance generator equipped with copper tube and 1d LYNXEYE detector, $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, acquisition from 5 to 40° of 2 Θ angle) to detect ibuprofen crystals and Differential Scanning Calorimetry (DSC; DSC4000, PerkinElmer, sample heated from 20 to 95 °C at 10 °C.min⁻¹ under 50 mL.min⁻¹ of nitrogen flow) to track the melting point of API crystals within the matrix.

Furthermore, *in vitro* releases were assessed from ibuprofen-loaded HMPs using flow-through cell apparatus (Sotax CE1) according to the United States Pharmacopoeia (USP) IV specifications for poorly water soluble APIs dissolution.¹⁵ Three protocols were established for the purpose, depending on the buffer system used: in protocol **(1)**, 25 mL of Simulated Gastric Fluid (SGF, hydrochloride solution containing 0.1 wt.% PS80, pH = 1.2 at 37 °C) were used as a release medium for 30 minutes, then 25 mL of an intermediate solution were added in order to reach 50 mL of a Simulated Intestinal Fluid (SIF, 50 mM of phosphate buffer containing 0.1 wt.% of PS80, pH = 6.8 at 37 °C) whereas in protocols **(2)** and **(3)**, 50 mL of media were directly used as follows **(2)**: SIF, 50 mM of phosphate buffer containing 0.1 % of PS80, pH = 6.8 at 37 °C and **(3)**: 12 mM of phosphate buffer without PS80, pH = 7.4 at 37 °C.¹⁶ PS80 is a hydrophilic surfactant used here at 0.1 wt.% to decrease the surface tension of release media down to 42 mN·m⁻¹. The low surface tensions of gastric juice^{17,18} reported between 35 and 45 mN·m⁻¹ and of the intestinal fluid¹⁹ around 50 mN·m⁻¹ were thus simulated ensuring an optimal dispersion and wettability of HMPs. The system was then connected in closed loop through powder cells containing 50 mg of microparticles. 1 mL samples were collected at defined times prior to an HPLC dosage and 1 mL of fresh medium was added after each sampling to maintain the volume constant.

A mathematical model for 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs releases in Simulated Intestinal Fluid (SIF) was established and described in Appendix B.

2.4.3. Biological characterization

Biodegradability and biocompatibility of HMPs were assessed. Biodegradability assays were achieved on the particles following a simulated digestion protocol. An AT7 smart Dissolution Apparatus from Sotax (USP II) was used as an incubation system: 500 mg of microparticles were dispersed in 50 mL of a pre-digestion medium at 37 °C, with continuous stirring (see Table A.1 for composition). As a reference, 500 mg of CO were emulsified in 50 mL of pre-digestion medium following the same protocol as used for the HMP formulation (9000 rpm for 2 min with T 18 digital Ultraturrax®). The lipase was then added to initiate the digestion. 1 mL samples were collected at defined times and their pHs were consecutively measured using a SevenCompact pH-meter equipped with an Inlab® Micro sensor (Mettler Toledo). 1mL of an aqueous solution of CaCl₂ ([Ca²⁺] = 36mM) was added in each medium in order to maintain the media volumes constant while the Ca²⁺ continuously precipitate the free fatty acids (FFAs) released during the digestion.²⁰ These FFAs, composed at 90 % of ricinoleic acid (pKa = 4.74), 4 % of linoleic acid (pKa = 4.77) and 3 % of oleic acid (pKa = 5.02), were able to exhibit their acidities at the pH of the medium (pH = 6.8). Thus, a pH drop versus time curve was drawn for each sample in order to monitor the digestion.²¹

On the other hand, cytotoxicity studies of the HMPs were conducted according to the ISO 10993 norm. The cytocompatibility of the particles was assessed by following the viability of two cell lines: Caco-2/TC7 enterocytes and NIH-3T3 fibroblasts. These cell lines were selected to simulate an intestinal environment for an oral administration of HMPs and a dermal environment for a subcutaneous administration, respectively. The cell viability was quantified using a CellTiter 96® AQ cell proliferation assay (Promega) composed of a tetrazolium compound (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt: MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate: PMS). The cells were seeded at 5000 per well into a 96-well culture dish plate containing 200 µL per well of a culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) and permitted to adhere after 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. Subsequently, they were treated with various HMP extracts (i.e. HMP suspensions at 0.1, 1 or 10 mg·mL⁻¹ in the culture medium, incubated 2 days at 37 °C then centrifuged. The supernatants were referred to as "extracts"). After 24 h of exposure, 20 µL of a mixture MTS-PMS was added to the cells according to the manufacturer instructions for 4 h reaction. The assay plate was read at 490 nm using a microplate reader

(Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific). The absorbance of the untreated cells (control group) corresponded to the 100 %.

3. Results and discussion

3.1. Castor oil functionalization and hybrid microparticle formulation

Castor oil was silylated with IPTES in solvent- and catalyst-free conditions corresponding to the first stage of the HMP preparation. For the four ratios X_R studied, the silylation reaction was followed by IR-ATR spectroscopy (Fig. 3) wherein two chemical groups could be monitored: i) the disappearance of the isocyanate group labeling the IPTES,²² which exhibits an asymmetric stretching vibration band at 2270 cm^{-1} ; ii) the appearance of urethane group characterized by three vibration bands: (a) an amid-I band at 1720 cm^{-1} corresponding to the C=O stretching vibration; (b) an amid-II band at 1700 cm^{-1} corresponding to the N-H bending vibration (these two bands were shouldered by the C=O vibration band of the ricinolein ester function) and (c) a band at 1240 cm^{-1} resulting from interaction between C-N stretching and N-H bending.^{23,24} However, the disappearance of ricinolein hydroxyl groups cannot be confidently monitored because of the overlapping between O-H and N-H stretching bands at adjacent frequencies (around $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$).

Table 1. Physicochemical properties of ICOs.

ICO	Molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	density
1.05	1600.9	961	0.999
0.8	1467.5	764	0.994
0.6	1334.1	709	0.986
0.4	1200.7	682	0.970
Castor oil	932.7	661	0.907

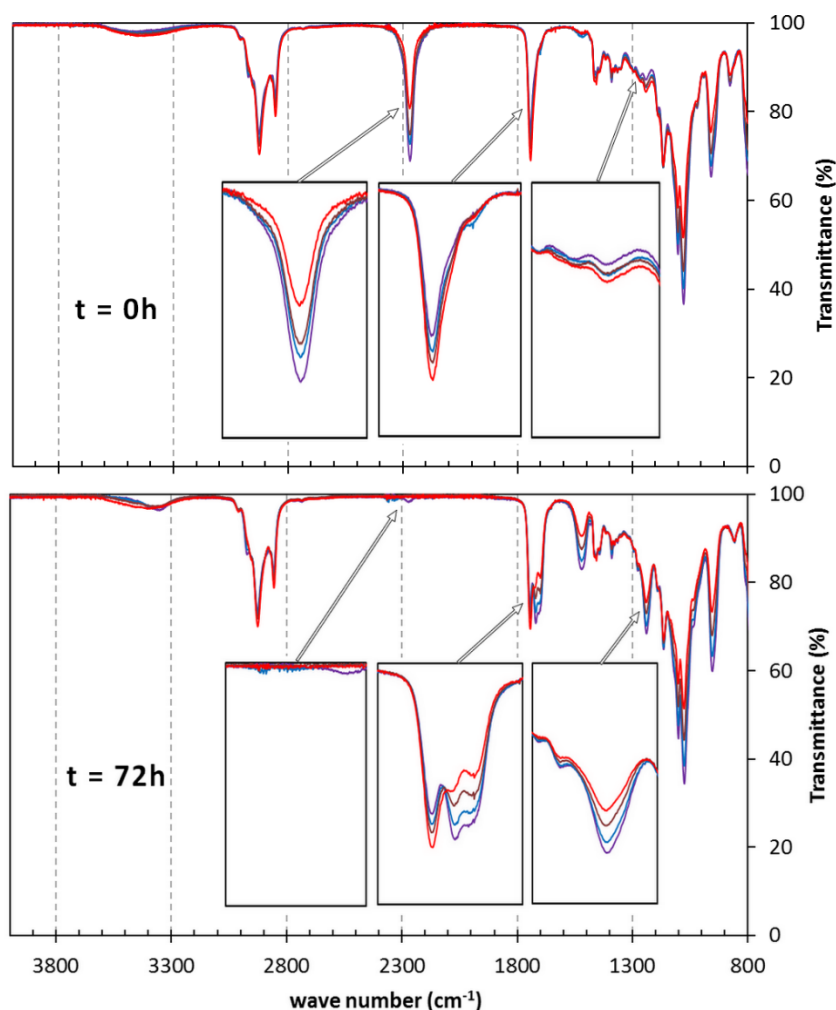


Fig. 3. FTIR monitoring of the castor oil silylation at various XR. Red: ICO 1.05; Brown: ICO 0.8; Blue: ICO 0.6; Purple: ICO 0.4.

The completion of hydroxy-isocyanate reaction between the IPTES and the ricinolein was attested for the four silylation ratios. In all cases, isocyanate group transmittance (2270 cm^{-1}) was proportional to the IPTES used in each reaction. They were minimal at $t = 0$ and increased to a 100 % transmittance at $t_{\text{final}} = 72$ hours. By contrast, the urethane group transmittances (1720 , 1700 cm^{-1} and 1240 cm^{-1}) decreased during the same period. Four ICOs with high purity were thus formed exhibiting an oily aspect and transparent to yellowish appearance. The physicochemical properties of these ICOs (Table 1) were consistent with their chemical structures: the silylation of the CO increased its molecular weight (from 932 up to $1600\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the higher X_R), which induced an increase of the viscosity (from 661 to $961\text{ mPa}\cdot\text{s}$) and of the density (from 0.907 to 0.999). During the HMP formulation, the viscosity is an important parameter and difference in ICO viscosities could affect emulsion properties.

The second stage of HMP preparation consists in their formulation by a TSE process in aqueous medium (Fig. 2). To calculate relevant preparation yields, hydroxyethyl moieties released

during hydrolysis (as described below) had to be taken into account. Therefore, assuming that the hydrolysis of ethoxysilanes was complete in our case, corrected preparation yields η' were calculated (Table 2) and displayed excellent values ranging from 87.4 to 95.3 %. The robustness of the process was thus proven since there is no influence of the silylation ratio on the preparation yield.

Table 2. Preparation yields of HMPs synthesized with the corresponding ICO. Data are shown as mean \pm SD (n = 3).

HMPs	Preparation yield η (%)	Weight loss by ethoxysilanes hydrolysis (%)	Corrected preparation yield η' (%)
1.05	73.4 \pm 1.4	21.9	95.3 \pm 1.4
0.8	70.0 \pm 1.6	19.1	89.1 \pm 1.6
0.6	75.3 \pm 2.9	15.7	91.0 \pm 2.9
0.4	75.7 \pm 2.5	11.7	87.4 \pm 2.5

3.2. Physicochemical characterization of the hybrid microparticles

Hybrid microparticles were spherically shaped through the emulsification step of TSE process. According to the used ICO, various HMP surface states were observed by SEM: for HMPs 1.05, rough and irregular surface (Fig. 4-A) whereas more regular and smooth textures were exhibited at the surface of HMPs 0.8 to 0.4 (Fig. 4-B to D). However, some broken particles were noticed on the overview of HMP 0.4 (Fig. 4-D). It may be explained by the low X_R of these particles, which leads to less potential siloxane bonds and results in a weaker cohesion of these objects. A matrix structure was also uncovered on cross-sections of HMPs revealing a microsphere organization of the particles (Fig. 8). Furthermore, it can be noticed that the freeze-dried microspheres were well-isolated and formed powders with good rheological behaviors.

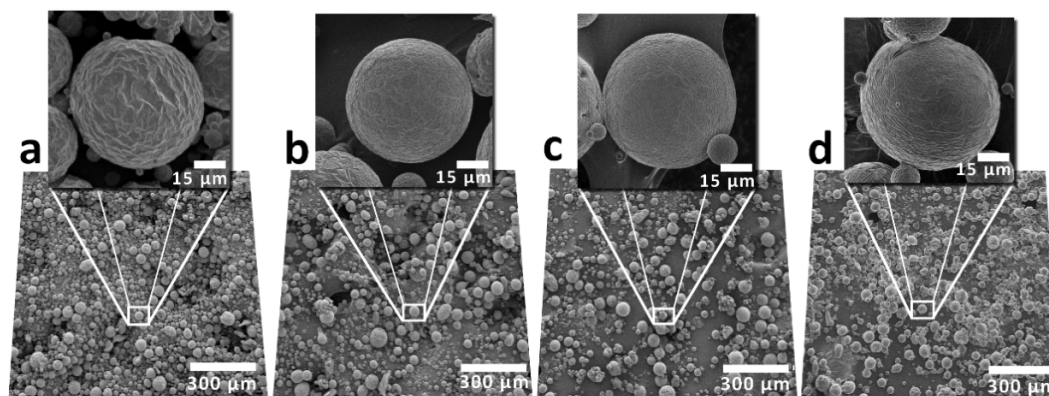
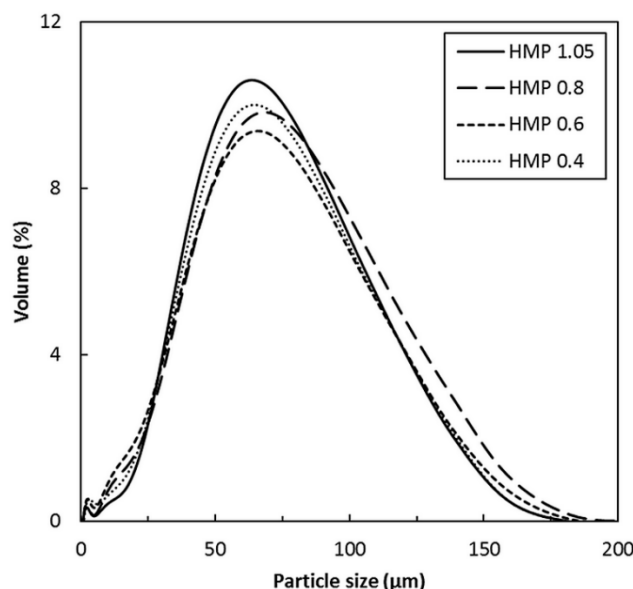


Fig. 4. Scanning electronic microscopy observations of: a) HMPs 1.05 b) HMPs 0.8 c) HMPs 0.6 d) HMPs 0.4.

Table 3. Volume Median Diameters (VMD)_s, spans and deduced parameters (volume and surface area moment means) of HMPs with four X_R. Data are shown as mean ± SD (n = 3).

HMP	VMD (μm)	Span	D [4,3] (μm)	D [3,2] (μm)
1.05	53.8 ± 4.9	1.38 ± 0.05	56.7 ± 5.1	22.3 ± 1.8
0.8	55.0 ± 5.3	1.55 ± 0.15	58.0 ± 5.3	22.4 ± 2.5
0.6	51.5 ± 2.7	1.67 ± 0.09	57.1 ± 6.9	19.9 ± 0.2
0.4	52.3 ± 2.9	1.54 ± 0.11	54.9 ± 2.9	22.6 ± 1.0

Size measurements put in evidence that for all the HMPs, volume size distributions (Fig. 5) followed an almost Gaussian curve around 50-60 μm with reasonable spans between 1.38 and 1.67 (Table 3). A slight asymmetry towards high values of size was also observed. We supposed that it was due to a coalescence phenomenon between the emulsification step and the thermogel freeze during the TSE process. D[4,3] ranged from 54.9 to 58 μm and were quite close to the VMD. In contrast, D[3,2] were much lower (from 19.9 to 22.6 μm) highlighting the presence of a significant number of small particles.²⁵ A Kruskal-Wallis test on summarized results in Table 3 proved that there is no statistically significant difference between all HMPs, neither in D[4,3] nor D[3,2]. We concluded that particle sizes were homogeneous and independent from the physicochemical properties of the used ICO, underlining the predominance of the mechanical stirring influence.

**Fig. 5.** Volume size distributions of the HMPs with four X_R. Each curve displays mean of n = 3.

The hybrid structure of HMPs was the result of the vegetable oil cross-linking by means of mineral bonds, during a sol-gel reaction. At the molecular scale, this chemical reaction proceeds in two phases: a first one of ethoxysilane hydrolysis leads to free silanols which, during a second

phase of condensation, can react between them to form siloxane bonds (Si-O-Si). To offset the progressive inactivation of the catalyst SnOct in the TSE aqueous medium (oxidation of Sn II into Sn IV), the use of a co-catalyst was investigated to accelerate HMP synthesis down to one week rather than one month. It was previously reported that the ethoxysilane residue hydrolysis increases using acetic acid in a co-catalysis mechanism firstly described by Andrianov.²⁶ An anionic substitution of the acetyl- moieties leads to an ethyl-acetate further eliminated during the microparticle recovery.²⁷ To confirm the influence of the acetic medium on the efficiency of cross-linking, infrared spectra were recorded on HMPs formulated in deionized water (HMPw) or in acetic buffer (HMPa) using ICO as reference (Fig. 6).

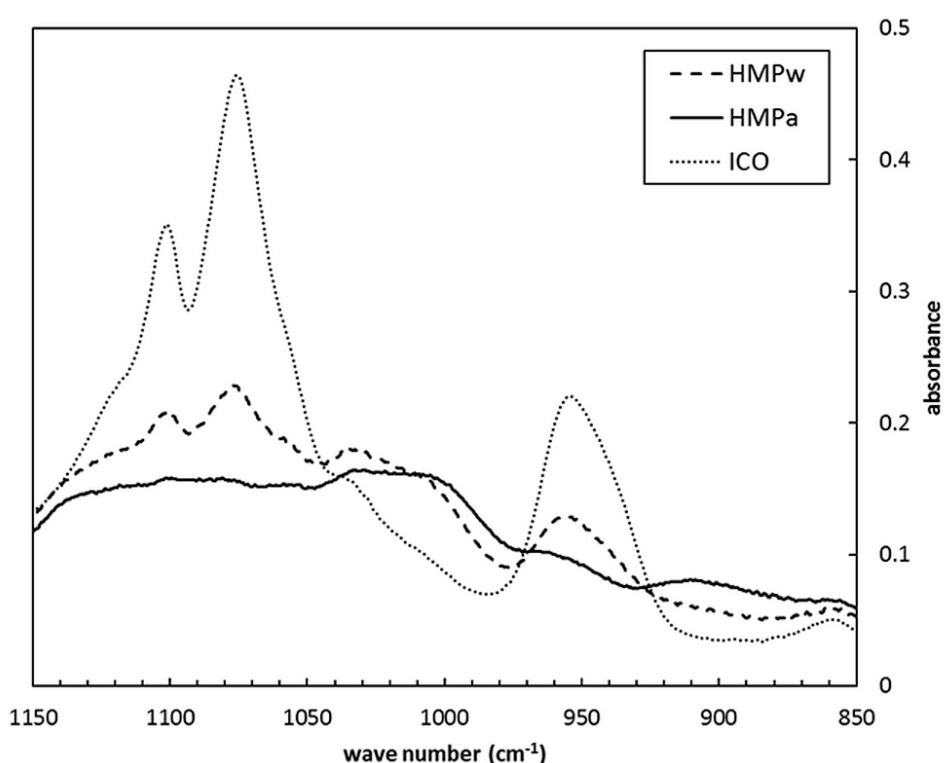


Fig. 6. IR-ATR spectra of silylated castor oil (ICO) and hybrid microparticles formulated in acetic buffer (HMPa) or in deionised water (HMPw). The Figure attests to the enhancement of ethoxysilane hydrolysis when the acetic buffer was used.

The absorbances at 952, 1075 and 1102 cm^{-1} were assigned to the ethoxysilanes ($\text{Si-O-CH}_2\text{-CH}_3$).^{28,24} An enhanced hydrolysis of the ethoxysilane moieties was observed for HMPa compared to HMPw. In addition, the broad-band around 1000 cm^{-1} attributed to overlapping of the -Si-O-Si- and -C-Si-O- stretching peaks²⁹ underscores the efficiency of the condensation in HMPa spectrum. To ensure that the acidic pH did not alter the triglyceride structure, especially the ester bond between glycerol and ricinoleate, microdroplets of CO

formulated in the same conditions were analyzed by ^1H NMR spectroscopy and the result showed that the ester bond remained stable despite the low pH (data not shown). In addition and according to the literature,³⁰ the ethyl-acetate generated during ICO formulation does not trans-esterify the ricinolein in mild conditions.

CP-MAS experiments in ^{29}Si -NMR spectroscopy enhanced the response of silicon nuclei and perfectly identified the chemical shifts of non-condensed (T^0), partially (T^1 , T^2) and fully condensed (T^3) silica species (Fig. 1) in the hybrid network at -48, -53, -57 and -67 ppm, respectively. The different natures of silica bonds between the ICO monomers were quantified by complementary SP-MAS experiments as summarized in Table 4 and Fig.A.2.

Table 4. Condensation yields and degrees of HMPs with various X_R .

HMPs ^a	^{29}Si signal (%)					CY (%)	CD (%)
	LP (-45 ppm)	T^0 (-48 ppm)	T^1 (-53 ppm)	T^2 (-57 ppm)	T^3 (-67 ppm)		
1.05	39.9	3.3	3.4	21.8	31.6	60.1	78.6
0.8	11.4	7.5	2.8	42.5	35.8	88.6	73.4
0.6	1.7	5.5	4.4	42.4	46.0	98.3	77.0

^a): HMPs 0.4 exhibited an insufficient signal-to-noise ratio to reach the confident accuracy of integrations (>95 %).

Unexpectedly, SP-MAS spectra presented a sharp peak (from 0.2 to 0.6 ppm wide) at -45 ppm with decreasing values from 39.9 % for HMP 1.05 to 1.7 % for HMP 0.6. As far as we searched in literature, we did not find any description on such thin peak during solid-state ^{29}Si NMR experiment in SP-MAS conditions. We supposed that it was a liquid-state profile with averaged anisotropic interactions and a liquid-state ^{29}Si NMR experiment was consequently conducted on uncross-linked ICO 1.05 (Fig. A.3). A strong peak was detected at -45.7 ppm and was assigned to liquid state ICO monomers of which none of the silanol functions had reacted (liquid peak = LP) whereas the T^0 peak represent non-condensed silica species in solid-state (i.e. connected to the hybrid network by other silica species present on the same ICO monomer). To quantify the sol-gel cross-linking, condensation yields (CY in eq. 3) were calculated:

$$CY = 100\% - LP \quad (3)$$

A correcting factor ($1/CY$) was then used to calculate accurate condensation degrees (CD in eq. 4):

$$CD = \frac{T^1 + 2T^2 + 3T^3}{3 \times CY} \quad (4)$$

Owing to the variable intensity of the liquid peak, CDs evolved from 60.1 to 98.3 % for HMP 1.05 and HMP 0.6, respectively, meaning that high silylation ratios did not permit an efficient

condensation. It would seem that the sol-gel reaction had not occurred in some domains within high silylated HMPs. The rough surface of HMP 1.05 (Fig. 4-A) could be thus explained, on the assumption that particles partially “collapse” above liquid domains. Nevertheless, CDs which represent the ability of silylated precursors to bind to each other, were not complete (around 70-80 %) and similar for the three HMPs (1.05, 0.8 and 0.6). Indeed it was documented that alkylsilanes with long organic tails don't reach a complete condensation owing to an increase of steric hindrance.^{31,32} Moreover, multifunctional silica precursors are often limited to form single siloxane bonds.³³

TGA analyses were conducted in order to check the hybrid structure of HMPs (Fig. 7). For all samples, the weight-loss began approximately at 160 °C corresponding to the ibuprofen degradation.³⁴ Then the dissociation of the urethane bond around 250 °C underscored the degradation onset of the hybrid matrix.³⁵ From 300 to 600 °C corresponding to the triglyceride disruption, the four curves differed: higher was the organic part, faster was the weight-loss (HMPs 0.4 > 0.6 > 0.8 > 1.05). Finally, a stabilization of the weights occurred after 650 °C, highlighting the mineral residue of each HMP. As expected, the values ranged from 7.4 to 14 % for the highest silylated sample (HMP 1.05) compared to the lowest one (HMP 0.4).

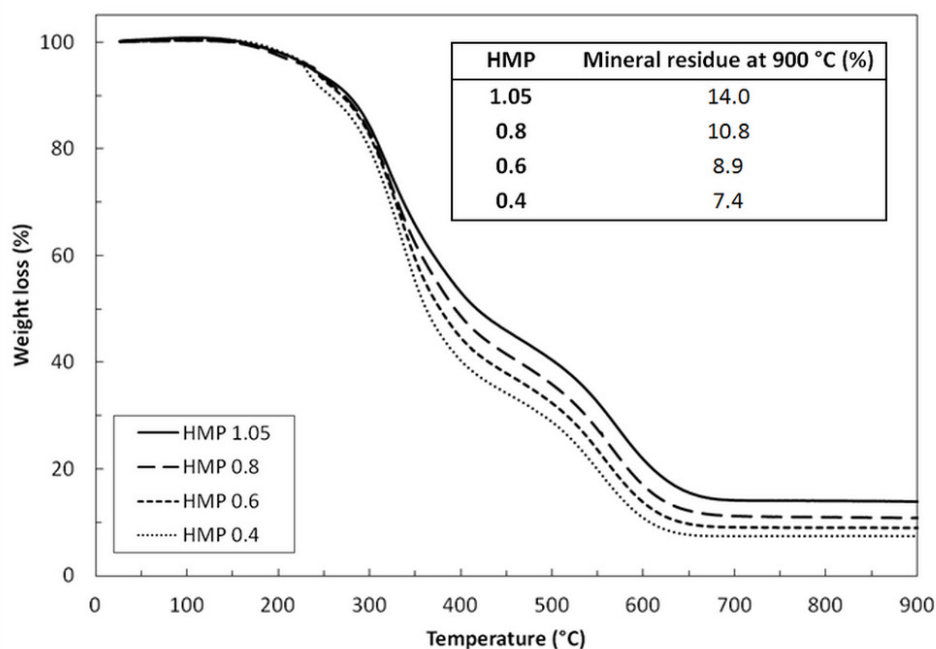


Fig. 7. TGA curves and mineral residues of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs formulated with multiple ICOs (from 0.4 to 1.05).

It is well known that the location of the API in microspheres governs release kinetics from the matrices. Therefore, EDX analyses were performed on flurbiprofen-loaded HMPs to study the

API location inside the particles using its own fluorine atom as probe. 8 wt.% flurbiprofen-loaded HMP 0.4 were cryofreezed prior to a mechanical shock. Firstly, EDX spectra of fluorine (K-L₂ and K-L₃ transition[§]), carbon (K-L₂ and K-L₃ transition) and silicium (K-L₃ transition) atoms were recorded on three HMP 0.4 cross-sections as illustrated in Fig. 8 and summarized in Table 5. Several positions in the inner and outer regions of HMP were recorded and similar values ranging from 0.37 to 0.52 % were measured attesting an almost homogeneous API distribution inside the HMPs.

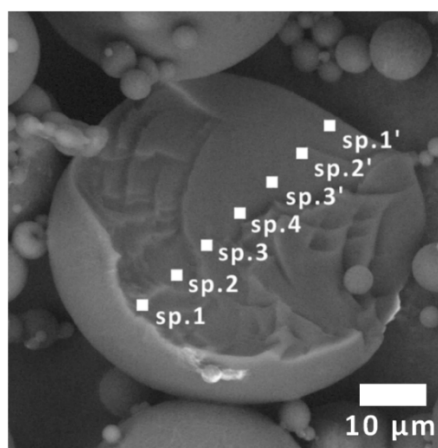


Fig. 8. EDX spectra (sp.) recorded on cross-section of 8 wt.% flurbiprofen-loaded HMPs. Each measurement was done on a 1 μm³ dot.

Table 5. Mass percentage of fluorine obtained from EDX spectra on a cross-section of 8 % flurbiprofen-loaded HMP. Data are shown as mean ± SD (n = 3) and the technical accuracy was ±10 % of each value.

Spectrum	Atomic rate (%)		
	Fluorine	Carbon	Silicium
1	0.44 ± 0.2	81.9 ± 4.0	1.87 ± 0.9
1'	0.49 ± 0.1	81.3 ± 0.7	1.73 ± 0.7
2	0.45 ± 0.1	82.7 ± 2.0	1.52 ± 0.4
2'	0.37 ± 0.1	82.7 ± 0.5	2.16 ± 0.9
3	0.52 ± 0.1	81.6 ± 3.0	1.75 ± 0.9
3'	0.39 ± 0.0	80.8 ± 1.1	1.77 ± 0.6
4	0.42 ± 0.2	81.7 ± 2.7	1.68 ± 0.6

The same conclusion was deduced from the silicium and carbon atoms on the homogenous composition of the hybrid matrix even if the carbon was slightly overestimated due to undetermined hydrogen atoms. To support this observation, retro-scattered electrons from

[§] K-L₂ and K-L₃ refer to the electronic transitions between atomic orbitals after the X-ray excitation.

carbon and silicium were recorded on HMP 1.05 during 20 min producing an atomic map depicted in Fig. 9.

Despite the presence of carbon in background and some electronic shadows due to the eccentric position of the SD Detector (at the top-right of the pictures), the scans exhibited an uniform disposition of carbon (Fig. 9– C) and silicium (Fig. 9– D) on particle surfaces. It should also be noted that less than 0.3 % of catalyst's tin was detected. In contrast with the TGA results on HMP 0.4 (i.e. 7.4 % of mineral residue), a smaller part of silicium (1.8 % in average of silicium, corresponding to 4 % in weight) was observed during EDX analyses on the same sample. The formation of silicon oxides throughout the thermal analysis under airflow was the cause of this overestimation.

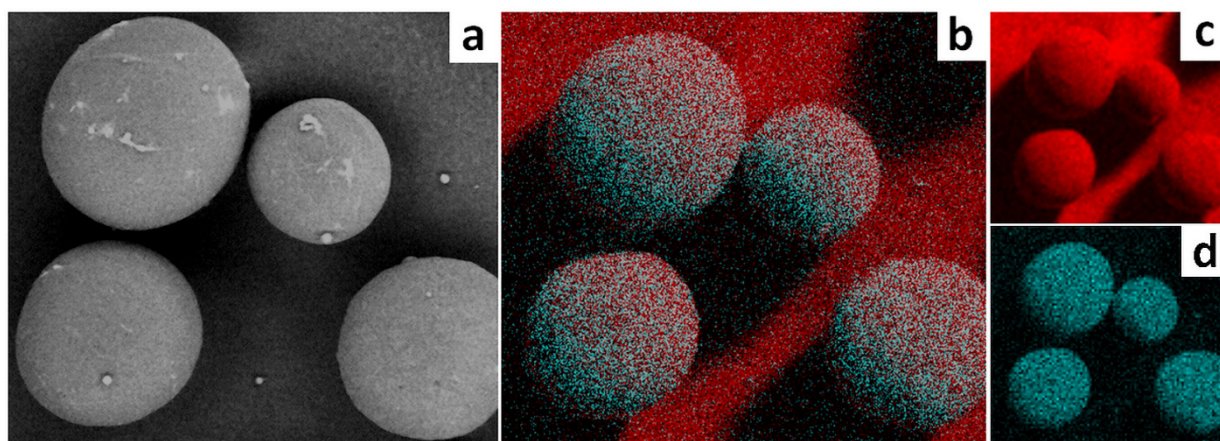


Fig. 9. EDX analysis of HMP 1.05: a) SEM image b) carbon / silicium map c) carbon map d) silicium map (the background is made from carbon).

3.3. Pharmaceutical characterization of the hybrid microparticles

The drug delivery potential of HMPs was firstly explored measuring the encapsulation yield of ibuprofen in the particles. Two parameters varied in the formulations: the silylation ratio of the ICO (from 0.4 to 1.05) and the loading rate of ibuprofen (from 4 to 16 wt.%). The silylation ratio was first tuned from 0.4 to 1.05 while the ibuprofen loading rate was set at 4 wt.%. Ranging from 90 to 100 %, the encapsulation yields showed an almost complete encapsulation of the API with a slight downward trend with the decreased silylation ratio (Fig. 10). In fact, some ethoxysilanes might remained within highly silylated HMPs and the previous assumption (i.e. complete hydrolysis of ethoxysilanes) was not yet accurate in this case. Therefore, the η' (and consequently the encapsulation yields) might be overestimated. Second, the loading rate of ibuprofen was tuned from 4 to 16 wt.% while the silylation ratio of the ICO was set at 1.05.

The results exhibited also very satisfying yields up to 16 wt.% loaded-HMP and no trend to loss of the API was noticed.

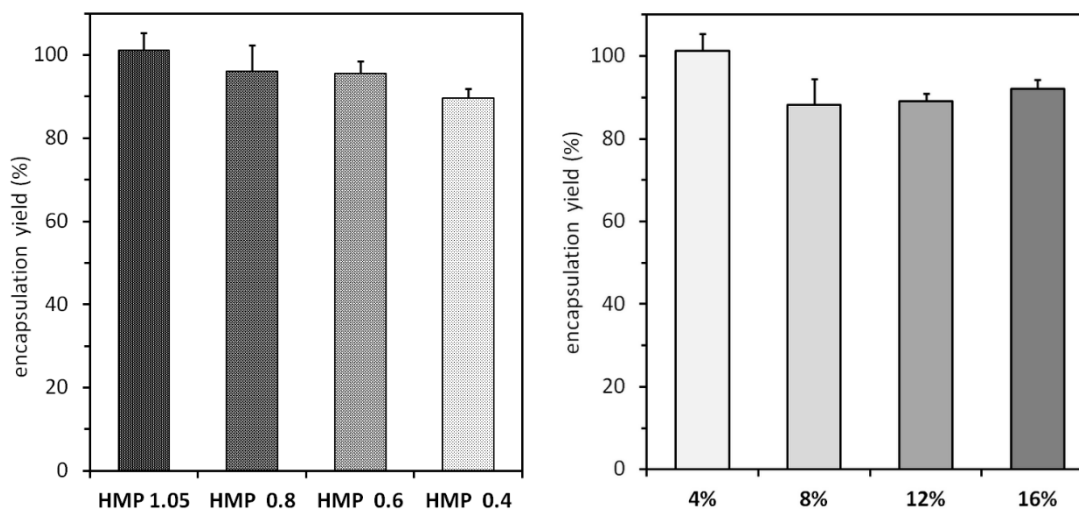


Fig. 10. On the left: encapsulation yields of HMPs for various silylation ratios, loaded with 4 wt.% of ibuprofen. On the right: encapsulation yields of HMP 1.05 loaded with various rates of ibuprofen. n=3.

The crystallinity of the API is a key parameter that modulates the drug dissolution. Indeed crystalline drugs are thermodynamically more stable than amorphous ones and are thus less able to dissolve *in vivo*.³⁶ XRD spectra were recorded on pure ibuprofen and ibuprofen-loaded HMPs at various loading rates (Fig. 11). 4 and 8 wt.% loaded-HMPs had an amorphous organization (large halo) highlighting a molecular solubilization of the ibuprofen within the particles. By contrast, 12 and 16 wt.% loaded-HMPs exhibited specific peaks of crystallized ibuprofen at 6, 16.5, 17.5, 20, 22 and 25° of 2theta underlining the formation of API microcrystals inside these HMPs.

The XRD results were corroborated by supplementary DSC experiments (Fig. 11). The endothermic peak of the ibuprofen melting (around 76 °C) was detected for 12 and 16 wt.% loaded-particles whereas 4 and 8 wt.% ibuprofen-loaded HMPs presented no peak of melting meaning the molecular solubilization of ibuprofen within the latter matrices.

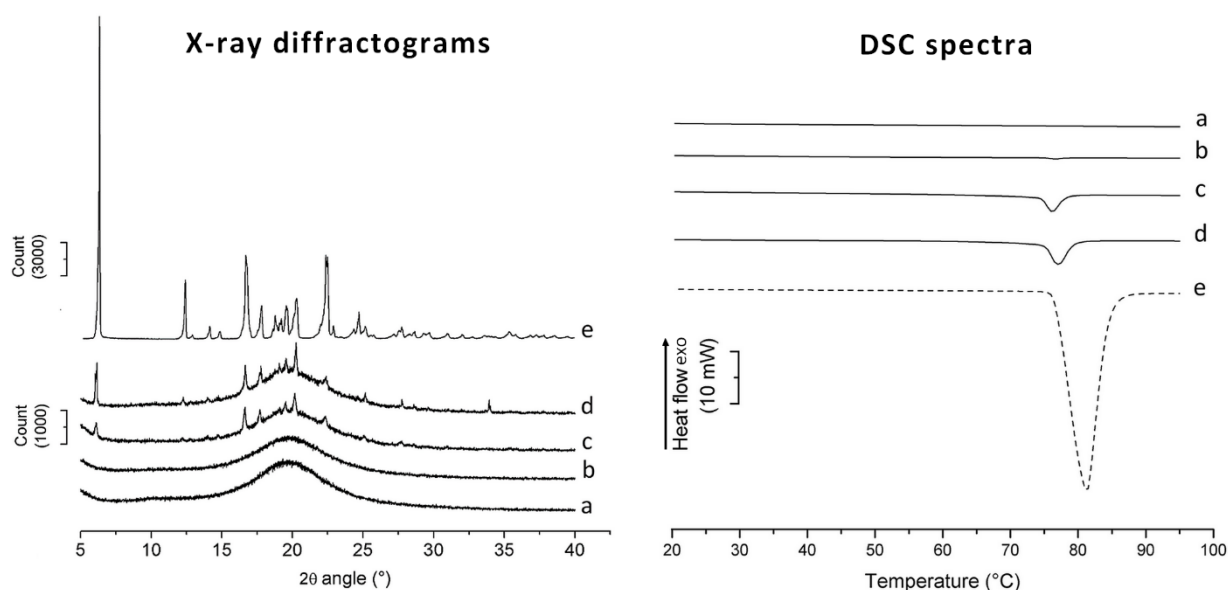


Fig. 11. X-ray powder diffractograms and differential scanning calorimetry of ibuprofen-loaded HMPs at: a) 4 wt.% b) 8 wt.% c) 12 wt.% d) 16 wt.% and of e) pure ibuprofen. The Y scale in the X-ray diffractogram “e” was increased three folds for more convenience.

The release kinetics of ibuprofen from the particles were widely investigated. In order to respect sink conditions, all the used media ensured more than tenfold of ibuprofen solubility.^{18,37} Therefore ibuprofen release kinetics from HMPs depended only on the particle properties. To investigate the oral route, the release properties of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs 1.05 were studied in simulated digestive medium added by a surfactant (protocol **1** – see Methods). The results depicted in Fig. A.4 showed a double stage release of the API. Ibuprofen being a carboxylic acid, it was protonated in acidic medium (SGF, pH = 1.2) whereas it lost its proton in neutral medium (SIF, pH = 6.8) accelerating its release from the matrix. The entire payload was then released after three hours.

A comprehensive study was done on the second stage of release (i.e. in SIF) using HMPs 0.4 to 1.05 loaded at 4 wt.% of ibuprofen in order to highlight the influence of the silylation ratio (Fig. 12).

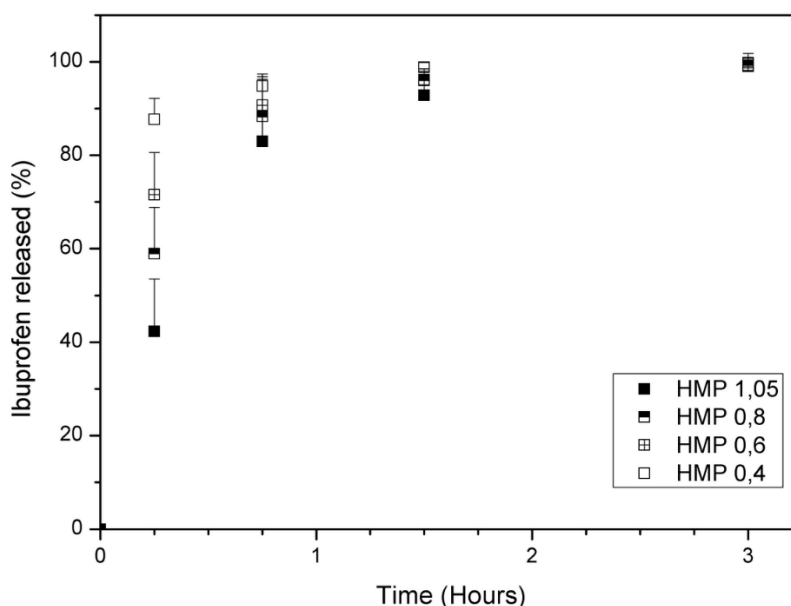


Fig. 12. Release kinetics from 4 wt.% ibuprofen -loaded HMPs in Simulated Intestinal Fluid (pH = 6.8). n = 3 and the minus error bars were hidden for more clarity.

The results exhibited a definite trend in the release kinetics: the lower is the ratio, the faster is the release. The size of HMPs being statistically similar, the difference observed in release kinetics could only be explained by a difference in HMPs properties and their abilities to retain the API. In case of LBDDS, the discussion remains open about the two models of “medium diffusion into the matrix” or the “API diffusion out of the matrix” as limiting, and thus controlling factors of release.³⁸ However, the use of a biorelevant medium to mimic the physiological conditions especially in term of pH and surface tension overcomes these considerations as it ensures an optimal *in vitro* / *in vivo* correlation. In other hand, Xu³⁹ demonstrated that the change in surface state of mesoporous silica nanoparticles by grafting trimethylsilane (an hydrophobic agent) was sufficient to slowdown the release of API without changing the matrix composition, the wettability of the particles is consequently a significant factor. The potential impact of the HMP surface states was annihilated in our study by optimizing the wettability of the HMPs and by setting the amount of the wetting agent at 0.1 wt.% for all experiments. In order to quantify the differences in internal structure of the matrices, the release kinetics were mathematically simulated from which the diffusion coefficients (D) of ibuprofen were deduced. Taking into consideration EDX, XRD and DSC results (i.e. homogeneity of the API within the spheres and its molecular state), 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs were related to monolithic solutions in which a molecular dissolution of the API happened.⁴⁰ Therefore, an appropriate release model was implemented (Appendix

B). The fitting optimization was carried out by least squares method (Fig. 13) and the diffusion coefficient (D) of ibuprofen in each HMP was then deduced (Table 6).

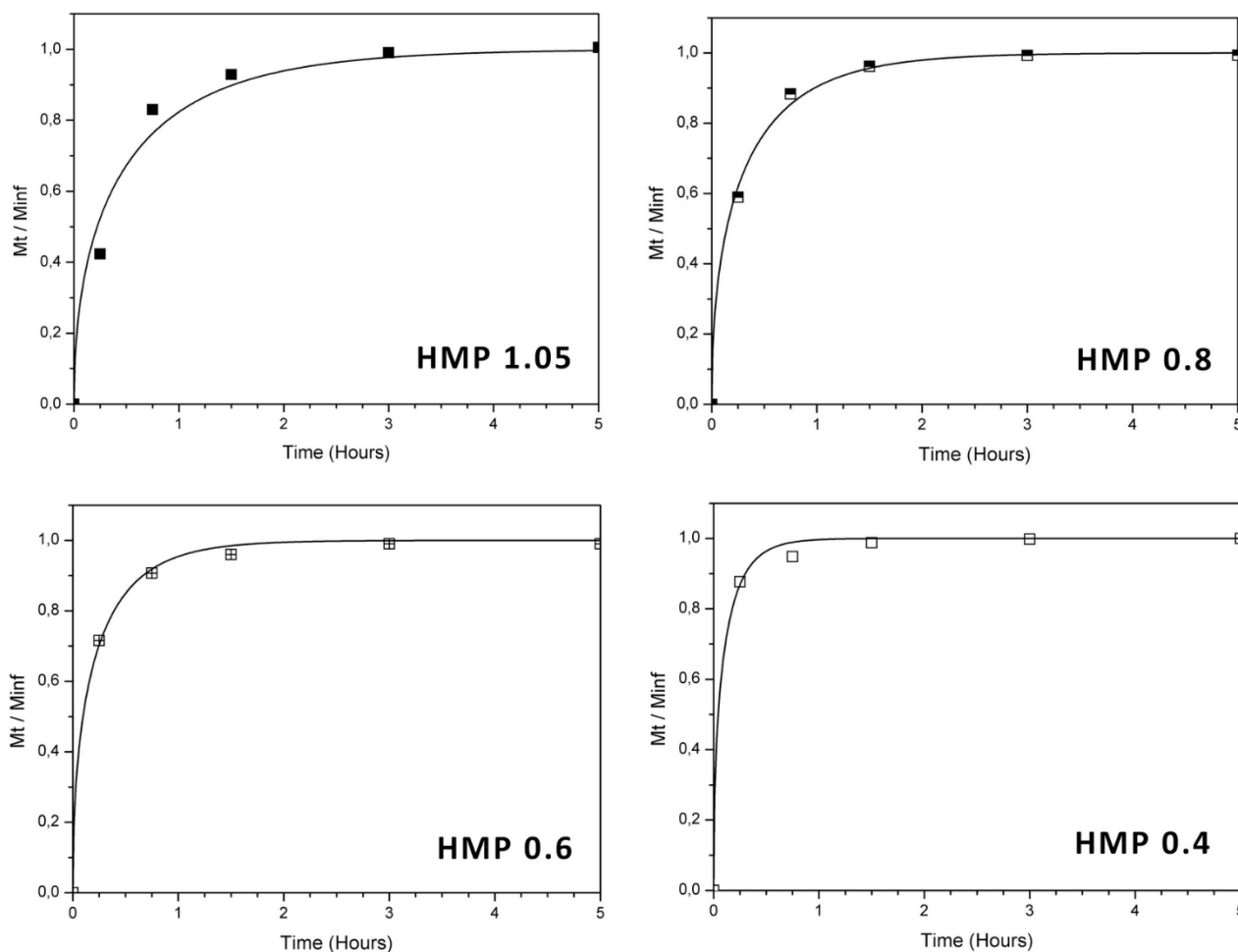


Fig. 13. Experimental and mathematical modeling release kinetics of ibuprofen from HMPs. squares: experimental data; line: computed fits. Mt = ibuprofen released at time “t”; Minf = ibuprofen released at infinite time.

Table 6. Diffusion coefficients (D) deduced from the mathematical model. Results are shown as value ± probability of deviation

HMP	Diffusion coefficient ($10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
1.05	1.44 ± 0.23
0.8	2.96 ± 0.18
0.6	4.35 ± 0.23
0.4	7.28 ± 0.75

The diffusion coefficients of ibuprofen ranged from $1.44 \cdot 10^{-9}$ to $7.28 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ according to the HMP type. They increased by a seven factor when the X_R decreased from 1.05 to 0.4. Considering ²⁹Si NMR results, the condensation yields seemed to follow the same trend whereas the condensation degrees were similar. It suggests that the release from effectively

cross-linked matrices is facilitated and the liquid fraction within ICO 1.05 and 0.8 exhibited a solubilization capacity towards ibuprofen and thus slowed down its release. These diffusion coefficients in our matrices are in same range with ones reported on classical materials such as the diffusion of ibuprofen in a mesoporous magnesium carbonate material “Upsalite®” ($9.8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)⁴¹ which permitted an extended-release on 24 h in phosphate buffer. Similarly, ibuprofen diffusion coefficients were determined in polyester-based microparticles and were found to be $4.18 \cdot 10^{-12}$ and $6.59 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, for PLLA and PLGA respectively;⁴² ibuprofen release in these systems occurred over 70 days (in phosphate buffer).

Finally, to consider the subcutaneous route as a potential administration route, release kinetics of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs 1.05 were recorded in PBS medium (Fig. 14). A first stage of “burst” effect was noted where 35 % (3.39 μmol) of the API was released in 50 h. However, a second stage of sustained release exhibited a slope of 5 % per 50 hours (9.7 nmol per hour). It can be explained by the poor dispersibility and wettability of the HMPs in PBS buffer that makes full sense to the hypothesis of water diffusion control.³⁸ Indeed, in absence of surfactant, HMPs tend to form a cluster that favors a sustained release by the slow diffusion of the API from the core to the surface of the device-like material.

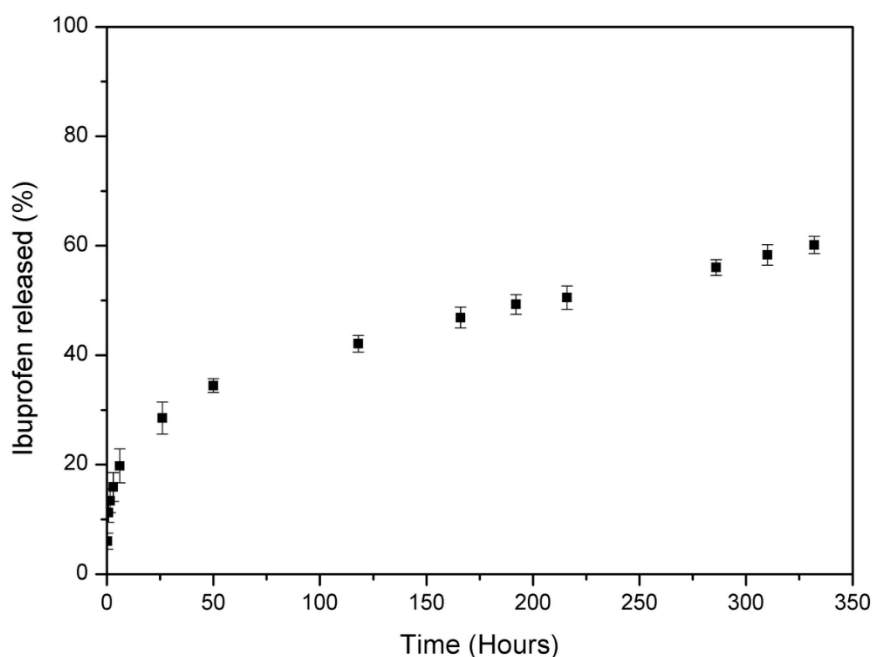


Fig. 14. Release kinetics of 4 wt.% ibuprofen-loaded HMP 1.05 in PBS (pH=7.4). The experiment was stopped after 350 hours. n=3.

3.4. Biological characterization of the hybrid microparticles

As noted above, HMPs presented an interesting potential for oral and subcutaneous drug delivery. Therefore, the digestibility and the cytotoxicity of these particles were studied. Fig. 15 shows the pH drop of digestion media containing CO or the HMPs. The fitted curve of CO digestion was used as reference and it exhibited a linear decrease of pH during the 1.5 h of the experiment highlighting a constant degradation rate of the ester bonds. However, HMP curves demonstrated an exponential decrease of pH with an initial drop higher than the one of CO curve, followed by a slowing after 45 min of digestion. We supposed that the particle hydrolysis was limited to the surface due to the inability of lipase to catalyze the rupture of deeper ester bonds. Indeed, silylated fatty acids (FA)s are linked to the matrix by two kinds of bonds: the ester and the siloxane. The ester bond could be hydrolyzed by the lipase while the siloxane remains stable preventing the catalytic progression of the enzyme. This hypothesis is in line with the more significant pH decrease recorded for HMP 0.4 compared to others, because of their high content of non-silylated FA.

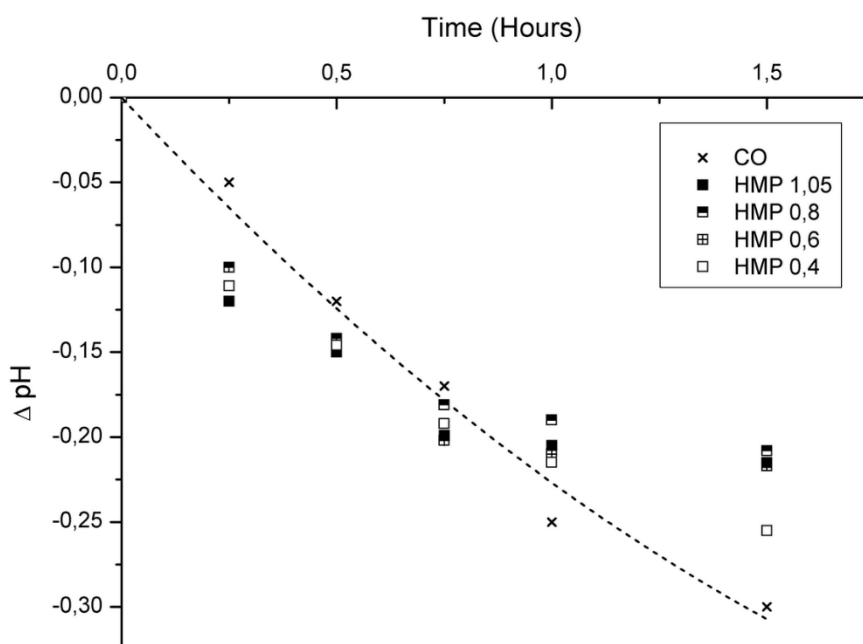


Fig. 15. pH drop over time of digestion media containing ICO or HMPs. $n = 2$

In order to support this hypothesis, HMPs 1.05 loaded with 1 wt.% of Sudan Black B (SBB) were synthesized and subjected to the same digestion protocol. The SBB allowed us to track the black HMPs within the digestion medium. After 2 h of digestion, the dye diffused in the medium but the morphology of HMP seemed to be preserved confirming the surface-limited digestion of the particles (Fig. 16).

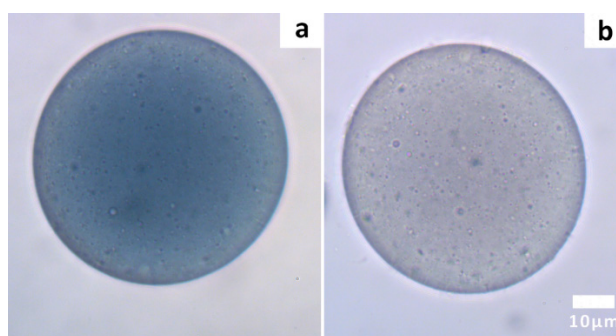


Fig. 16. Sudan Black B-loaded HMP a) before and b) after 2 hours in a simulated digestion medium containing lipases.

The cytotoxicity studies of the four HMPs at different concentrations were conducted on two kinds of cells simulating the digestive (Caco-2) and the subcutaneous (NIH-3T3 fibroblasts) cellular environments. Briefly, satisfying results were reached and the elements extracted from HMPs had not induced cell death in both cases (Fig. 17). For Caco-2/TC7 enterocytes, the cell viability varied from 80 to 120 % without a trend dependent on microparticle concentration or X_R and this cellular type seems little sensitive. On the contrary, two trends were observable for the fibroblast assays: the influence of the HMP concentration and their X_R . The cell viability decreased from 100 to 70 % by increasing the concentration from 0.1 to 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ or by decreasing the silylation ratio from 1.05 to 0.4. An explanation to this slight viability decrease could be related to the release of FFA from 0.4 HMP leading to the acidification of the culture medium. Concerning the influence of the concentration that was already observed,⁶ we could attribute it to the presence of carrageenan residues. However, viability results were higher than 84 % below this excessive concentration of 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Thus we could consider that HMPs are well tolerated.

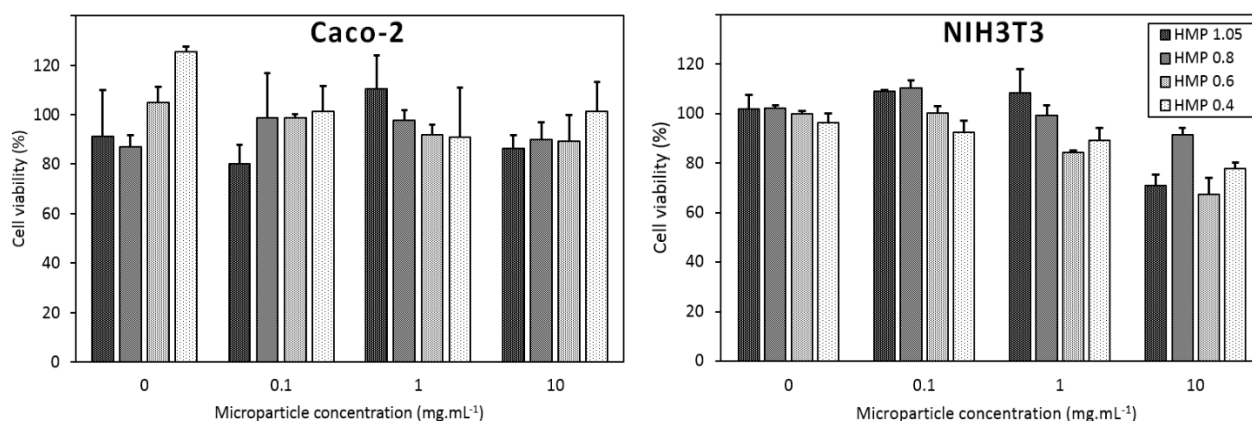


Fig. 17. Cytotoxicity studies of HMPs conducted on Caco-2/TC7 enterocytes and NIH-3T3 fibroblasts.

4. Conclusion

An original approach to formulate poorly water-soluble APIs in vegetable oil / silica hybrid microparticles was described. A complete oil silylation in solvent- and catalyst-free conditions was reached whatever the oil / silica ratio used, and the TSE process was optimized for pharmaceutical application exhibiting a good robustness with high preparation yields (> 85 %) in all formulations. This process produced solid and microspheric particles in which the API was homogeneously disposed. For ibuprofen, excellent encapsulation yields were reached up to 16 wt.% of ibuprofen-loaded HMPs. Furthermore, two behaviors of the loaded-API were highlighted: an amorphous solubilization up to 8 wt.% then a microcrystalline dispersion up to 16 wt.% of ibuprofen. A tunability of API release from HMPs was underscored and depended on two physicochemical parameters. First, the wettability of the HMPs, which is related to the biorelevant medium used, induced a complete API release ranging from 3 hours (in simulated intestinal fluid) up to 15 days (in subcutaneous simulated medium). Second, the structure of the HMP matrix, which depends on the silylation ratio of the CO and the sol-gel condensation yield and degree, led to a slowdown of API release when the uncross-linked amount of ICO increased. These releases were also mathematically fitted to the diffusion model from a sphere described by Crank and the diffusion coefficients D were then deduced. Finally, a surface-limited digestion of the HMPs by means of lipases was highlighted and a good cytocompatibility was exhibited on fibroblasts and enterocyte-like cells.

5. Appendix A: Supporting Data

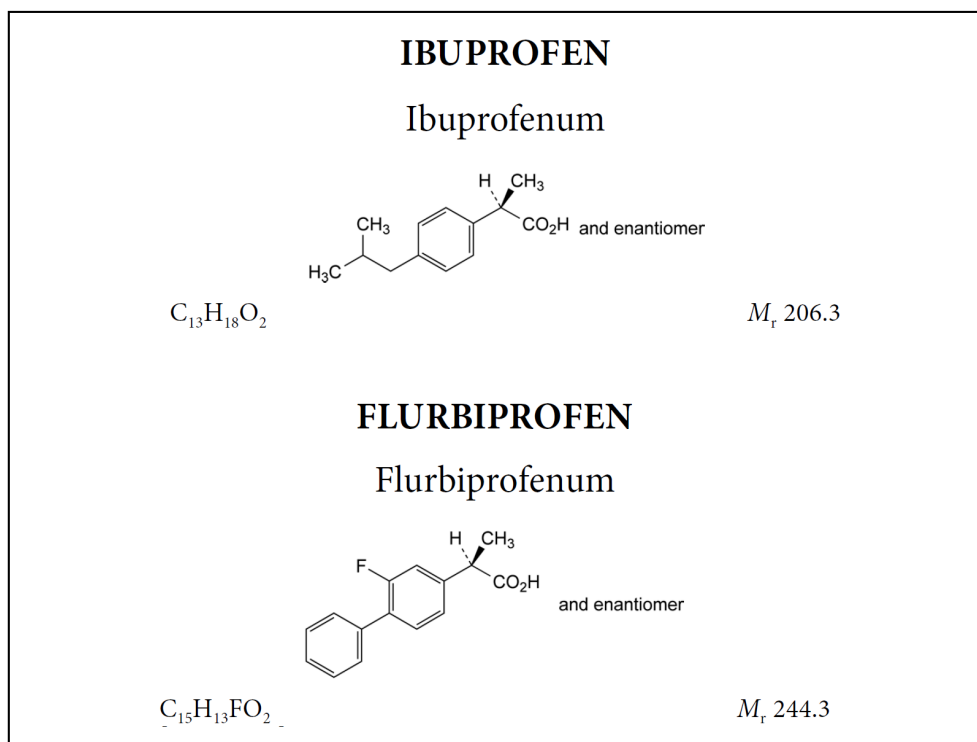


Fig. A.1. Chemical structures of ibuprofen and flurbiprofen (from European Pharmacopeia 9.5)

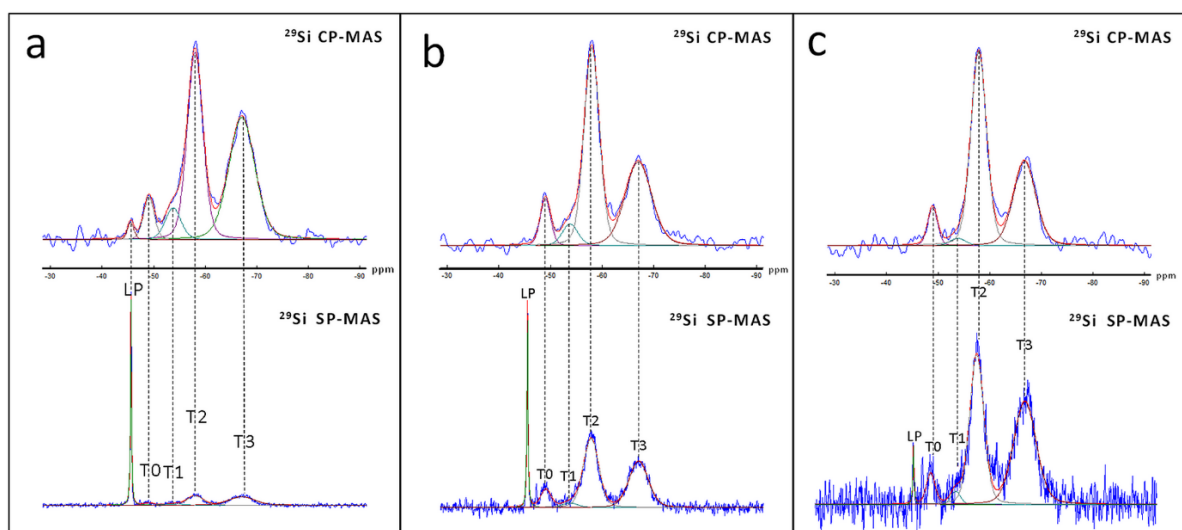


Fig. A.2. ^{29}Si NMR spectra of HMPs: a) 1.05 b) 0.8 c) 0.6 . Spectra were fitted and area under curves for SP-MAS experiments were integrated in percent.

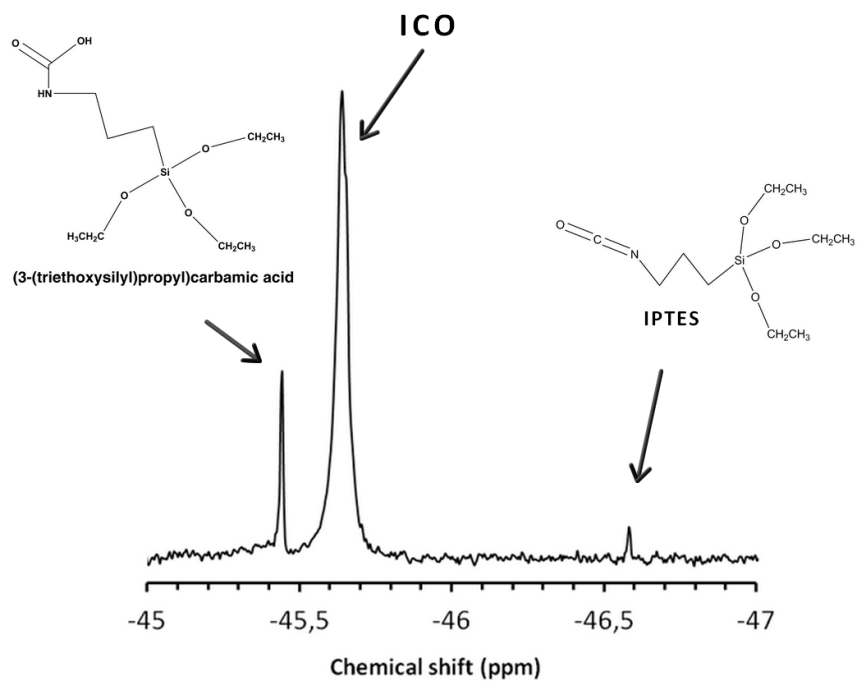


Fig. A.3. ^{29}Si NMR of ICO 1.05. The peak at -46.6 ppm was assigned to the excess of IPTES, and the one at -45.4 ppm to an impurity initially present in the reagent.

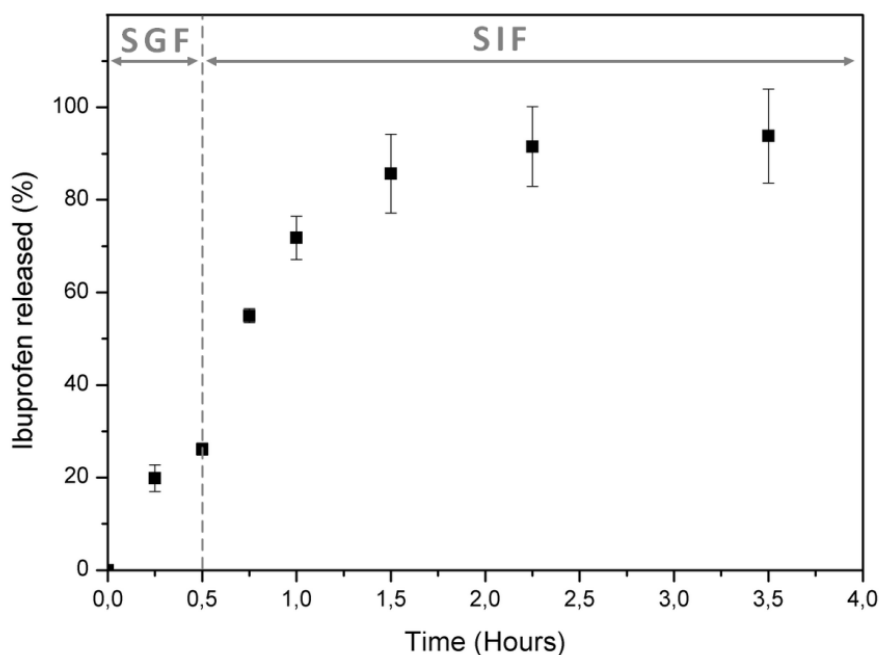


Fig. A.4. Release kinetics from 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs 1.05 in Simulated Gastric and Intestinal Fluids (SGF and SIF respectively). $n = 3$.

Table A.1. Composition of the HMPs digestion medium for biodegradability assays

		Component	Concentration	Purpose
		Digestion medium	Pre-digestion medium	PBS buffer
Porcine bile extract	5 mM			Emulsifying the substrate
Phospholipids (S 100 Lipoïd)	1.25 mM			
Pancreatin (4 × USP)	450 UA		Hydrolysis of glycerol-fatty acid bonds	
		Ca ²⁺	36mM aqueous solution 1mL injected every 15mn	Precipitation of free fatty acids (FFA)s

6. Appendix B: Mathematical Modeling

Considering that:

- An optimal wettability has been ensured on HMPs;
- The API is homogeneously and amorously disposed within HMPs;
- The HMPs are not significantly swelling or eroding during API release (surface-limited digestion).
- Sink conditions are provided in the release media.

A mathematical model for 4 wt.% ibuprofen-loaded HMPs releases in Simulated Intestinal Fluid (SIF) was established referring to the diffusion equation in spheres:⁴³

$$M(R, t) = M_{\infty}(R) - M_{\infty}(R) \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2t}{R^2}\right)}{n^2} \quad (\text{B.1})$$

Where $M(t)$ and M_{∞} are the cumulative amounts of ibuprofen released at time “t” and at infinite time, respectively. D is the diffusion coefficient of the ibuprofen within the particle, and R is the radius of this particle.

The cumulative amounts of ibuprofen at infinite time depends on three parameters, C_1 , C_0 and R, which represent the concentration at the surface of the sphere, the initial concentration within the sphere and the radius of the particle, respectively.⁴⁴

$$M_{\infty}(R) = (C_0 - C_1) \times V = (C_0 - C_1) \frac{4\pi R^3}{3} \quad (\text{B.2})$$

It is important to note that $M(t)$ and M_{∞} are both R dependent. As the amount of released ibuprofen is additive, then the total of released ibuprofen depends on the size distribution of HMPs at a given radius ($P(R)$):

$$\overline{M(t)} = \overline{M(R, t)} = \int_{R_{min}}^{R_{max}} M(R, t) P(R) dR \quad (\text{B.3})$$

$$\overline{M(R, t)} = \overline{M_{\infty}(R)} - M_{\infty}(R) \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2t}{R^2}\right)}{n^2} \quad (\text{B.4})$$

$$\frac{\overline{M(R, t)}}{\overline{M_\infty(R)}} = 1 - \frac{1}{\overline{M_\infty(R)}} M_\infty(R) \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2}\right)}{n^2} \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{\overline{M(R, t)}}{\overline{M_\infty(R)}} = 1 - \frac{1}{\overline{R^3}} R^3 \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2}\right)}{n^2} \quad (\text{B.6})$$

The size distribution of HMPs ($N(R)$) can be obtained experimentally by Laser diffraction particle sizing technique, and used to calculate the $\overline{R^3}$ and $R^3 \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2}\right)}{n^2}$.

$$\overline{R^3} = \int_{R_{min}}^{R_{max}} R^3 P(R) dR \quad (\text{B.7})$$

$$\begin{aligned} R^3 \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2}\right)}{n^2} \\ = \int_{R_{min}}^{R_{max}} R^3 \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{N \rightarrow \infty} \frac{\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2}\right)}{n^2} P(R) dR \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

The eq. (B.6) was used to fit the experimental data points, using the non-linear least square method, and the GNU Octave software (leasqr function). To work out the eq. (B.6), we used the experimental size distribution of particles and the trapeze method to estimate integrals in the eqs. (B.7) and (B.8). Finally, the solver was used in order to extract the diffusion coefficient (D) of ibuprofen in each HMP.

7. References

1. *Towards drugs of the future: key issues in lead finding and lead optimization.* (IOS Press, 2008).
2. Chen, D. & Yazdi, S. Polymer- and Lipid-Based Systems for Parenteral Drug Delivery. in *Sterile Product Development* (eds. Kolhe, P., Shah, M. & Rathore, N.) vol. 6 47–60 (Springer New York, 2013).
3. Wissing, S. A., Kayser, O. & Müller, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1257–1272 (2004).
4. Pouton, C. W. & Porter, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 625–637 (2008).
5. Kalepu, S., Manthina, M. & Padavala, V. Oral lipid-based drug delivery systems – an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **3**, 361–372 (2013).
6. Gallon, G. *et al.* Cross-Linked Castor Oil-Based Hybrid Microparticles as Drug Delivery Systems. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **5**, 4311–4319 (2017).
7. Li, Y., Li, J., Ma, S. & Luo, Y. Different catalytic systems on hydroxyl-terminated GAP and PET with poly-isocyanate: Curing kinetics study using dynamic *in situ* IR spectroscopy. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **21**, 495–503 (2016).
8. Department of Health and Human Services. *CFR - Code of Federal Regulations.* <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=175.300> (2018).
9. Niemeyer, C. & Mirkin, C. A. *Nanobiotechnology II: more concepts and applications.* (Wiley-VCH, 2007).
10. Mangione, M. R. *et al.* K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of κ-Carrageenan. *Biophysical Chemistry* **113**, 129–135 (2005).
11. Shi, X., Graiver, D. & Narayan, R. Hydrolysis and Condensation of Hydrophilic Alkoxysilanes Under Acidic Conditions. *Silicon* **4**, 109–119 (2012).
12. Brinker, C. J. Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. *Journal of Non-Crystalline Solids* **100**, 31–50 (1988).
13. Rawle, A. Basic principles of particle size analysis. (2018).
14. Massiot, D. *et al.* Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra: Modelling 1D and 2D solid-state NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* **40**, 70–76 (2002).
15. Paprskářová, A., Možná, P., Oga, E. F., Elhissi, A. & Alhnan, M. A. Instrumentation of Flow-Through USP IV Dissolution Apparatus to Assess Poorly Soluble Basic Drug Products: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech* **17**, 1261–1266 (2016).
16. Stippler, E., Kopp, S. & Dressman, J. B. Comparison of US Pharmacopeia Simulated Intestinal Fluid TS (without pancreatin) and Phosphate Standard Buffer pH 6.8, TS of the International Pharmacopoeia with Respect to Their Use in In Vitro Dissolution Testing. *Dissolution Technologies* **11**, 6–10 (2004).
17. Efentakis, M. & Dressman, J. B. Gastric juice as a dissolution medium: surface tension and pH. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **23**, 97–102 (1998).

18. Finholt, P. & Solvang, S. Dissolution kinetics of drugs in human gastric juice--the role of surface tension. *J Pharm Sci* **57**, 1322–1326 (1968).
19. Klein, S. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. *The AAPS Journal* **12**, 397–406 (2010).
20. Zangenberg, N. H., Müllertz, A., Kristensen, H. G. & Hovgaard, L. A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. *Eur J Pharm Sci* **14**, 115–122 (2001).
21. Mosgaard, M. D., Sassene, P., Mu, H., Rades, T. & Müllertz, A. Development of a high-throughput in vitro intestinal lipolysis model for rapid screening of lipid-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **94**, 493–500 (2015).
22. Socrates, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. (Wiley, 2010).
23. Cannon, C. G. Infrared frequencies of amide, urea, and urethane groups. *The Journal of Physical Chemistry* **80**, 1247–1248 (1976).
24. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th Edition*. (Wiley, 2005).
25. Piacentini, E. Droplet Size. in *Encyclopedia of Membranes* (eds. Drioli, E. & Giorno, L.) 1–2 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-40872-4_1690-1.
26. Andrianov, K. A. *Metalorganic Polymers*. (John Wiley & Sons Inc, 1965).
27. Pope, E. J. A. & Mackenzie, J. D. Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst. *Journal of Non-Crystalline Solids* **87**, 185–198 (1986).
28. Leyden, D. E. & Atwater, J. B. Hydrolysis and condensation of alkoxy silanes investigated by internal reflection FTIR spectroscopy. *Journal of Adhesion Science and Technology* **5**, 815–829 (1991).
29. Allauddin, S., Narayan, R. & Raju, K. V. S. N. Synthesis and Properties of Alkoxy silane Castor Oil and Their Polyurethane/Urea–Silica Hybrid Coating Films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **1**, 910–918 (2013).
30. Shafiei, A., Rastegari, H., Ghaziaskar, H. S. & Yalpani, M. Glycerol transesterification with ethyl acetate to synthesize acetins using ethyl acetate as reactant and entrainer. *Biofuel Research Journal* **4**, 565–570 (2017).
31. Delattre, L. & Babonneau, F. Influence of the nature of the R Group on the Hydrolysis and Condensation Process of Trifunctional Silicon Alkoxides, R-Si(OR')₃. *MRS Proceedings* **346**, (1994).
32. Peeters, M. P. J., Wakelkamp, W. J. J. & Kentgens, A. P. M. A ²⁹Si solid-state magic angle spinning nuclear magnetic resonance study of TEOS-based hybrid materials. *Journal of Non-Crystalline Solids* **189**, 77–89 (1995).
33. Brochier Salon, M.-C. & Belgacem, M. N. Hydrolysis-Condensation Kinetics of Different Silane Coupling Agents. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **186**, 240–254 (2011).
34. Lerdkanchanaporn, S. & Dollimore, D. A thermal analysis study of Ibuprofen. *Journal of thermal analysis* **49**, 879–886 (1997).

35. Saunders, J. H. The Reactions of Isocyanates and Isocyanate Derivatives at Elevated Temperatures. *Rubber Chemistry and Technology* **32**, 337–345 (1959).
36. Hancock, B. C. & Parks, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* **17**, 397–404 (2000).
37. Avdeef, A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 568–590 (2007).
38. Siepman, J. & Siepman, F. Mathematical modeling of drug release from lipid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics* **418**, 42–53 (2011).
39. Xu, W. *et al.* Controllable release of ibuprofen from size-adjustable and surface hydrophobic mesoporous silica spheres. *Powder Technology* **191**, 13–20 (2009).
40. Siepman, J. & Siepman, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release* **161**, 351–362 (2012).
41. Zhang, P., Zardán Gómez de la Torre, T., Forsgren, J., Bergström, C. A. S. & Strømme, M. Diffusion-Controlled Drug Release From the Mesoporous Magnesium Carbonate Upsalite[®]. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **105**, 657–663 (2016).
42. Lee, W. L., Shi, W.-X., Low, Z. Y., Li, S. & Loo, S. C. J. Modeling of drug release from biodegradable triple-layered microparticles: Modeling of Drug Release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **100A**, 3353–3362 (2012).
43. Crank, J. *The mathematics of diffusion*. (Clarendon Press, 1975).
44. Zhang, Y. *Geochemical kinetics*. (Princeton University Press, 2008).

2^e volet***Etudes complémentaires*****Sommaire**

1. Introduction	97
2. Etude de la libération à partir des microparticules hybrides chargées avec des taux croissants en ibuprofène.....	97
3. Essais de surcondensation des microparticules hybrides.....	99
4. Essais de synthèse d'une huile de ricin « supersolubilisante »	104
4.1. Caractérisation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO)	106
4.2. Fonctionnalisation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO).....	108
4.3. Caractérisation du polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPCO)	109
4.4. Formulation du polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPCO).....	112
5. Suppléments	115
6. Références bibliographiques.....	118

Figures

Fig. 1. Observation microscopique des HMPs chargées à différents taux en ibuprofène.	98
Fig. 2. Diffractogramme de l'ibuprofène pur et des HMPs chargées à différents taux	98
Fig. 3. Tests de libération <i>in vitro</i> de l'ibuprofène dans un milieu intestinal simulé à partir des HMPs chargées à différents taux	99
Fig. 4. Représentation chimique du tétraethyl orthosilicate (TEOS)	101
Fig. 5. Spectres 29Si-RMN acquis sur un échantillon de microparticules hybrides surcondensées.	102
Fig. 6. Libération de l'Ibuprofène à partir des HMPs à base d'ICO 0,4 dans un milieu intestinal simulé.....	103
Fig. 7. Libération de l'Ibuprofène à partir des HMPs à base d'ICO 0,8 dans un milieu intestinal simulé.....	103
Fig. 8. Spectres EDX des HMP 0,8s0,25	104
Fig. 9. Structures chimiques des composants majoritaires (A et B) du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO).....	106
Fig. 10. Spectre RMN HSQC ¹ H - ¹³ C du PCO : zoom sur les >CH-O et -CH ₂ -O	106
Fig. 11. Spectres RMN 2D COSY et HMBC ¹ H - ¹³ C du PCO	107
Fig. 12. Mécanisme réactionnel de la silylation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO).....	108
Fig. 13. Spectre RMN HSQC ¹ H - ¹³ C de l'IPCO 0,8 : zoom sur les >CH-O et -CH ₂ -O.....	108

Fig. 14. Détermination expérimentale de la concentration micellaire critique du PCO et de l'IPCO 0,4 à 25°C	110
Fig. 15. Solubilisation de l'ibuprofène en fonction de la quantité d'IPCO 0,4 ajoutée	111
Fig. 16. Schéma de l'organisation micellaire de polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPCO) en milieu aqueux	113

Tableaux

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des HMPs à différents taux de silylation	100
Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des microparticules hybrides surcondensées	102
Tableau 3. Solubilité des principes actifs étudiés dans l'huile de ricin et dans l'eau.....	105
Tableau 4. Tests de dissolution de l'ibuprofène dans l'ICO 0,8, en présence d'IPCO 0,4	110
Tableau 5. Composition des formulations étudiées comportant de l'IPCO 0,4	112
Tableau 6. Taille des micelles de PCO et d'IPCO après 24 h en milieu catalytique et non catalytique	114

1. Introduction

Le 1^{er} volet de ce chapitre décrit une étude effectuée sur l'huile de ricin silylée (ICO), un nouvel excipient bio-sourcé fonctionnalisé au laboratoire. Cette étude avait pour but d'évaluer le potentiel de cet excipient, formulé en microparticules hybrides (HMP), en tant que réservoir de PA. L'article décrit notamment la caractérisation physicochimique du matériau élaboré, l'exploration de ses capacités d'encapsulation et de libération modulée du PA dans différents milieux physiologiques, sa digestibilité ainsi que son innocuité sur des lignées cellulaires de référence. En complément de cet article, trois études additionnelles ont été menées et feront l'objet de ce second volet : la première consistait à établir les profils de libération de taux croissants d'ibuprofène à partir des HMPs. La seconde avait pour objectif d'explorer l'action d'un second agent silylé libre (i.e. non greffé à l'huile) sur la structure des HMPs et consécutivement sur la libération du PA. Enfin, la dernière avait pour but l'élaboration d'une huile « supersolubilisante » par adjonction d'un agent dérivé de l'huile de ricin aux propriétés tensioactives et solubilisantes.

2. Etude de la libération à partir des microparticules hybrides chargées avec des taux croissants en ibuprofène

Les HMP synthétisées à partir d'ICO à un ratio 1,05 ont été chargées avec quatre taux croissants en ibuprofène : 4, 8, 12 et 16 wt.%, et les rendements d'encapsulation publiés dans l'article précédent montraient des résultats très satisfaisants (> 85 %). Dans ce qui suit, des essais de libération *in vitro* ont été effectués dans les mêmes conditions que dans l'article précédent (i.e. en milieu intestinal simulé). Aussi, les résultats des diffractions aux rayons X ont été repris de l'article, et des observations microscopiques ont été ajoutées.

Les résultats ont montré des amas d'ibuprofène agglomérés en surface à partir de 12 wt.% d'ibuprofène chargé dans les HMPs (Microscopie à balayage - Figure 1), tandis que les diffractogrammes (Figure 2) avaient précédemment mis en évidence l'empreinte cristalline de l'ibuprofène dans ces amas. Dès lors, deux paramètres physiques pourraient, *a priori*, influencer la libération du PA encapsulé dans les HMPs :

- L'état cristallin du PA, car les dispersions moléculaires et la molécule à son état amorphe (indétectables sur les diffractogrammes) tendent à se dissoudre plus rapidement dans le milieu de libération que les cristaux correspondants¹ ;
- La répartition du PA dans les HMPs, car il est d'autant plus accessible au milieu de libération qu'il est proche de la surface.²

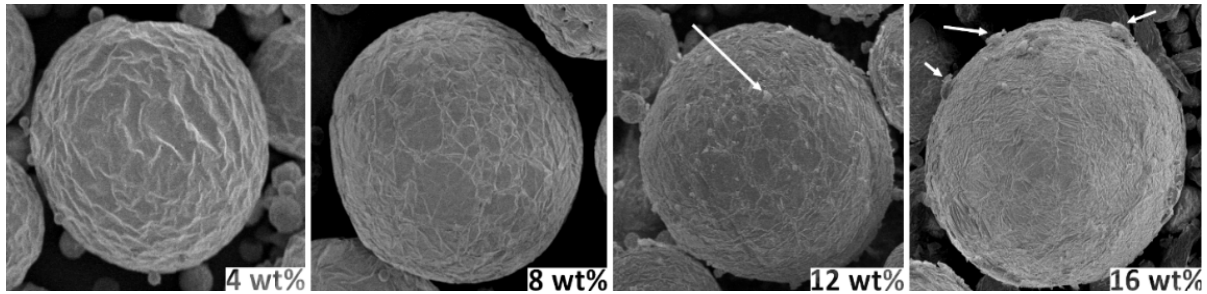


Fig. 1. Observation microscopique des HMPs chargées à différents taux en ibuprofène. Les flèches blanches indiquent les microcristaux d'ibuprofène en surface.

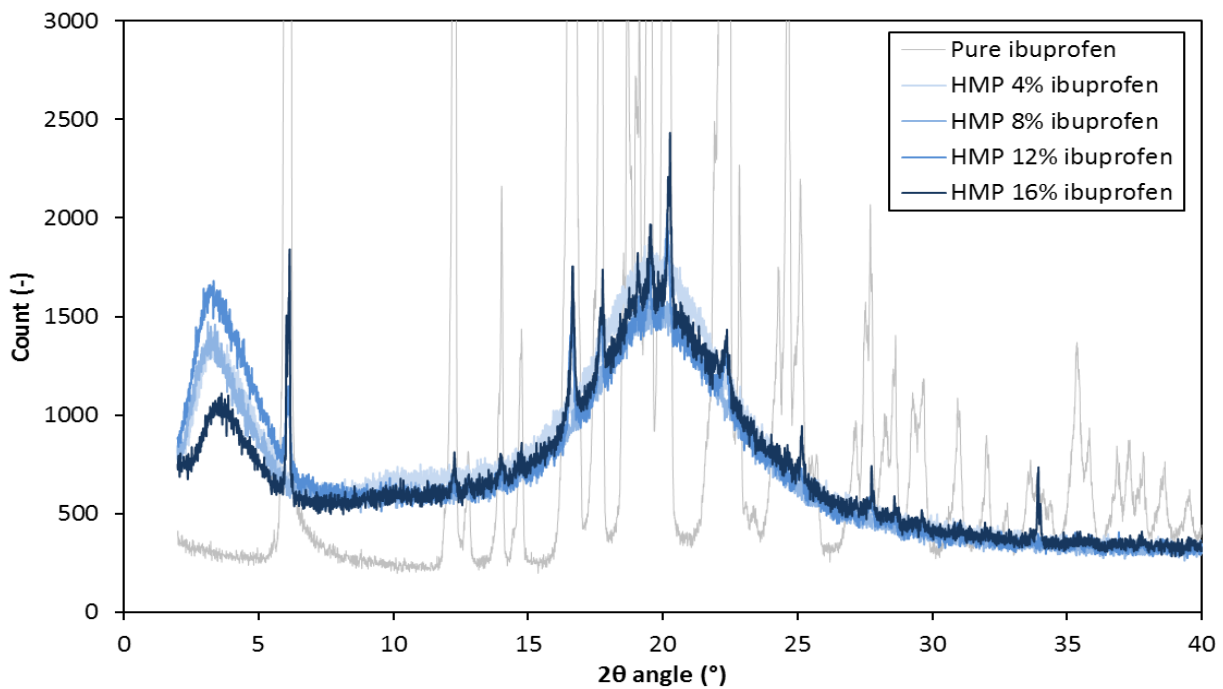


Fig. 2. Diffractogramme de l'ibuprofène pur et des HMPs chargées à différents taux.

Les cinétiques de libération effectuées (Figure 3) retracent, en pourcentage d'ibuprofène libéré, les profils de chacun des échantillons et mettent en évidence une tendance assez claire : plus la particule est chargée en PA, plus ce dernier est libéré rapidement. En effet, après 15 min, 35 % sont libérés à partir des HMP chargées à 4 wt.%, contre 45 % à partir des HMP chargées à 8 wt.%, 55 % à partir des HMP chargées à 12 wt.%, et enfin 70 % à partir des HMP chargées à 16 wt.%. Ces résultats semblent en adéquation avec la présence excessive d'ibuprofène en surface pour les fortes teneurs. Ainsi, plus la microparticule est chargée en ibuprofène, plus celui-ci a tendance à se placer en périphérie, et plus il se recristallise. L'ibuprofène superficiel est alors plus facilement accessible et se dissout rapidement dans le milieu de libération car dans le cas particulier de l'ibuprofène (température de fusion cristalline assez basse : 76°C), les liaisons cristallines n'ont que peu d'influence sur sa vitesse dissolution, et par conséquent sur

sa cinétique de libération. Par contre, une influence de l'état cristallin serait attendue avec des PA à forte énergie de liaison cristalline (i.e. point de fusion proche ou supérieur à 200°C).³

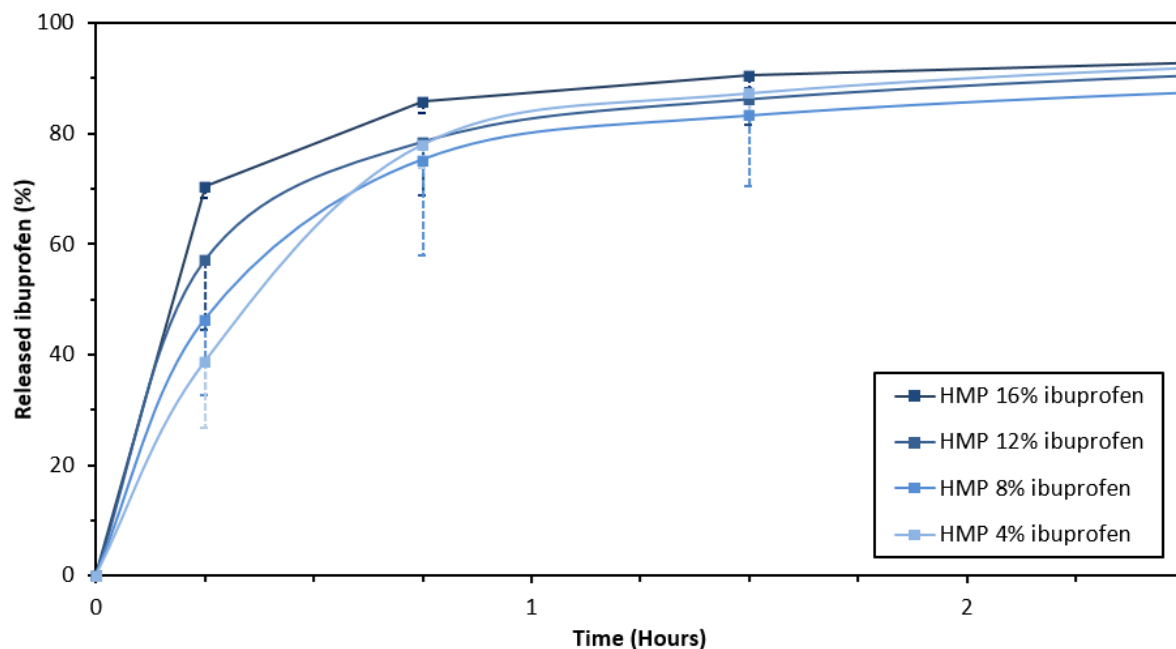


Fig. 3. Tests de libération *in vitro* de l'ibuprofène dans un milieu intestinal simulé à partir des HMPs chargées à différents taux. n=3, et seules les barres d'erreur négatives sont mentionnées pour plus de clarté.


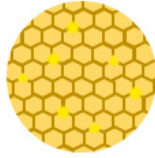
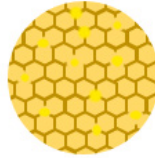
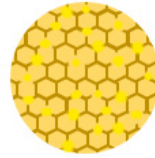
3. Essais de surcondensation des microparticules hybrides

Dans l'article précédent, nous avons conclu que quel que soit le ratio de silylation sélectionné pour la synthèse d'HMP (0,4 ; 0,6 ; 0,8 ou 1,05), les libérations du PA dans un milieu à faible tension de surface ($42 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) avaient lieu en plus ou moins 3 heures. Pourtant, les coefficients de diffusion extraits via modélisation mathématique variaient du simple ($1,44\cdot 10^{-9} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pour les HMP 1,05) au septuple ($7,28\cdot 10^{-9} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pour les HMP 0,4), soulignant ainsi une variabilité évidente des propriétés de rétention du PA par chacun des matériaux synthétisés. Cette divergence entre les propriétés des matériaux et leur cinétique de libération de PA peut être expliquée par la taille micrométrique des HMPs : les dimensions réduites du matériau font que le cœur de la particule est proche de sa surface, et par conséquent la différence lors des cinétiques de libération n'est plus perceptible.

La ^{29}Si -RMN a permis l'étude de la structure du réseau en révélant la présence de fractions liquides d'huile silylée à l'intérieur des particules, d'autant plus importantes (45 %) que le taux de silylation était élevé (ICO 1,05). L'analyse microscopique sur des coupes d'HMP ayant révélé des structures matricielles (absence de structure « cœur-couronne »), les fractions liquides ne pouvaient être organisées qu'en nano-domaines uniformément disposés dans les particules. Ce phénomène est en réalité dû à une moindre efficacité de condensation liée à la

présence excessive de groupements alcoxysilane. Les taux de condensation qui reflètent la densité du réseau effectivement condensé par voie sol-gel étaient, quant à eux, assez proches (aux alentours de 75 %). Dès lors, nous avons émis l'hypothèse que l'huile fonctionnalisée liquide « aidait » à la rétention du PA par effet de solvatation et que les libérations sont d'autant plus prolongées que la fraction liquide est importante. L'inconvénient majeur, si l'on souhaite continuer dans cette voie de développement de systèmes à libération prolongée, est que ces HMPs contiennent des monomères résiduels d'ICO encore réactifs qui risqueraient d'interférer *in vivo*.

Tableau 1. Résumé des caractéristiques des HMPs à différents taux de silylation.

Ratio de silylation	0,4	0,6	0,8	1,05
Coefficient de diffusion ($10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$7,28 \pm 0.75$	$4,35 \pm 0.23$	$2,96 \pm 0.18$	$1,44 \pm 0.23$
^{29}Si RMN Pic liquide à 45 ppm (%)	-	1,7	11,4	39,9
Représentation des domaines d'ICO liquides				
Cinétique de libération	Rapide	Assez rapide	Assez lente	Lente

Nous nous sommes alors orientés vers des essais pour augmenter le degré de condensation du matériau en créant des réseaux « surcondensés ». L'idée était d'incorporer dans l'huile fonctionnalisée un composant silylé de petite taille à même de renforcer le réseau et d'augmenter sa densité afin de retenir le PA en s'aidant de contraintes physiques à l'échelle moléculaire. Le candidat idéal était le Tétraethyl Orthosilicate (TEOS), un agent silylé tétrafonctionnel, de faible poids moléculaire ($208 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) et comportant des groupements « éthyles » destinés à protéger les fonctions « silanols » réactives (Figure 4), au même titre que sur l'huile silylée. Théoriquement, la présence d'un même groupement protecteur sur deux précurseurs silylés (l'ICO et le TEOS en l'occurrence) assurerait des cinétiques d'hydrolyse comparables lorsque les conditions de température et de solvatation sont similaires. Cela permettrait ainsi une synchronisation de la réaction de condensation des deux entités et une meilleure homogénéité du réseau formé.

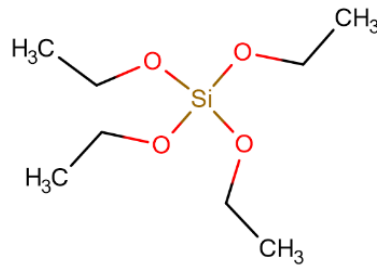


Fig. 4. Représentation chimique du tétraéthyl orthosilicate (TEOS).

Pour cette étude, deux types d'huiles silylées ont été choisis : l'ICO 0,4 et l'ICO 0,8. Le ratio 0,8 a été retenu car il permet l'obtention de particules dont le lyophilisat présente des qualités d'écoulement remarquables ainsi que les résultats les plus satisfaisants en terme de viabilité cellulaire. Le ratio 0,4, quant à lui, a été sélectionné car il montre la plus faible fraction d'huile liquide rémanente dans la matrice ; le biais créé par la rétention du PA par solvation de l'huile peut donc être annihilé afin d'estimer avec précision l'apport de la surcondensation au prolongement des libérations. Au ratio de silylation s'ajoutera la notion de ratio de surcondensation : par définition, ce ratio correspond à la quantité de fonctions « silane » apportée par l'agent de surcondensation (le TEOS en l'occurrence) par rapport à la quantité de fonctions apportée par l'huile fonctionnalisée, selon l'équation suivante :

$$\text{Ratio de surcondensation} = \frac{\text{quantité de TEOS} \times 4}{\text{quantité d'huile silylée "x"} \times n (\text{ICO"x"})}$$

$$\text{Avec : } n (\text{ICO } 0,8) = 6,48 \quad \text{et : } \quad n (\text{ICO } 0,4) = 3,24$$

Deux ratios de surcondensation ont été empiriquement sélectionnés : le ratio s0,25 et le s1. Au final, quatre formulations combinatoires ont donc été retenues : 0,4s0,25 ; 0,4s1 ; 0,8s0,25 ; et 0,8s1. Les différentes microparticules ont été synthétisées dans les mêmes conditions précédemment décrites, le TEOS liquide étant simplement mélangé à l'huile silylée dans laquelle l'ibuprofène avait été préalablement dissous à une concentration finale de 4 wt.%.

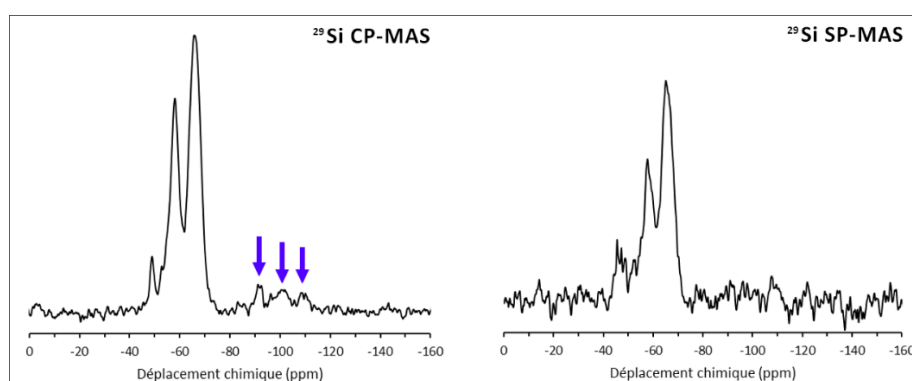
Les rendements de synthèse des HMPs 0,4s1 et 0,4s0,25 (Tableau 2) se sont montrés étonnement faibles (29 % et 20 % respectivement) comparativement aux rendements enregistrés sur les microparticules classiques (76 %). Cette baisse est imputable aux pertes dues à la densité des particules assez proche de celle de l'eau, phénomène qui a rendu leur séparation des eaux de lavages par centrifugation assez difficile. La baisse de rendement de synthèse pour les HMPs 0,8s0,25 et 0,8s1 a été, quant à elle, minime (61 et 62 % contre 70 %).

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des microparticules hybrides surcondensées.

Particule (HMP)	Rendement de synthèse (%)	Taille D[4,3] (μm)	Span	Rendement d'encapsulation brut (%)
0,4	76	55	1,54	102
0,4s0,25	20	81	1.36	91
0,4s1	29	93	1.56	103
0.8	70	58	1,55	107
0,8s0,25	62	121	1.40	92
0,8s1	61	60	1.23	113

La caractérisation des microparticules a permis la mise en évidence d'une relation entre la taille des particules à base d'ICO 0,4 et leurs degrés de surcondensation : plus la particule est surcondensée (HMP 0,4 < HMP 0,4s0,25 < HMP 0,4s1), plus sa taille est importante ($55 \mu\text{m} < 81 \mu\text{m} < 93 \mu\text{m}$). La tendance n'était par contre pas vérifiée pour les microparticules à base d'ICO 0,8 : les HMPs surcondensées à un ratio de 0,25 présentent de loin la plus grande taille moyenne ($121 \mu\text{m}$). Ceci est probablement dû à une organisation particulière de leur matrice (hypothèse confirmée ultérieurement).

D'autre part, la structure hybride a été confirmée par des analyses thermogravimétriques sur chacune des HMPs. Les résidus minéraux après calcination à $800 \text{ }^\circ\text{C}$ étaient d'autant plus importants que le ratio de silylation était élevé et que la particule était surcondensée, la tendance liée à ce dernier phénomène étant davantage visible avec les particules à base d'ICO 0,8 (Figures S.1 et S.2). Par ailleurs, une acquisition de spectres ^{29}Si RMN cross-polarisé ^1H a permis de mettre en évidence la présence d'entités siliciques quaternaires à différents degrés de condensation (flèches bleues sur la Figure 5), signe de la présence de TEOS condensé dans l'échantillon analysé. Une quantification par Single Pulse à angle magique n'était cependant pas possible car les signaux correspondants ne ressortaient pas même après 2 jours d'acquisition des spectres.

**Fig. 5.** Spectres ^{29}Si -RMN acquis sur un échantillon de microparticules hybrides surcondensées.

D'un point de vue pharmaceutique, les quatre formulations présentaient d'excellents rendements bruts d'encapsulation (i.e. ne prenant pas en compte les pertes d'éthanol libéré durant l'hydrolyse des entités silylées – voir l'article précédent pour davantage de détails) variant entre 91 % et 113 %. Les rendements nets, quant à eux, ne pouvaient être calculés de façon fiable en raison des pertes de particules dans les eaux de lavage. Des tests de libération de l'ibuprofène dans un milieu simulé intestinal ont ensuite été effectués. Les figures 6 et 7 retracent la quantité d'ibuprofène libérée au cours du temps à partir des particules à base d'ICO 0,4 et 0,8 respectivement.

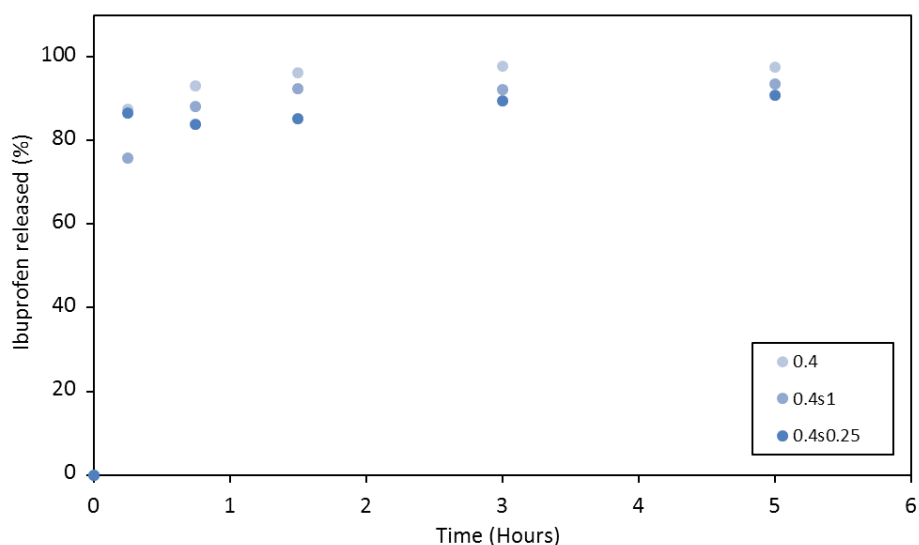


Fig. 6. Libération de l'Ibuprofène à partir des HMPs à base d'ICO 0,4 dans un milieu intestinal simulé.

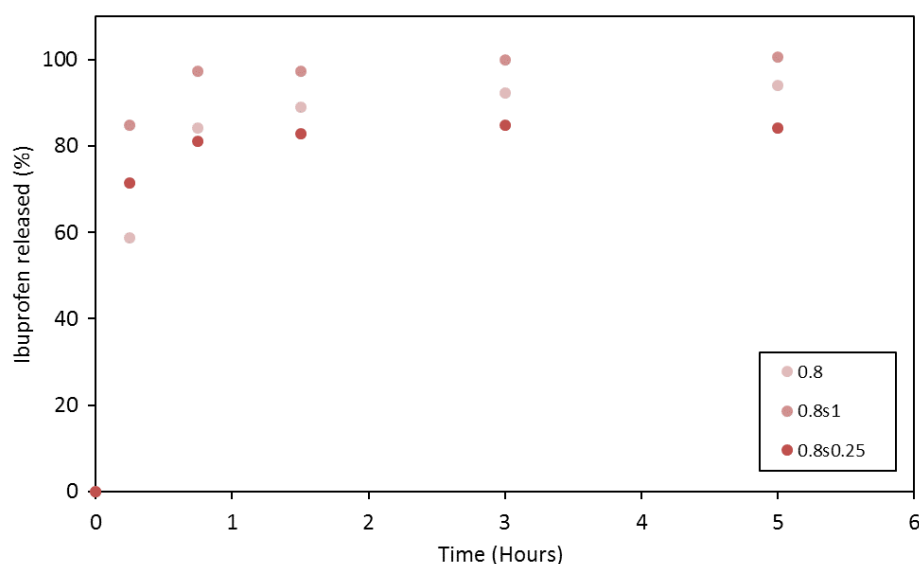


Fig. 7. Libération de l'Ibuprofène à partir des HMPs à base d'ICO 0,8 dans un milieu intestinal simulé.

Les cinétiques de libération étaient très rapides concernant les HMPs 0,4s0,25 et 0,4s1 où 80 % de l'ibuprofène environ a été libéré après 15 min, et la totalité après 3 h. De ce fait, aucune

différence significative des cinétiques de libération à partir des microparticules à base d'ICO 0,4 n'a pu être mise en évidence. Concernant les microparticules à base d'ICO 0,8, on observe une accélération des cinétiques en lien avec la surcondensation au ratio 0,8s1 (100 % d'ibuprofène libéré après 1 h), ceci n'allant pas dans le sens voulu de la prolongation des libérations. Néanmoins, il est utile de noter que les HMP 0,8s0,25 n'ont pas libéré la totalité de leur contenu en ibuprofène et qu'*a priori* 20 % serait piégé dans la matrice. Pour essayer de comprendre l'organisation structurale de ces dernières, elles ont été analysées par EDX et les résultats présentés en Figure 8 montrent la présence d'amas de TEOS à forte teneur en silicium à côté des microparticules. Les amas de TEOS, vides en ibuprofène, ont induit un effet de « dilution » sur les microparticules chargées, ce qui explique la surestimation du contenu réel de ces dernières ; elles avaient donc libéré la totalité du contenu initial.

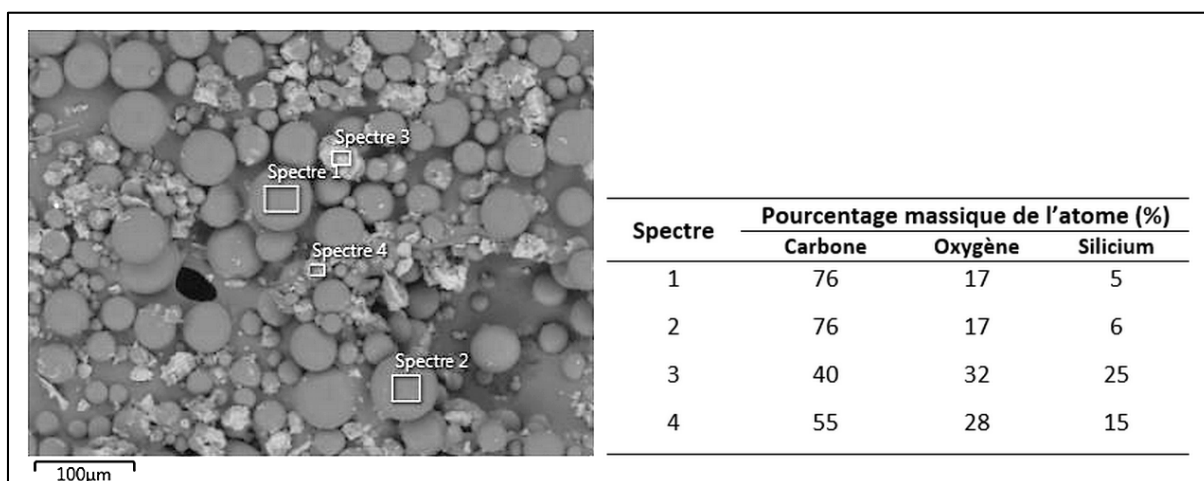


Fig. 8. Spectres EDX des HMP 0,8s0,25.

En conclusion, nous avons donc essayé de « surcondenser » le réseau des HMPs par adjonction de TEOS dans le but de ralentir les cinétiques de libération d'ibuprofène. Les rendements de synthèse des nouvelles microparticules surcondensées étaient diminués. Aussi, le TEOS a perturbé la formation des microparticules, et s'est notamment séparé de l'huile silylée pour former des amas isolés ou agrégés en surface des microparticules conduisant à l'augmentation de la taille de ces dernières. Dans ces conditions, la présence de TEOS comme agent de surcondensation n'avait aucune répercussion significative sur les cinétiques de libération. Par ce fait, la piste de la « surcondensation » du réseau des microparticules a été abandonnée.

4. Essais de synthèse d'une huile de ricin « supersolubilisante »

Les systèmes à base de lipides pour la libération de PA (LBDDS) sont, comme rapporté précédemment, une solution de choix pour la formulation des PA peu hydrosolubles, qui représentent plus de 70 % des PA nouvellement développés dans l'industrie pharmaceutique.

L'atout majeur de ces systèmes réside dans la capacité intrinsèque qu'ont les lipides à solubiliser ces PA et à en assurer la libération *in vivo*.

L'huile de ricin, comme toutes les huiles végétales utilisées en galénique (ex. huiles de coco, de palme, d'olive et de sésame) présente des propriétés intéressantes dans ce sens. Modifiée au laboratoire par greffage d'entités silylées afin de lui conférer des propriétés de réticulation, cette huile a conservé ses propriétés solubilisantes vis-à-vis des PA peu hydrosolubles : l'ibuprofène a pu y être dissous à hauteur de 13,2 wt.%. L'estradiol ainsi que le JMV 5038 (agent anticancéreux contre le mélanome) quant à eux, ont pu être solubilisés à des teneurs de 4 wt.% et de 2 wt.%, respectivement (Tableau 3).

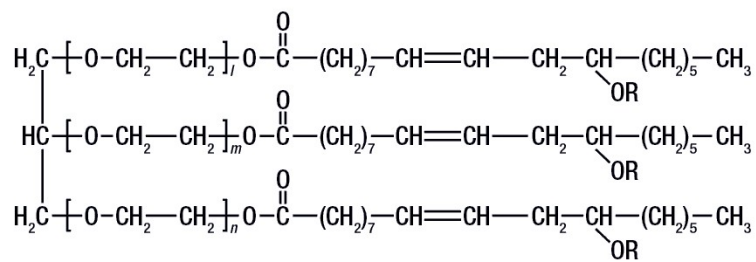
Tableau 3. Solubilité des principes actifs étudiés dans l'huile de ricin et dans l'eau.

Solubilité dans :	ibuprofène	estradiol	JMV5038
Huile de ricin	132 mg·mL ⁻¹	40 mg·mL ⁻¹	20 mg·mL ⁻¹
Eau	0,021 mg·mL ⁻¹	0,0032 mg·mL ⁻¹	0,0054 mg·mL ⁻¹

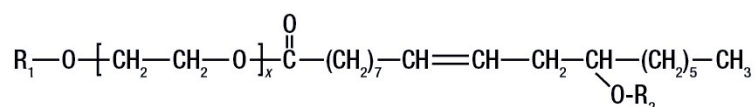
Afin de pouvoir augmenter le ratio $PA/Huile\ silylée$, et donc formuler des HMPs chargées à de plus forts taux en PA, nous nous sommes intéressés aux propriétés solubilisantes d'un composé dérivé de l'huile de ricin : le Polyéthylène glycol-35 Castor oil (PCO), appelé également Polyoxyl 35 Castor oil (US.Ph) ou ricinoleate de macrogolglycérol (Ph.Eu). Il est obtenu par réaction entre 1 équivalent d'huile de ricin vierge et 35 équivalents d'éthylène glycol et est composé majoritairement de triricinoléates de glycérol PEGylé et de ricinoléates de PEG (Figure 9).

Le PCO est un surfactant non ionique à propriétés solubilisantes et émulsifiantes (HLB compris entre 12 et 14), notamment utilisé pour la formulation parentérale de différents PA sensibles et peu hydrosolubles (ex. Miconazole, Hexetidine, Clotrimazole, Benzocaïne, Vits. A, D E et K). Un PCO de grade pharmaceutique (Kolliphor[®] ELP de BASF) a été utilisé pour l'étude.

L'idée était de silyler le PCO sur ses hydroxyles libres rémanents et d'ajouter par la suite le PCO silylé dans une certaine proportion à l'ICO afin d'en améliorer les propriétés solubilisantes. Au final, le PCO devrait réticuler par procédé sol-gel afin de faire partie intégrante du réseau des microparticules hybrides.



(A) $l + m + n = 35$ (nominal value); R = H or polyethylene glycol residue



(B) $x = 0 \dots 40$; R₁ = H or ricinoleate, R₂ = H or polyethylene glycol / polyethylene glycol ricinoelate

Fig. 9. Structures chimiques des composants majoritaires (A et B) du polyéthylène glycol-35 Castor oil (PCO). Adapté à partir de la réf. 4.

4.1. Caractérisation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO)

Des analyses RMN ont été effectuées sur le PCO initial afin de vérifier la structure du composé : 80 % d'hydroxyles libres (et donc fonctionnalisables) étaient annoncés par le fournisseur.⁵

Un spectre HSQC ¹H - ¹³C (Heteronuclear Single Quantum Correlation - Figure 10) a été acquis sur le produit. L'HSQC ¹H - ¹³C est une technique de RMN à deux dimensions qui permet d'associer un carbone protoné aux hydrogènes qu'il porte. Elle a mis en évidence la présence de 3 types de carbones protonés et oxygénés (CH-O-):

- CH à 4,81 ppm (H) / 72,8 ppm (C)
- CH à 3,58 ppm (H) / 77,6 ppm (C)
- CH à 3,22 ppm (H) / 79,4 ppm (C)

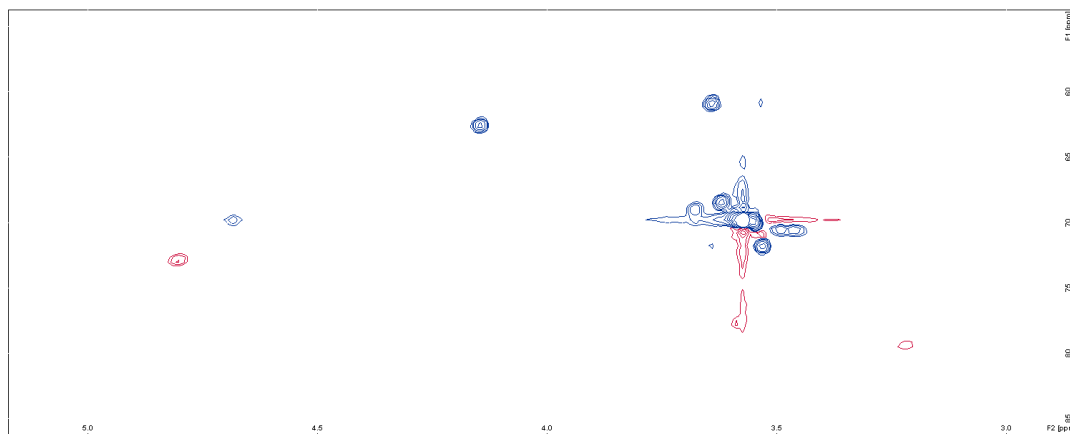


Fig. 10. Spectre RMN HSQC ¹H - ¹³C du PCO : zoom sur les >CH-O (taches rouges) et -CH₂-O (taches bleues).

Deux analyses RMN complémentaires ont été effectuées afin d'élucider l'organisation de la structure autour des CH-O- cités plus haut. Ainsi, deux spectres supplémentaires ont été acquis :

- Un spectre HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), qui met en évidence les corrélations entre les carbones et les protons environnants distants de deux ou trois liaisons ;
- Un spectre COSY ^1H (COrrrelation SpectroscopY), qui met en évidence les interactions proton-proton distants de 3 liaisons au plus.

On constate, que ce soit sur le spectre COSY ou celui de la HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (Figure 11) que les CH à 4.81 et 3.22 ppm ont les mêmes corrélations avec la chaîne alkyle du PCO ; ces 2 CH sont proches du système éthylénique en témoigne la corrélation avec le carbone à 125 ppm. La différence entre eux réside dans le fait que le massif à 4,81 ppm corréle avec un carbone quaternaire à 174 ppm, zone typique des carbonyles, alors que le massif à 3,22 ppm ne présente aucune corrélation dans cette zone. Par conséquent, le massif à 3,22 ppm correspond selon notre assignation au $>\text{CH-OH}$ libres des ricinoleyls du PCO, le CH à 4,81 à un produit dérivé de la forme CH-O-C(=O)-R et le massif à 3,58 ppm est le CH-O du glycérol.

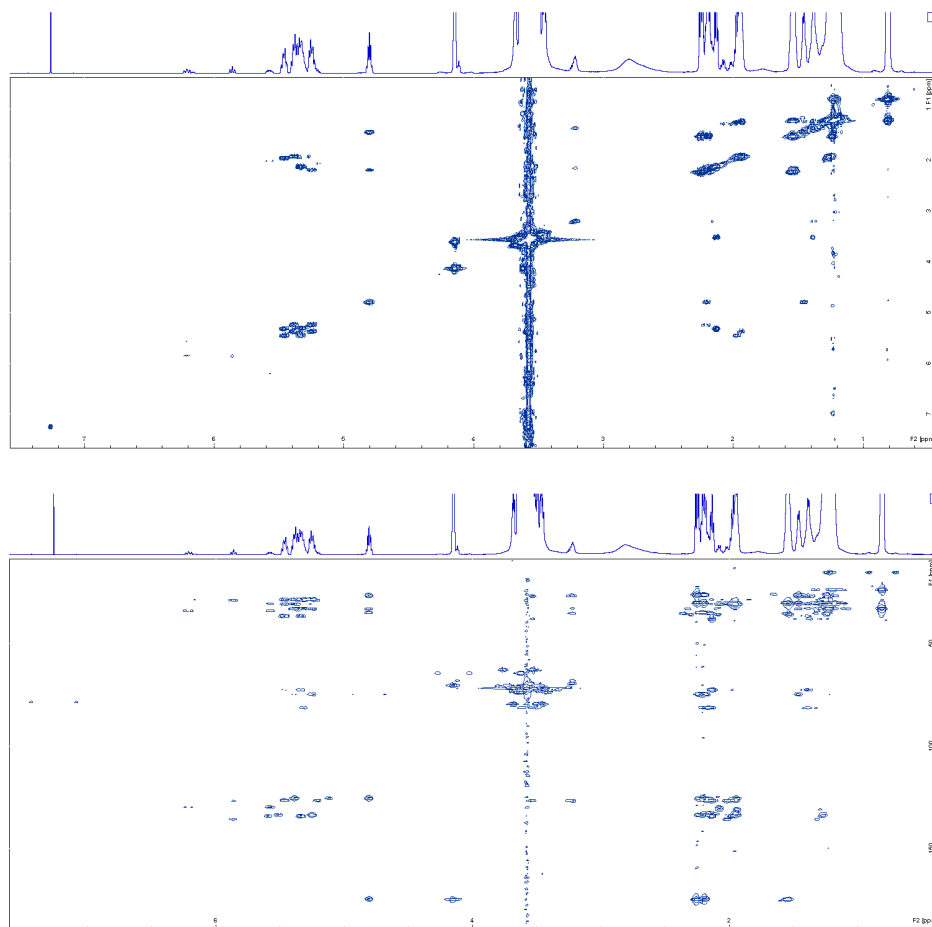


Fig. 11. Spectres RMN 2D COSY (en haut) et HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (en bas) du PCO.

Compte tenu des intégrations du spectre RMN ^1H (Figure S1), le PCO ne présente que 44 % de sites OH libres contrairement aux 80 % annoncés par le fournisseur.⁵ Nous avons alors émis l'hypothèse que des résidus d'éthylène glycols soient venus réagir avec les hydroxyles en grand nombre de l'huile de ricin, lors de la synthèse. Les contacts établis avec le fournisseur n'ont pas pu nous fournir davantage de détails concernant les analyses spectroscopiques du produit.

4.2. Fonctionnalisation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO)

Une silylation classique du PCO a été entreprise (Figure 12) afin qu'il puisse intégrer par procédé sol-gel et de façon covalente le réseau des HMPs. Brièvement, un mélange PCO + l'IPTES sans solvant ni catalyseur a été mis à chauffer à 70°C pendant 72 h. Deux ratios ont été choisis : un ratio 0,8 se basant sur les données rapportées par le fournisseur (80 % d'hydroxyles libres) et un ratio 0,4 visant une silylation totale des hydroxyles libres mis en évidence par les analyses RMN présentées ci-dessus (i.e. 44 %).

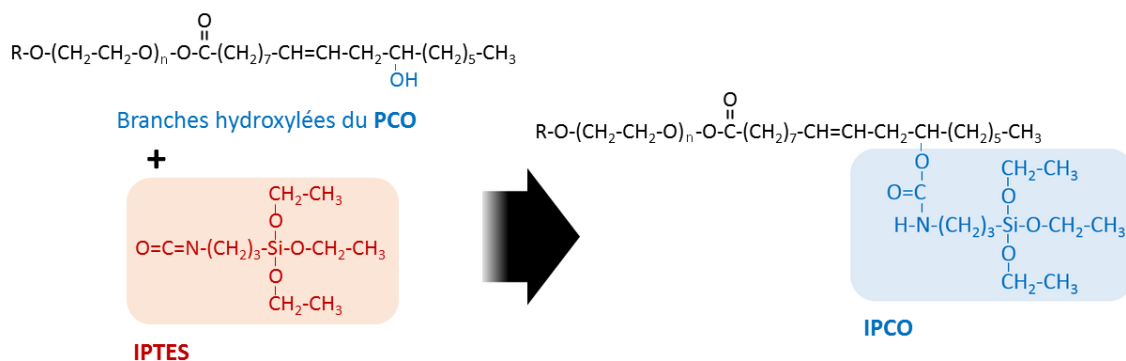


Fig. 12. Mécanisme réactionnel de la silylation du polyéthylène glycol-35 castor oil (PCO).

4.2.1. Fonctionnalisation du PCO à un ratio 0,8

Concernant le PCO silylé à un ratio 0,8 (IPCO 0,8), il présente 4 types de CH-O en RMN (Figure 13). On retrouve les 3 mêmes signaux cités précédemment ainsi qu'un nouveau signal à 4,58 / 73,4 ppm.

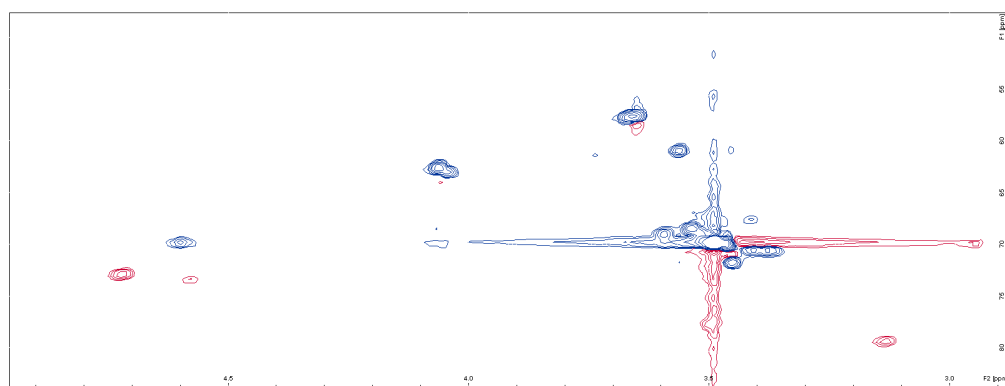


Fig. 13. Spectre RMN HSQC ^1H - ^{13}C de l'IPCO 0,8 : zoom sur les $>\text{CH}-\text{O}$ (taches rouges) et $-\text{CH}_2-\text{O}$ (taches bleues).

L'HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ montre une corrélation entre ce signal à 4,58 ppm et un carbone éthylénique ainsi qu'avec un carbone à 155 ppm, typique d'un carbonyle du type $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ (liaison uréthane). Aussi, ce dernier présente des corrélations avec des ^1H de l'IPTES. Ceci démontre qu'il s'agit d'un greffage de l'IPTES sur le PCO. En outre, la formation de la liaison uréthane a été confirmée par spectrométrie infrarouge (IR-ATR) ; les résultats sont présentés dans la figure S.4

Par intégration des signaux en RMN ^1H (Figure S.5), nous avons estimé à 30 % la proportion d'hydroxyles libres et à 15 % celle de liaison uréthane formée, ce qui équivaut à un **rendement de silylation* de 18 %** (i.e. rapport entre la proportion effectivement silylée et le taux de silylation théoriquement visé).

4.2.2. Fonctionnalisation du PCO à un ratio 0,4

S'agissant du PCO silylé à un ratio 0,4 (IPCO 0,4), les mêmes signaux HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ sont retrouvés. Après intégration des signaux en RMN ^1H (Figure S.6), nous avons estimé à 25 % la proportion d'hydroxyles libres et à 19 % celle de liaison uréthane formée, ce qui équivaut à un **rendement de silylation* de 47 %**.

Les quantités restantes d'IPTES qui ne s'étaient pas greffées ont néanmoins perdu leurs fonctions isocyanate par dimérisation (disparition du pic à 120 ppm sur le spectre ^{13}C au profit d'un pic à 157 ppm, et disparition totale du signal IR à 2270 cm^{-1} correspondant à l'isocyanate).

4.3. Caractérisation du polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPCO)

Pour la suite de l'étude, seul l'IPCO 0,4 a été sélectionné, car il présente un taux de silylation effectif (19 %) supérieur à celui de l'IPCO 0,8 (15 %), avec moins de réactif rémanent dans le produit final. Deux caractérisations physicochimiques ont été entreprises sur l'IPCO 0,4 : la détermination de sa concentration micellaire critique (CMC) et l'évaluation de sa capacité à améliorer la solubilité de l'ibuprofène dans l'huile de ricin silylée.

4.3.1. Détermination de la CMC de l'IPCO 0,4

La tension superficielle de solutions à des concentrations croissantes en PCO et en IPCO 0,4 a été mesurée par la technique de mesure à la lame de Wilhelmy, raccordée à un tensiomètre Kruss K100. La retranscription des points sur le graphe en Figure 14 a ensuite permis de déduire une CMC de $2 \cdot 10^{-3}\text{ wt.}\%$ pour l'IPCO 0,4, similaire à celle du PCO. Néanmoins, le pouvoir

* Rendement de silylation = $\frac{\text{pourcentage de liaisons urethane formées}}{\text{pourcentage de silylation théorique}}$

tensioactif de l'IPCO 0,4 est plus prononcé vu qu'un écart de $4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (36 contre $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) est enregistré sur le plateau ($C > \text{CMC}$) comparativement au PCO.

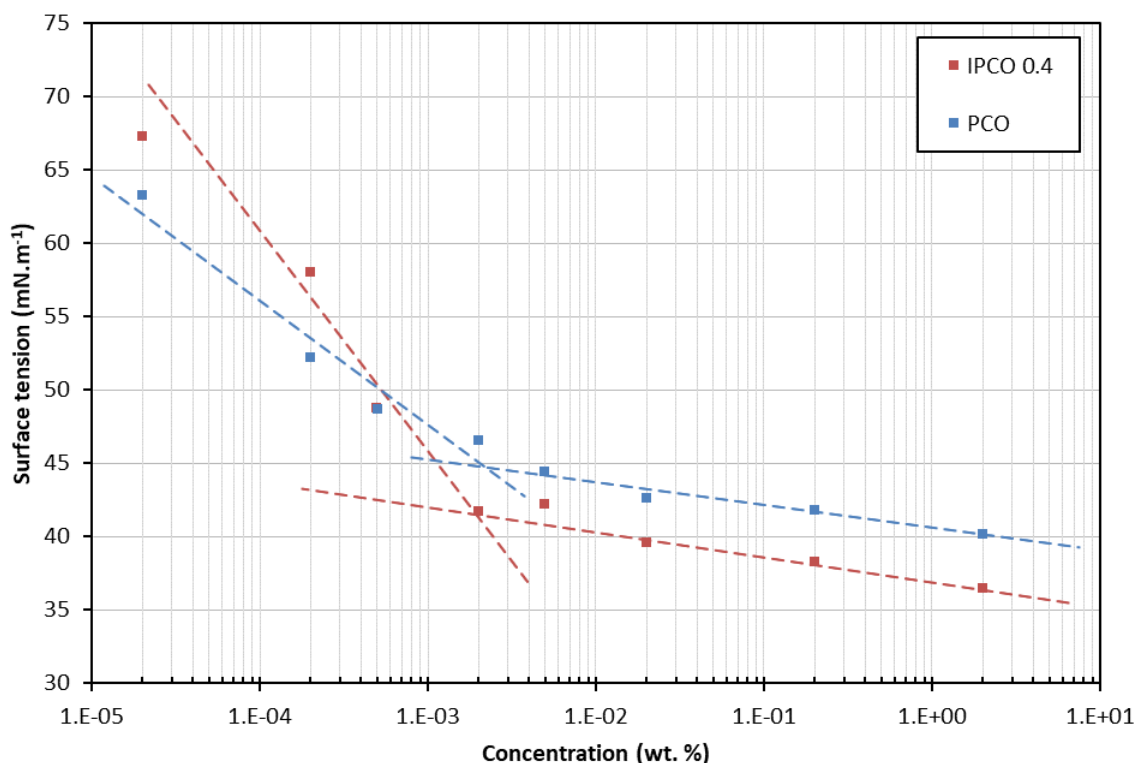


Fig. 14. Détermination expérimentale de la concentration micellaire critique du PCO et de l'IPCO 0,4 à 25°C.

4.3.2. Détermination de la capacité de l'IPCO 0,4 à sursolubiliser l'ibuprofène dans l'ICO 0,8

Dans le but de déterminer l'influence de l'IPCO sur la solubilisation des PA dans l'huile silylée, des concentrations croissantes en IPCO 0,4 ont été ajoutées à des solutions saturées d'ibuprofène dans de l'ICO 0,8 ($300 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Les solutions ont été laissées sous agitation magnétique pendant 24h, puis centrifugées afin de séparer la solution huileuse de PA des cristaux non dissous. Une quantité déterminée de surnageant a ensuite été reprise dans du méthanol, puis dosée en HPLC. Les résultats sont présentés dans le tableau et le graphe ci-dessous.

Tableau 4. Tests de dissolution de l'ibuprofène dans l'ICO 0,8, en présence d'IPCO 0,4.

N°	Composition de la formulation (%)			Taux solubilisé (wt.%)
	ICO 0,8	IPCO 0,4	ibuprofène	
S1	70	-	30	13,28
S2	69	1	30	14,05
S3	65	5	30	14,44
S4	60	10	30	15,57
S5	45	25	30	16,59

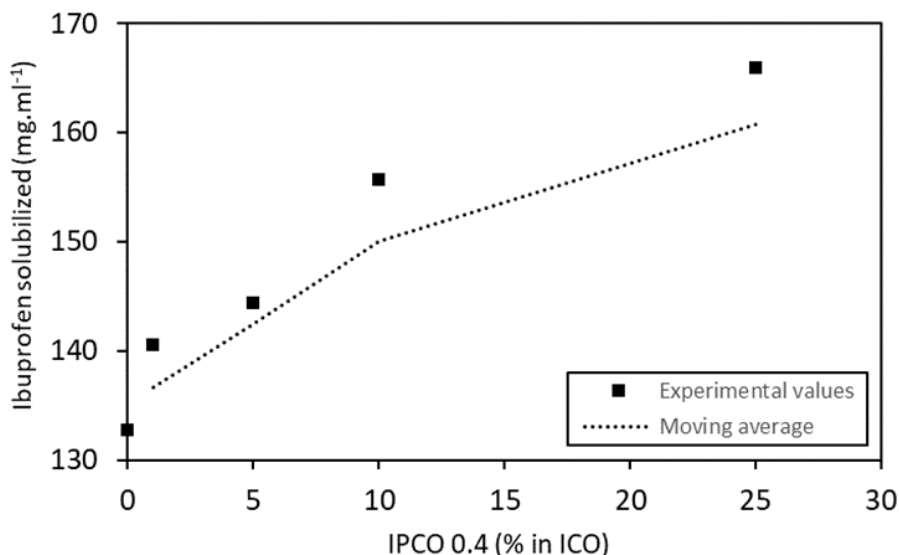


Fig. 15. Solubilisation de l'ibuprofène en fonction de la quantité d'IPCO 0,4 ajoutée.

En l'absence d'IPCO 0,4, la solubilité maximale de l'ibuprofène dans l'ICO 0,8 est de 132,8 mg·ml⁻¹. L'ajout d'IPCO 0,4 améliore cette valeur progressivement d'environ 2 mg·ml⁻¹ d'ibuprofène solubilisé par 1 % d'IPCO 0,4 ajouté, jusqu'à une valeur de 155,7 mg·ml⁻¹ pour 10 % d'IPCO 0,4 ajouté. Au-delà, l'efficacité de solubilisation apportée par l'IPCO tend à baisser. Ainsi, pour 25 % d'IPCO 0,4 ajoutées, seulement 165,9 mg·ml⁻¹ ont été solubilisées. L'amélioration de la solubilité est toutefois moindre que celle constatée en milieu aqueux et rapportée dans la littérature⁴ : par exemple l'acétate de vitamine E, quasiment insoluble dans de l'eau pure (< 1 mg·ml⁻¹), est solubilisé à 50 mg·ml⁻¹ en présence de 15 % de PCO (3,3 mg·ml⁻¹ solubilisé par 1% de PCO ajouté) et à plus de 150 mg·ml⁻¹ quand la proportion de PCO est augmentée à 25 % (10 mg·ml⁻¹ solubilisé par 1 % de PCO ajouté). Cette amélioration importante de la solubilité en milieu aqueux est due principalement à la formation de micelles de grande taille, permise par les longueurs importantes des ricinoleyls et des chaînes de PEG. En milieu huileux parcontre, le PCO (ou son homologue silylé IPCO) est soit solubilisé, soit organisé en micelles inverses (i.e. les parties hydrophiles vers l'intérieur des micelles). En conséquence, il est incapable de solvater convenablement les PA peu hydrosolubles. Toutefois et en dépit de ce résultat décevant, nous avons jugé bon de tester l'influence de l'IPCO sur la formation des microparticules hybrides.

4.4. Formulation du polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPCO)

Trois formulations à différentes proportions avec de l'ICO 0,8 ont été étudiées (Tableau 5).

Tableau 5. Composition des formulations étudiées comportant de l'IPCO 0,4.

Formulation	Taux incorporé (%)	
	ICO 0,8	IPCO 0,4
A	90	10
B	75	25
C	50	50

Dans les trois formulations, l'huile et le tensioactif silylés ont formé un mélange homogène et aucune anomalie n'était à signaler durant le procédé. Après 10 jours, nous avons tenté de récupérer les particules mais les formulations ont présenté d'emblée des surnageants lactescents lors des lavages dus à la présence d'IPCO. Sachant que la réaction sol-gel est plutôt lente, nous avons émis l'hypothèse que l'IPCO « s'échappait » de la phase huileuse après émulsification, préférant une adsorption à l'interface eau/gouttelettes d'huile et limitant ainsi son intégration de façon covalente au réseau hybride. Sa CMC étant basse ($2 \cdot 10^{-3}$ wt.%), l'IPCO forme alors des micelles en phase aqueuse, et ces dernières sont par la suite perdues dans l'eau de lavage tout en opacifiant son aspect. Au final très peu de microparticules formées ont été récupérées, pas suffisamment pour effectuer des analyses. Un protocole de séparation différent (ex. filtration) devra être mis en place.

En conséquence, la piste de la « sursolubilisation » à l'aide de l'IPCO a été abandonnée, d'une part car l'amélioration de la solubilisation n'était pas si remarquable, et de l'autre car le tensioactif silylé n'a pas pu intégrer le réseau hybride final. Toutefois, il était intéressant d'étudier plus en détail ce tensioactif silylé, en solution micellaire aqueuse. En effet, l'IPCO étant amphiphile et le groupement silylé étant accroché à la partie hydrophobe (i.e. orientée vers le cœur de la micelle), on pourrait s'attendre à des formations « en étoile », comme le démontre la Figure 16, avec :

- Un cœur réticulé et dense pouvant encapsuler des molécules hydrophobes ;
- Une périphérie décorée par les PEG hydrophiles qui lui conféreraient une furtivité dans la circulation générale, à l'image des vecteurs de 2^e génération (cf. chapitre I).

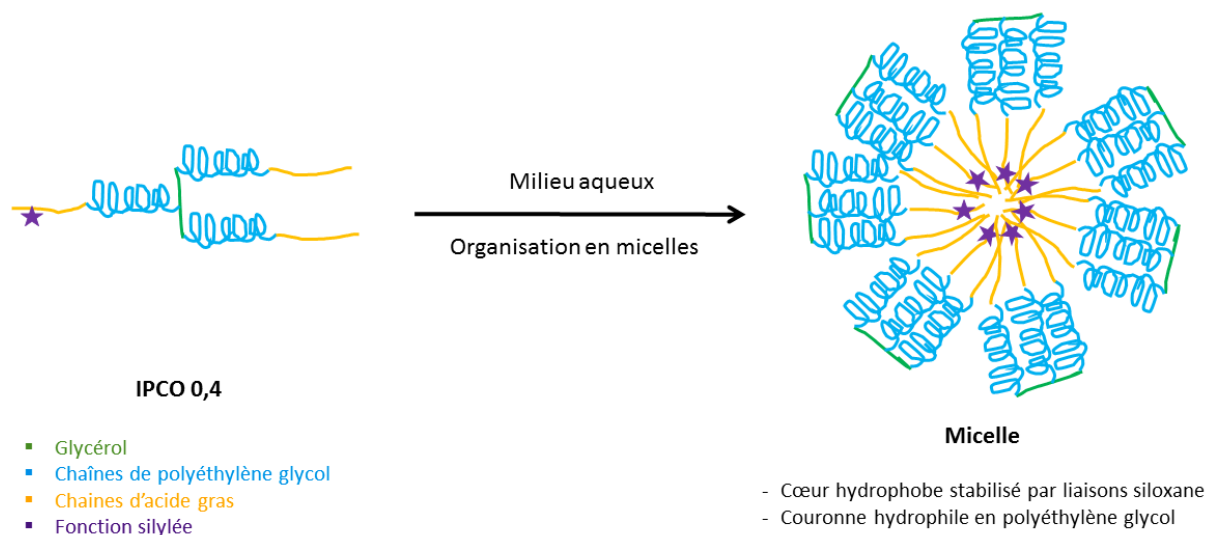


Fig. 16. Schéma de l'organisation micellaire de polyéthylène glycol-35 castor oil silylé (IPC0) en milieu aqueux.

Afin mettre en évidence la réaction sol-gel au sein des micelles d'IPC0, nous nous sommes intéressés à l'évolution de leur taille dans un milieu catalytique (3 % acide paratoluènesulfonique en solution aqueuse, pH = 1) et non catalytique (eau milli-Q, pH = 7) comparativement aux micelles de PCO. Pour ce faire, des solutions micellaires à 1 % de PCO et d'IPC0 ont été préparées dans les milieux précités et laissées pour stabilisation durant 24 h avant mesure par diffusion de la lumière (Nano[®] ZS, Malvern Instruments). Il est à noter que lors d'analyses préliminaires, l'acide paratoluènesulfonique à 3 % a donné des résultats optimaux de catalyse sol-gel sur l'huile de ricin silylée en moins de 6 h (données non présentées).

Dans tous les cas, nous avons observé des tailles de micelle comprises entre 10 et 20 nm (Tableau 6) avec des distributions de taille homogènes (pdi < 0,06). En milieu aqueux non catalytique, une différence notable d'environ 2 nm entre les tailles de micelles formées par le PCO (i.e. 10,35 nm) et celle d'IPC0 (i.e. 12,17 nm) a été observée, sans évolution au bout de 48 h. Cette différence était attendue car l'encombrement stérique créé par les branches silylées de l'IPC0 devait logiquement conduire à une augmentation de la taille des micelles. En milieu catalytique par contre, la présence d'un environnement acide a eu pour effet d'augmenter graduellement la taille des micelles de PCO (15,14 nm après 24 h ; 18,18 nm après 48 h) et d'IPC0 (15,69 nm après 24 h ; 19,39 nm après 48 h). Toutefois, la différence de taille entre micelles de PCO et d'IPC0 (0,5 nm après 24 h ; 1,2 nm après 48 h) était moins marquée qu'en milieu non catalytique, soulignant un encombrement stérique moindre au cœur des micelles d'IPC0. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une libération des éthyles après hydrolyse sol-

gel suivi de la formation des siloxanes durant l'étape de condensation, étapes qui auraient eu lieu durant les premières 24 h. Des analyses complémentaires devront toutefois être effectuées dans ce sens afin d'appuyer notre hypothèse, d'autant plus qu'aucune conclusion ne peut être tirée sur la base de ces résultats quant à la stabilité de ces micelles potentiellement réticulées.

Il est intéressant de signaler enfin qu'au bout de 7 jours, les solutions micellaires de PCO et d'IPCO en milieu catalytique ont pris un aspect opalescent à lactescent, probablement dû à la dénaturation de la structure du tensioactif au pH très acide du milieu. Aussi, des formations solides ont été observées sur les parois du récipient contenant les micelles d'IPCO, cela peut être expliqué par la réticulation des résidus d'agent de silylation (i.e. IPTES) non branchés sur la structure du PCO et présents dans le milieu.

Tableau 6. Taille des micelles de PCO et d'IPCO après 24 h en milieu catalytique et non catalytique.

		En milieu non catalytique		En milieu catalytique	
		PCO	IPCO	PCO	IPCO
Taille : Mean \pm SD en nm (pdi)	24 h	10,35 \pm 0,03 (0,09)	12,17 \pm 0,04 (0,03)	15,14 \pm 0,02 (0,05)	15,69 \pm 0,06 (0,04)
	48 h	10,29 \pm 0,02 (0,07)	12,17 \pm 0,03 (0,04)	18,18 \pm 0,08 (0,08)	19,39 \pm 0,09 (0,07)

5. Suppléments

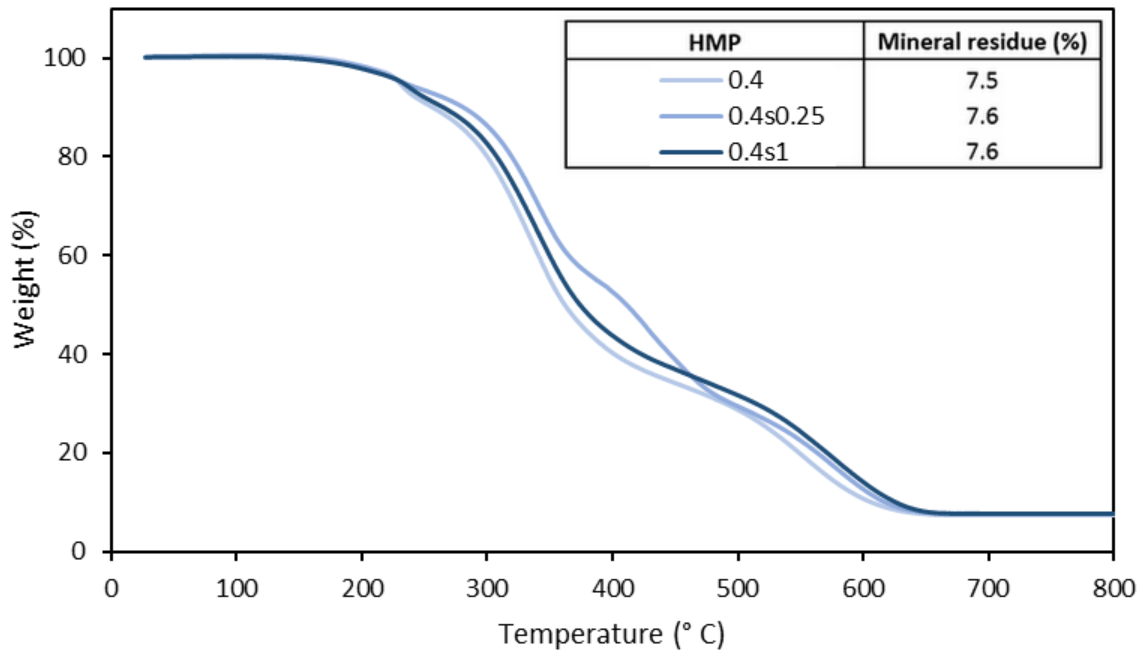


Fig. S.1. Thermogramme des HMPs à base d'ICO 0,4.

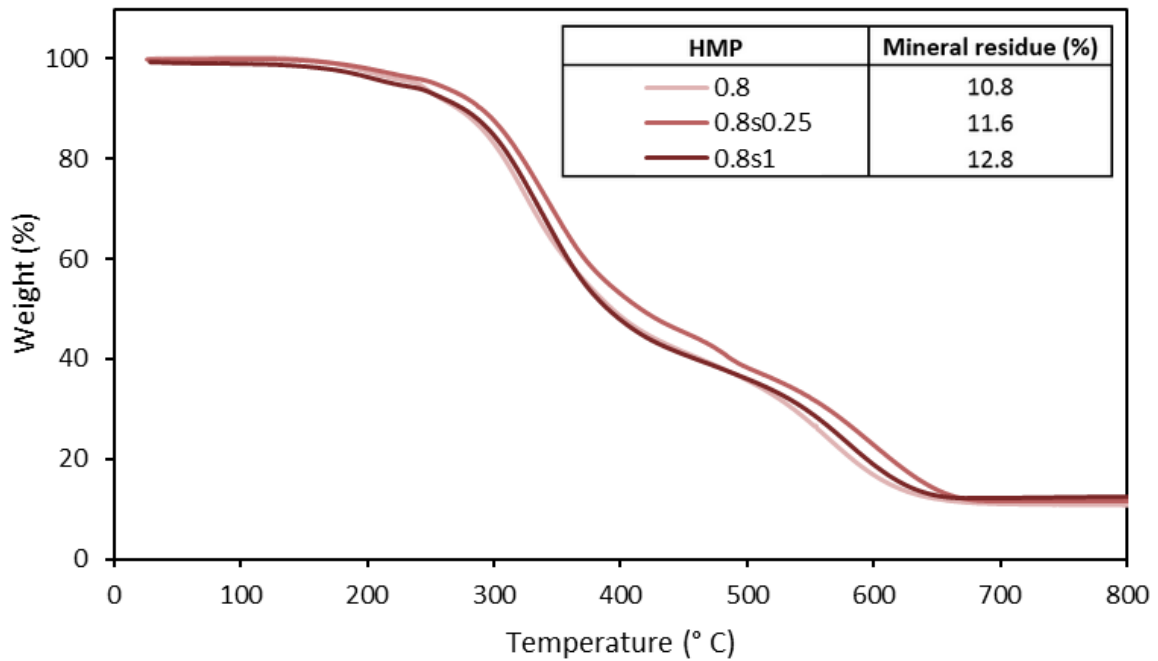


Fig. S.2. Thermogramme des HMPs à base d'ICO 0,8.

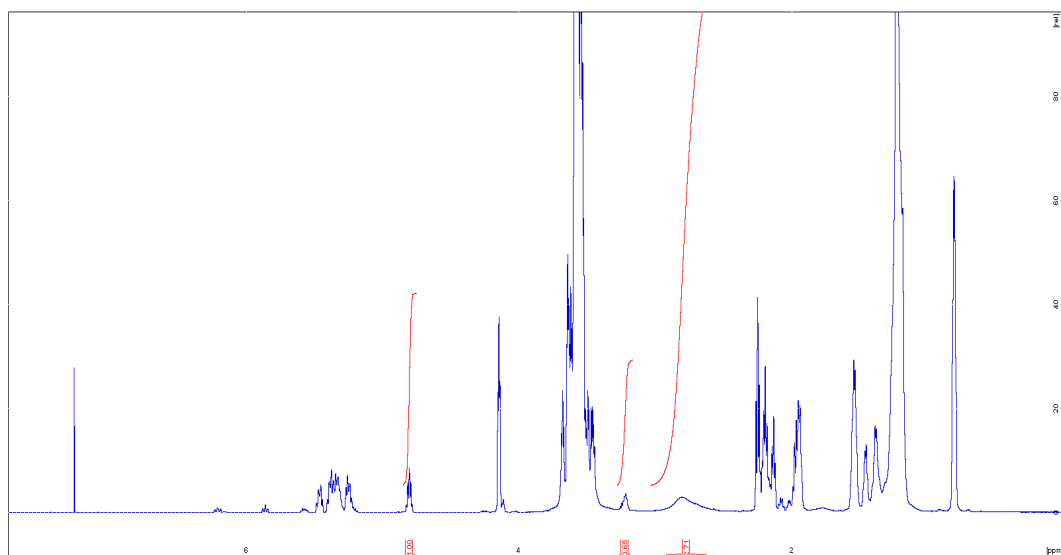


Fig. S.3. Spectre RMN ^1H du PCO.

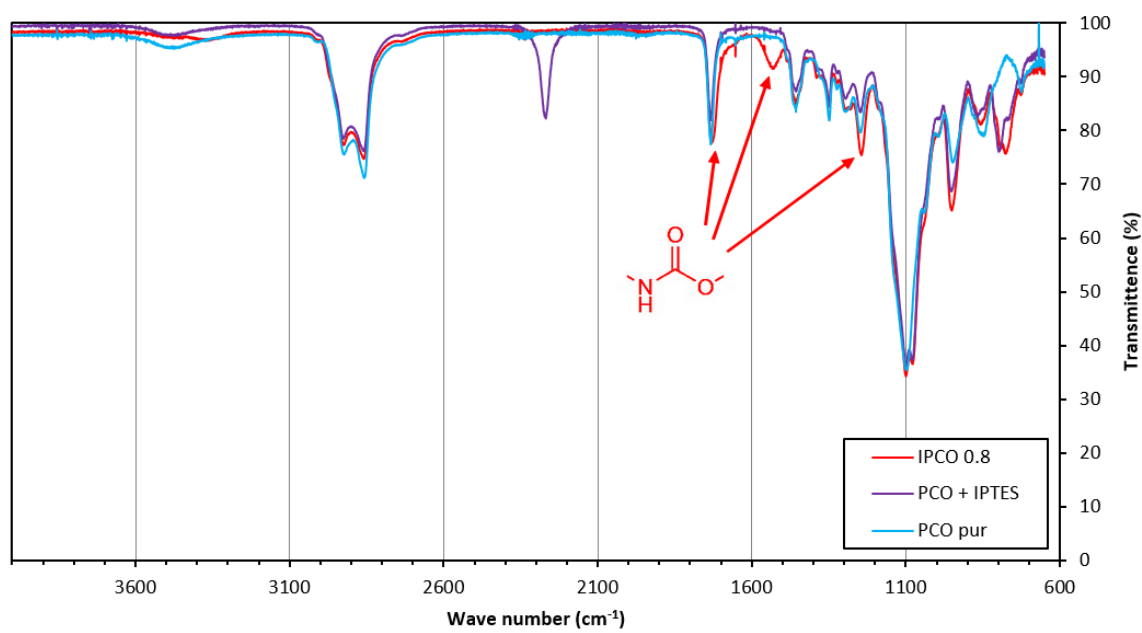


Fig. S.4. Spectre infrarouge du PCO et de l'IPCO 0,8.

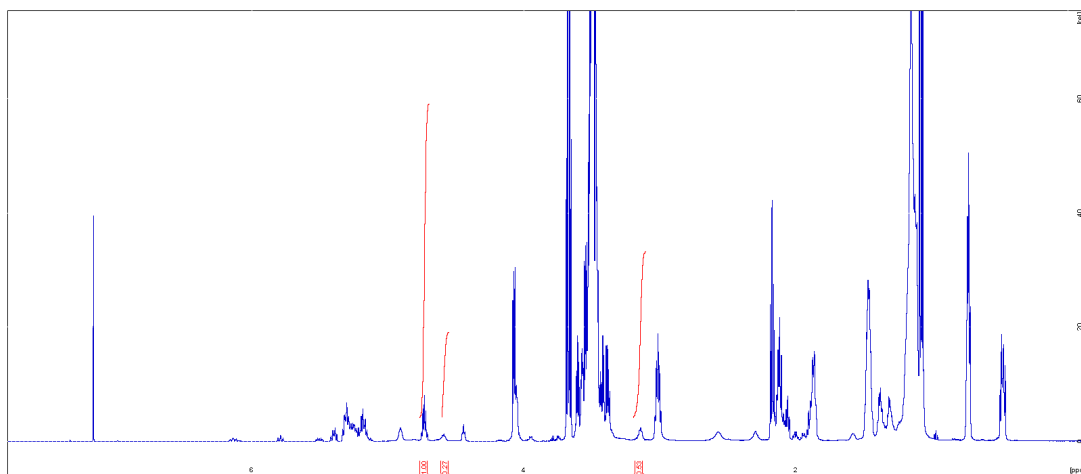


Fig. S.5. Spectre RMN ^1H de l'IPCO 0,8.

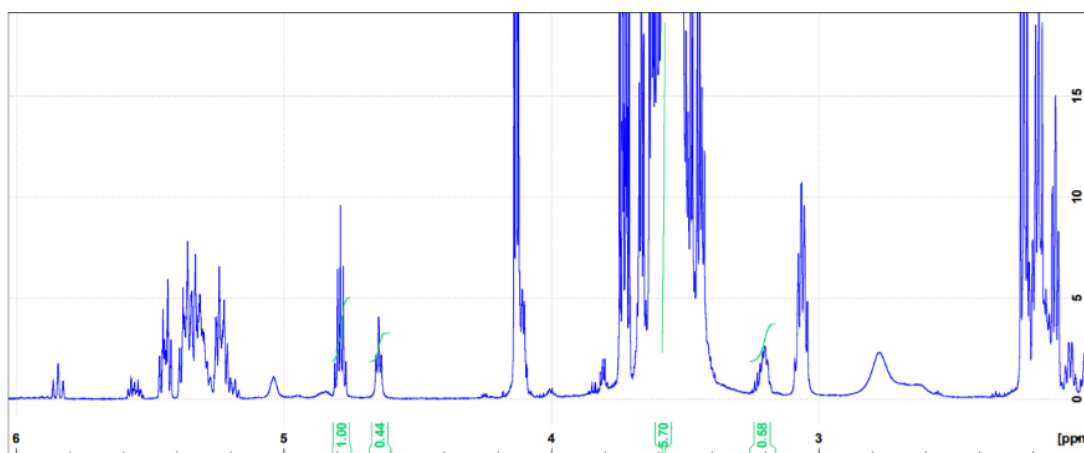


Fig. S.6. Spectre RMN ^1H de l'IPCO 0,4.

6. Références bibliographiques

1. Hancock, B. C. & Parks, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* **17**, 397–404 (2000).
2. Crank, J. *The mathematics of diffusion*. (Clarendon Press, 1975).
3. Edueng, K., Mahlin, D. & Bergström, C. A. S. The Need for Restructuring the Disordered Science of Amorphous Drug Formulations. *Pharm Res* **34**, 1754–1772 (2017).
4. Reintjes, T. Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers: Solubilizer Compendium.
5. BASF. *Technical Informations of Kolliphor ELP*.
<https://products.basf.com/documents/pim;view/en/8952262928853.Technical%20Information.pdf>
(2019).

Chapitre III

Les Microparticules Hybrides

Applications Thérapeutiques

Après avoir optimisé la synthèse des microparticules hybrides huile végétale/silice notamment avec la mise en œuvre d'un catalyseur biocompatible, et après avoir mis en évidence les caractéristiques physico-chimique, pharmaceutique et biologique de ces particules, nous avons entrepris des études visant à démontrer leur intérêt dans des applications thérapeutiques.

Ainsi, ce III^e chapitre, divisé en deux volets rédigés sous forme d'articles scientifiques publiés dans *Journal of Pharmaceutical Sciences* et *International Journal of Pharmaceutics* respectivement, s'intéresse aux applications thérapeutiques potentielles des particules hybrides. Le 1^{er} volet décrit la formulation du JMV5038, un PA développé pour son action cytotoxique contre le mélanome, mais qui présente des soucis de solubilité en milieu aqueux. Ce travail a été mené en collaboration avec le Professeur Nicolas Masurier et son doctorant Yohan Malki de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM). Une étude de préformulation a permis d'identifier les caractéristiques physico-chimiques du JMV5038, avant que sa formulation au sein de particules hybrides submicroniques ne soit développée. Des tests *in vitro* ont été effectués pour mettre en évidence les cinétiques de libération du JMV5038, le maintien de son activité biologique, ainsi que l'innocuité de la formulation développée.

Le second volet de ce chapitre, quant à lui, s'intéresse à la mise en place d'un procédé de microencapsulation « 100 % *green* » ainsi qu'à l'étude de la biocompatibilité *in vivo* des microparticules hybrides obtenues, en collaboration avec les Docteurs Ilaria Basile et Nadir Bettache de l'IBMM. Une nouvelle chimie de silylation a été développée pour s'affranchir de l'utilisation de tout catalyseur durant le procédé de microencapsulation. L'estradiol a été choisi comme PA modèle de la famille des stéroïdes afin d'évaluer le potentiel de ces nouvelles microparticules hybrides. Le but de cette étude est de développer des microparticules hybrides biocompatibles injectables par voie sous-cutanée.

1^{er} volet

***Vegetable Oil-based Hybrid Submicron Particles Loaded with
JMV5038: A Promising Formulation against Melanoma***

Doufène, K., Malki, Y., Vincent, L-A., Cuq, P., Devoisselle, J-M., Masurier, N., and Aubert-Pouëssel, A.

Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020.

DOI: 10.1016/j.xphs.2020.10.019

Summary

1. Introduction	124
2. Material and methods	125
2.1. Material.....	125
2.2. Synthesis of JMV5038 and of its open-ring derivative (ORD)	126
2.3. Preformulation study of JMV5038	127
2.4. Formulation of unloaded and JMV5038-loaded hybrid submicron particles	127
2.5. <i>In vitro</i> release tests of JMV5038 from hybrid submicron particles.....	128
2.6. <i>In vitro</i> activity assays	129
2.7. Cytocompatibility evaluation of hybrid submicron particles.....	130
3. Results and discussion	130
3.1. Physicochemical characterization of JMV5038 and ORD	130
3.2. Formulation of the hybrid submicron particles.....	132
3.3. <i>In vitro</i> release tests on JMV5038-loaded hybrid submicron particles.....	136
3.4. <i>In vitro</i> activity assays	138
3.5. Cytocompatibility assays	139
4. Conclusion	140
5. References	141

Figures and schemes

Fig. 1. Chemical structure of JMV5038 and its open-ring derivative (ORD).....	127
Fig. 2. Experimental set-up of the dialysis device within a PBS/octanol biphasic system under magnetic stirring	129
Fig. 3. Thermogravimetric analysis of JMV5038 and its ORD under nitrogen atmosphere.....	131
Fig. 4. Differential scanning calorimetry analysis of JMV5038 and its ORD under nitrogen atmosphere.....	132

Fig. 5. Optical microscopy observation (on the left) and particle size measurement (on the right) of the HNP suspension..... 133

Fig. 6. UPLC traces of compounds released from HNP formulated in acidic medium **(A)** or from HNP formulated in neutral medium **(B)**, compared to pure JMV5038 **(D)** and ORD **(C)**, at $\lambda = 214$ nm..... 134

Scheme 1. Proposed mechanisms for the formation of ORD and ORALD..... 135

Fig. 7. *In vitro* cumulative release of JMV5038 from HNP in a PBS/octanol biphasic system at 37 °C..... 136

Fig. 8. **(A)** Activity of loaded and unloaded HNP on A375 cells compared to control at four corresponding concentrations. **(B)** Cell viability dose-response curve of A375 cells treated by JMV5038-loaded or unloaded HNP, JMV5038, or ORD; **(C)** Calculated IC₅₀..... 138

Fig. 9. Cell viability of NIH 3T3 exposed to unloaded or JMV5038-loaded HNP..... 139

1. Introduction

Skin cancer is one of the most common cancers in the world with an incidence of 2 %, ¹ and it is one of the most expanding over the last decades with continuously increasing cases mainly due to sunlight repeated exposures and to changes in the thickness of the ozone protective layer, ² Melanoma represents 10 % of the skin cancers, and is by far the deadliest form in the world (60,000 deaths per year) affecting young adults with an average age of 35 years. ³ Indeed, the resistance of melanoma cells to pharmacological treatment constitutes a critical issue on the way of anti-cancer therapy. Various oncogenic mutations were found in 90 % of cutaneous melanomas, ⁴ mainly the activating BRAF mutation (50 % of melanomas). In fact, BRAF is a serine / threonine protein kinase involved in several mechanisms underlying melanomagenesis. Most of these mechanisms are triggered by the deregulated activation of the downstream MAPK / ERK signaling pathway which promote cell proliferation and migration. ⁵ Research carried out on these mechanisms has made it possible to adapt treatments according to the mutations detected. ⁶

Melanoma treatment protocols are based on surgery, chemotherapy and immunotherapy. For over 20 years, dacarbazine was the only chemotherapeutic treatment approved by the US Food and Drug Administration but recently, breakthroughs have been made in the areas of monoclonal antibody immunotherapies and MAPK pathway-targeted therapies (e.g., vemurafenib and dabrafenib). ⁷ Despite these innovations, there are still non-responder patients, and the rapid emergence of drug resistance to initially responsive cancers has globally led to only marginal patient benefit. ⁸ Numerous treatment options emerged over the past decade, most of them aimed to increase efficiency and reduce side effects through therapeutic combination approaches. Other strategies leveraging advances in nanotechnology provided the same benefits. ⁹ Indeed, various nanoparticles were considered either as anti-melanoma agents (e.g., carbon nanotubes, copper and gold nanoparticles) or as drug carriers of anti-melanoma molecules (e.g., lipid nanoparticles, liposomes, nanomemulsions), and they permitted the administration via several routes (e.g., intravenous, intralesional, oral, topical).

In previous studies, we developed new imidazopyridine-fused [1,3]-diazepinones molecules and highlighted their potential as cytotoxic agents against several cancer cell lines, including several melanoma cell lines. ¹⁰⁻¹² The hit of this family, referred to as JMV5038, showed a high efficiency on melanoma cells and no toxicity on fibroblast cells ($IC_{50} > 100 \mu M$). ¹² However, and like most active pharmaceutical ingredients (APIs) in the pipeline, ¹³ JMV5038 exhibited a poor aqueous solubility ($7.75 \mu g \cdot ml^{-1}$ in PBS) and the formulations tested so far, based on the

classical use of hydrophilic surfactants or co-solvents for parenteral administration (data not shown here), have failed.

A common strategy applied in the formulation of poorly water-soluble APIs is the use of lipid-based drug delivery systems. Indeed, these systems have shown their high solubilizing capacities of poorly water-soluble APIs, and their suitability for parenteral administration. Hence, several forms are on the market (e.g. Diprivan[®]: a lipidic emulsion of propofol, Daunoxome[®]: a liposomal formulation of daunorubicin). Besides, innovative lipid-based drug delivery systems in anti-cancer therapies were developed and showed promising early results, such as nanoemulsions of paclitaxel¹⁴ or solid lipid nanoparticles of doxorubicin, idarubicin,¹⁵ paclitaxel¹⁶ and camptothecin.¹⁷ However, these systems often exhibit a limited stability and low loading capacity of very lipophilic APIs, and only few studies were conducted to develop appropriate alternatives.^{18,19} In order to meet these requirements, we propose here an original hybrid drug delivery system that combines advantages of lipid-based systems and of silicon in order to develop a stable, efficient, and versatile dosage form of JMV5038. Indeed, lipid-based systems are well-known for their biocompatibility and their high solubilizing capacity of poorly water-soluble molecules, and silicon provides high structuring capacity as a mineral part of this hybrid system, while being biocompatible. Moreover, sol-gel crosslinking of the mineral part makes possible to obtain amorphous solid dispersions of high melting point molecules, and to stabilize the latter in high energy states.

Hybrid submicron particles (HNP) made of silylated castor oil (ICO) cross-linked by sol-gel chemistry were developed by means of a simple emulsification process in order to entrap JMV5038 while maintaining its biological activity. First of all, a preformulation study was performed to characterize JMV5038 prior to the selection of its optimal formulation. Suitable conditions were required to prevent the degradation of JMV5038, whereas the degradation products were thoroughly identified in order to set-up a quality procedure. Then, pharmacotechnical tests were conducted to show in particular the ability of HNP to efficiently entrap and to release JMV5038. Finally, *in vitro* cellular tests were performed to quantify the cytotoxic activity of the released JMV5038 on A375 human melanoma cells, and to underline the cytocompatibility of the developed formulation on NIH 3T3 non cancer cells.

2. Material and methods

2.1. Material

Pharmaceutical grade castor oil ($M_w = 934 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was purchased from Cooper Pharmaceutique. (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilane (IPTES; $M_w = 247.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), κ -

carrageenan, solvents and reactants (acetonitrile, 4-bromobenzoic acid, dichloromethane, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, hydroxybenzotriazole, methanol, octanol and triethylamine) were supplied by Sigma-Aldrich.

A375 human melanoma cancer cell line aimed to the cytotoxic activity assays, and NIH 3T3 fibroblast cell line aimed to the cytocompatibility assays, were both obtained from ATCC.

2.2. Synthesis of JMV5038 and of its open-ring derivative (ORD)

JMV5038 (Fig. 1) was synthesized according to our previous reported procedure, and its physical characteristics were in agreement with the published data (purity > 99 %, Mw = 369 g·mol⁻¹).²⁰

Preliminary tests (not shown here) have demonstrated the sensitivity of JMV5038 to a formulation in an acidic medium. In order to check the assumption of diazepine ring opening when JMV5038 is formulated in these conditions, the open-ring derivative (ORD ; Fig. 1) of JMV5038 was synthesized as follows: to a solution of (2*S*)-2-amino-1-(2-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-propan-1-one²⁰ (471 mg, 2.31 mmol) in dichloromethane (50 ml) at 0°C, were added hydroxybenzotriazole (346 mg, 2.54 mmol, 1.1 equiv.), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (487 mg, 2.54 mmol, 1.1 equiv.), triethylamine (353 μl, 2.54 mmol, 1.1 equiv.), and 4-bromobenzoic acid (201 mg, 2.54 mmol, 1.1 equiv.). The resulting mixture was stirred at 0°C for 30 min and then at room temperature for 6 h. After completion of the reaction (monitoring by thin-layer chromatography), the solution was washed with saturated NaHCO₃ aqueous solution (3 x 30 ml). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane and filtered through alumina gel using sintered glass Büchner funnel. The solvent was removed in vacuo to afford the ORD as a white solid (417 mg, 47 % yield, > 95 % purity); mp: 110 – 111 °C; [α]_D²⁰ = +4.8 ° (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (DMSO *d*₆, 500 MHz): δ ppm 1.43 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 5.24 (q, 1H, *J* = 7.1 Hz), 6.73 (bd s, 2H), 6.97 (td, 1H, *J* = 1.3 Hz, *J* = 6.9 Hz), 7.36 (dt, 1H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.8 Hz), 7.50 (td, 1H, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.1 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.89 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 9.01 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz); ¹³C NMR (DMSO *d*₆, 100 MHz): δ ppm 17.4, 51.0, 113.0, 114.1, 125.7, 129.0, 130.2, 130.8, 131.7, 133.2, 147.5, 166.2, 185.7; HPLC, RT = 1.07 min; MS (ESI⁺): *m/z* 387.1 [M+H]⁺, 389.1 [M+H+2]⁺; HRMS calcd for C₁₇H₁₆BrN₄O₂ 387.0457, found 387.0451.

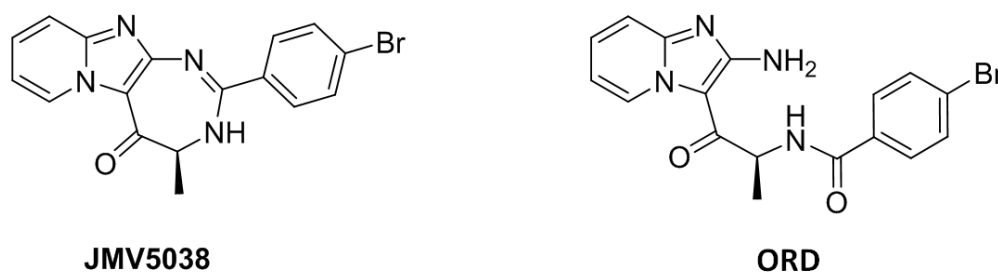


Fig. 1. Chemical structure of JMV5038 and its open-ring derivative (ORD).

2.3. Preformulation study of JMV5038

The determination of the melting point, the solubility, and the lipophilicity of an active pharmaceutical ingredient are key steps to choose its appropriate formulation.²¹ In order to study the thermal behavior of JMV5038, a thermogravimetric analysis (STA 6000, PerkinElmer) and a differential scanning calorimetry (DSC4000, PerkinElmer) were carried out. During the first, 10 mg of JMV5038 were heated from 25 to 600 °C and during the second, 5 mg of JMV5038 in a hermetically sealed aluminum pan were heated from 25 to 200 °C. Both analyses were conducted at 5 °C·min⁻¹ rate under nitrogen flow. Besides, the thermal behavior of ORD was studied in the same conditions. For determination of the JMV5038 lipophilicity, the XLOGP3 algorithm was requested.²²

The solubility of JMV5038 in ICO was measured as follows: 15 mg (40.65 μmol) of JMV5038 were put into 285 mg of ICO (i.e. 5 wt.% saturated mixture), then the mixture was gently stirred during 24 h at room temperature. After that, the mixture was centrifuged at 12000 rpm during 30 min, and 50 mg of the supernatant were diluted 200 times in methanol. The obtained solution was analyzed by HPLC (integration at λ = 214 nm). The system consisted of a Beckman System Gold HPLC, using a Merck Chromolith® SpeedROD C18, 25 x 4.6 mm reversed-phase column. A flow rate of 3 ml·min⁻¹ and a gradient of (0–100) % B over 5 min were used (eluent A: water / 0.1 % CF₃CO₂H; eluent B: acetonitrile / 0.1 % CF₃CO₂H). Quantitative determination was obtained by mean of a calibration curve (r² = 0.9923); standards were diluted in methanol within a concentration range of 0 up to 1500 μM.

2.4. Formulation of unloaded and JMV5038-loaded hybrid submicron particles

The silylation of castor oil to obtain ICO was detailed elsewhere.²³ Herein, ICO 0.8 was used, meaning that 80 % of hydroxyl groups of the castor oil were grafted with isocyanate groups of (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilane.

Unloaded and JMV5038-loaded HNP were formulated following a thermostabilized oil-in-water emulsification process combined with sol-gel crosslinking. The outlines of the formulation method were described in a previous study,²³ but has been adapted here to constraints of submicron sizing and of soft processing related to the pH-sensitivity of JMV5038. For the formulation of JMV5038-loaded HNP, a preliminary step of JMV5038 dissolution in ICO 0.8 (2 wt.%) was required. The ICO 0.8 ± JMV5038 was emulsified in an acidic (acetate aqueous buffer, pH = 2.7) or neutral (milli-Q water, pH = 6.5) aqueous medium containing 0.5 wt.% carrageenan at 60 °C, using an ultrasonic probe (Branson[®] Sonifier 250 equipped with a 3 mm tapered microtip) to obtain submicron droplets. A fast cooling down to 4 °C allowed to “freeze” the aqueous continuous phase by means of the dissolved carrageenan, and thus to immobilize the nanodroplets of unloaded or JMV5038-loaded ICO 0.8. After that, the sol-gel crosslinking occurred inside the nanodroplets during 10 days at room temperature and led to the formation of unloaded or JMV5038-loaded HNP. After washing, HNP were resuspended in PBS (150 mM, pH = 7.4).

After synthesis, the HNP were observed under optical microscopy (EVOS[®] FL Imaging System, Thermo Fisher Scientific) and their size was measured by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS[®], Malvern Panalytical). The loading efficiency was assessed by extracting JMV5038 from HNP in octanol over 24 h, prior to an UPLC / MS analysis by a Waters Acquity H-Class Plus[®], coupled to a Waters SQD2 spectrometer[®] (electrospray ionization mode, ESI+). All the analyses were carried out using an analytic C18 reversed-phase column (Acquity UPLC[®] BEH C18, 1.7 µm, 50 x 4.6 mm, Waters[®]). A flow rate of 0.6 ml·min⁻¹ and a gradient of (0–100) % B over 5 min were used (eluent A: water / 0.1 % HCO₂H; eluent B: acetonitrile / 0.1 % HCO₂H). Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 100 to 1000 m/z in 0.1 s intervals; 10 scans were summed up to get the final spectrum. The chromatograms of the extracts from JMV5038-loaded HNP formulated in acidic and neutral media were then compared to the JMV5038 and ORD chromatograms as references. The identity of the compounds was confirmed by mass spectrometry.

2.5. *In vitro* release tests of JMV5038 from hybrid submicron particles

Release tests of JMV5038 from HNP have been carried out in a PBS/octanol biphasic system, which was selected as a biorelevant system that mimics the *in vivo* conditions of API release (Fig. 2) as reported for several other systems^{24–26}. Our system was composed of a dialysis device (MWCO = 12 kDa) that contains 3 ml of JMV5038-loaded HNP suspension,

immersed in 100 ml PBS (pH = 7.4, T = 37 °C, rotation = 100 rpm) as a physiological simulated phase, and 10 ml of octanol as a storage phase that entrap the JMV5038 released from the HNP. 500 µl samples of the upper phase were collected at determined times prior to an UPLC / MS dosage (conditions detailed above), and 500 µl of fresh octanol were added after each sampling to maintain the volume constant. Finally, a percentage curve of JMV5038 released over time was drawn for a triplicate.

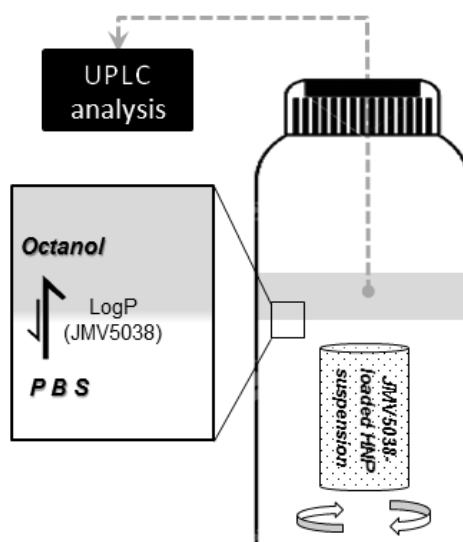


Fig. 2. Experimental set-up of the dialysis device within a PBS/octanol biphasic system under magnetic stirring. The system is thermostated at 37 °C.

2.6. *In vitro* activity assays

The A375 human melanoma cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich) supplemented with 10 % heat-inactivated foetal calf serum (FCS, Gibco), 2 mM Glutamax[®] (Gibco), 100 IU·ml⁻¹ penicillin G sodium (Sigma Aldrich), 100 IU·ml⁻¹ streptomycin sulfate (Sigma Aldrich). The cells were allowed to grow at 37 °C in a fully humidified atmosphere containing 5 % CO₂. A viability assay was used to evaluate the cytotoxic activity on A375 melanoma cells as previously described¹². Cells were seeded at a final concentration of 2000 cells per well in 96-well microtiter plates for 24 h. Then, cells were exposed to negative control (1 % PBS in culture medium for submicron particles or 1 % DMSO in culture medium for JMV5038 and for ORD), or to particles in suspension into PBS or to JMV5038 or ORD freshly dissolved in DMSO, in a range of concentration from 0.01 to 40 µM (six wells per concentration). After 72 h of incubation, cells were stained with new medium containing 50 µg·ml⁻¹ of neutral red (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, Sigma Aldrich) at 37 °C for 2 h. The neutral red medium solution was then removed and the wells were washed with PBS. Finally, 100 µl of solution containing ethanol,

acetic acid and water (50/1/49 v/v/v respectively) were added into the wells and the absorbance was measured at 540 nm using the microplate reader 352 Multiscan MS (Labsystems). Cell survival rates were normalized to the absorbance values of untreated control cells. IC₅₀ was obtained using a logistic regression model on Origin software, and the loading rate of JMV5038 within loaded HNP (i.e. 2 wt.%) was considered in order to relate the cell survival rates to four corresponding concentrations of HNP (from 8 up to 675 µg·ml⁻¹). Results are given as the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, and statistical analysis was performed using the Student's t-test.

2.7. Cytocompatibility evaluation of unloaded and JMV5038-loaded hybrid submicron particles

Cytocompatibility direct assays were conducted according to the ISO 10993-5 norm. The NIH 3T3 cells were seeded to be 5000 per well into a 96-well culture dish plate containing 200 µl per well of culture medium (composition listed above) for 24 h. Simultaneously, unloaded and JMV5038-loaded HNP were suspended in culture medium, both at 1350 µg·ml⁻¹ during 24 h. Subsequently, the cells were treated with the HNP suspensions diluted in the culture medium at several concentrations ranging from 1350 down to 8 µg·ml⁻¹, or with a fresh culture medium for the negative control cells.

After 48 h of exposure, the viability of NIH 3T3 cells treated or not with unloaded and JMV5038-loaded HNP was measured using a CellTiter 96[®] AQ cell proliferation assay (Promega) composed of a tetrazolium compound (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; PMS), as follows : 20 µl of a mixture MTS-PMS was added in each well for 3 h reaction with the cells, then the assay plate was read at 490 nm using a microplate reader (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific). Finally, cell viability rates were normalized to the absorbance values of the negative control cells (100 % viability). Results are given as the mean ± SD of three independent experiments and statistical analysis was performed using the Student's t-test.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization of JMV5038 and ORD

Thermal gravimetric analyses of JMV5038 and its ORD are depicted in Fig. 3. A loss of 4 % weight was observed for both compounds between 90 and 120 °C, probably due to an evaporation of hygroscopic water. For JMV5038, a slight loss was recorded after 190 °C

highlighting the onset of degradation, followed by a massive loss after 270 °C. The residual mass at 600 °C was 40.2 % of the initial JMV5038 mass, and was consistent with previous studies performed on imidazopyridine (IP) derivatives²⁷. Regarding to the ORD, earlier onsets of degradation (i.e. 140 °C) and of massive weight loss (i.e. 240 °C) as well as a lower residual mass (i.e. 28.6 % of the initial ORD mass) were observed. Hence, the better thermostability of JMV5038 compared to its ORD underlines the key role held by the diazepine central ring for the structural stability of these compounds.

The differential scanning calorimetry analysis (Fig. 4) showed an endothermic peak at 166 °C assigned to the fusion of JMV5038 crystals, followed by an exothermic one at 192 °C that supports the TGA results (onset of JMV5038 degradation). Nevertheless, the ORD thermogram did not show any significant event in these conditions when we were expecting a fusion peak around 110 °C. The difference of energy needed for the state change appears to be very small, highlighting the presence of weak bonds between ORD molecules.

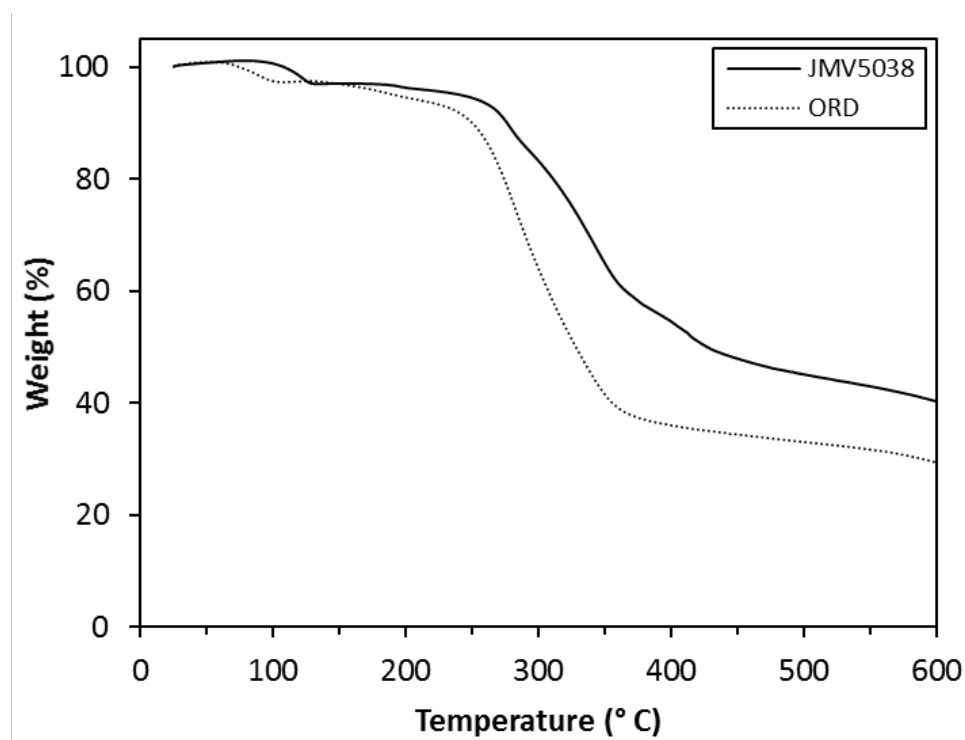


Fig. 3. Thermogravimetric analysis of JMV5038 and its ORD under nitrogen atmosphere.

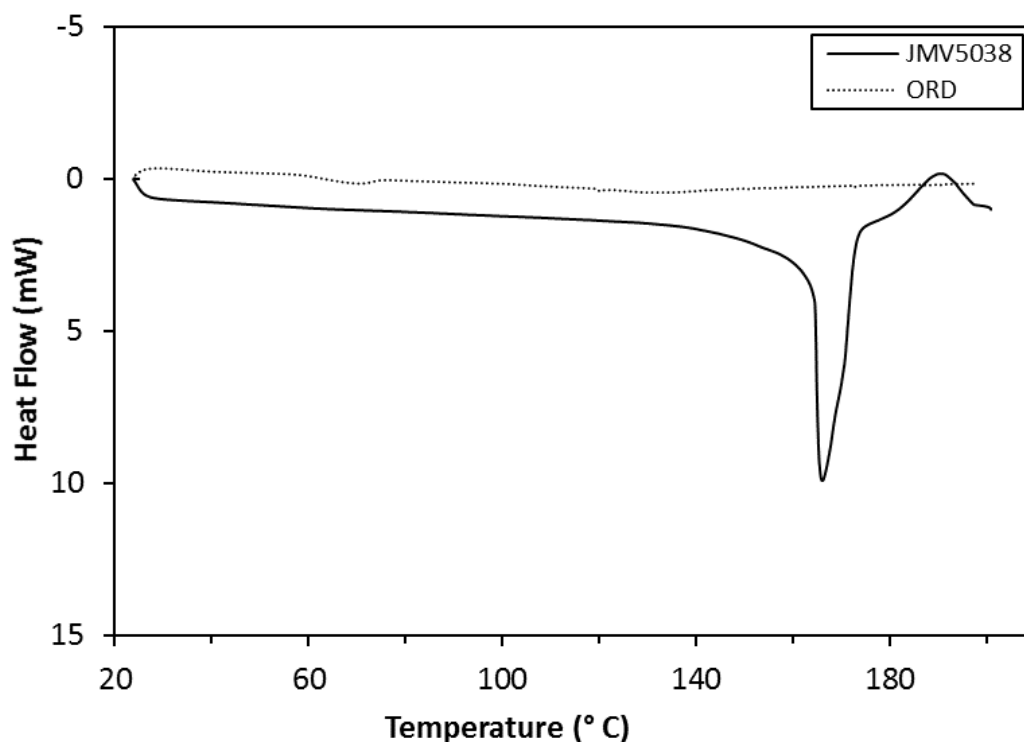


Fig. 4. Differential scanning calorimetry analysis of JMV5038 and its ORD under nitrogen atmosphere.

The computed value of LogP (JMV5038) was 4.01, suggesting that the molecule is very lipophilic. Indeed, this value means that the partition coefficient of JMV5038 in octanol / water mixture is 10233 / 1, respectively. Overall, the preformulation tests revealed that JMV5038 has a significant hydrophobicity considering its high LogP, along with a strong crystalline binding energy evidenced by its high melting point. Thus, formulating JMV5038 within HNP is highly suitable since these particles combines the advantages of lipid-based drug delivery systems that should solubilize the hydrophobic JMV5038, and of amorphous solid dispersions that should break the crystalline bonds.

The solubility of JMV5038 in ICO 0.8 was measured to be $34 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (i.e. 3.4 wt.%, corresponding to $92 \pm 3 \text{ mM}$), meaning that JMV5038 is nearly 4400 times more soluble in ICO 0.8 than in PBS. Hence, this high solubility result concludes the preformulation study and makes possible a further formulation of JMV5038 in HNP.

3.2. Formulation of the hybrid submicron particles

In contrast to the mechanical stirring we used in a previous study,²³ the ultrasonic emulsification process allowed to decrease the droplet size down to submicron either in acidic or neutral medium. The resulting HNP showed a reasonably homogeneous size centered on 615

nm allowing their administration through several routes, as discussed hereafter. They were solid, spherical, well-isolated, and they exhibited a smooth surface on optical microscopy (Fig. 5), with both formulation protocols.

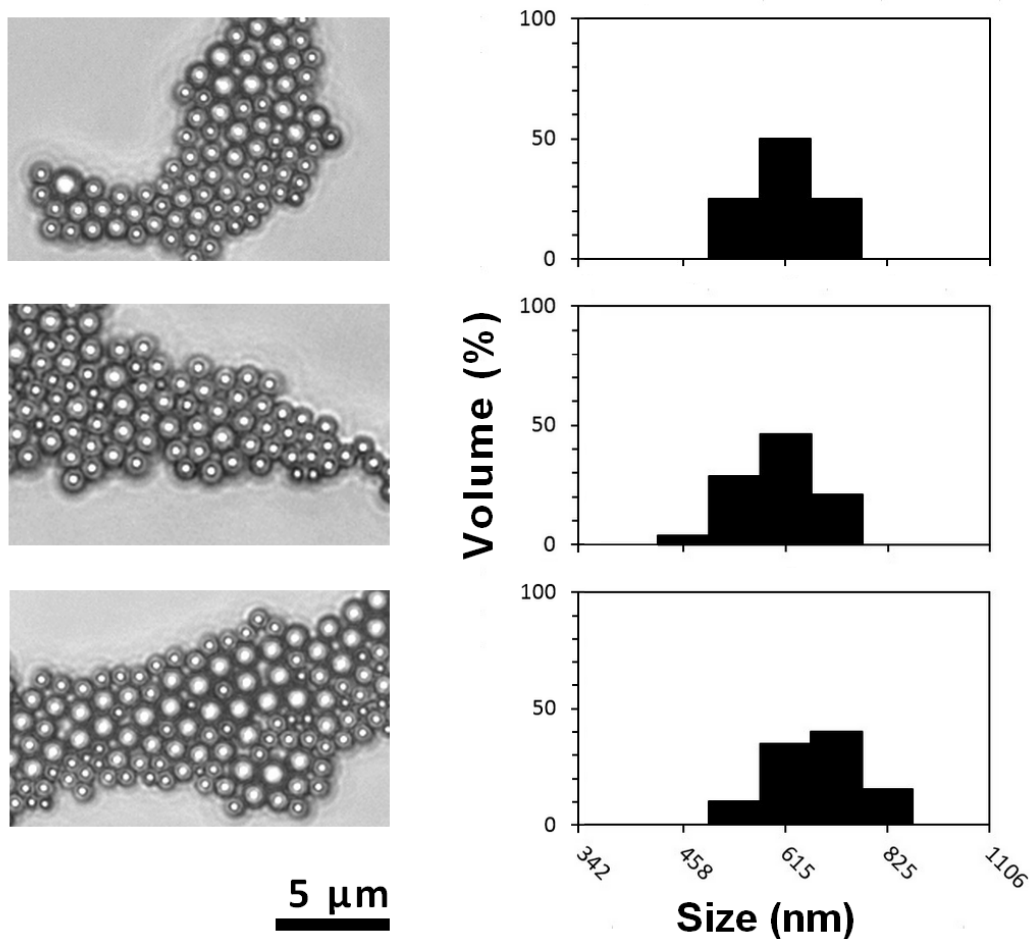


Fig. 5. Optical microscopy observation (on the left) and particle size measurement (on the right) of the HNP suspension. $n = 3$.

Furthermore, the loading efficiencies of JMV5038 in HNP were substantially different according to the pH of the formulation medium. Indeed, HNP formulated in neutral medium showed a loading efficiency of $80 \pm 1 \%$, corresponding to an effective loading rate of $397 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in the HNP suspension (i.e. 1.076 mM) whereas those formulated in acidic medium entrapped less than 1 % of JMV5038 and revealed also a partial degradation of JMV5038 through UPLC / MS analysis (chromatogram A in Fig. 6).

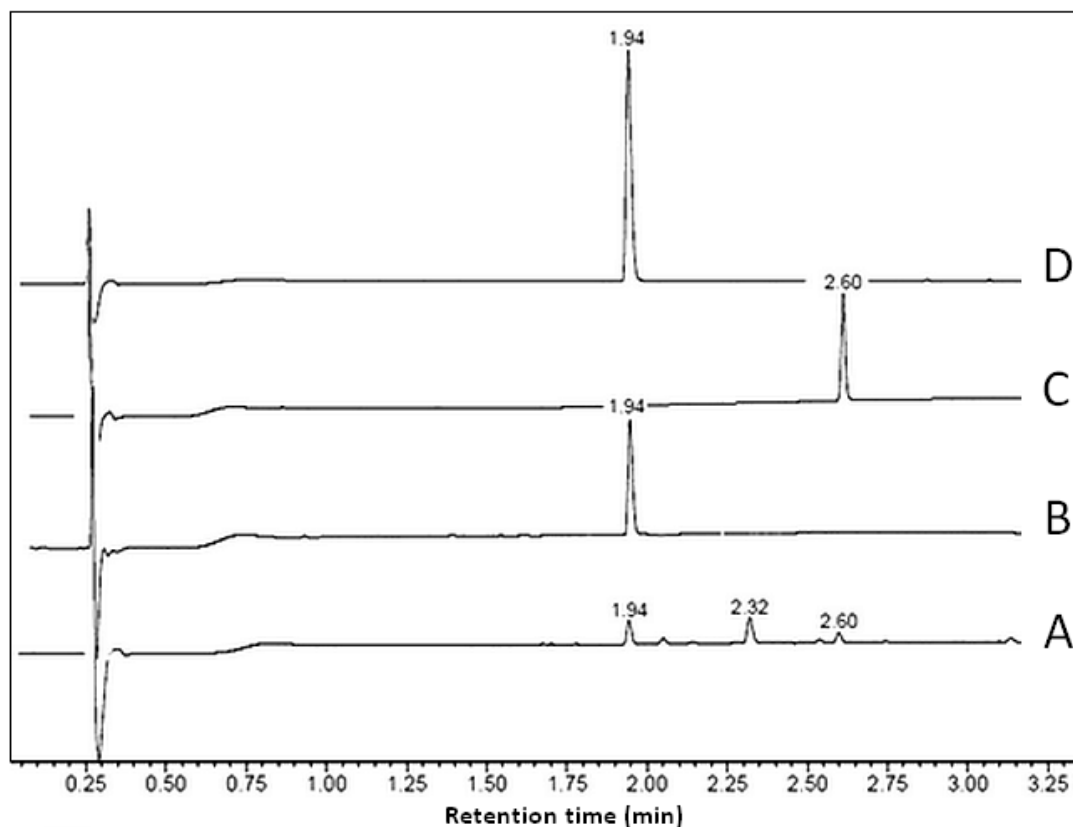
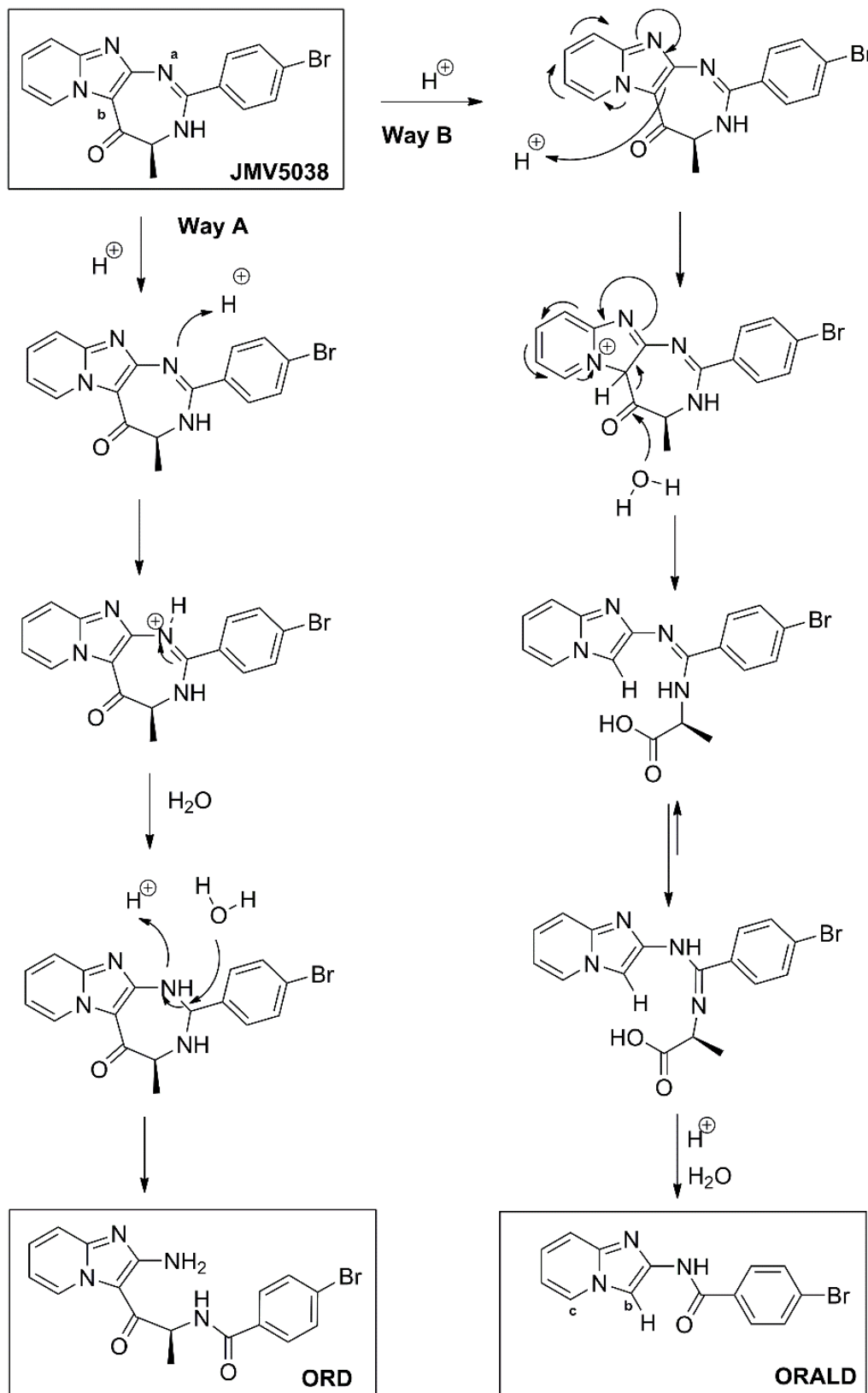


Fig. 6. UPLC traces of compounds released from HNP formulated in acidic medium (A) or from HNP formulated in neutral medium (B), compared to pure JMV5038 (D) and ORD (C), at $\lambda = 214$ nm.

Three main peaks were found in chromatogram A. The peak at 1.94 min corresponded to JMV5038 (same retention time and mass spectrum than pure JMV5038, chromatogram D). The compound at 2.60 min showed an increase of mass of 18 Da compared to JMV5038 and corresponded to the ORD that we synthesized (same retention time and mass spectrum than pure ORD, chromatogram C). Its formation was attributed to the opening of the diazepine ring due to acidic conditions used in the formulation (Scheme 1, way A). Another compound, among other minor ones, was also formed (retention time at 2.32 min). Its mass pattern confirmed the presence of a bromine atom in its structure (molecular ions at 316 and 318 Da) indicating that this compound is also derived from JMV5038, but with a loss of one part of the molecule. This compound was separated from the crude by preparative HPLC and then analyzed by NMR. The analysis of the ^1H and the ^1H - ^1H COSY spectra indicated the presence of a *para*-substituted phenyl group and four aromatic protons, which were attributed to the protons of the pyridine nucleus. Furthermore, the presence of a singlet at 8.31 ppm and another one at 11.5 ppm was attributed to the apparition of one proton in the IP nucleus (position “b”) and to a NH of an amidic function, respectively. A ^1H - ^{13}C HMBC analysis revealed a correlation between the

singulet at 8.31 ppm and the carbone “c” of the IP nucleus, confirming the structure of this compound.



Scheme 1. Proposed mechanisms for the formation of ORD and ORALD.

A possible mechanism to explain the formation of these two compounds of degradation in acidic medium is shown in Scheme 1. Protonation of the nitrogen “a” of the diazepine ring, followed by hydrolysis could lead to the opening of the diazepine ring and the formation of ORD (way A). Alternatively, the IP ring could react at position “b” with a proton (way B). Indeed, IP derivatives are known to be sensitive to electrophilic aromatic substitutions, and this position is the most preferred position for these reactions.²⁸ Then, the carbonyl group could be attacked by a water molecule to lead to the opening of the diazepine ring. Then, as previously described for ORD, imine protonation followed by its hydrolysis and loss of one molecule of alanine could lead to the formation of ORALD (Open-Ring and Alanine-Loss Derivative). Finally, the analysis of the payload from HNP formulated in neutral medium did not show these compounds of degradation (chromatogram B in Fig. 6). Hence, the formulation process in neutral medium has been retained for all the subsequent tests.

3.3. *In vitro* release tests on JMV5038-loaded hybrid submicron particles

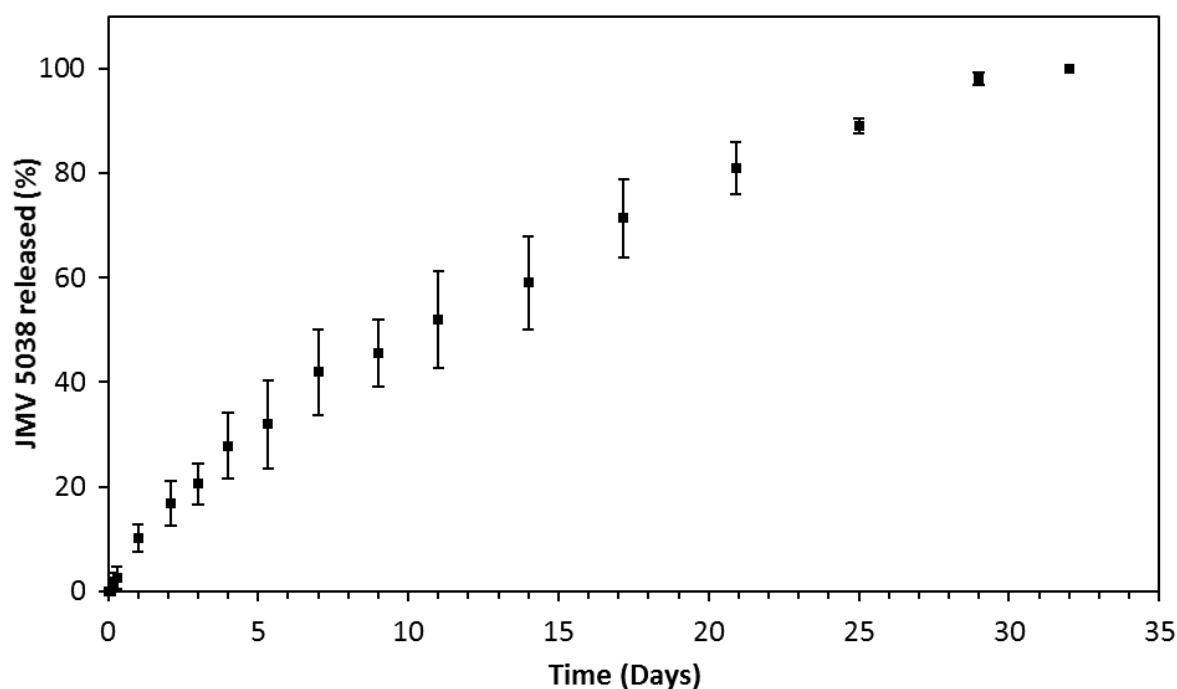


Fig. 7. *In vitro* cumulative release of JMV5038 from HNP in a PBS/octanol biphasic system at 37 °C.

The release kinetic of JMV5038 from HNP (Fig. 7) exhibited a sustained, constant and complete release profile over 28 days, underlining the potential of HNP as a long-acting drug delivery system. No burst effect was pointed out (10 ± 3 % released after 24 h) attesting that JMV5038 was entrapped within the HNP matrix, and was not adsorbed on the surface. It may be noted that this release profile differs from the one obtained in a previous study we conducted

on micrometer-sized hybrid particles loaded with ibuprofen,²³ which showed a double stage release with a burst effect (26 ± 3 % of ibuprofen released after 24 h). In fact, we were expecting a faster release with HNP because of their higher surface area, but it seems that the physicochemical nature of the API is more determinant in the release profiles. Indeed, JMV5038 has a higher molecular weight ($369 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), a higher melting point ($166 \text{ }^\circ\text{C}$), and no labile proton compared to ibuprofen ($206 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $76 \text{ }^\circ\text{C}$, and one carboxylic proton respectively).

The sustained constant release profile along with the submicron size of HNP allow several routes of administration. For example, the subcutaneous injection of the HNP suspension can be considered since the critical criteria were fulfilled.²⁹ Indeed, the volume of each sample used during the release tests was 3 ml according to the maximum subcutaneously tolerated volume, and the release rate was constant with an average of 115.6 nmol per 24 h corresponding to 3.6 % of the entire payload. The HNP suspension is also suitable for intratumoral administration ensuring *in situ* cytotoxic activity on the cancer cells, when the tumor removal is not possible. An original approach already described³⁰ would be the cutaneous deposition by holding the HNP on the surface of the lesion in a wound dressing. However, these assumptions have to be confirmed in future preclinical studies.

Finally, the intravenous administration could be considered by further reducing the HNP size in order to allow them reaching the tumor sites through passive or active targeting. Passive targeting of melanoma cells can be achieved by the enhanced permeability and retention (EPR) effect that allows accumulation of the circulating nanosized drug delivery system in tumors much more than they do in healthy tissues.³¹ The EPR effect was already pointed out with liposomes and nanoparticles (e.g., nanoparticle formulation of paclitaxel³²), and is mainly permitted by their specific nanometric size lower than 150 nm. Moreover, the PEGylation (i.e. grafting of poly(ethylene glycol) chains on the surface) of our nanosized drug delivery system would be a complementary approach leading to a prevention from a capture by the mononuclear phagocyte and reticuloendothelial systems, and to an increase of its uptake by the cancer cells (e.g., PEGylated liposomal formulation of doxorubicin³³). Active targeting may also be considered in melanoma treatment by anchoring specific antibodies on the surface of JMV5038-loaded HNP when the corresponding antigen is expressed on the cancer cells (e.g., anti $\alpha\beta 3$ integrin antibodies anchored on doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles³⁴).

3.4. *In vitro* activity assays

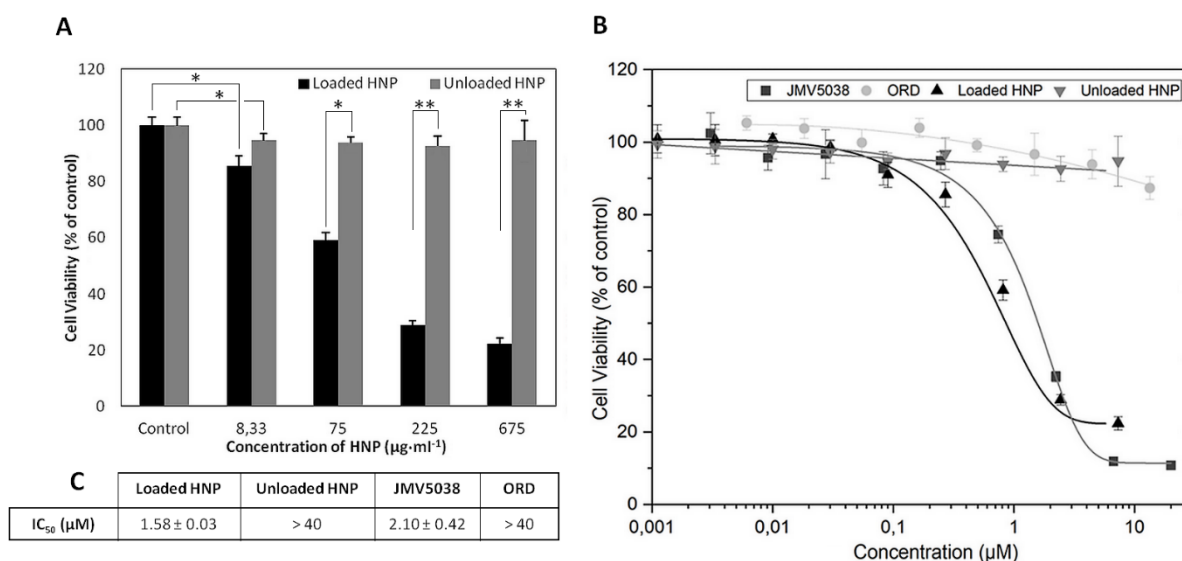


Fig. 8. (A) Activity of loaded and unloaded HNP on A375 cells compared to control at four corresponding concentrations. One asterisk and two asterisks correspond to p values <0.05 and <0.01 , respectively (B) Cell viability dose-response curve of A375 cells treated by JMV5038-loaded or unloaded HNP, JMV5038, or ORD; (C) Calculated IC_{50} . All results are mean \pm SD of three independent experiments.

First, we evaluated the cytotoxic activity profile of unloaded HNP in A375 melanoma cells, using neutral red uptake viability assay. We observed that, even at $675 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ over a period of 72 h, cell viability was not significantly reduced, compared to the control experiments (Fig. 8A). This result indicates that such unloaded particles have no toxic effect on the cells. The *in vitro* anticancer activity of JMV5038-loaded HNP was then evaluated in A375 cells at different concentrations through 72 h of incubation. At $8.33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of loaded HNP, only a weak cytotoxicity was observed, probably due to a too low concentration of the released free API (Fig. 8A). Indeed, if 100 % of API release from the HNP is assumed, the concentration of JMV5038 was about $0.45 \mu\text{M}$, which was about 4.5 times less than the IC_{50} of JMV5038 ($\text{IC}_{50} = 2.10 \pm 0.42 \mu\text{M}$).¹² If 20 % of release is considered as demonstrated above during *in vitro* release tests (Fig. 7), the concentration fell to $0.09 \mu\text{M}$, which was about 23 times less than the IC_{50} of the free API. At higher concentrations of JMV5038-loaded HNP (75 to $675 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), cell viability decreased dramatically, proving that the formulation process in neutral medium did not alter the biological activity of JMV5038 (Fig. 8A and 8B). Considering 20 % of drug release after 72 h, the IC_{50} of JMV5038-loaded HNP was determined to be $1.58 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (Fig. 8C). This value, slightly lower than that of the free API, could be explained by a better ability of the HNP to penetrate into the cells and deliver the API compared to free JMV5038. The ORD, corresponding to an opening of the diazepine ring that occurs when loaded HNP are

formulated in an acidic medium, was totally inactive ($IC_{50} > 40 \mu M$, Fig. 8C). Thus, the process developed here to formulate JMV5038-loaded HNP in neutral medium was able to ensure the integrity of the API and to maintain its biological activity.

3.5. Cytocompatibility assays

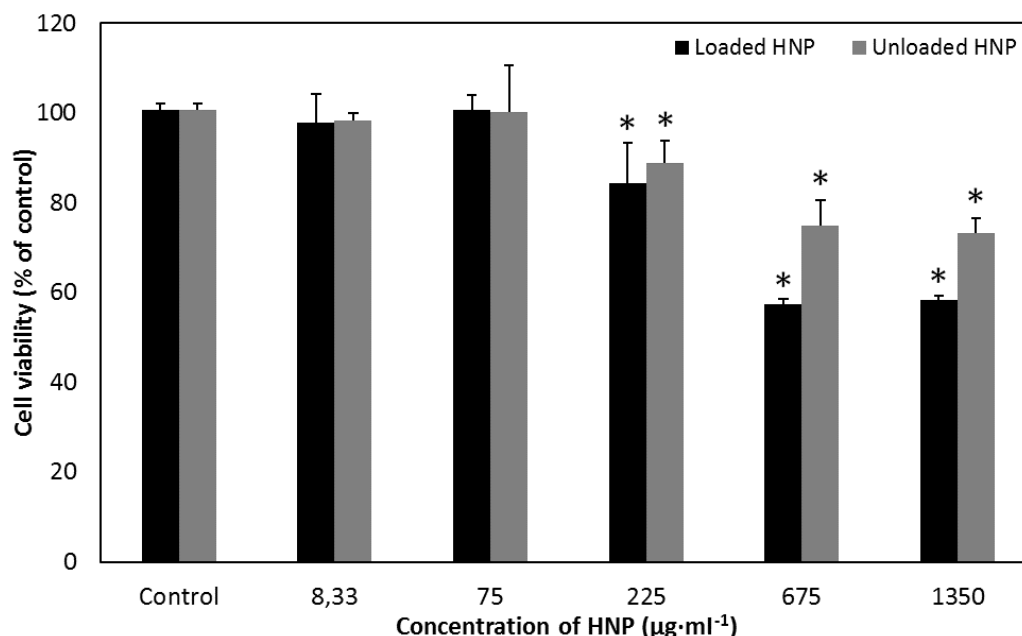


Fig. 9. Cell viability of NIH 3T3 exposed to unloaded or JMV5038-loaded HNP. All results are mean \pm SD of three independent experiments, and asterisk corresponds to a p value < 0.05 compared to the control.

In order to contrast the activity of JMV-loaded HNP on melanoma cells with their safety on healthy tissues, we performed cytocompatibility tests on NIH 3T3 cells in the same conditions and concentration range (Fig. 9). For the lowest concentrations of unloaded and loaded HNP (8.33 and $75 \mu g \cdot ml^{-1}$) all the cells survived, but a slight decrease in viability started to appear at $225 \mu g \cdot ml^{-1}$ (i.e. $88 \pm 5 \%$ and $84 \pm 8 \%$, respectively). For unloaded HNP, the viability stabilized to be around 75% viable cells up to $1350 \mu g \cdot ml^{-1}$ of particles, whereas for loaded HNP the cell viability decreased until $58 \pm 1 \%$ was reached at the same concentration. Despite these very high concentrations, the IC_{50} was not reached highlighting a low cytotoxicity. Overall, these results underline satisfying and quite similar cytocompatibility profiles of the unloaded and JMV5038-loaded HNP on NIH 3T3 fibroblasts in line with the previous data we obtained using free JMV5038 ($IC_{50} > 100 \mu M$).¹²

A more detailed look brings out two further conclusions: first, a lower viability of NIH 3T3 cells was recorded starting from $675 \mu g \cdot ml^{-1}$ of unloaded HNP compared to A375 cells. It suggests that the submicron particles (loaded or not) have a non-negligible effect at very high concentrations on cultured NIH 3T3, probably due to a disruption of *in vitro* cell growth during

co-incubation that might not be found *in vivo*. Secondly, the moderate cytotoxicity of loaded HNP highlighted a specificity of JMV5038 action according to the cellular type. Indeed, comparison with results obtained on melanoma cells (Fig. 8A) showed that when considering the toxicity onset of the loaded HNP (i.e. $8.33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ on A375 vs. $225 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ on NIH 3T3), it appears that their minimum activity threshold is 27 times lower on the melanoma cells than on the fibroblasts. When considering the active concentrations on melanoma cells (i.e. $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and higher), it appears that around 50 % more NIH 3T3 cells survive compared to A375 cells for the same concentrations. Hence, we can easily assume that the formulation has an effective anti-melanoma activity, while ensuring a sufficient margin of safety when administered *in vivo* for further preclinical studies.

4. Conclusion

In this paper, we covered two complementary studies aiming to the development of an efficient and versatile dosage form of JMV5038, a new potent cytotoxic agent we previously developed against melanoma.

First, the preformulation study conducted on JMV5038 highlighted its high lipophilicity and its strong crystalline binding energy, along with its interesting solubility in ICO. The latter outcome opened the way for the second study that consisted in the development of a stable and efficient formulation of JMV5038 in HNP. The thermostabilized emulsion process we usually perform to formulate hybrid particles was adjusted here according to the pH-sensitivity of JMV5038, and to the particle size reduction we intended. HNP of homogeneous size and of high loading efficiency were thus obtained, allowing intratumoral, topical, as well as subcutaneous administration. The *in vitro* release kinetics of JMV5038 from HNP in a biorelevant PBS/octanol biphasic system showed a constant and sustained release profile (3.6 % of the entire payload per day, over 28 days), underlining the potential of HNP as a long-acting system of JMV5038 delivery. On the other hand, *in vitro* assays conducted on A375 melanoma cell line highlighted an enhanced activity of JMV5038 when formulated in HNP compared to free JMV5038, contrasting with satisfying outcomes of cytocompatibility obtained on NIH 3T3 cells.

In sum, the JMV5038-loaded HNP proved to be efficient against melanoma and the preliminary outcomes brought out a sufficient safety of the formulation for further development through preclinical studies.

5. References

1. Khazaei, Z. *et al.* Global incidence and mortality of skin cancer by histological subtype and its relationship with the human development index (HDI); an ecology study in 2018. *World Cancer Research Journal* **6**, (2019).
2. World Health Organization. *Skin cancers*. <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>.
3. Karimkhani, C. *et al.* The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol* **177**, 134–140 (2017).
4. Najem, A. *et al.* New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer Research* **37**, 5941–5953 (2017).
5. Savoia, P., Fava, P., Casoni, F. & Cremona, O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *IJMS* **20**, 1483 (2019).
6. Ascierto, P. A. *et al.* The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* **10**, 85 (2012).
7. Luther, C., Swami, U., Zhang, J., Milhem, M. & Zakharia, Y. Advanced stage melanoma therapies: Detailing the present and exploring the future. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **133**, 99–111 (2019).
8. Ambrosi, L., Khan, S., Carvajal, R. D. & Yang, J. Novel Targets for the Treatment of Melanoma. *Curr Oncol Rep* **21**, 97 (2019).
9. Mishra, H. *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 2283–2302 (2018).
10. Gallud, A. *et al.* Imidazopyridine-fused [1,3]-diazepinones: Synthesis and antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **75**, 382–390 (2014).
11. Bellet, V. *et al.* Imidazopyridine-fused [1,3]-diazepinones part 2: Structure-activity relationships and antiproliferative activity against melanoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **125**, 1225–1234 (2017).
12. Baccon-Sollier, P. L. *et al.* Imidazopyridine-fused [1,3]diazepinones: modulations of positions 2 to 4 and their impacts on the anti-melanoma activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **35**, 935–949 (2020).
13. Bergström, C. A. S. & Porter, C. J. H. Understanding the Challenge of Beyond-Rule-of-5 Compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews* **101**, 1–5 (2016).
14. Ye, J. *et al.* Vitamin E-rich Nanoemulsion Enhances the Antitumor Efficacy of Low-Dose Paclitaxel by Driving Th1 Immune Response. *Pharm Res* **34**, 1244–1254 (2017).
15. Cavalli, R., Caputo, O. & Gasco, M. R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *International Journal of Pharmaceutics* **89**, R9–R12 (1993).
16. Cavalli, R., Caputo, O. & Gasco, M. R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci* **10**, 305–309 (2000).
17. Martins, S. *et al.* Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: Formulation design, in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics* **439**, 49–62 (2012).

18. Simovic, S. *et al.* Dry Hybrid Lipid–Silica Microcapsules Engineered from Submicron Lipid Droplets and Nanoparticles as a Novel Delivery System for Poorly Soluble Drugs. *Mol. Pharmaceutics* **6**, 861–872 (2009).
19. Shirodkar, R. K., Kumar, L., Mutalik, S. & Lewis, S. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Emerging Lipid Based Drug Delivery Systems. *Pharm Chem J* **53**, 440–453 (2019).
20. Masurier, N. *et al.* Selective C-Acylation of 2-Aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine: Application to the Synthesis of Imidazopyridine-Fused [1,3]Diazepinones. *J. Org. Chem.* **77**, 3679–3685 (2012).
21. Bandopadhyay, S., Bandyopadhyay, N., Deb, P. K., Singh, C. & Tekade, R. K. Preformulation Studies of Drug Substances, Protein, and Peptides. in *Dosage Form Design Considerations* 401–433 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-814423-7.00012-5.
22. Cheng, T. *et al.* Computation of Octanol–Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *J. Chem. Inf. Model.* **47**, 2140–2148 (2007).
23. Doufène, K. *et al.* Tunable vegetable oil / silica hybrid microparticles for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 118478 (2019) doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118478.
24. Phillips, D. J., Pygall, S. R., Cooper, V. B. & Mann, J. C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64**, 1549–1559 (2012).
25. Phillips, D. J., Pygall, S. R., Cooper, V. B. & Mann, J. C. Toward Biorelevant Dissolution: Application of a Biphasic Dissolution Model as a Discriminating Tool for HPMC Matrices Containing a Model BCS Class II Drug. *Dissolution Technol.* **19**, 25–34 (2012).
26. Denninger, A., Westedt, U., Rosenberg, J. & Wagner, K. G. A Rational Design of a Biphasic Dissolution Setup—Modelling of Biorelevant Kinetics for a Ritonavir Hot-Melt Extruded Amorphous Solid Dispersion. *Pharmaceutics* **12**, 237 (2020).
27. Velázquez-Olvera, S. *et al.* Fluorescent property of 3-hydroxymethyl imidazo[1,2-*a*]pyridine and pyrimidine derivatives. *Chemistry Central Journal* **6**, 83 (2012).
28. Masurier, N. *et al.* New Opportunities with the Duff Reaction. *J. Org. Chem.* **73**, 5989–5992 (2008).
29. Collins, D. S., Sánchez-Félix, M., Badkar, A. V. & MRSNY, R. Accelerating the development of novel technologies and tools for the subcutaneous delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release* **321**, 475–482 (2020).
30. Bragta, P. *et al.* Intratumoral administration of carboplatin bearing poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles amalgamated with in situ gel tendered augmented drug delivery, cytotoxicity, and apoptosis in melanoma tumor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **166**, 339–348 (2018).
31. Golombek, S. K. *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* **130**, 17–38 (2018).
32. Hamaguchi, T. *et al.* NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer* **92**, 1240–1246 (2005).
33. Smylie, M. G., Wong, R., Mihalcioiu, C., Lee, C. & Pouliot, J.-F. A phase II, open label, monotherapy study of liposomal doxorubicin in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs* **25**, 155–159 (2006).

34. Wagner, S. *et al.* Enhanced drug targeting by attachment of an anti α_v integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 2388–2398 (2010).

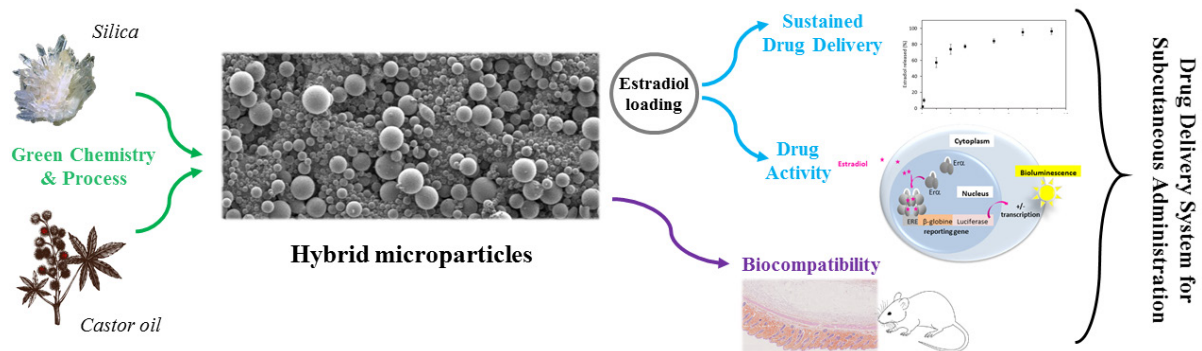
2^e volet

Vegetable Oil-based Hybrid Microparticles as a Green and Biocompatible System for Subcutaneous Drug Delivery

Doufène, K., Basile, I., Lebrun, A., Pirot, N., Escande, A., Chopineau, J., Devoisselle, J-M., Bettache, N., and Aubert-Pouëssel, A.

International Journal of Pharmaceutics, 120070 (2020).

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120070



Summary

1. Introduction 147

2. Material and methods 148

 2.1. Material 148

 2.2. Synthesis and characterization of silylated castor oil 148

 2.3. Formulation and characterization of hybrid microparticles 149

 2.4. *In vitro* release of estradiol 149

 2.5. *In vitro* activity assays of released estradiol 150

 2.6. Cytocompatibility assays 151

 2.7. Biocompatibility assays 152

3. Results and discussion 152

 3.1. Characterization of the silylated castor oil 152

 3.2. Physicochemical characterization of the hybrid microparticles 153

 3.3. *In vitro* release kinetics of estradiol 155

 3.4. *In vitro* activity of estradiol released from the hybrid microparticles 156

3.5.	Cytocompatibility evaluation of the hybrid microparticles	157
3.6.	Biocompatibility evaluation of the hybrid microparticles	157
4.	Conclusion	160
5.	Appendix A: Supplementary data.....	161
6.	Appendix B: Methodology of the NMR analyses and peak assignment	162
7.	References	169

Figures

Fig. 1.	Experimental set-up of the flow through cell apparatus with a PBS/octanol biphasic system	150
Fig. 2.	Synthesis reaction of ICOM	153
Fig. 3.	<i>In vitro</i> cumulative release of E2 from HMPm in a PBS/octanol biphasic system	155
Fig. 4.	<i>In vitro</i> activity of E2 released from HMPm	156
Fig. 5.	Cytocompatibility assays of HMPm on NIH 3T3 fibroblasts.....	157
Fig. 6.	Histological section of mouse subcutaneous tissue (x 40) stained with HES after 4 days of injection	158
Fig. 7.	Histological overview section of mouse subcutaneous tissue stained with HES after 28 days of injection	158
Fig. 8.	Summary illustration of the histological sections stained with HES according to the conditions of the study (4 or 28 days after injection, of vehicle or HMPm)	159

Tables

Table 1.	Solid-state ²⁹ Si NMR results of the HMPm sample analysis	154
Table 2.	EC ₅₀ of pure E ₂ and E ₂ released from HMPm on HELN Erα cells	156
Table 3.	Summary of the histopathology scores.....	159

1. Introduction

The therapeutic management of chronic diseases is a tricky challenge for both healthcare professionals and their patients. Although most of the drugs prescribed are orally administered, some formulation constraints (e.g. pH-sensitive active pharmaceutical ingredients (APIs)) and the non-compliance of some patients (e.g. mental disorders) may require alternative routes of administration.¹ In these cases, the subcutaneous (SC) delivery of APIs offers a valuable alternative. Indeed, it is a relatively low-cost route compared to the intravenous one, it is safe, effective, and it allows patient self-administration.² Nevertheless, the scientific community has agreed on the critical need for the development of new technologies and systems in this area.³ The SC route is relatively unexplored and there is still plenty of room for improvement through long-acting delivery systems⁴ and systems dedicated to biotherapeutics (e.g. antibodies, insulin and antibiotics).⁵⁻⁸

For a long time, injectable oils have been used to deliver APIs such as antipsychotics and steroid hormones.⁹⁻¹¹ Among the used oils, castor oil (CO) and its derivatives (hydrogenated and polyoxylated COs) have been widely introduced in parenteral formulations since their approval by the US-FDA.¹² While the derivatives are used as hydrophilic surfactants in aqueous formulations, native CO is used to formulate oily depots for the sustainable release of poorly water-soluble APIs. Indeed, Riffkin *et al.* pointed out as early as the 1960s the interest of using CO as a parenteral vehicle for steroids.¹³ This oil in particular offers a greater API solubilization capacity and an improved safety. Furthermore, we highlighted in a previous paper that silylated CO (ICO) synthesized with the aim of a further sol-gel cross-linking kept its solubilizing capacity of poorly water-soluble APIs. ICO was able to solubilize up to 160 mg of ibuprofen per milliliter and the hybrid microparticles (HMP) obtained after cross-linking of the ICO exhibited an interesting sustained release of ibuprofen in a SC simulated medium.¹⁴

In this present study, we redesigned the chemistry of CO silylation in order to improve "green" conditions of HMP synthesis, i.e. in solvent-free and catalyst-free conditions. Estradiol (E₂, LogP = 4.01) was used as a model for poorly water-soluble APIs from the broad chemical family of steroids, which includes corticosteroids and contraceptives. A comprehensive characterization of the new E₂-loaded HMP is presented with an emphasis on E₂ release kinetics, the *in vitro* cellular activity of the released E₂, and the *in vivo* biocompatibility of HMP evaluated on mice.

2. Material and methods

2.1. Material

Pharmaceutical grade castor oil (CO, 934 g·mol⁻¹) was purchased from Cooper Pharmaceutique. (3-Isocyanatopropyl)trimethoxysilane (IPTMS, 205 g·mol⁻¹), κ-carrageenan, estradiol (E₂, 272 g·mol⁻¹) and solvents (acetonitrile, acetic acid, methanol and octanol) were supplied by Sigma-Aldrich.

HeLa ERE-luciferase (HELN) ERα cell line aimed to *in vitro* activity assays was kindly donated by the team of Prof. P. Balaguer (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier - Inserm U1194), and NIH 3T3 fibroblast cell line aimed to cytocompatibility assays was obtained from ATCC. Their culture media were purchased from Thermofisher.

2.2. Synthesis and characterization of silylated castor oil

2.2.1. Synthesis of silylated castor oil

A silylating agent (IPTMS) was grafted on CO following an isocyanate-hydroxyl reaction in solvent-free and catalyst-free conditions as follows: 15 g CO (containing one molar equivalent of hydroxyl groups (-OH)) were silylated with 7.58 g IPTMS (containing 0.8 molar equivalent of isocyanate groups (-N=C=O)) during 72 h at 60 °C, under nitrogen atmosphere. The silylation ratio 0.8 (i.e., ratio between the quantity of -N=C=O groups in the silylating agent, and -OH groups in the oil) was selected from our previous study¹⁴ because of the lowest toxicity of the resulting HMP on NIH3T3 fibroblasts and their interesting pharmacotechnical qualities (i.e. hardness and flow properties of the HMP powder). The IPTMS was chosen to replace the (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilane (IPTES) that we previously used to functionalize castor oil then to obtain ICOe. Indeed, IPTMS is a better sol-gel reactive agent¹⁵, that will enhance the reactivity of the new silylated castor oil referred to as ICOM. In short, it allows the synthesis of hybrid particles without the use of any metallic catalyst

2.2.2. Characterization of the silylated castor oil

¹H, ¹³C and ²⁹Si NMR analyses (Bruker Avance III 500 and 600 MHz equipped with cryoprobes) were performed on ICOM in order to determine its structure. The methodology and the peak assignment are thoroughly described in Appendix B. For determination of x, y, and z substituent ratios depicted in Fig. 2, the various “CH” were identified by 2D NMR g-edited HSQC ¹³C and g-HMBC ¹³C and then integrated on 1D ¹H NMR. The ICOM was synthesized and analyzed in triplicate for the purpose.

Furthermore, the viscosity of ICOM was measured with a rotative rheometer (RM 200 Rheomat, Lamy Rheology) equipped with a DIN33 measuring system.

2.3. Formulation and characterization of hybrid microparticles

2.3.1 Microparticle synthesis

The ICOM-based hybrid microparticles (HMPm) were formulated following the thermostabilized emulsion process we developed.¹⁴ Briefly, E₂, as a representative API of the steroid class, was dissolved at 4 wt.% in the ICOM, and the whole was emulsified by means of a mechanical rotating system in an aqueous phase (acetate buffer + 0.5 wt.% κ -carrageenan, pH = 2.8) heated at 60 °C. The temperature was then dropped in an ice bath for 5 min to “freeze” the aqueous phase. Afterwards, the stabilized emulsion was kept at room temperature during 8 days whilst the sol-gel crosslinking occurred inside the oil droplets. Finally, the emulsion (which has meanwhile turned into a suspension of solid microparticles) was heated to break the aqueous phase, and the HMPm were washed with milli-Q water then freeze-dried.

2.3.2 Microparticle characterization

The synthesized microparticles were characterized by complementary techniques to study their morphology (i.e. granulometry using a Mastersizer 2000 from Malvern instruments), their structure (i.e. solid-state ²⁹Si NMR using a Varian VNMRS 400 MHz [9.4T] NMR spectrometer equipped with a 7.5 mm Varian T3 HX MAS probe spinning at 5 kHz; thermogravimetric analysis using STA 6000 from PerkinElmer) and their E₂ loading efficiency (by means of liquid chromatography -2010HT from Shimadzu: static phase = C18 Protonsil[®] column from Bischoff, mobile phase = acetonitrile/Milli-Q water, 40/60, v/v). The reader is directed to the ref. ¹⁴ for further technical details.

2.4. *In vitro* release of estradiol

Release tests of E₂ from HMPm were carried out in a flow-through cell apparatus and a biphasic system was chosen to mimic the *in vivo* release of E₂ after SC administration, as depicted in Fig. 1. Indeed, the biphasic systems were extensively reported in literature as of great interest in the study of the *in vitro* release of poorly water-soluble API^{16–18} and in the correlation with the *in vivo* behavior of the drug delivery system.¹⁹ Our system consisted of 200 ml PBS buffer at pH = 7.4 and T = 37 °C as a biorelevant flowing phase in contact with the sample (40 mg of E₂-loaded HMPm, containing 5.874 μ mol of E₂) entrapped in a flow-through cell. As a storage phase that entraps the E₂ released from the HMPm, we used 40 ml of octanol at room temperature. The very high affinity of E₂ for octanol rather than water caused all the released E₂ in PBS to be entrapped in the organic phase, and thus it ensured the sink conditions

($\text{LogP}(\text{E}_2) = 4.01$, meaning that the partition coefficient of estradiol in octanol : water mixture is 10233 : 1, respectively). At determined intervals, samples of the organic phase were analyzed by liquid chromatography as described above, and then a percentage curve of released E_2 over time was drawn from triplicate tests.

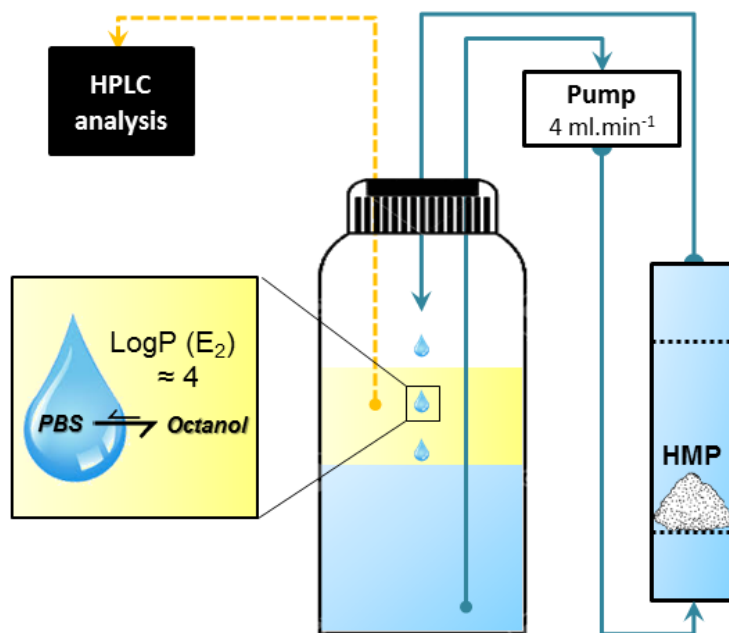


Fig. 1. Experimental set-up of the flow through cell apparatus with a PBS/octanol biphasic system. The cell containing HMPm is thermostated at 37 °C.

2.5. *In vitro* activity assays of released estradiol

2.5.1. Cell line

In order to check the activity of the E_2 released from HMPm and thus to ensure the suitability of the process for drug encapsulation, we used an already established cell model: HELN cell line expressing the estrogen receptor alpha ($\text{ER}\alpha$)^{20,21} that exhibits estradiol-induced $\text{ER}\alpha$ activity (Fig. A.1). Briefly, HELN $\text{ER}\alpha$ cells were obtained by stably expressing the $\text{ER}\alpha$ DNA binding domain in HELN cells.

HELN $\text{ER}\alpha$ cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium without phenol red (DMEM/F-12) supplemented with 5 % steroid free foetal bovine serum, 1 g·ml⁻¹ glucose, 100 units·ml⁻¹ of penicillin, 100 µg·ml⁻¹ of streptomycin, 0.5 µg·ml⁻¹ puromycin and 1 mg·ml⁻¹ geneticin in a 5 % CO_2 humidified atmosphere at 37 °C.

2.5.2. Extract preparation

Unloaded and E_2 -loaded HMPm (freshly synthesized, or stored 12 months at 25 °C and referred to as old) were suspended in culture medium (10 mg in 50 ml) and the samples were

gently shaken during 24 h at 37 °C. After centrifugation, the supernatants (referred to as extracts) were analyzed by HPLC to determine the amount of released E₂. As references, solutions of pure E₂ in dimethyl sulfoxide (10⁻⁵ to 10⁻¹² M) were prepared.

2.5.3. Transactivation experiments

The cells were seeded at a density of 25000 cells per well in 96-well white opaque tissue culture plates (Greiner CellStar) in the aforementioned medium and conditions. The extracts were diluted in the culture medium according to defined concentrations of E₂ (10⁻⁵ to 10⁻¹² M) and added to the cells. After 16 h co-incubation, the diluted extracts were replaced with test medium containing 0.3 mM luciferin. Luciferase activity was measured for 2 s in intact living cells using a MicroBeta Wallac luminometer (PerkinElmer). Tests were performed in quadruplicate in at least three independent experiments. Data are expressed as a percentage of the theoretical maximal activity of pure E₂ and are given as the mean ± SD.

Agonistic activity of the ER α was tested in presence of increasing concentrations of extracted E₂. For each sample, the potency corresponding to the concentration yielding half-maximal luciferase activity (EC₅₀ value) was determined using the dose/response fitting on Origin[®] software.

2.6. Cytocompatibility assays

Cytocompatibility assays of unloaded HMPm were conducted according to the ISO 10993-5 standard. Various concentrations of HMPm (0, 0.1, 1 and 10 mg·ml⁻¹) were infused in DMEM culture medium during 48 h then centrifuged. The NIH 3T3 fibroblasts (cultured in the same medium and seeded at 5000 cells per well in 96-well plate) were exposed to the extracts, and the viability of the cells was checked after 24 and 48 h using a CellTiter 96[®] AQ cell proliferation assay (Promega). This test is composed of a tetrazolium compound (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; PMS), and it was used as follows: 20 μ l of a mixture MTS-PMS was added in each well for 3 h reaction with the cells, then the assay plate was read at 490 nm using a microplate reader (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific). Finally, cell viability rates were normalized to the absorbance values of the negative control cells (100 % viability) and the results are given as the mean ± SD of three independent experiments and statistical analysis was performed using the Student's t-test on Minitab[®] software.

2.7. Biocompatibility assays

Biocompatibility assays of unloaded HMPm were conducted according to the ISO 10993-6 standard.

2.7.1. Treatment of the animals

18 BALB/cAnNRj albino male mice (Janvier Labs, France) 10 weeks aged, weighting 26.1 ± 1.4 g, were used for the experiment. The mice were cared for in accordance with the ethical guidelines and the standard protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Languedoc-Roussillon C2EA-36 (reference: #23448-2019122017024717). Before injection, the mice had back hairs shaved and were disinfected with chlorhexidine. The mice were divided into 4 experimental groups with two injected preparations (either the vehicle defined hereafter, or the unloaded HMPm suspended in the vehicle), and with two experiment time-points (4 or 28 days).

The unloaded HMPm were sterilized through exposure to UVC rays (Bio-Link 254 nm from Vilber Lourmat, France), then suspended at $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in an apyrogenic, isotonic aqueous solution containing 1.5 wt.% carboxymethylcellulose and 0.1 wt.% polysorbate 80. A single dose containing 8 mg of HMPm was injected in the SC space behind the neck of the mouse. The same preparation without HMPm, referred to as “vehicle”, was used for the control group.

2.7.3. Sample collection and data analysis

At the two time-points (day 4 and day 28), the mice were euthanized and the dorsal skin was carefully resected in the injection site. The skin samples were fixed in 4 % formaldehyde solution for 24 h at room temperature and embedded in paraffin. 3 μm thick sections were cut and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and red sirius (RS). The scoring criteria permitted to evaluate local tissue effects according to the ISO 10993-6 guidelines. The grading system was performed by a veterinary pathologist as follows: 0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = marked, 4 = severe.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the silylated castor oil

In order to elucidate the structure of the ICOM, a wide range of NMR experiments were performed allowing to identify 4 types of CH-O that were assigned to “CH-O” of the glycerol part, “CH-OH” of the non-silylated branch, “CH-O-IPTMS” of the silylated branch, and the transesterified form “CH-O-Si” (see Fig. B.6 and Table B.1 in Appendix B). Then the

percentages x , y and z , depicted in Fig. 2, were determined by integration on 1D ^1H NMR using the “CH-O” of the glycerol part as reference, even if the measurement of x was slightly imprecise because of overlapped signals on this area. The results were as follows: $x = 9.7\%$ (± 0.6), $y = 62\%$ (± 0.4) and $z = 28.3\%$ (± 0.2).

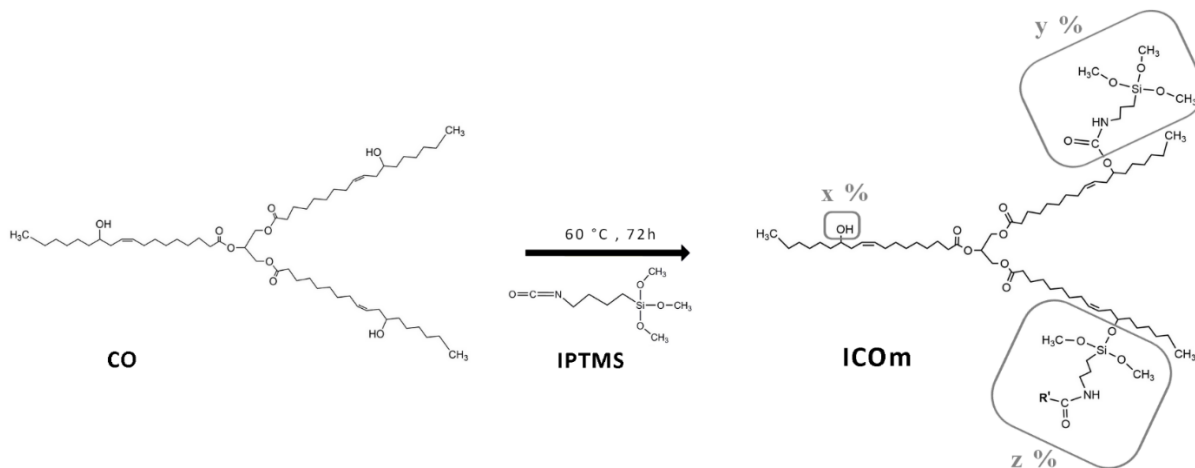


Fig. 2. Synthesis reaction of ICOM. x , y and z refer to the percentage of free hydroxyls, urethane groups and Si-O-C bridges, respectively. R' refers to another ICOM monomer.

Overall, a complete silylation was reached and no early crosslinking was underlined (absence of Si-O-Si bridge signals on Fig. B.5), but an unexpected reaction between some methoxysilane groups of IPTMS and free hydroxyl groups of CO was pointed out by the non-negligible z percentage, in contrast with the results we previously obtained during the silylation with IPTES. We explain it by the high reactivity of the methoxysilanes that are well known to induce interfering reactions. However, the narrow standard deviations on the triplicate demonstrate the reproducibility of the results and the mastering of the silylation process.

The high viscosity of ICOM, which was measured to be 3180 mPa·s (approximately 4-fold higher than the corresponding ICOe viscosity, 764 mPa·s), revealed the physical impact of transesterification reaction. Indeed, in the absence of early sol-gel crosslinking, the high viscosity value can only be explained by the formation of ICOM oligomers, which are linked by the urethane group and by the Si-O-C bridge.

3.2. Physicochemical characterization of the hybrid microparticles

The resulting HMPm exhibited a spherical morphology and a micrometric size. Their volume median diameter was around 83 μm (span = 1.43) and was slightly higher than that of HMPe (i.e. HMP made of ICOe, around 55 μm) previously reported.¹⁴ We assumed that this size increase was due to the higher viscosity of ICOM as compared to ICOe. The tendency was confirmed by the higher volume moment mean $D[4,3]$ (89 μm), whereas the surface-area

moment mean $D[3,2]$ was 38 μm and reflected a high number of small HMPm as we have already seen using the same emulsification process.

The organic/inorganic hybrid structure of HMP was attested by a mineral residue of approximately 6 % after heating up to 800 °C (Fig. A.2). In addition, the density of the crosslinked hybrid structure of HMPm was investigated by solid-state ^{29}Si NMR. As indicated in Table 1, the condensation yield (CY) and degree (CD) were 85 % and 79 % respectively, and they were in the same range with those of HMPE at the same silylation ratio.¹⁴ However, the condensation behavior was different as highlighted by the analysis of T^x percentage, i.e. condensation state of a hydrolyzed trialkoxysilane, with $0 \leq x \leq 3$ referring to the number of the siloxane generated bonds (Si-O-Si). Indeed, it is interesting to consider the variation of T^3 amount that was slightly higher herein (44 %) than in the HMPE (36 %), meaning that a higher amount of silica parts fully crosslinked. We assumed that it was due to the better sol-gel reactivity of trimethoxysilanes than triethoxysilanes. Indeed, the former are more able to form multiple siloxane bonds since the steric hindrance and the electro-donor inductive effect of the methyl residue on the silicium center (Si) are lower than those of the ethyl one. Overall, a better sol-gel crosslinking efficiency was ensured for these new particles despite the absence of a tin catalyst, and a more sustained API release might be expected.

Table 1. Solid-state ^{29}Si NMR results of the HMPm sample analysis. CY and CD were calculated as follows: $\text{CY} = 100 \% - \text{LP}$; $\text{CD} = \frac{T^1+2\cdot T^2+3\cdot T^3}{3\cdot \text{CY}}$

^{29}Si signal (%)						
Liquid peak (-45 ppm)	T^0 (-49 ppm)	T^1 (-54 ppm)	T^2 (-58 ppm)	T^3 (-67 ppm)	CY (%)	CD (%)
14.98	4.22	4.33	32.51	43.89	85	79

Furthermore, the loading efficiency of E_2 within HMPm was determined by assessing their effective loading rate. The results showed an effective rate of 4.29 ± 0.18 wt.% slightly higher than the theoretical one pointing out a concentration effect on E_2 inside HMPm that occurred during the formulation process. This phenomenon was reported in our previous study and we explained it by alcohol evaporation during the sol-gel hydrolysis reaction (ethanol in the previous study,¹⁴ methanol herein).

3.3. *In vitro* release kinetics of estradiol

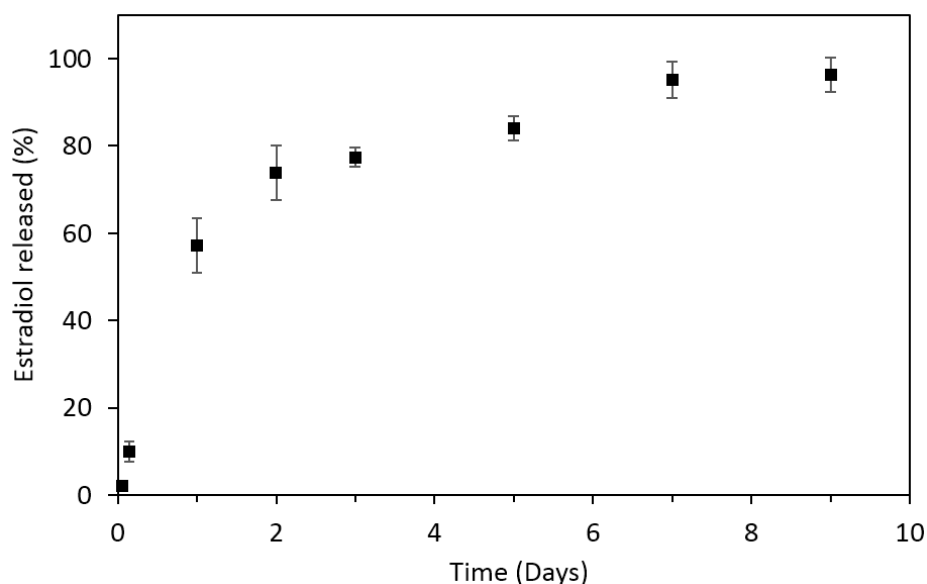


Fig. 3. *In vitro* cumulative release of E₂ from HMPm in a PBS/octanol biphasic system.

As discussed above, release kinetics of E₂ from HMPm were carried out in a PBS/octanol biphasic system. The data depicted in Fig. 3 point out a “burst” stage during the 1st day, leading to the release of $56 \pm 6 \%$ ($3.29 \pm 0.35 \mu\text{mol}$) of the payload. This step was followed by a sustained release of 391 nmol per day, starting from day 1 until the release of the entire payload after 7 days. Hence, HMPm seem to be adapted to the delivery of APIs that require low plasma concentrations for their systemic activity, such as steroid hormones and their analogs. However, a more sustained release would be interesting in order to reduce the SC injection frequency. One could argue that it can be achieved by increasing the density of the hybrid network since we have already shown that API release from HMP occurs by a diffusion mechanism.¹⁴ To set the context in the literature, we discuss two examples of E₂-loaded microparticles subcutaneously injected: Guo *et al.*²² synthesized an E₂-polyketal conjugate and formulated it into microparticles that showed an interesting sustained release of E₂ over 20 weeks. However, the synthesis and purification involved several steps and various organic solvents were used (ether, toluene, tetrahydrofuran, chloroform, hexane, acetonitrile and methanol), and the particles released simultaneously equivalent amounts of acetone and 1,4-cyclohexanedimethanol from the conjugate. In another case, the researchers entrapped E₂ in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles and the *in vitro* release in mini dialysis device took place over 4 weeks. Here again, the same manufacturing disadvantages were reported. Moreover, the degradation of PLGA *in vivo* is well known to acidify the surrounding cellular environment and may eventually alter the tissues.

Furthermore, it is known that the use of different *in vitro* release set-ups can significantly affect the release kinetic profiles.²³ Regarding the PBS/octanol biphasic system used here, we considered it as the most biorelevant set-up for such poorly water-soluble APIs release and, to the best of our knowledge, no study on steroid release in a biphasic system has already been described in the literature.

3.4. *In vitro* activity of estradiol released from the hybrid microparticles

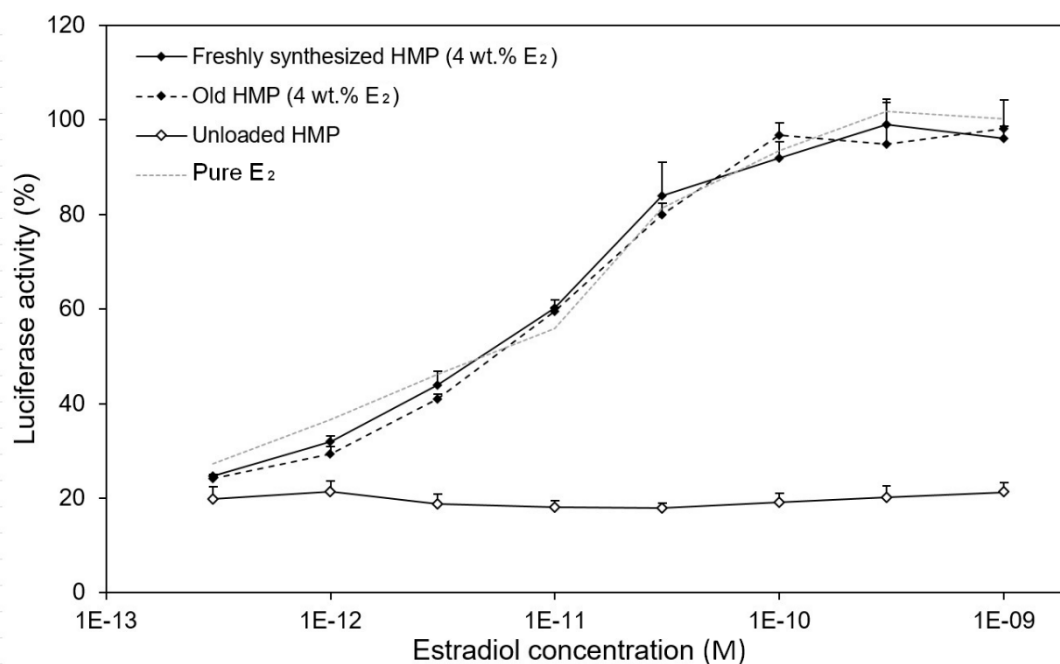


Fig. 4. *In vitro* activity of E₂ released from HMPm.

Table 2. EC₅₀ of pure E₂ and E₂ released from HMPm on HELN ER α cells.

Sample	EC ₅₀ ($\times 10^{-12}$ M)
Pure E ₂	7.3 \pm 0.07
Freshly synthesized HMPm (4 wt.% E ₂)	6.2 \pm 0.03
Old HMPm (4 wt.% E ₂)	6.2 \pm 0.03

The suitability of the formulation process was determined by assessing the *in vitro* activity of E₂ released from 12 months old and freshly synthesized HMPm (Fig. 4). The two formulations reached 100 % of the theoretical E₂ activity, meaning that the intrinsic activity of the released E₂ is fully preserved in both cases. Moreover, the EC₅₀ deduced from the dose-response curves (Table 2) were close to the reference attesting that the affinity of the released E₂ to ER α is also fully maintained. Considering these outcomes, we assume that the chemical structure of the API was not affected by the formulation process and that the entrapped API was stable over 12 months at room temperature highlighting a protective effect of HMPm.

3.5. Cytocompatibility evaluation of the hybrid microparticles

As a prerequisite for the *in vivo* study, the HMPm cytocompatibility was evaluated on NIH3T3 cell line. Almost all the cells survived (> 98 %) up to a concentration of 10 mg·ml⁻¹ after 24 h exposure to HMPm extracts. The viability decreased at 84 ± 5 % with the upper concentration of HMPm after 48 h exposure, but still being acceptable. This could be explained by the presence of residual carrageenan on HMPm arising from the aqueous phase after washing.

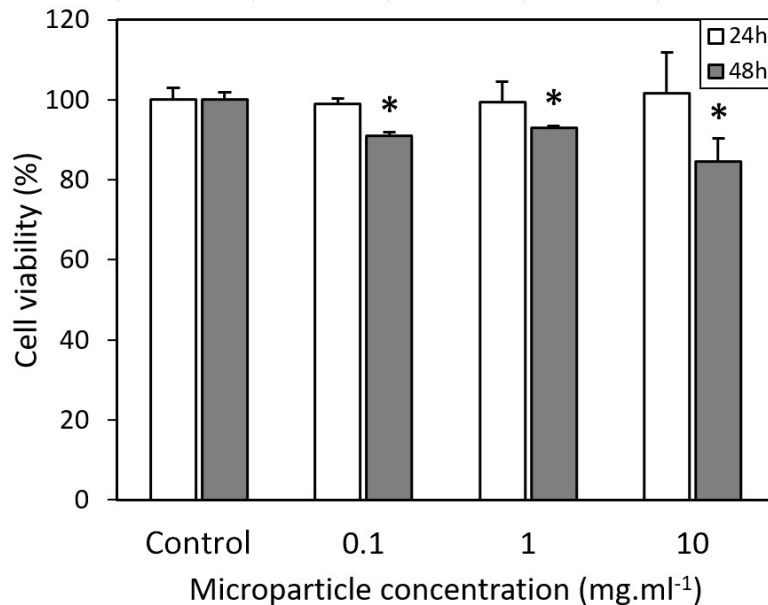


Fig. 5. Cytocompatibility assays of HMPm on NIH 3T3 fibroblasts. All results are mean ± SD of three independent experiments, and asterisk corresponds to a *p* value <0.05 compared to the control.

3.6. Biocompatibility evaluation of the hybrid microparticles

For each animal, the one section out of four stained with HES that showed the most severe changes was scored. After 4 days, the aqueous vehicle content (i.e. carboxymethylcellulose and polysorbate) was evidenced inside moderate numbers of vacuolated macrophages in the subcutaneous tissue. However, there was no evidence of vehicle-induced acute or subacute inflammation. For animal treated with HMPm dispersed in the vehicle, the particles could be seen as round imprints of variable sizes surrounded by macrophages, which were the main cell type present to phagocytose them (Fig. 6). However, there was no inflammation as proved by the absence of neutrophils and lymphocytes.

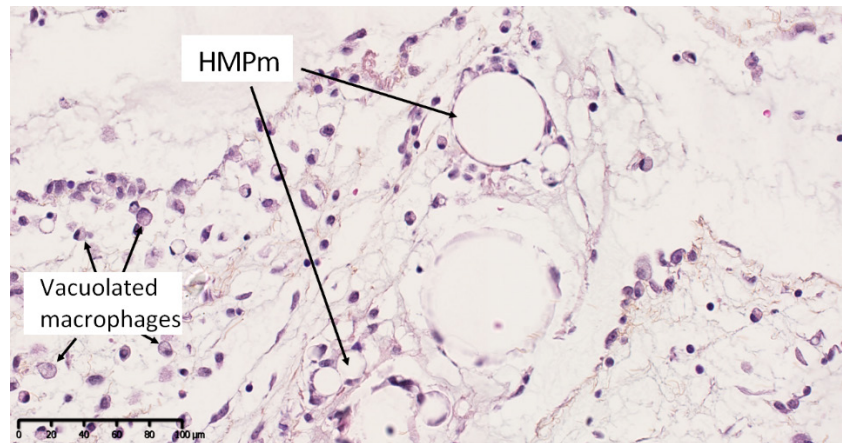


Fig. 6. Histological section of mouse subcutaneous tissue (x 40) stained with HES after 4 days of injection. Loosely arranged HMPm and a few vacuolated macrophages are found.

After 28 days, the vehicle was still visible as small amounts of grey transparent amorphous material, surrounded by large numbers of macrophages as seen after 4 days. Multifocally, there was minimal to mild fibrosis confirmed on the section stained with RS (data not shown). The sites injected with the HMPm were characterized by variable amounts of grey transparent material and several rounded clear spaces (imprints), surrounded by walls of vacuolated macrophages and occasionally thin strands of collagen (consistent with minimal to mild fibrosis) (Fig. 7).

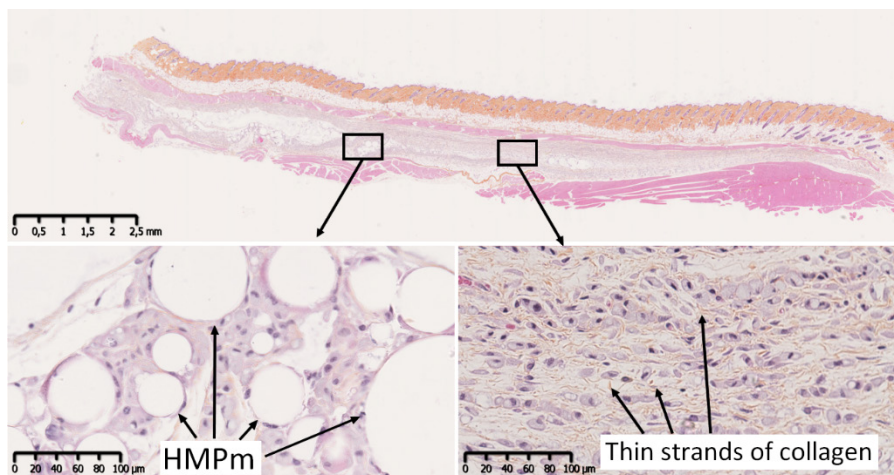


Fig. 7. Histological overview section of mouse subcutaneous tissue stained with HES after 28 days of injection. HMPm, numerous vacuolated macrophages, and thin strands of collagen are found.

A global score was given to reflect the overall host tissue reaction based on the most marked parameter (mainly macrophagic reaction and fibrosis, Table 3). At day 4, the severity was deemed moderate for the vehicle alone and marked for the HMPm. After 28 days, there was no real difference between the vehicle and the HMPm (both marked) (Fig. 8).

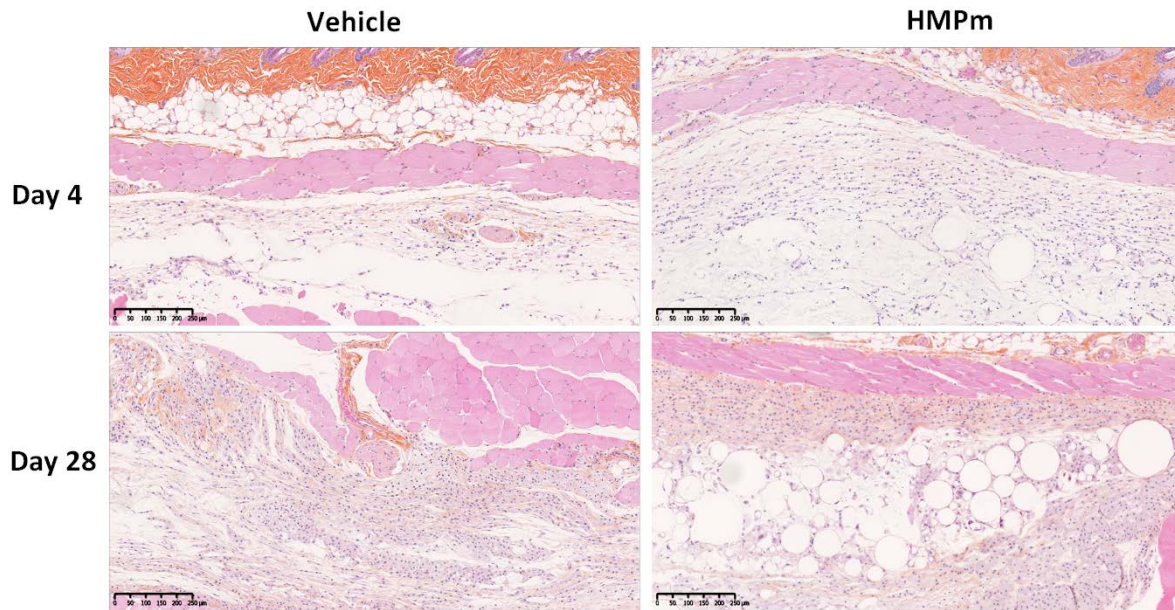


Fig. 8. Summary illustration of the histological sections stained with HES according to the conditions of the study (4 or 28 days after injection, of vehicle or HMPm).

Table 3. Summary of the histopathology scores (mean of n = 3 for vehicles and n = 6 for HMPm, NA: not applicable).

Time period	Group	Neutrophils	Lymphocytes	Plasma cells	Macrophages	Giant cells	Necrosis	Fibrosis	Fibrin	Cell or tissue degeneration	Tissue integration	Tissue ingrowth	Global score
Day 4	Vehicle	0	0.3	0	2	0	0	0	0	0.3	NA	NA	2
	HMPm	0.1	1	0	3	0.4	0	0	0	0.3	NA	NA	3
Day 28	Vehicle	0	0.3	0	3	0	0	1	0	0	1	1	3
	HMPm	0	0.5	0	2.7	0.3	0	1	0	0	1	1	2.7

Overall, the histopathologic examination showed that the local tissue reactions elicited by the HMPm and the vehicle were very similar in nature and severity. They both were well tolerated, causing an expected and appropriate macrophagic reaction (phagocytosis), but no acute or subacute reaction. The level of lymphocytic infiltration was extremely low. It can be noticed that there was no evolution over time, the reaction was stable, and that the HMPm tend to migrate, as there was no structure, such as a fibrotic capsule, to hold the product in place.

When considering the *in vitro* release time of the entire E₂ payload (i.e. 7 days), the persistence of HMPm after that in tissues would be irrelevant with this model API. Indeed, the HMPm were still present in tissues even after 28 days because of their full biocompatibility. Hence, this may suggest that either an improvement of the API retention would turn the HMPm into a very long-acting drug delivery system, or an enhancement of the microparticle degradability have to be studied. The HMPm could potentially degrade under the action of enzymes and generate metabolizable fatty acids, glycerol, and small chains of siloxanes (less than 7% of the entire mass). The latter compounds require longer degradation time lasting several months by oxidation/hydrolysis mechanisms inside macrophages, as described by Pfeiderer et al.²⁴ Indeed, they are uptaken by macrophages present in all tissues, and under the action of reactive oxygen metabolites generated by macrophages, they are biotransformed in functional groups containing silicon atoms bound to three or four oxygens. Such metabolites are transported to organs (i.e. liver, kidneys) and then excreted. If the microparticle biodegradation does not take place over a suitable period of time and their elimination is consequently delayed. An alternative will consist in developing monolithic and removable drug delivery devices made of ICOM.

4. Conclusion

In line with our previous studies, new hybrid microparticles were synthesized in two steps consisting of a silylation of castor oil then an emulsification throughout a thermostabilized emulsion process. In order to reduce the environmental impact, the green process requirements were fully complied here since no catalyst and no solvents other than water were used, thanks to the high sol-gel reactivity of ICOM. Resulting HMPm were 80 μm sized and presented high condensation yield and degree reflecting the crosslinking quality, and when loaded with E₂, they showed an outstanding loading efficiency. Moreover, the HMPm demonstrated a complete stability at room temperature, and the entrapped API was unaltered over 12 months. Release kinetics in a PBS/octanol biphasic system exhibited a one-week release profile, and the released E₂ was fully active on HELN ERα cells pointing out the formulation process quality. Finally, the HMP demonstrated their safety through their cytocompatibility on NIH 3T3 fibroblasts (ISO 10993-5 standard) and their full biocompatibility after subcutaneous injection on mice (ISO 10993-6 standard). Hence, HMPm proved to be a promising green and biocompatible drug delivery system that can substantially contribute in the area of long-acting and subcutaneously delivered systems.

5. Appendix A: Supplementary data

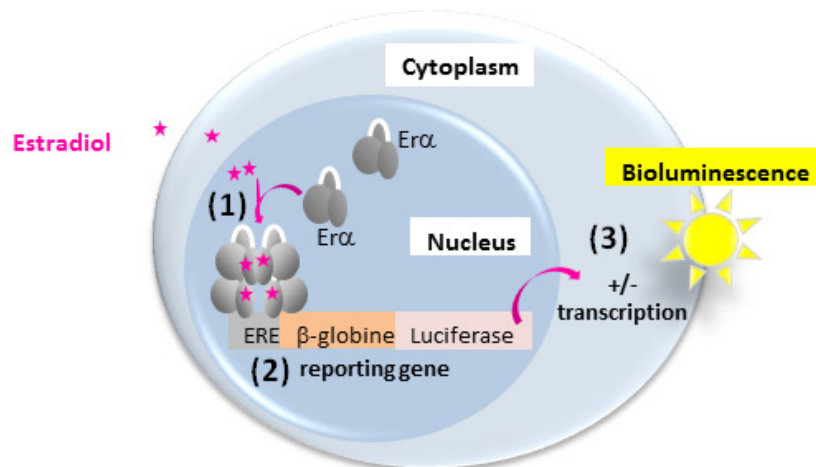


Fig. A.1. Scheme of the mechanism involved in HELN ER α cell bioluminescence as a model for the assessment of estradiol activity.

HeLa cells were transfected by means of plasmids encoding the human ER α with an estrogen-responsive element promoter fused to the luciferase gene. (1) Upon E₂ binding, the receptors ER α dimerize and undergo conformational changes to allow cofactor recruitment, then (2) the receptors directly bind DNA at estrogen response elements (EREs) coupled to luciferase gene in order to ensure the efficiency of the latter. (3) After luciferin addition, a luminescence directly related to the expression of the ER α gene is observed.

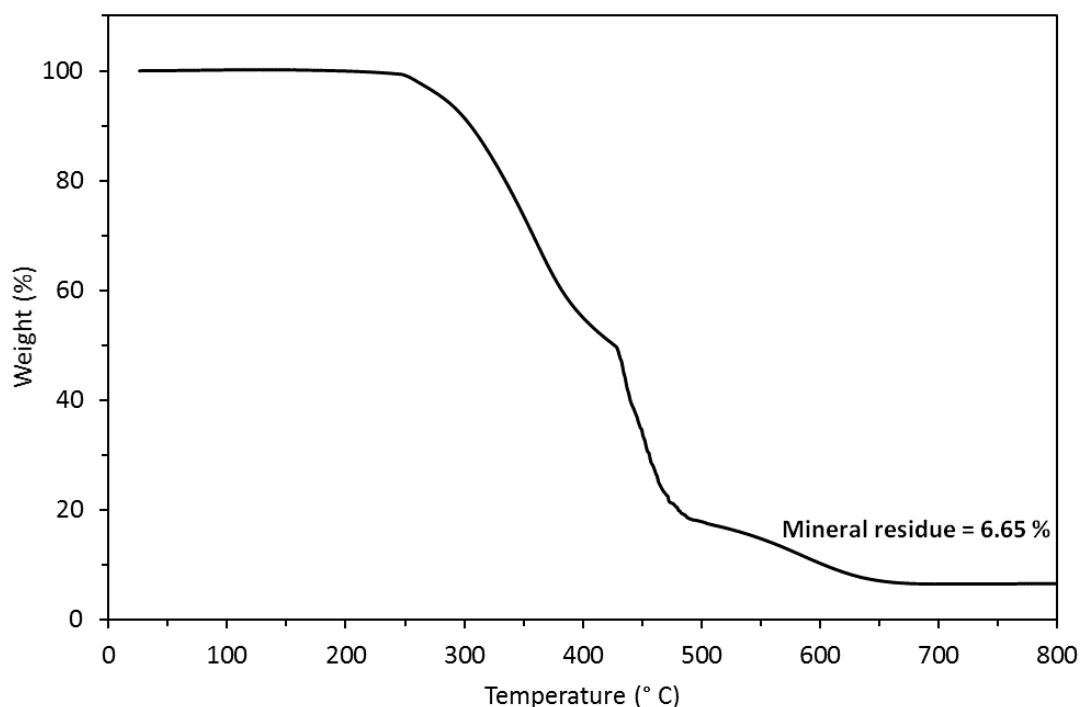


Fig. A.2. Thermogravimetric analysis of HMPm at 10 °C.min⁻¹ under airflow. The break point at 430 °C could be attributed to a sudden release of methanol from the hydrolysis of the residual methylsilanes.

6. Appendix B: Methodology of the NMR analyses and peak assignment

A. Methodology of the NMR analyses

NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance III 600 MHz NMR spectrometer, using TCI Cryoprobe Prodigy[®]. Chemical shift data are given in δ ppm calibrated with residual protic solvent (e.g. CDCl₃ : 7.26 ppm -¹H / 77.16 ppm – ¹³C). 2D heteronuclear spectra ¹H-¹³C g-edited HSQC and ¹H-¹³C g-HMBC were acquired to assign the compound (8 - 16 scans, 512 real (t1) \times 2048 (t2) complex data points). 2D heteronuclear spectra ¹H-²⁹Si g-HMBC (16 scans, 512 real (t1) \times 2048 (t2) complex data points) was obtained on a Bruker Avance III 500 MHz NMR spectrometer, using BroadBand Observable helium cryoprobe in order to establish presence of transesterification on silicium positions. Spectra were processed and visualized with Topspin 3.6.2 (Bruker Biospin) on a Linux station. CDCl₃ was purchased from Aldrich.

B. Recorded NMR spectra

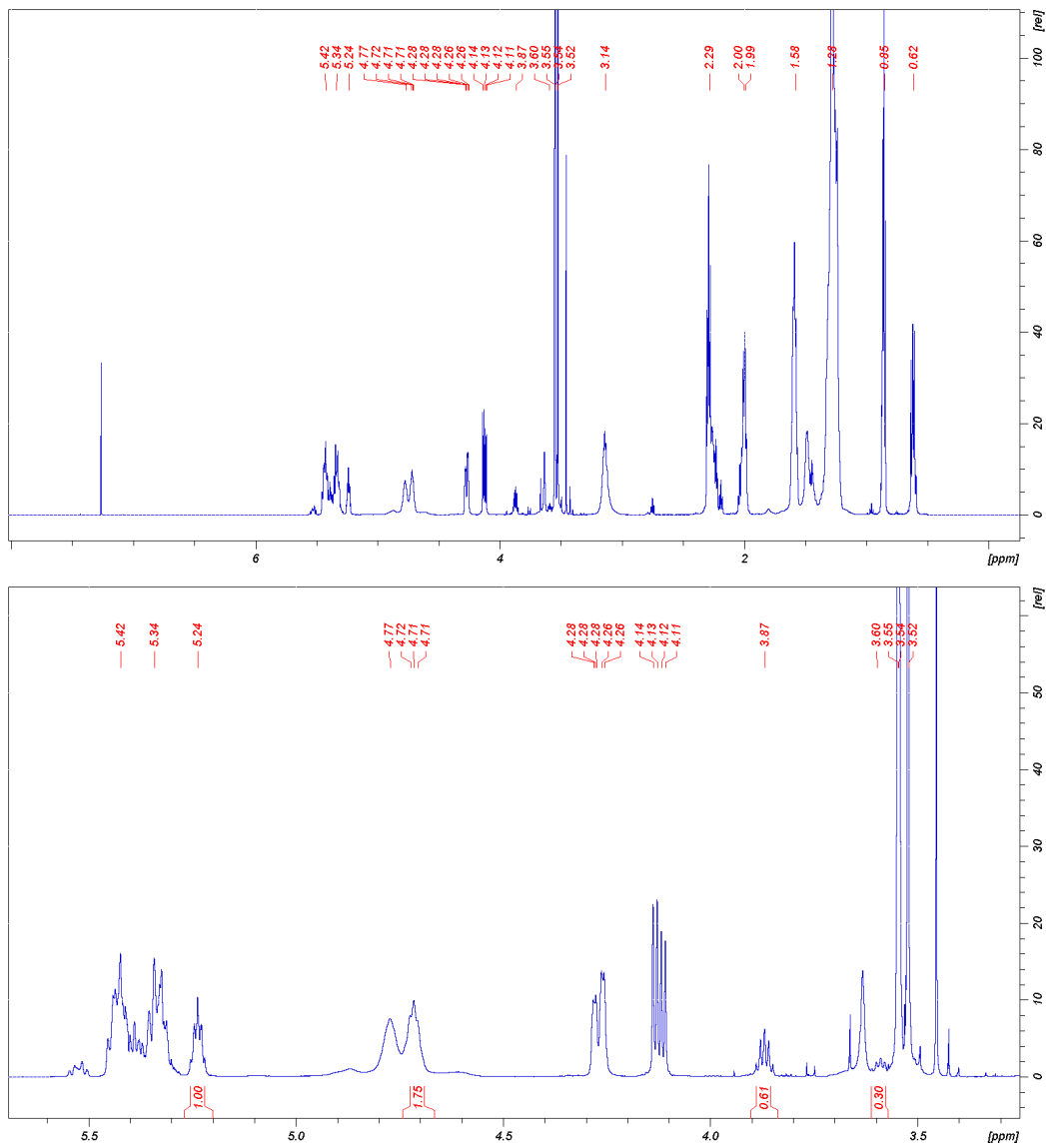


Fig. B.1. 1D ^1H NMR spectra (CDCl_3 , 600 MHz - full-scale and zoom)

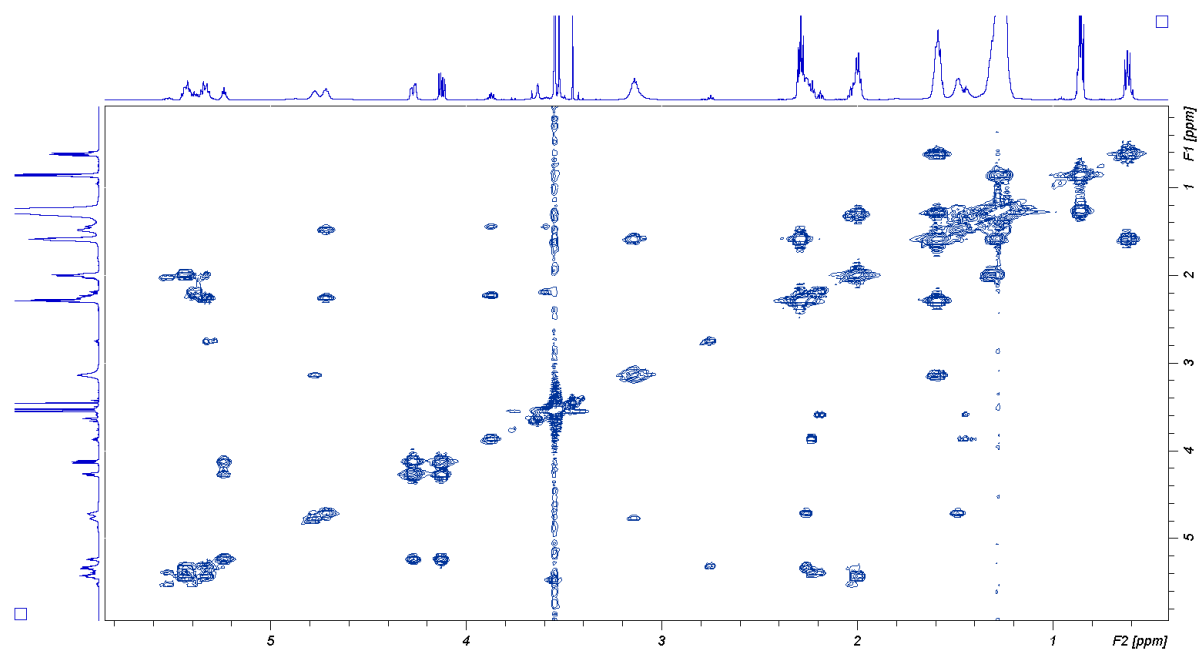


Fig. B.2. 2D ^1H - ^1H COSY spectrum (CDCl_3 , 600 MHz)

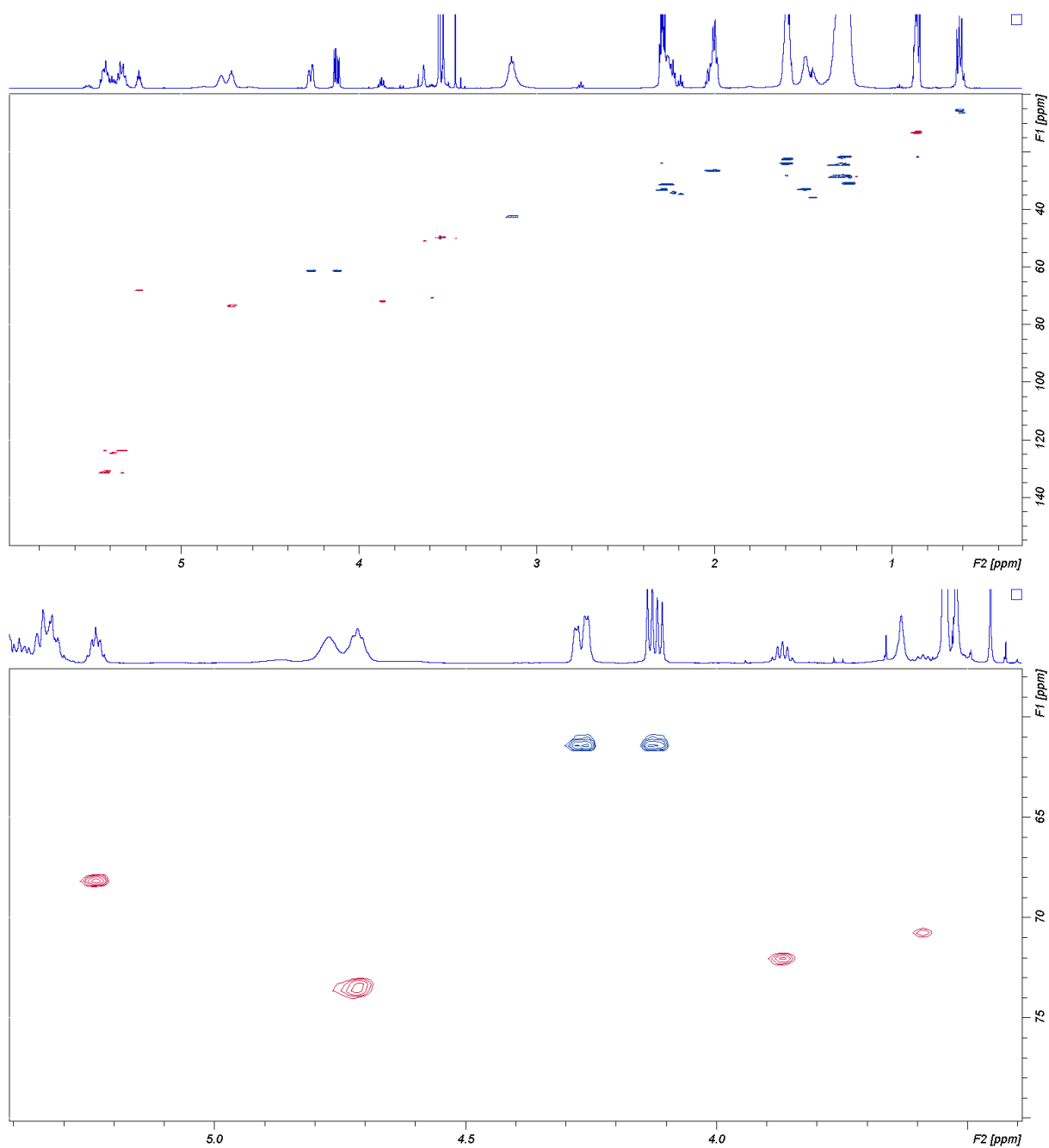


Fig. B.3. 2D ^1H - ^{13}C g-edited HSQC spectra (CDCl_3 , 600 MHz - full-scale and zoom)
 red tasks: CH/CH₃, blue tasks: CH₂

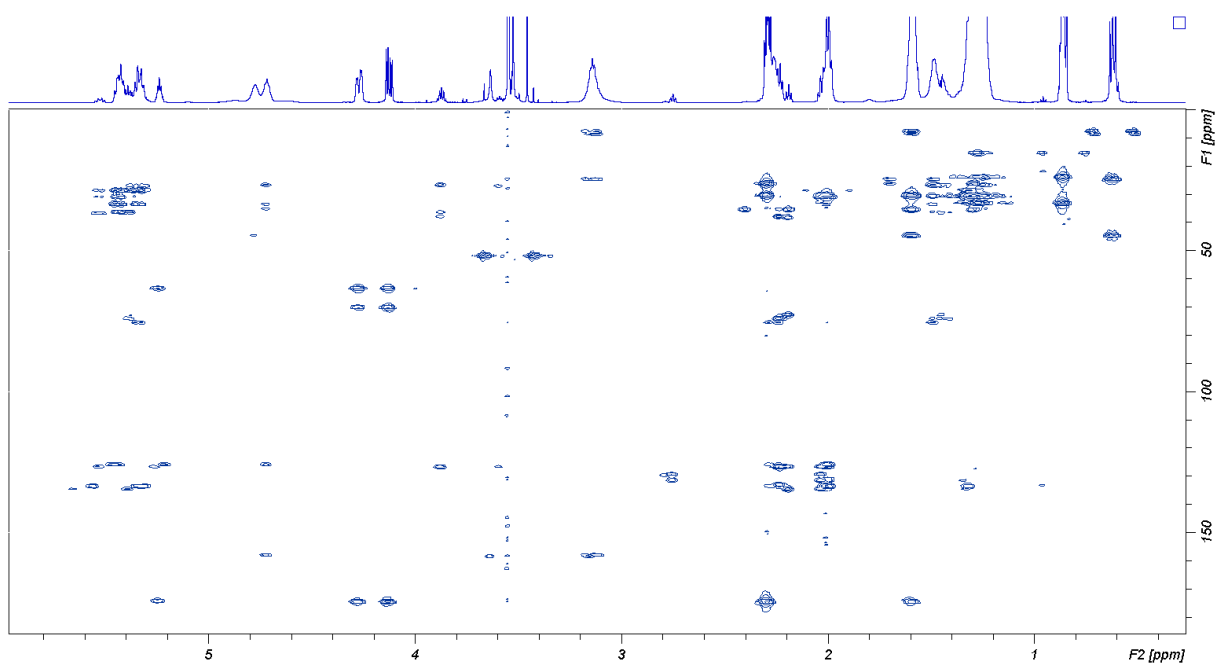


Fig. B.4. 2D ^1H - ^{13}C g-HMBC spectrum (CDCl_3 , 600 MHz)

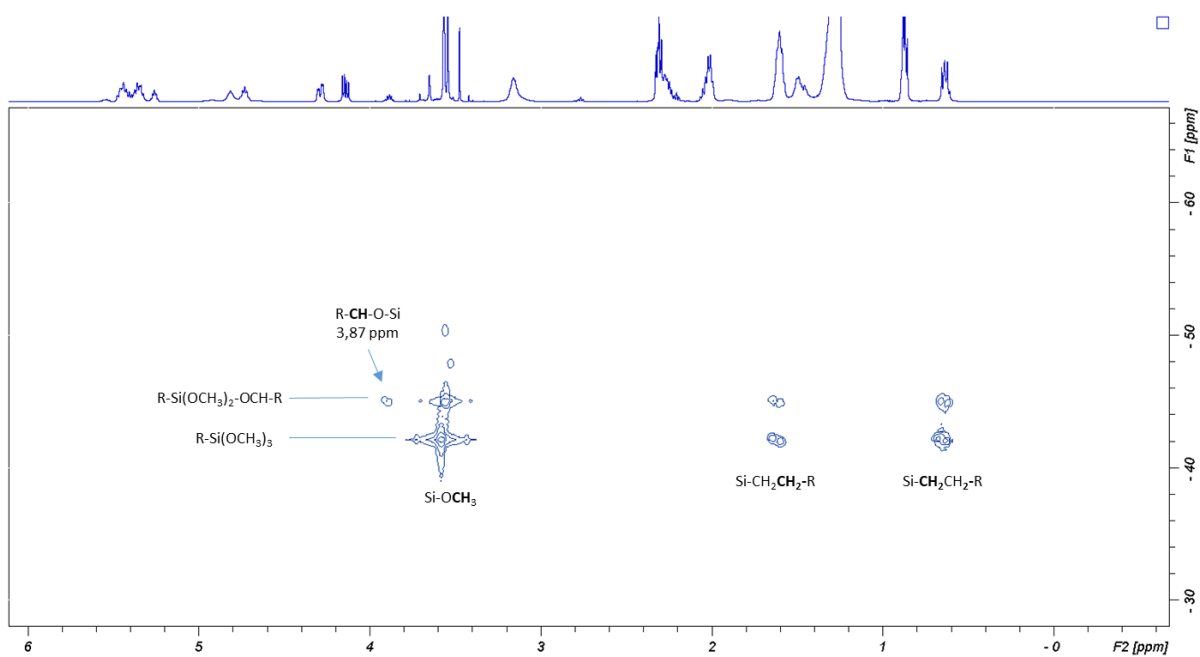


Fig. B.5. 2D ^1H - ^{29}Si g-HMBC spectrum (CDCl_3 , 500 MHz)

C. Peak assignment

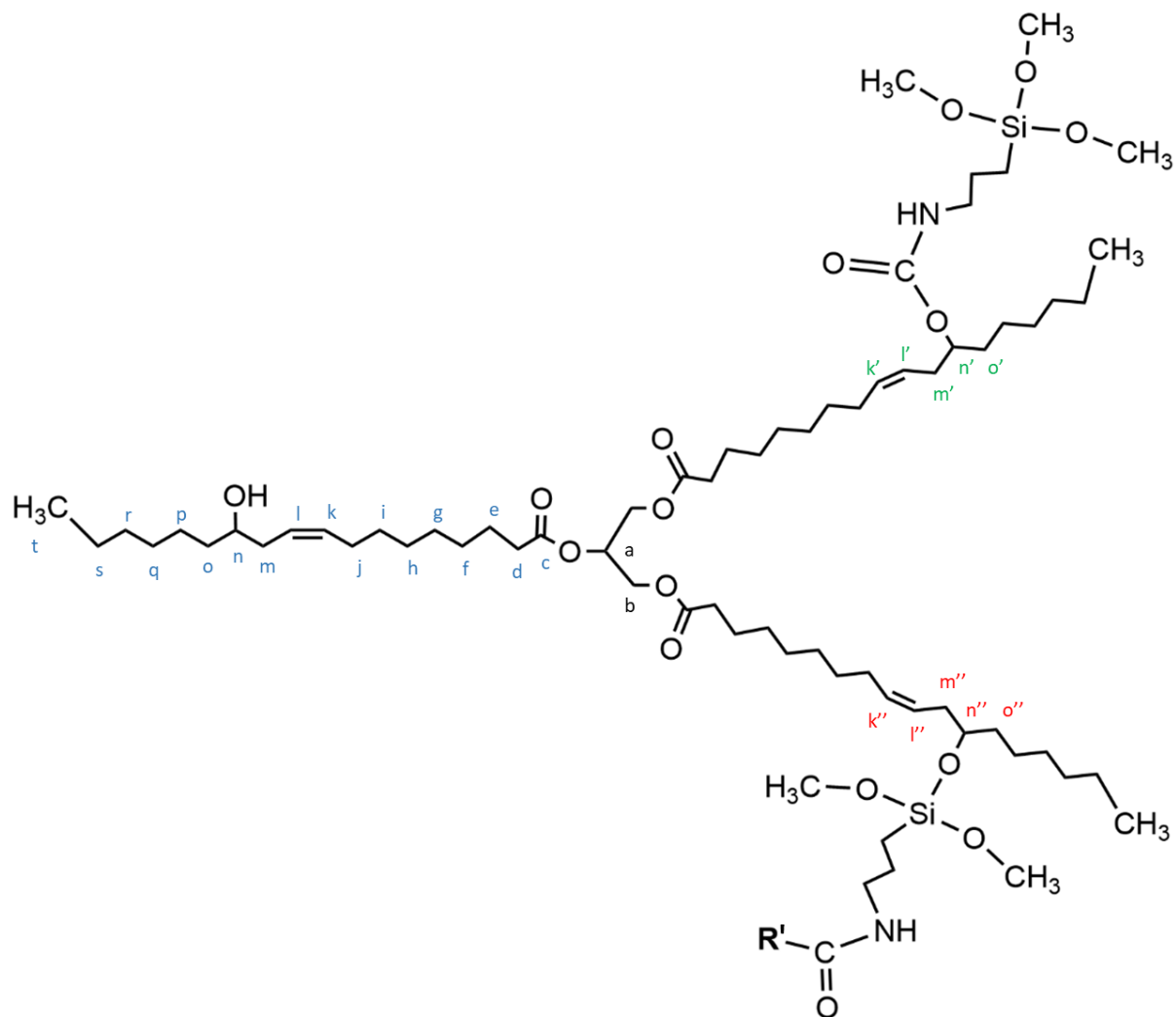


Fig. B.6. Chemical structure of ICOM with the various possibilities of silylation.

R-OH	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	R-O- IPTMS	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	R-O-Si-	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
a	5.24	68.1						
b	4.27 4.13	61.4						
c	-	172.4						
d	2.29	33.3						
e	1.59	24.1						
f/g/h/i/j /p/q/r/s								
k	5.41	131.0	k'	5.43	131.5	k''	5.41	131.0
l	5.38	124.7	l'	5.34	123.8	l''	5.38	124.7
m	2.19	34.7	m'	2.26	31.5	m''	2.23	34.3
n	3.59	70.7	n'	4.72	73.5	n''	3.87	72.0
o	1.44	35.9	o'	1.48	33.0	o''	1.44	35.9
t	0.86	13.4						
			NH-C(=O)- O	-	155.8			
			α	3.14	42.7			
			β	1.60	22.4			
			γ	0.62	5.6			
			NH	4.77	-			
			O-CH₃'	3.57	49.8	O-CH₃''	3.54	49.8

Table B.1. Assignment of the NMR peaks on the ICOM structure.

7. References

1. Sav, A. *et al.* Burden of treatment for chronic illness: a concept analysis and review of the literature. *Health Expect* **18**, 312–324 (2015).
2. Jones, G. B., Collins, D. S., Harrison, M. W., Thyagarajapuram, N. R. & Wright, J. M. Subcutaneous drug delivery: An evolving enterprise. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaaf9166 (2017).
3. Collins, D. S., Sánchez-Félix, M., Badkar, A. V. & Msrny, R. Accelerating the development of novel technologies and tools for the subcutaneous delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release* **321**, 475–482 (2020).
4. Chen, W., Yung, B. C., Qian, Z. & Chen, X. Improving long-term subcutaneous drug delivery by regulating material-bioenvironment interaction. *Advanced Drug Delivery Reviews* **127**, 20–34 (2018).
5. Bittner, B., Richter, W. & Schmidt, J. Subcutaneous Administration of Biotherapeutics: An Overview of Current Challenges and Opportunities. *BioDrugs* **32**, 425–440 (2018).
6. Hernández-Ruiz, V. *et al.* Subcutaneous Antibiotic Therapy: The Why, How, Which Drugs and When. *Journal of the American Medical Directors Association* S1525861020303637 (2020) doi:10.1016/j.jamda.2020.04.035.
7. P.V., J., Nair, S. V. & Kamalasanan, K. Current trend in drug delivery considerations for subcutaneous insulin depots to treat diabetes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **153**, 123–131 (2017).
8. Viola, M. *et al.* Subcutaneous delivery of monoclonal antibodies: How do we get there? *Journal of Controlled Release* **286**, 301–314 (2018).
9. Gao, Z., Crowley, W. R., Shukla, A. J., Johnson, J. R. & Reger, J. F. Controlled Release of Contraceptive Steroids from Biodegradable and Injectable Gel Formulations: In Vivo Evaluation. *Pharmaceutical Research* **12**, 864–868 (1995).
10. Vintiloiu, A. & Leroux, J.-C. Organogels and their use in drug delivery — A review. *Journal of Controlled Release* **125**, 179–192 (2008).
11. Kalicharan, R. W., Oussoren, C., Schot, P., de Rijk, E. & Vromans, H. The contribution of the in-vivo fate of an oil depot to drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics* **528**, 595–601 (2017).
12. Strickley, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharm Res* **21**, 201–230 (2004).
13. Riffkin, C., Huber, R. & Keysser, C. H. Castor Oil as a Vehicle for Parenteral Administration of Steroid Hormones. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **53**, 891–895 (1964).
14. Doufène, K. *et al.* Tunable vegetable oil / silica hybrid microparticles for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 118478 (2019) doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118478.
15. Loy, D. A., Baugher, B. M., Baugher, C. R., Schneider, D. A. & Rahimian, K. Substituent Effects on the Sol–Gel Chemistry of Organotrialkoxysilanes. *Chem. Mater.* **12**, 3624–3632 (2000).

16. Phillips, D. J., Pygall, S. R., Cooper, V. B. & Mann, J. C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64**, 1549–1559 (2012).
17. Phillips, D. J., Pygall, S. R., Cooper, V. B. & Mann, J. C. Toward Biorelevant Dissolution: Application of a Biphasic Dissolution Model as a Discriminating Tool for HPMC Matrices Containing a Model BCS Class II Drug. *Dissolution Technol.* **19**, 25–34 (2012).
18. Denninger, A., Westedt, U., Rosenberg, J. & Wagner, K. G. A Rational Design of a Biphasic Dissolution Setup—Modelling of Biorelevant Kinetics for a Ritonavir Hot-Melt Extruded Amorphous Solid Dispersion. *Pharmaceutics* **12**, 237 (2020).
19. Al Durdunji, A., AlKhatib, H. S. & Al-Ghazawi, M. Development of a biphasic dissolution test for Deferasirox dispersible tablets and its application in establishing an in vitro–in vivo correlation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **102**, 9–18 (2016).
20. Bellet, V. *et al.* Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research* **46**, 1912–1922 (2012).
21. Delfosse, V. *et al.* Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 14930–14935 (2012).
22. Guo, S. *et al.* Extended Release of Native Drug Conjugated in Polyketal Microparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 6127–6130 (2016).
23. Qureshi, S. A. & Shabnam, J. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **12**, 271–276 (2001).
24. Pfleiderer, B., Moore, A., Tokareva, E., Ackerman, J. L. & Garrido, L. Biodegradation of polysiloxanes in lymph nodes of rats measured with ²⁹Si NMR. *Biomaterials* **20**, 561–571 (1999).

Deuxième Partie

Les Microparticules Hybrides

Approches de Synthèse par Microfluidique

❖ **Chapitre IV – La Microfluidique, les Microgouttelettes et les Phases Continues Aqueuses** **p. 173**

Après avoir mis en évidence les verrous liés à la génération de gouttelettes en phase continue aqueuse par microfluidique, ce chapitre bibliographique reprend les différentes stratégies adoptées dans la littérature pour y faire face, ainsi que les différents résultats obtenus par la communauté scientifique.

❖ **Chapitre V – La Microfluidique Appliquée à la formulation des Microparticules Hybrides** **p. 213**

Ce dernier chapitre se penche sur la formulation des microparticules hybrides par microfluidique à travers trois volets : la fabrication d'un dispositif microfluidique innovant apte à générer des gouttelettes d'huile silylée de façon stable et continue, l'adaptation de la chimie de réticulation sol-gel aux conditions microfluidiques, et la mise en place d'une preuve de concept quant à la génération de microparticules hybrides.

Chapitre IV

**La Microfluidique,
les Microgouttelettes
&
les Phases Continues Aqueuses**

La microfluidique est une science ayant pour sujet d'étude le comportement des fluides dans des micro-canaux, et une technologie dédiée à la fabrication de dispositifs pour les laboratoires sur puces (concept du « *lab-on-a-chip* »).¹ Elle est incontestablement l'un des domaines scientifiques les plus fascinants que les chercheurs ont développé au cours des deux dernières décennies dans un large éventail de disciplines : santé, cosmétique, énergie, biotechnologies, environnement, agro-alimentaire (schéma ci-dessous). Et les exemples d'application commencent à apparaître dans notre quotidien : têtes d'imprimante à jet d'encre, test de grossesse urinaire, test sanguin pour le dépistage du sida, papier électronique (ex. liseuses, étiquettes).² Toutefois cette science est complexe et nécessite non seulement de maîtriser un nombre considérable de paramètres, mais également de surmonter de multiples obstacles. C'est notamment le cas en formulation, où la microfluidique peut être utilisée pour générer de microgouttelettes et former des émulsions et des microparticules pharmaceutiques, alimentaires ou cosmétiques. En effet, les propriétés physiques des liquides aux échelles micrométriques étant particulières, la génération de gouttelettes dans les dispositifs microfluidiques est un grand défi à relever, d'autant plus quand la phase continue du système est aqueuse.

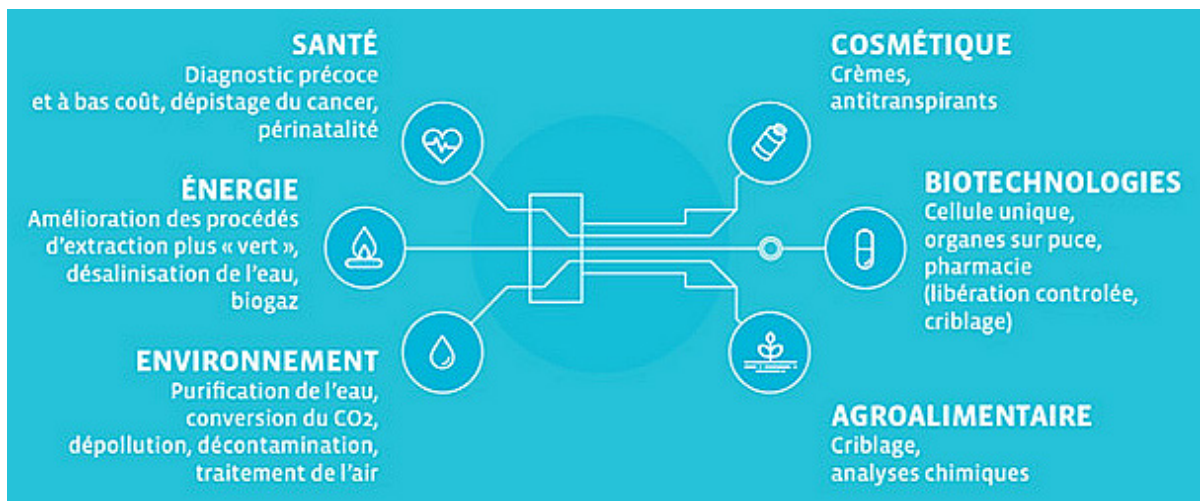


Schéma récapitulatif des différentes disciplines scientifiques auxquelles la microfluidique a été transposée. Adapté à partir de la réf. 3.

Ce IV^e chapitre, sous forme d'une revue publiée dans le journal « *Langmuir* », se veut être une initiation pour ceux qui voudraient générer des microgouttelettes dans des systèmes microfluidiques impliquant des phases continues aqueuses. Il offre un aperçu de l'état de l'art de ces systèmes, en se concentrant sur les dispositifs microfluidiques utilisés, leurs applications pour former une grande variété

d'émulsions et de particules, ainsi que sur le rôle critique de l'interface entre les canaux du dispositif et l'émulsion générée. Ce chapitre conduit également à des réflexions sur les nouveaux matériaux pouvant être utilisés dans les systèmes microfluidiques à phases continues aqueuses pour la génération de microgouttelettes. En outre, il ouvre des perspectives pour nos travaux de recherche axés sur l'application de la microfluidique pour la synthèse des microparticules hybrides, décrits dans le V^e et dernier chapitre de ce manuscrit.

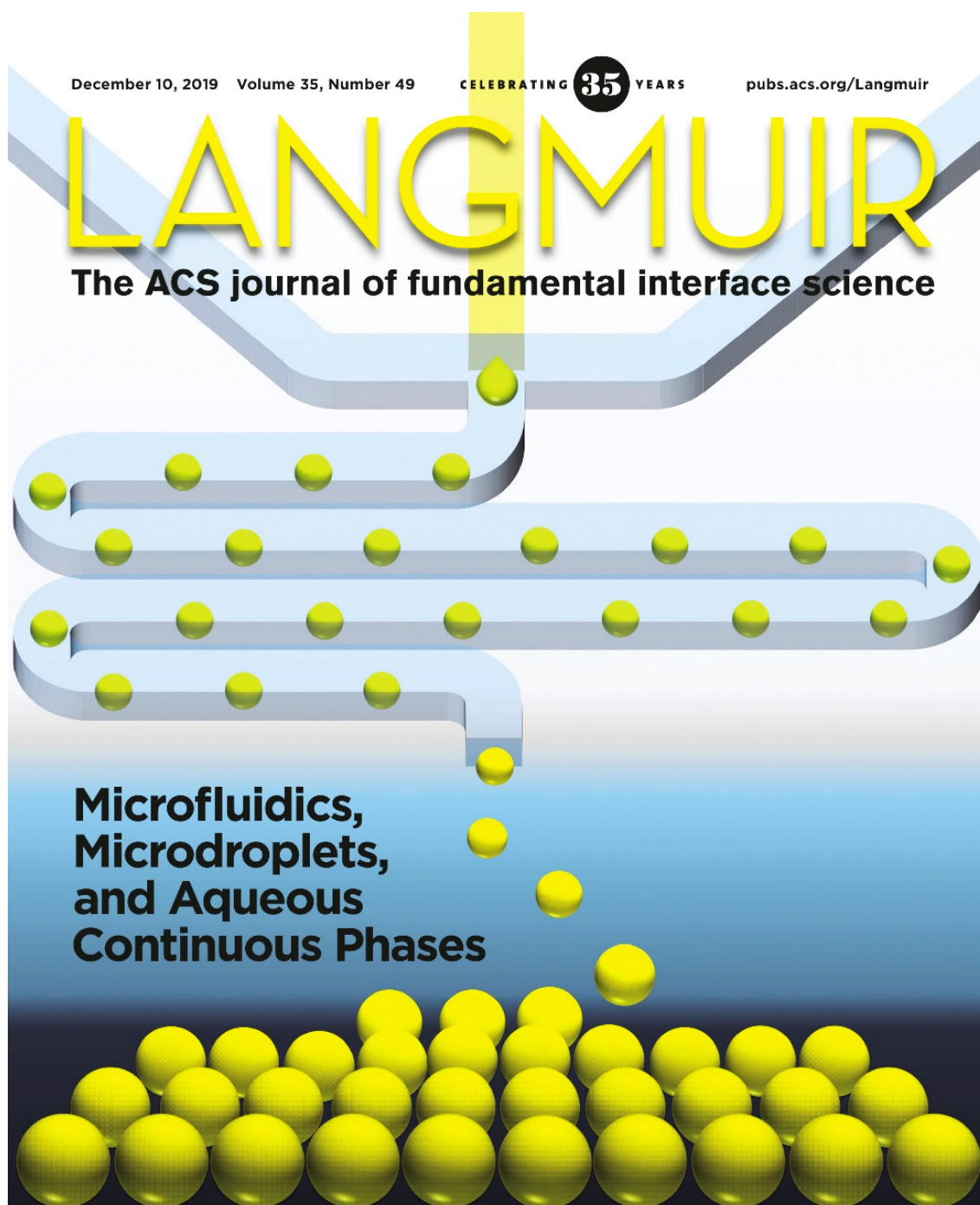
Références bibliographiques

1. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
2. Nardello-Rataj Véronique & Ontiveros Jesús Fermin. Microfluidique et formulation Émulsions et systèmes colloïdaux complexes. *Techniques de l'ingénieur* (2019).
3. Institut Pierre Gilles de Gennes. Aventures microfluidiques - Le projet Lutétium. https://www.institut-pgg.fr/Comprendre-la-microfluidique_65.html.

Microfluidic Systems for Droplet Generation in Aqueous-Continuous Phases: A Focus Review

Doufène, K., Tourné-Péteilh, C., Etienne, P. & Aubert-Pouëssel, A. *Langmuir* **35**, 12597–12612 (2019).

DOI : 10.1021/acs.langmuir.9b02179



Summary

1. Introduction	180
2. Problem of droplet generation in aqueous continuous phase systems	181
3. Microfluidic devices for aqueous-continuous phase systems	183
3.1. Glass-based devices	185
3.2. Norland Optical Adhesive devices	190
3.3. Polyurethane devices	191
3.4. Polydimethylsiloxane devices	192
3.5. Miscellaneous devices	195
4. Enhancement of the Device walls - Aqueous continuous phase affinity	195
4.1. Plasma treatment	197
4.2. Layer-by-layer deposition of hydrophilic electrolytes	200
4.3. Sol-gel grafting of hydrophilic coatings.....	201
4.4. Photo-initiated grafting of hydrophilic compounds.....	203
4.5. Dynamic surface modification	204
5. Conclusion and perspectives	206
6. References	207

Figures

Fig. 1. Three main categories of microfluidic devices: (a) co-flowing device, (b) flow-focusing device and (c) T-junction device.....	181
Fig. 2. Examples of microfluidic devices with geometry adapted to the droplet generation in aqueous continuous phases	182
Fig. 3. Microfluidic emulsification in two individual flow-focusing devices with different surface energies.....	183
Fig. 4. Co-axial glass capillary devices in various settings.....	188
Fig. 5. Schematics of the channel layouts on lab-made glass chips.....	189
Fig. 6. Schematic diagram of NOA microfluidic chip fabrication by soft lithography.....	190
Fig. 7. Design of the microfluidic device for the preparation of a W/O/W emulsion with an ultra-thin oil phase layer	194
Fig. 8. Plasma treatment of PDMS surfaces and hydrophobic recovery.....	200
Fig. 9. (a) Schematic of the layer-by-layer surface modification of a PDMS microchannel. (b) Schematic of the polyelectrolyte multilayer building up at the channel wall.....	201
Fig. 10. Schematic view of the PDMS modification process by sol-gel grafting of a hydrophilic coating	202
Fig. 11. Photo-initiated grafting of hydrophilic compounds on the PDMS microchannel walls	204

Fig. 12. Schematic that illustrates the effect of surfactant molecule adsorption on the wetting properties.205

Tables

Table 1. Microfluidic device materials, characteristics and applications184

Table 2. Effects of flow rate and viscosity of the phases on the size and morphology of double emulsions obtained in a co-axial glass capillary device.....188

Table 3. Summary of hydrophilic surface treatments applied to microfluidic devices made of polydimethyl-siloxane (PDMS)196

Table 4. Summary of hydrophilic surface treatments applied to microfluidic devices made of various materials197

1. Introduction

Defined as “the science and technology of systems that handle small volumes of fluids (10^{-9} to 10^{-18} liters) using channels as large as a few dozen micrometers" by G. Whitesides,¹ microfluidics nowadays is experiencing a rapid growth mainly because of its wide range of applications in all scientific disciplines. Whether in the formulation of drugs or food products, the design of *in situ* drug delivery systems, performing microanalysis or in micro-electro-mechanical systems engineering, microfluidics is the tool of choice for laboratory miniaturization (lab-on-a-chip concept) in order to save time and reagents, to control physicochemical phenomena and to avoid the risks of bulk handling to manipulators. Among all microfluidic systems, those intended for the generation of microdroplets have inspired many researchers and led to various innovations.^{2,3} Typically, most of these systems are composed of several components: pumps (\pm pressure controllers), tubing, temperature controllers, flowing phases and a microfluidic device as the core element. The latter comes in various forms ranging from connected tubing and capillaries to chips with embedded channels. The internal architecture, however, makes it possible to constitute three main categories depending on the geometry of the channels : (i) Co-flowing devices (Figure 1-a), in which the continuous and discontinuous phases (i.e., liquids that will form the emulsion) flow in the same direction at the junction; (ii) Flow-focusing devices (Figure 1-b), in which the continuous phase flows from two opposite channels and perpendicularly to the discontinuous phase flow; and (iii) T-junction devices (Figure 1-c), that are similar to the flow-focusing devices except that the continuous phase flows from a single channel. A major interest for microdroplet-generating systems is noted in the community of food, cosmetic, and pharmaceutical product formulators, particularly in order to go beyond the limits of the emulsification techniques traditionally used.⁴ Several industrial companies have specialized in this field such as Emultech (The Netherlands), Capsum (France) and Microcaps (Switzerland). Indeed, the microfluidic applied to formulations permits the entrapment of sensitive or poorly water-soluble molecules under soft conditions⁵⁻⁷, to generate highly monodisperse droplets (CV lower than 5 %) with adjusted sizes⁸ and to reduce the raw materials used, which are often expensive.

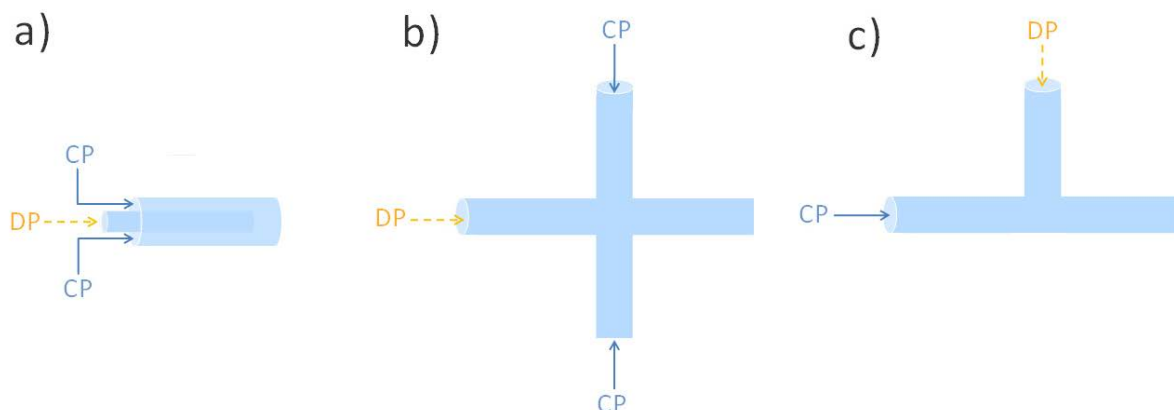


Fig. 1. Three main categories of microfluidic devices: (a) co-flowing device, (b) flow-focusing device and (c) T-junction device. CP: continuous phase ; DP: discontinuous phase.

With regard to the technical side, microfluidics applied to formulations involves the use of a discontinuous phase that contains products to be entrapped and a continuous immiscible phase, all to generate microdroplets that could be further processed into microparticles. In such a context, it seems in the literature that more and more organic⁹ or hybrid¹⁰ lipid-based matrices are intended to entrap products to be formulated, thus requiring the use of a wide variety of aqueous continuous phases.

In this review, we describe microfluidic systems for the generation of droplets with a focus on those involving aqueous-continuous phases. Typically, these systems enable the formation of Oil-in-Water (O/W) or Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) emulsions mainly exploited in formulation discipline, beside which Water-in-Water (W/W) and Oil-in-Water-in-Water (O/W/W) emulsions are more original but are emerging in microfluidics.¹¹ We report the devices described in the literature and their applications, and we expose problems caused by the incompatibility of most device materials with aqueous continuous phases as well as solutions provided by the authors to solve them. In all that follows, unless otherwise stated, we use the term “device walls” to the walls of the junction where the microdroplets are formed or to the following channels until the device outlet.

2. Problem of droplet generation in aqueous continuous phase systems

During an emulsification process, the inertial, gravitational, viscous and interfacial tension forces are applied on the two immiscible phases and govern the generation of droplets and their successive stability inside the device. As a miniaturization of the dimensions occurs within microfluidic devices, the viscous and interfacial tension forces tend to be more determinant in

the process than the others. Concerning the viscous force, typically in aqueous-continuous phase systems, the continuous phase has low viscosity (η_c) close to 1 mPa·s while the discontinuous phase, generally made of oil, is more viscous (η_d). Hence, the ratio η_d / η_c tends to be high ($\eta_d / \eta_c \gg 1$, contrary to oil continuous phase systems) and disfavors droplet generation, especially within flow focusing devices.¹² To overcome this inconvenience, two strategies were adopted in the literature : some authors have added viscous agents within the continuous phase in order to reduce the viscosity ratio, such as glycerol¹³⁻¹⁷ or poly(ethylene glycol) (PEG).¹⁸ Other authors worked on the design of the device and prepared flow-focusing devices with a constriction^{19,20} or an extended nozzle²¹ to focus the shear stress on a small surface at the meeting point of the phases and further break up the discontinuous phase into microdroplets (Figure 2). Nie *et al.*¹⁹ noticed that for high η_d / η_c ratios the size of the droplets depends on the channel dimensions rather than the phases flow ratio ensuring however a good monodispersity (CD < 5 %). More recently, simulations based on a coupled level-set and volume-of-fluid method were applied to predict the sizes of droplets made of highly viscous polymer (640 mPa·s) generated in a flow-focusing device with channels of 100 μm width.²² However, the authors pointed out limitations related to the addition of surfactant in the aqueous continuous phase preventing such simulations to predict the droplet sizes.

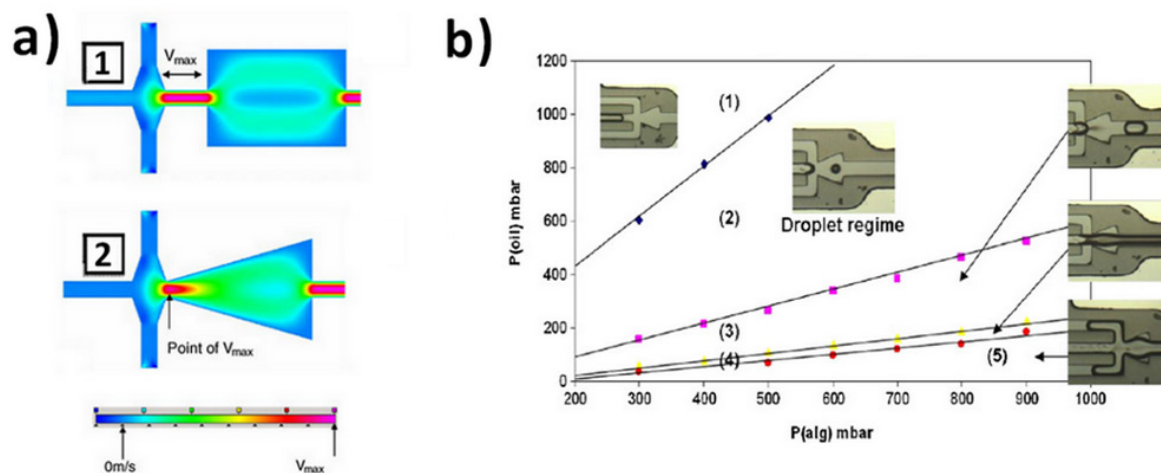


Fig. 2. Examples of microfluidic devices with geometry adapted to the droplet generation in aqueous continuous phases: (a) Flow-focusing device with a constriction connected to a subsequent (1) rectangular expansion or (2) extended nozzle. The velocity scale is attached to the bottom of the schemes. (b) Flow regime diagram of a viscous discontinuous phase emulsified in a device with constriction and extended nozzle. The droplet regime (2) was ensured in a wide range of phase pressures. Oil: mineral oil with surfactant (continuous phase); Alg: 1.25 wt% alginate solution (discontinuous phase). Reproduced with permission from refs. 21 and 23. Copyright 2006 and 2010 Elsevier.

Regarding interfacial tension forces, the interactions between the liquid and the walls of the device play a key role in microfluidic systems. Dreyfus *et al.*²⁴ showed that ordered patterns of

the discontinuous phase (drops, pears and pearl necklaces) can be obtained when the continuous phase completely wets the device walls, whereas disordered patterns were produced when the wetting was partial. It was explained by a “jumping” phenomenon of the continuous phase molecules throughout the wall, resulting in turbulence in straightflow. On their side, Xu and colleagues^{15,25} concluded that the disordered pattern formation was due to a high affinity of the discontinuous phase for the device walls, leading to a partial adhesion in absence of surfactant. Furthermore, Seo *et al.* were able to invert an emulsion produced in microfluidic devices by changing the material used for the channels (hydrophilic vs. hydrophobic)²⁰ or by treating it.²⁶ Hence as shown in Figure 3, a W/O emulsion was obtained with a PDMS device (water contact angle = 110°) whereas an O/W emulsion was obtained with a polyurethane device (water contact angle = 86°) or a PDMS device treated with acrylic acid (water contact angle = 73°). In all cases, the water phase was supplied by either the outer or central channels.

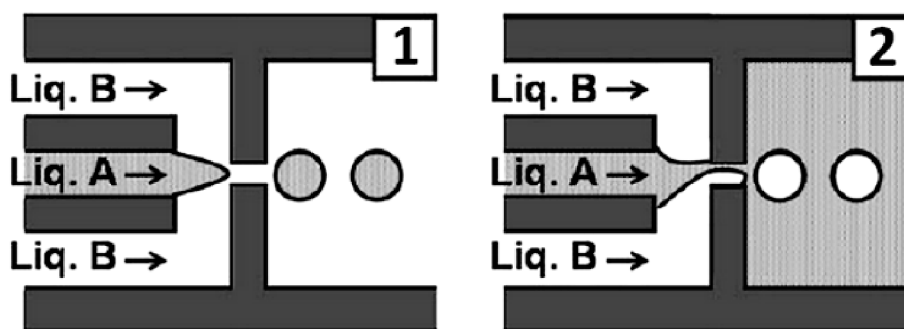


Fig. 3. Microfluidic emulsification in two individual flow-focusing devices with different surface energies. In (1) and (2) the same liquids, liquids A and B, are supplied to the central and the side channels, respectively. In (1), liquid B has better wettability for the device material than liquid A. Droplets of liquid A are generated by the periodic break up of the thread of liquid A. In (2), liquid A has a high affinity for the material of the device. Droplets of liquid B are formed by shearing off a stream of liquid B. Reproduced with permission from ref. 26. Copyright 2007 Royal Society of Chemistry.

In the particular case of W/W or O/W/W emulsions, the water-water interface provides an additional challenge for forming stable microdroplets. Indeed the interfacial tension between the aqueous phases of such systems is extremely low, ranging from 10^{-6} to 10^{-4} N/m (i.e., 100-1000 times lower than the interfacial tension of typical O/W interfaces). The low interfacial tension then leads to a reduction in the driving force for liquid jets to break up into droplets.²⁷

3. Microfluidic devices for aqueous-continuous phase systems

A high affinity between the continuous phase and the walls of the microfluidic device is crucial to controlling the generation of stable microdroplets. Herein, the affinity enhancement is defined as a minimization of the free energy on the interface between the continuous phase

and the walls in order to improve the wettability. To do that two strategies are possible, either by adjusting the wall material or by decreasing the surface tension of the continuous phase. Furthermore water and aqueous solutions remain some of the most challenging continuous phases to handle in microfluidic systems because of their high surface tensions ($72.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ for water at $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Some materials such as glass,^{13,28} polyurethanes,^{29,20,19} and hydrophilic UV-curable polymer “Nortland Optical Adhesive (NOA)”^{30–32,17} are suitable for droplet generation in aqueous-continuous phase with respect to their affinity toward aqueous solutions. However, it is difficult to design microfluidic devices with such materials because they require specific equipment and they are not always accessible in laboratories. In contrast, more easy-to-use materials, mainly polydimethylsiloxane (PDMS),³³ are hydrophobic and have to be hydrophilized in order to obtain systems that generate stable microdroplets. In this section, we report the state-of-the-art regarding materials used for the design of microfluidic devices applied to systems with aqueous continuous phases, as well as the various applications given to these devices. The respective characteristics and applications are summarized in Table 1.

Table 1. Microfluidic device materials, characteristics and applications

Material	Characteristics	Devices	Generated objects	Ref.	Applications
Glass	High strength High rigidity High chemical stability Impermeability Transparency High cost	▪ Co-axial capillaries	Lipid microcapsules	16,34–36	Drug encapsulation (proteins, incompatible drugs in multi-compartmental particles) and food technology.
			▪ Chips	Polymersomes	
		Polymer microcapsules		18,38	
		Microparticles		39	
			W/O/W emulsion	28,40	
Nortland Optical Adhesives	Easy molding High resistance to solvent	▪ Chips	O/W emulsion	17,31,32,41	

Material	Characteristics	Devices	Generated objects	Ref.	Applications
Poly-urethane	High resistance to deformation High stiffness Impermeability Transparency	▪ Chips	O/W emulsion	19,20,29	Bioanalytical technology
	Flexibility Easy molding Resistance to water UV light transparency				
Poly-dimethyl-siloxane	Easy molding Flexibility Gas permeability Instability Low cost Transparency	▪ Chips	O/W emulsion	42–45	Drug encapsulation, cytometric analyses and micro-electro-mechanical systems
			W/O/W emulsion	42–44,46–48	
			Polymer microparticles	49,50	
			Polymersomes	51–53	
			Microdroplets	54	

3.1. Glass-based devices

Glass is a hydrophilic material mainly composed of SiO_2 in the amorphous state, with other oxides. Depending on its composition and manufacturing process, glass can exhibit high strength and rigidity, high chemical stability against solvents and catalysts as well as transparency to UV and visible light. In the summarized papers for this review, the composition of the glass-based devices was not well described except by Abbaspourrad and his team,^{34,35,38} who use borosilicate glass as the material for their microfluidic devices (i.e., a combination of boric oxide, silica sand, sodium carbonate, and alumina that shows high physical, thermal, and chemical resistance). With regard to the design, two kinds of microfluidic glass-based devices were described in the literature: co-axial glass capillaries and glass chips. As its name suggests, co-axial glass capillaries are one or two cylindrical capillaries made of glass, disposed coaxially and nested into a square one. O/W and W/W emulsions can be produced using one cylindrical

capillary in co-flowing (Figure 4-a) or flow-focusing (Figure 4-b) systems whereas two capillaries are used to generate W/O/W or O/W/W double emulsions in co-flowing + flow-focusing (Figure 4-c) or double co-flowing (Figure 4-d) systems. The phases flow typically over a range of $10^3 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ for the continuous phase and $10^2 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ for the middle and inner phases. The device was first described by Utada et al.¹³ with the objective of microcapsule synthesis by hardening the middle phase of W/O/W emulsions. The size of the microdroplets was tuned by varying the diameter of the exit orifice from 20 to 200 μm and uncore with thin or thick shell (from 3 % up to 40 % of the radius) as well as multi-core double emulsions were successfully obtained when the flow rates of the three phases were tuned. The device has since been extensively reproduced and then applied in food technology^{34,35,38} and drug encapsulation,^{6,14,16,36} especially to stabilize and protect the entrapped compounds. As examples, Comunian et al. developed solid lipid microcapsules by a temperature shift of a W/O/W emulsion. The capsule sizes ranged from 195 to 340 μm with a thin shell of solidified palm oil, and the core contained either ascorbic acid³⁴ or food pigments.³⁵ In the same way Ravanfar et al.³⁸ encapsulated, via an O/W/W emulsion, fish oil inside a polymerized shell of a protein-polysaccharide complex (whey protein-beet pectin) with a 125 μm size. For their part, Weitz and collaborators^{16,36} proved the concept of drug formulation within solid lipid microcapsules templated from W/O/W emulsion. The middle phase of the emulsion was composed of Suppocire[®] AIM (hard fat, Gattefossé, France) that has a melting point slightly lower than body temperature (33-35°C). Thus it permitted the formation of a solid shell around an aqueous core that contained 0.2 % FITC-dextran and a subsequent release after heating at body temperature (37 °C). Furthermore, the double encapsulation of potentially incompatible active compounds in W/O/W emulsions were demonstrated^{16,55} when two distinct innermost phases co-flowed separately within two parallel capillaries to form a multi-core double emulsion. A co-axial glass capillary device was also designed by Pessi et al.¹⁸ to generate a W/O/W emulsion that entraps 1 % of bovine serum albumin (BSA, a model protein) in the innermost phase, surrounded by a polycaprolactone shell initially dissolved in ethyl acetate. The microcapsules were in the size range of 23 to 47 μm depending on the diameter of the collecting capillary and showed a sustained release of the BSA in a physiologically simulated medium. Lorenceau, Shum and respective co-workers^{14,37} have operated coaxial glass capillary devices to generate W/O/W double emulsions as an ingenious platform for drug encapsulation in biodegradable polymersomes (ie. vesicles made of an aqueous core and polymers in the shell); the inner aqueous phase contained the drug in aqueous solution, the middle phase was composed of diblock polymers (either poly(ethylene glycol)-*b*-poly(lactic acid)³⁷ or

poly(normal-butyl acrylate)-poly(acrylic acid)¹⁴) dissolved in organic solvents and the outer phase was a mixture of water and 80 % of glycerol¹⁴ or 10 % of PVA.³⁷ Shum *et al.*²⁷ have also worked on W/W emulsions with co-axial glass capillary devices. They used a solution of PEG (17 wt.%) and calcium chloride (1 wt.%) as the dispersed phase and dextran solution (16 wt.%) with sodium carbonate (1 wt.%) as the continuous phase with flow rates of 50 $\mu\text{L}/\text{h}$ and 5000 $\mu\text{L}/\text{h}$, respectively. Mechanical shaking was applied to the tubing of the dispersed phase to control the formation of monodispersed droplets whereas their gelation was completed by the precipitation of the calcium carbonate.

To design the production of double emulsions in co-axial glass capillary devices, Nabavi and co-workers⁴⁰ developed a three-phase axisymmetric numerical model and then performed parametric analyses on a co-flowing + flow-focusing glass capillary device (Figure 4.c). They used a continuous phase ($\eta=7.91$ mPa·s) composed of 58 % water, 40 % glycerol and 2 % PVA, a middle phase ($\eta=10.37$ mPa·s) containing 98 % PDMS and 2 % xiameters[®] rsn-0744 resin (UNIVAR), and an inner phase ($\eta=1.24$ mPa·s) composed of water with 5 % glycerol. The numerical model successfully predicted the generation of uni- and multi-core double emulsions and permitted to investigate the effects of device geometry, flow rates and physicochemical properties of the three phases on the size, morphology, and generation rate of double emulsions (Table 2). Briefly, the most important results concerning the impact of flow rates were the following: (i) the internal and external diameters of the double emulsion decrease when the flow rate of the continuous phase increases, whereas the generating frequency increases; (ii) the internal diameter decreases when the flow rate of the middle phase increases, whereas the external diameter increases and (iii) both the diameters increase when the flow rate of the inner phase increases. Regarding the impact of viscosity, the team tuned them and found that (iv) the internal and external diameters of the double emulsion decrease when the continuous phase viscosity increases, whereas the generating frequency increases and (v) the number of inner droplets increases (ie. multi-core double emulsions are formed) when the inner phase viscosity decreases.

Table 2. Effects of flow rate and viscosity of the phases on the size and morphology of double emulsions obtained in a co-axial glass capillary device.

Phase flow rate			droplet diameter		Comments
inner	middle	continuous	internal	external	
-	-	↗	↘	↘	↗ generating frequency
-	↗	-	↘	↗	-
↗	-	-	↗	↗	-

Viscosity			droplet diameter		Comments
inner	middle	continuous	internal	external	
-	-	↗	↘	↘	↗ generating frequency
↘	-	-	-	-	↗ number of inner droplets

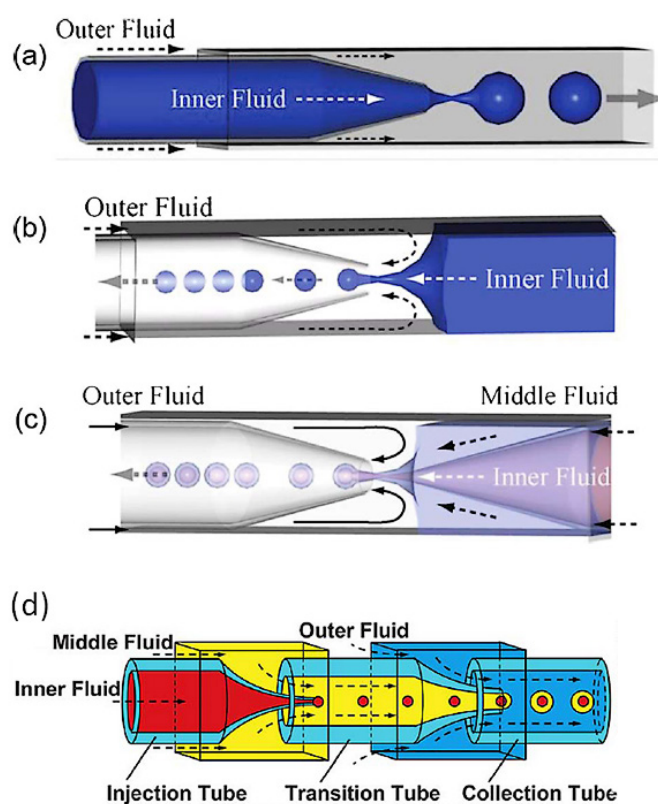


Fig. 4. Co-axial glass capillary devices in various settings. (a,b) Devices generating single emulsions: (a) Schematic of a co-flow glass capillary device. (b) Schematic of a flow-focusing glass capillary device. (c,d) Devices generating double emulsions: (c) Schematic of a glass capillary device that combines co-flowing and flow focusing. (d) Schematic of a double co-flowing glass capillary device. Arrows indicate the flow direction of fluids and droplets. Reproduced with permission from refs. 8 and 56. Copyright 2012 and 2013 Royal Society of Chemistry.

Despite the attention given to such devices, the artisanal manufacturing of the co-axial glass capillaries reduces their reproducibility. Moreover, the calibration of the collector capillary inlet, in order to tune the droplet size, remains a delicate and imprecise operation.¹³ About glass chips, several droplet generating devices are manufactured by registered brands (e.g. Microfluidic ChipShop, Darwin Microfluidics, FluiCell and Idex Health & Science). However,

the main disadvantage is their high manufacturing cost because of the advanced techniques involved during the process such as laser engraving. Nonetheless, two droplet generating systems involves lab-made glass devices in the literature. Okushima et al.²⁸ studied the formation of W/O/W emulsions in two kinds of T-junction glass devices: the first one composed of two connected single emulsion chips and the second consisting of one chip that allows the straight generation of double emulsions. They treated the upstream of both devices (i.e. the segments where the W/O emulsion should be generated) with a hydrophobic silane-coupling agent and they were able to generate multi-core emulsions as well as entrap two distinct internal phases in the same oil phase. Nisisako et al.³⁹ designed two glass chips made of quartz with rectangular channels in cross section: (i) A T-junction device (Figure 5.a) was used to generate an O/W emulsion, and then the oil phase containing a UV-curable polymer (1,6-hexanediol diacrylate) was photocured to generate solid microparticles in the range of 30 to 120 μm size; (ii) A sheath-flow device with a double Y-junction (Figure 5.b) was intended for the synthesis of hemispherically colored microparticles in the range of 90 to 190 μm size by photocuring an O+O/W emulsion. The setting consisted of two oil phases (uncolored and colored isobornyl acrylate) that co-flowed without mixing prior to flow-focusing by the aqueous phase. In both cases, the particle sizes depended on the flow rate ratio as suggested by Nie et al.¹⁹ about microfluidic systems with low viscosity discontinuous phases (6.71 and 8.29 mPa·s, respectively).

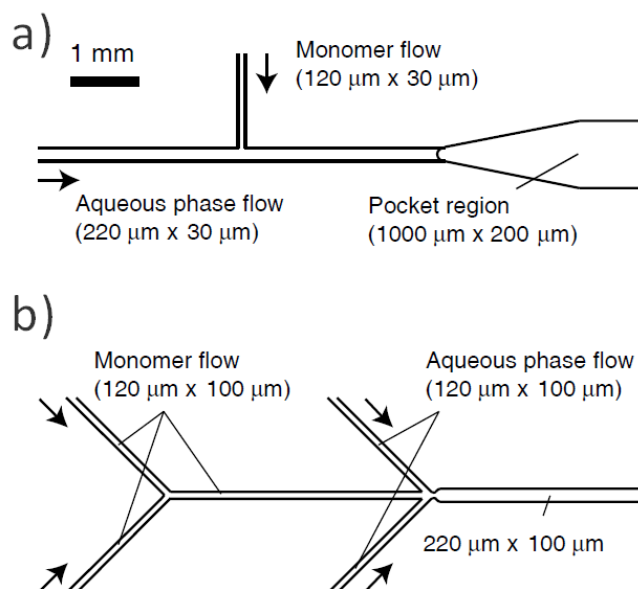


Fig. 5. Schematics of the channel layouts on lab-made glass chips: (a) T-shaped channels, for the generation of a single emulsion, and (b) Y-shaped channels in a co-flowing + flow-focusing configuration, for the generation of hemispherically colored single emulsions. The channel sizes are shown as width \times depth, and the orientation of flow is specified by arrows. Reproduced with permission from ref. 39. Copyright 2004 Elsevier.

3.2. Norland Optical Adhesive devices

Norland optical adhesives (NOA) are liquid UV-curable polymers containing mercaptoesters that can be molded and then cross-linked via a thiol–ene-based reaction. A wide range of polymers that differ in refractive index, viscosity and cross-linking speed are available. NOA63 was the first used by Kim and colleagues³⁰ to produce hydrophilic microfluidic devices. A thin film of PDMS as an anti-adhesion support was deposited on a positively patterned master and the polymer was poured over all to form the molded part. A cover layer was fabricated by coating of a toluene solution containing 10 % NOA63 on a flexible poly(ethylene terephthalate) film (Figure 6). Both were cured under UV light and reactivated with oxygen plasma. The obtained device showed a spontaneous aqueous flow through the microchannel by capillary force even after one month storage and was intended to microbioanalyses as an immunoassay platform.

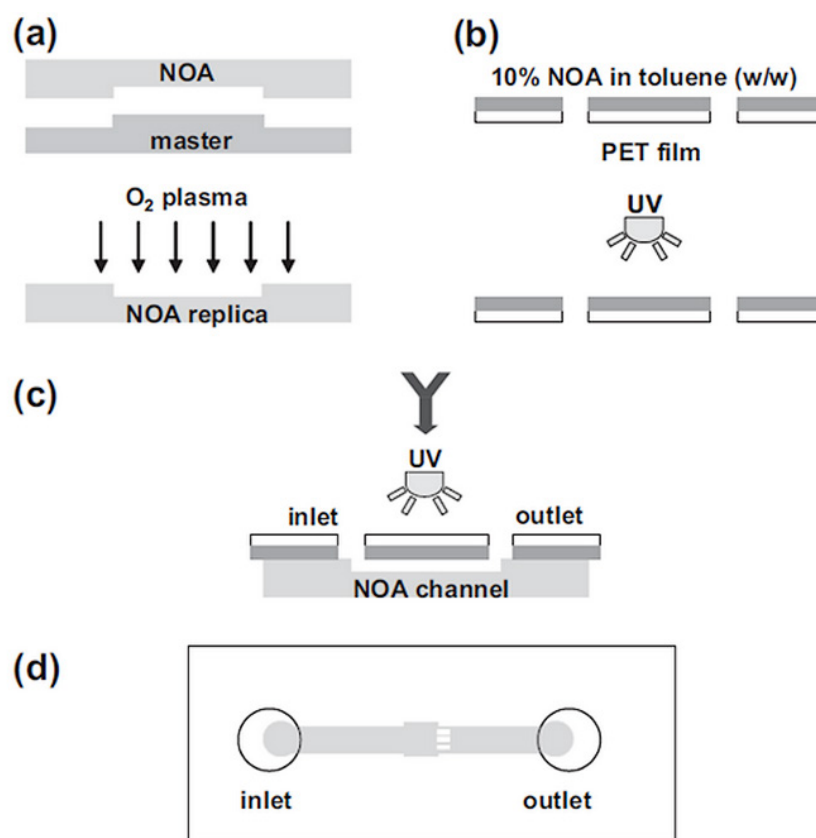


Fig. 6. Schematic diagram of NOA microfluidic chip fabrication by soft lithography. The fabrication process of (a) a microchannel and (b) a top cover layer; (c) Bonding of the microchannel layer to the top cover layer and (d) the obtained chip. Reproduced with permission from ref. 30. Copyright 2007 Wiley-VCH.

Thereafter, other authors^{31,32,17} preferred to use NOA81 mainly for its lower autofluorescence and applied the concept to the microdroplet generation. Compared to PDMS (the most used

material for microfluidic devices, described below), NOA81 offers many advantages: (i) A greater resistance to solvent both in swelling and in chemical inertia (n-pentane, n-hexane, cyclohexane, and n-heptane), (ii) a higher resistance to deformation, (iii) an air and water vapor impermeabilities³¹ and (iv) a higher stiffness of the cured polymer that permits high-resolution nanostructure patterning³⁰ and allows a stronger sticking required for droplet generation at high pressures.³² Moreover, oxygen plasma treatment can enhance the hydrophilic nature (detailed in the section “Plasma treatment”). With such devices, Hung *et al.*⁴¹ produced monodisperse toluene microdroplets of about 30 μm in water whereas Bartolo *et al.*³¹ produced monodisperse microdroplets of hexadecane in an aqueous solution of orange G dye containing 1 % sodium dodecyl sulfate. Wägli *et al.*³² were able to generate ethyl acetate droplets in an aqueous phase of saliva colored with amaranth dye. Recently, Meissner *et al.*¹⁷ used an NOA81 microfluidic device to study the O/W emulsification using two oil phases (80:20 cis-decalin/cyclohexyl bromide, dodecane) and two aqueous phases (milli-Q water, 50:50 milli-Q water/Glycerol). They produced monodisperse droplets ranging from 2 to 12 μm with CV = 5 % and they also demonstrated the ability of such a system to produce colloidal emulsions with tunable size and composition.

3.3. Polyurethane devices

Polyurethanes are polymers of urethane, an organic compound produced by the reaction of an isocyanate on an alcohol. These materials offer optical transparency, high flexibility and the ability to be used in the soft lithographic production of microfluidic devices as well as good biocompatibility.⁵⁷ Thorsen *et al.*²⁹ were first to produce a hydrophilic acrylated urethane device by photopolymerizing Ebecryl[®] 270 (Allnex), an aliphatic urethane diacrylate, on a silicon wafer mold. In 2005, Seo and colleagues²⁰ designed a microfluidic device made by the soft lithography of polyurethane. The device was composed of a flow focusing part for the emulsification of an O/W emulsion and a serpentine channel for the subsequent UV-curing of the oil phase that contains tri(propylene glycol) diacrylate or pentaerythritol triacrylate monomers. The size of obtained polymer particles ranged from 20 to 200 μm and was dependent on the microchannel dimensions (from 25×15 μm^2 to 100×120 μm^2), the composition of the phases, and their flow rates. Furthermore, the team synthesized two types of copolymer-based microspheres carrying surface carboxyl- and amino- groups (tri(propylene glycol) diacrylate co-acrylic acid and tri(propylene glycol) diacrylate co-amino ethyl methacrylate, respectively) intended for various applications in the bioanalytical field. Concerning the production of the former, the microfluidic system permitted to operate with an acrylic acid concentration of below

5 %; otherwise the hydrophilic nature of the compound induced adhesion of the microparticles to the polyurethane device walls. For their part, Nie *et al.*¹⁹ used a device prepared by mixing a polyurethane intermediate (Airthane[®] PET-60D, Air Products and Chemicals, Inc.) with 20 % PEG and 0.02 % of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane as a catalyst. A water contact angle of 82° was thus recorded. They studied in such a device the influence of discontinuous phase viscosity on microdroplet generation using several silicon oils with viscosities ranging from 10 to 500 mPa·s and an aqueous continuous phase containing 2 % SDS.

3.4. Polydimethylsiloxane devices

Polydimethylsiloxane (PDMS) is the polymer of dimethylsilane, an organometallic compound that polymerizes via a sol–gel reaction. The PDMS is by far the most widely used material for the soft lithographic production of microfluidic devices because in addition to the above-mentioned advantages of polyurethanes (optical transparency, high flexibility, and biocompatibility) it offers additional ones^{33,31} : (i) Low cost, (ii) optical transparency down to 280 nm and low autofluorescence, (iii) a low elastic modulus and an elastomeric behavior allowing highly reversible deformation and easy integration of valves and tubing, and (iv) a low curing temperature (≈ 70 °C). Unlike most organic solvents, water does not induce swelling of the material and therefore seems *a priori* compatible with PDMS microfluidic devices. However, the hydrophobicity of PDMS is contrary to its use in systems with aqueous-continuous phases. Several approaches have been studied to overcome this inconvenience and are described in the section “Enhancement of the Device walls – Aqueous continuous phase affinity”.

The resulting PDMS devices that have hydrophilic natures were extensively exploited to generate a wide range of emulsions, usually as templates for the production of microparticles. Barbier *et al.*⁴² generated, in PDMS devices treated with a plasma-polymerized acrylic acid, a single emulsion of tetradecane in milli-Q water added to 0.4 % sodium laurylsulfate (SDS) and a double emulsion of milli-Q water in tetradecane added to 0.75 % Span[®] 80 (sorbitan oleate, Croda) in milliQ water added to 2 % Tween[®] (polysorbate, Croda). It was the first time that a stable W/O/W emulsion was generated in a PDMS device. Microfluidic systems with PDMS devices and aqueous continuous phases have then been exploited by two teams for the synthesis of PLGA microparticles. Xu and his team⁴⁹ synthesized monodisperse microparticles (28 μm , CV 3.8 %) loaded with 25 % bupivacaïne by solvent evaporation. For that, they generated, in a PDMS plasma-oxidized device, an emulsion of dichloromethane containing a 4 % PLGA/Bupivacaïne mixture (75:25) in a TRIS buffer added to 1 % PVA. Then, they removed

the solvent by evaporation under reduced pressure outside of the device. However, Hung and colleagues⁵⁰ used a PDMS device treated with PVA to synthesize monodisperse PLGA micro- and nanoparticles (from 70 nm to 30 μm with $\text{CV} = 2\%$) by a solvent evaporation technique inside the device: an organic phase of dimethylcarbonate added to 0.5 to 5 % PLGA was emulsified in an aqueous phase containing 1 % of PVA, and then the organic solvent was evaporated through the device. The concept of PVA-treated PDMS devices was taken over by Trantidou *et al.*⁴³ to generate stable O/W and W/O/W emulsions. The aqueous phases (i.e. internal and external) contained milliQ water, 14 % ethanol and 14 % glycerol, and the oil phase was composed of oleic acid with 0.1 % 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, or oleic acid with 1 % 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine for the formation of O/W and W/O/W emulsions, respectively. On the other hand, Weitz and his team^{51–53} have extensively exploited the PDMS to design coated and spatially patterned hydrophobic / hydrophilic devices. They prepared polymersomes (40 μm diameter) from copolymer-stabilized double emulsions consisting of a glucose aqueous solution as the inner phase, a first shell phase of chloroform with 12 % poly(ethylene-glycol)-*b*-poly(lactid acid) copolymer and 4 % poly(lactid acid) homopolymer, a second shell phase of toluene, and a continuous phase based on water with 3 % PVA. The team also developed a one-step double emulsification device that combines the co-flow of the inner phase with a chaperoning middle phase and flow focusing by the continuous aqueous phase. Despite some satellite drops (from 1 to 50 μm in diameter with $\text{CV} = 5\%$), this approach is particularly interesting for the emulsification of viscous or viscoelastic polymer solutions (around 500 mPa·s) or polymer melts that exhibit low interfacial tension.⁵³ For their part Huck and his team designed a spatially patterned flow focusing PDMS device by coating the upstream of the device with Aquapel[®] (fluoroalkylsilanes from PPG Industries, that provides hydrophobic treatment aimed to generate the initial W/O emulsion) and treating the downstream of the same device with a layer-by-layer technique (hydrophilic treatment detailed in the “layer-by-layer deposition of hydrophilic electrolytes” section and aimed to generate the W/O/W emulsion). By means of the device, they generated a stable W/O/W emulsion that consists of milli-Q water in fluoruous oil (Fluorinert[®]FC-40, 3M) added to 2 % EA surfactant (a non-ionic fluoro-surfactant synthesized by coupling oligomeric perfluorinated polyethers with PEG⁴⁶) in milli-Q water added to SDS (0.5 %) ⁴⁴ and also proved the concept of W/O/W emulsions as uniform and defined containers for quantitative flow cytometric analyses ⁴⁷. Another variant of the device comprised only the hydrophilic part and is dedicated to the formation of O/W emulsions. The team demonstrated the ability of such devices to generate emulsions of hexadecane in milli-Q water stabilized by 0.5 % SDS, with narrow sizes ranging

from $51.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ at a low production frequency (170 Hz) to $35.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ at a higher one (13.5 kHz).⁴⁴ Moreover, they applied the concept to produce dodecane droplets in an aqueous continuous phase containing 2 % methacrylic acid co-poly(ethylene glycol)methacrylate as a functional surfactant.⁴⁵ The droplets were thus functionalized by a pH-responsive branched co-polymer surfactant at the oil-water interface in order to study their reversible pH-dependent aggregation behavior. The team also formed eutectic gallium-indium liquid-metal microdroplets of $< 30 \mu\text{m}$ in an aqueous solution containing 20 % PEG and 5 % SDS. The particles could be of high interest in microelectromechanical systems engineering.⁵⁴ On the other hand, Saeki *et al.*⁴⁸ designed an ingenious three-dimensional device that takes advantage of the native PDMS hydrophobicity in order to attract the middle oil phase of a W/O/W emulsion and to reduce its volume by forming an ultra-thin film oil layer of less than $1 \mu\text{m}$ thickness (Figure 7). With this device the team successfully encapsulated polymer particles within the internal aqueous phase of the W/O/W emulsion.

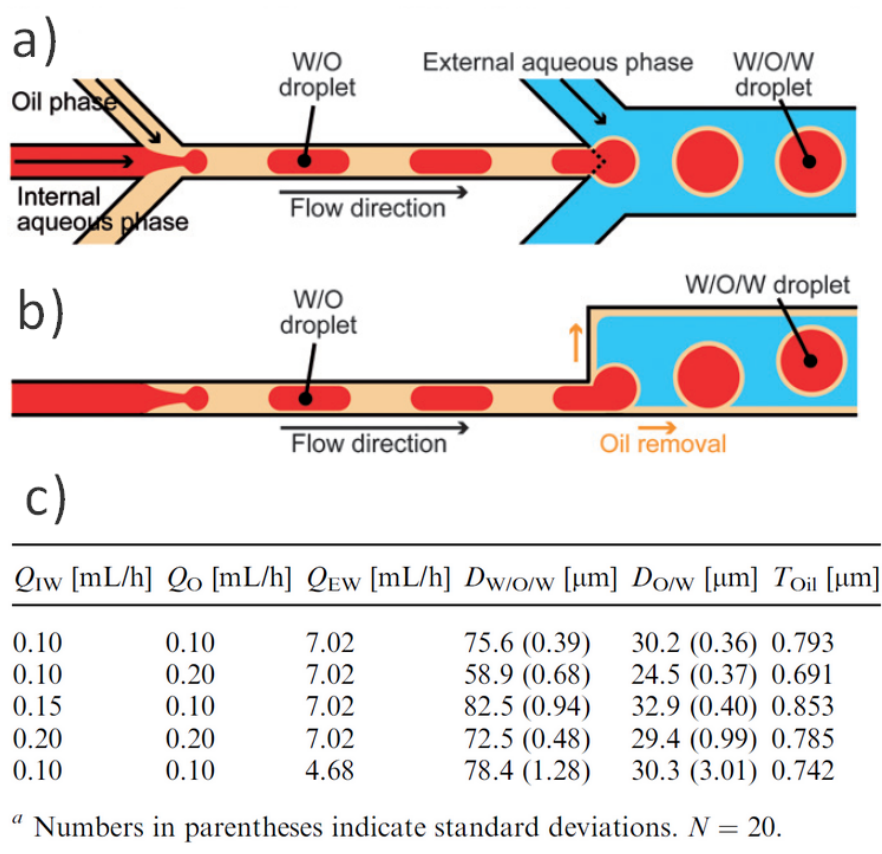


Fig. 7. Design of the microfluidic device for the preparation of a W/O/W emulsion with an ultra-thin oil phase layer. (a) Schematic of formation of the microdroplets. (b) Cross-sectional view of the microchannel center shown in (a). (c) Table showing the diameter of the microdroplets and thickness of the oil-phase layer according to the experimental conditions. Q , D and T refer to the flow rate, diameter and thickness respectively, while the indices IW , O and EW indicate the internal water phase, the oil phase and the external water-phase respectively. Reproduced with permission from ref. 48.

Copyright 2010 Royal Society of Chemistry.

More recently, a flow-focusing device made of native PDMS was used to generate particle-stabilized W/W emulsions. The poor affinity of the internal phase to the device walls allowed droplet generation within a hydrophobic device even if the continuous phase is also aqueous. Abbasi *et al.*⁵⁸ worked with a suspension of carboxylated microspheres (10 μm) as interface stabilizing particles in PEG 10 w/v % as a continuous phase and a solution of dextran (12.8 w/v%) as a discontinuous one, to form dextran droplets (50 μm diameter) with a high potential in cell encapsulation and drug delivery.

3.5. Miscellaneous devices

In addition to the aforementioned materials, some unusual ones have been used to design microfluidic devices. Xu *et al.*¹⁵ designed a T-junction microfluidic device made of poly(methyl methacrylate) with an embedded capillary made of quartz. They dispersed n-octane droplets in an aqueous continuous phase, and several concentrations of SDS ranging from 0.001 to 1 % were added to tune the surface tension of the aqueous phase while several concentrations of glycerol (24, 52, and 62 %) were used to control its viscosity. Capretto *et al.*⁵⁹ designed a co-flow device composed of a stainless steel needle embedded in a polyoxymethylene round tube (contact angle = 84°). They used it to generate O/W emulsions then to form solid lipid microparticles by a temperature shift of the oil phase. For their part Piccin *et al.*⁶⁰ printed a polyester-toner microfluidic device by means of xerography. Hexadecane and mineral oil droplets were successfully generated in an aqueous continuous phase added to concentrations ranging from 0.5 to 1.5 % of Triton[®] X-100 as a non-ionic surfactant.

4. Enhancement of the Device walls - Aqueous continuous phase affinity

Since the advent of microfluidics in the generation of monodisperse microdroplets, several strategies were adopted to overcome the incompatibility of some device materials with aqueous continuous phases. As examples, Huang and colleagues⁶¹ proposed a three-dimensional flow-focusing device made of three SU-8 photoresist layers for the generation of single or double emulsions. This device avoids contact between the inner phase and the device walls, thus it can produce stable O/W emulsions. Yu and Han⁶² anchored a hydrophilic additive, the poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(ethylene glycol) diblock copolymer (PDMS-*b*-PEG 25:75, MW = 764.5, Polysciences), onto a PDMS device following a swelling / deswelling process in chloroform solution. PDMS-*b*-PEG penetrated within the PDMS matrix and interacted chemically with it. For their part Yao *et al.*⁶³ added PDMS-*b*-PEG (35:65, MW = 600,

Polysciences) at several concentrations as an additive to the prepolymer PDMS before device manufacturing. They were able to lower the water contact angle from 80.9 to 21.5° using 1.9 % PDMS-*b*-PEG while maintaining the bonding properties of plasma-activated PDMS.

Nevertheless, most authors widely focused on the surface treatment of commonly used materials in microfluidics whereas other researchers tried to tune the surface tension of the aqueous continuous phase, both in order to enhance the *continuous phase – device wall* affinity. In this section, we extensively report the state-of-the-art of these strategies while Tables 3 and 4 summarize them.

Table 3. Summary of hydrophilic surface treatments applied to microfluidic devices made of polydimethyl-siloxane (PDMS).

Hydrophilic treatments	Water contact angles		Ref.
	Before treatment	After treatment	
Photo-initiated grafting of acrylic acid	110°	73°	26
		63.2° (with 5 % Tween [®] 20)	64
		22°	51
Photo-initiated grafting of acrylamide		68°	65
Incorporation of PDMS- <i>b</i> -PEG (1.9 %)	80.9°	21.5°	63
Plasma oxidation		< 10°	66,67
Plasma pretreatment + plasma polymerized acrylic acid		60°	42
Plasma pretreatment + spin coating of 2-hydroxyethyl methacrylate		49°	68
Plasma pretreatment + deposition of PVA (88% hydrolyzed)		24°	43
Corona discharge on a poured PVA solution		20°	69
Incorporation of SiO ₂ nanoparticles		90°	70
Preactivation with tetra n-butylammonium fluoride + sol-gel grafting of trimethoxyboroxine and tetraethyl orthosilicate		58°	71
Plasma pretreatment + PEG-grafting		40° (Bi-silylated PEG, mw = 3400)	72
		10°	73

(Mono-silylated
PEG, mw = 450-
600)
23° 74
(Mono-silylated
PEG with 8
repetitive units)
47°
(Bi-silylated
PEG with 70
repetitive units)
46°
(Monosilylated
PEG with 109
repetitive units)

Table 4. Summary of hydrophilic surface treatments applied to microfluidic devices made of various materials.

Device materials	Hydrophilic treatments	Water contact angles		Ref.
		Before treatment	After treatment	
NOA	Plasma treatment (NOA 68)	63°	38°	30
	Plasma treatment (NOA 81)	65°	25° (2 min exposure)	41
			18° (5 min exposure)	
			10° (10 min exposure)	
Polyurethane (+20 % PEG)	-	82°	-	19
Polyoxy-methylene	-	84°	-	59
Cyclic olefin copolymer	Photo-initiated grafting of acrylamide	89°	46°	65
Polystyrene	Photo-initiated grafting of acrylamide	90°	52°	65
Poly(methyl methacrylate)	Photo-initiated grafting of acrylamide	66°	53°	65

4.1. Plasma treatment

First described by Irving Langmuir in 1928, plasma is an ionized gaseous state of matter obtained under highly energetic conditions. The plasma processing of many gases such oxygen, argon, or air was employed for surface activation aiming at adhesion enhancement or physicochemical treatments.⁷⁵ The PDMS was the most plasma-processed material in microfluidic field either to bond multilayer devices or chips to substrates as well as to enhance

their hydrophilic nature. Many studies conducted by Toth, Owen, Hillborg and respective co-workers⁷⁵⁻⁷⁹ showed via X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses that the oxygen rate on the PDMS surface increases after a plasma treatment producing a silica-like layer at the surface (SiO_x ; $2 < x < 4$) with free silanols. The layer had a thickness ranging from 3 nm⁷⁶ to 10 nm⁷⁷ and exhibited hydrophilic behavior as monitored by a water contact angle of $< 10^\circ$.^{66,67} More recently Hemmilä et al.⁸⁰ proposed two alternative pathways for the PDMS oxidation mechanism on the molecular scale (Figure 8.a) : (i) the first involves a methyl elimination (Si-CH_3) on the PDMS, which is replaced by a silanol (Si-OH) or a free radical (Si-O^\bullet) that evolves in a reactive sequence toward a silica peroxide (Si-OOH); (ii) the second case involves a grafting of reactive oxygen entities on pre-existing methylsilanes to form hydroxyl-methylsilanes ($\text{Si-CH}_2\text{OH}$) that may evolves toward carboxylic moieties (Si-COOH), peroxide bridges ($\text{Si-CH}_2\text{OO-Si}$), or even peroxide radicals (Si-COO^\bullet). Nevertheless, the surface activation of PDMS is transient and reversible resulting in a hydrophobic recovery extensively pointed out in the literature. Sharma et al.⁷³ highlighted an increase in the contact angle up to 38° after 20 min of exposure to air and a total recovery of the hydrophobicity after 200 min. In the same way, Ginn and Steinbock⁸¹ observed an increase in the contact angle up to 79° after 200 min when the plasma-treated PDMS was exposed to the air. However according to Chen and Lindner⁶⁶ the recovery can be slowed down when the plasma-treated PDMS was placed into a high dielectric constant environment (e.g., water) and/or in low temperature. Many suppositions had been given about the phenomena that govern the hydrophobic recovery, and a few years ago, a general consensus was reached, stating that the migration of low molecular weight (LMW) PDMS chains to the surface is the main cause, especially when a large number of cracks occur on the silica-like layer.⁸² Eddington et al.⁶⁷ proposed a protocol consisting of thermal aging at 100°C of PDMS that is supposed to enhance polymerization and thus reduce the quantity of LMW chains; they successfully delayed the hydrophobic recovery up to 14 days proportionally to the aging time from 2 to 14 days of heating (Figure 8.d). Ma et al.⁸³ followed the same reasoning using an oxidative UV-ozone treatment instead of the plasma. They modeled the surface hydrophilization and the subsequent hydrophobic recovery process (Figure 8.c) and they found that the time required for the hydrophilization by UV-ozone decreases when the PDMS is previously thermally aged for 1h at 80°C . More recently, Bodas and Khan-Malek⁸⁴ proved via SEM characterization that the nano-structure of PDMS postplasma treatment plays a significant role in the enhancement of the wetting properties contrary to the rough surface of native PDMS (Figure 8.b). Thus, the hydrophobic recovery could also be explained by a recovery of the rough surface due to the elasticity of PDMS. The theory is indeed

supported by Fritz and Owen works⁷⁵ in which they have shown that a treatment with argon, nitrogen, or helium plasmas (i.e., in the absence of oxygen) reduces the contact angle to less than 10°.

Because of the reversibility of the PDMS plasma oxidation, researchers explored grafting pathways of hydrophilic polymers on the silanols formed after plasma oxidation. Barbier and colleagues⁴² deposited a coating of plasma polymerized acrylic acid on PDMS channels after a plasma pretreatment with argon and thus decreased the water contact angle down to 60°. The coating was stable over time and resistant to aqueous flows. Bodas and Khan-Malek⁶⁸ spin-coated 2-hydroxyethyl methacrylate on plasma-treated PDMS and were able to stabilize the water contact angle at 49° over 2 weeks of exposition to air. The grafting of PVA on microfluidic devices was explored by Wu et al.⁸⁵ in the field of biopolymer electrophoresis: following a plasma pretreatment with oxygen, a solution of PVA (88 % hydrolyzed) was poured into the device channels and then eliminated after deposition, and the treatment allowed a sustainable hydrophilization of the device walls. Hung, Trantidou, and respective colleagues^{43,50} supported these findings and successfully applied PVA-treated PDMS devices to generate microdroplets in aqueous-continuous phases. More recently Samandari and colleagues⁶⁹ reported an original concept of PVA deposition on PDMS channels by the simultaneous injection of a PVA solution from the inner phase inlet of the device and air activated with an electrical corona discharge from the outer phase inlet. A water contact angle of around 20° stable over a month was obtained.

On the other hand, the effect of plasma treatment on NOA was explored by some authors. Kim and colleagues³⁰ exposed the NOA surface to an oxygen-plasma treatment and highlighted long-lasting enhanced hydrophilization. Indeed the water contact angle dropped from 68° on native NOA to 38° on oxygen-plasma treated NOA and was stable over a month. Hung et al.⁴¹ studied the influence of exposure time to oxygen plasma on the hydrophilization process. They underscored water contact angles of 25, 18 and 10° after 2, 5 and 10 min of exposure, respectively. These previous results were exploited by Meissner, Wägli and their respective colleagues^{17,32} to design devices made of NOA that generate microdroplets in aqueous continuous phases (The results are detailed in the “Norland Optical Adhesive devices” section).

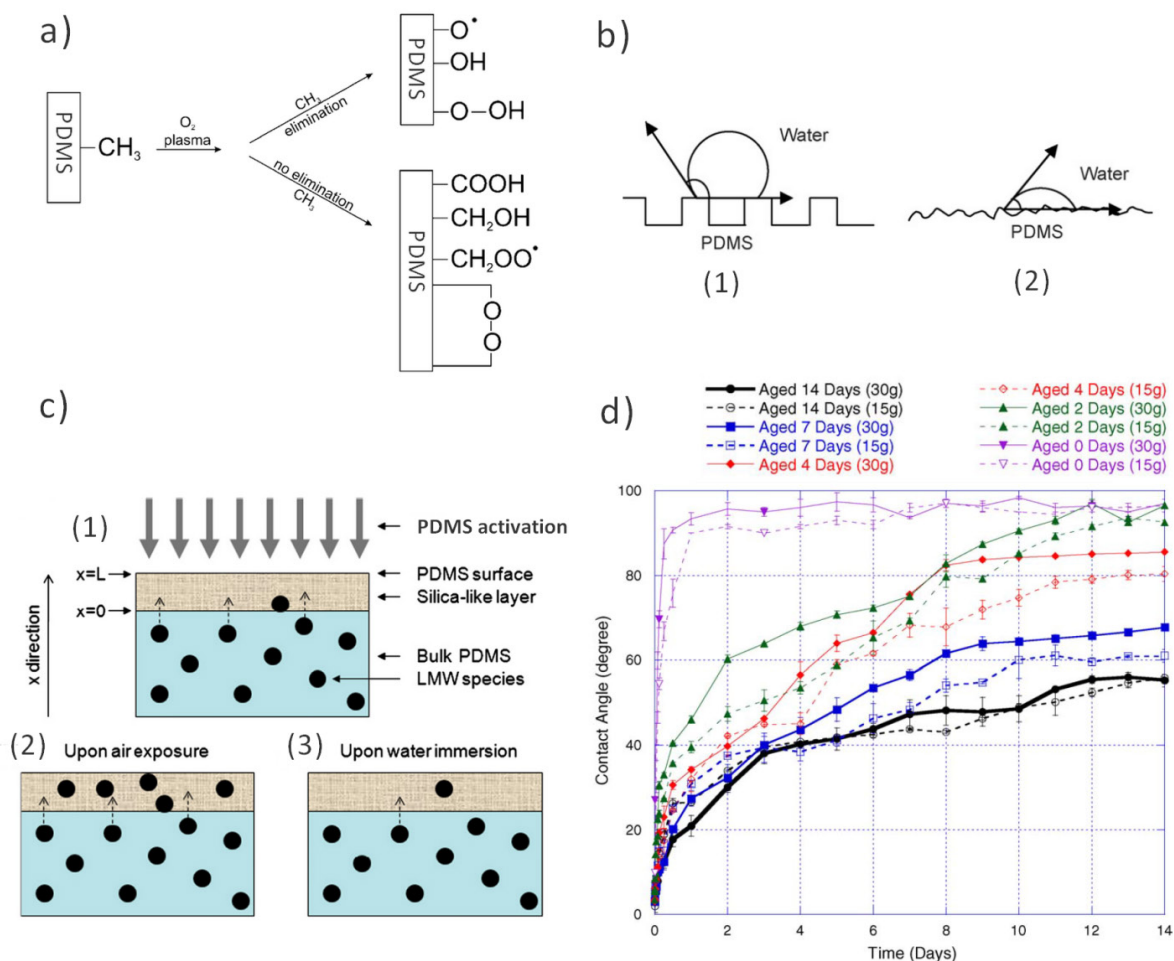


Fig. 8. Plasma treatment of PDMS surfaces and hydrophobic recovery: (a) Two possible reactions after PDMS surface activation with oxygen plasma. (b) Nano-structure model for the hydrophilic property of plasma-treated PDMS: (1) hydrophobicity before treatment and (2) hydrophilicity after treatment. (c) Schematic of migration of LMW species in PDMS (1) during surface activation; (2) upon air exposure or (3) upon water immersion. (d) Plot of contact angle with respect to time for oxygen plasma exposed PDMS. The inset plot shows the time points up to 14 days for both the 30 g (solid) and 15 g (dashed) samples (i.e., the mass of PDMS). Reproduced with permission from refs. 67, 80, 83, and 84. Copyright 2006, 2007, 2011, and 2012 Elsevier.

4.2. Layer-by-layer deposition of hydrophilic electrolytes

Multilayer-made devices have long fascinated researchers because of the diverse applications that they offer. The first obtaining process described in the literature was the Langmuir-Blodgett technique that consists of the formation of monolayers on a water surface and a further transfer onto a solid support. The layer-by-layer (LbL) deposition of polyelectrolytes was then introduced by Decher⁸⁶ as a multi-step (generally two steps) deposition of charged compounds on a reversely charged surface. Liu et al.⁸⁷ applied the technique in the electrophoresis field by depositing a cationic layer of Polybrene (i.e., hexadimethrine bromide) on a negatively charged PDMS channels and then an anionic layer of dextran sulfate. They successfully enhanced the electroosmotic flow of the channels and

provided a stable hydrophilic treatment that lasts for more than 100 electrophoresis runs. The technique has been applied to coat PDMS devices for microdroplet generation and extensively reproduced to generate microdroplets in aqueous continuous phases. Bauer *et al.*⁴⁴ described a simple injection protocol of a polyelectrolyte sequence into PDMS channels as follows (Figure 9): (i) 0.1 % poly(allylamine hydrochloride) in 0.5 M NaCl aqueous solution; (ii) 0.1 M NaCl aqueous solution; (iii) 0.1 % poly(sodium 4-styrenesulfonate) in 0.5 M NaCl aqueous solution, and then (iv) 0.1 M NaCl aqueous solution. The treatment provided a hydrophilic coating that was stable over 5 months of storage and resistant to high flow rates of up to 550 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$.

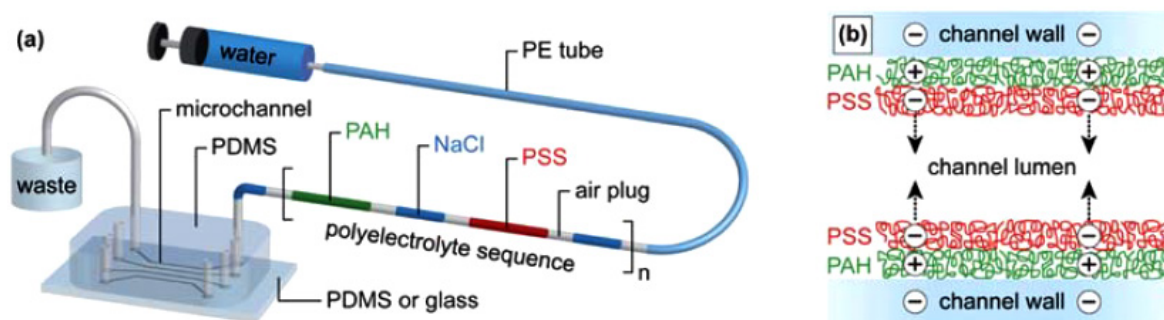


Fig. 9. (a) Schematic of the layer-by-layer surface modification of a PDMS microchannel. (b) Schematic of the polyelectrolyte multilayer building up at the channel wall. Reproduced with permission from ref. 53. Copyright 2010 Royal Society of Chemistry.

4.3. Sol-gel grafting of hydrophilic coatings

The sol-gel process involves the polymerization of reactive monomers, most often alkoxy silanes, in the presence of water under mild conditions. The “sol” material can be molded into layers and serves as a coating before polymerization and further formation of the “gel”, thus the surface characteristics of the device walls could be tuned depending on the silane-agent used. The coating process of microfluidic channels via the sol-gel reaction was first exploited in the electrophoresis field. Roman *et al.*⁷⁰ fabricated a PDMS device for electrophoresis and incorporated SiO_2 nanoparticles within the PDMS material. The PDMS device was immersed in tetraethyl orthosilicate and then in a basic aqueous solution (2.8 % ethylamine). Consecutive thermal activation caused nanoparticles formation by the sol-gel reaction inside the PDMS polymer. The resulting PDMS- SiO_2 hybrid matrix exhibited a water contact angle of 90° (versus 108° on native PDMS) and an electroosmotic flow enhanced 2-fold. Orhan *et al.*⁷¹ were able to coat PDMS channels with a borosilicate glass layer of 800 nm thickness (Figure 10). After a preactivation of the PDMS surface with tetra n-butylammonium fluoride, the device channels were flushed with a solution of trimethoxyboroxine and tetraethyl orthosilicate as glassy agents. The protective coating provided a hydrophilic behavior and permitted a decrease

in the water contact angle down to 58° . For their part, Pessi, Nabavi and respective colleagues^{18,40} applied sol-gel coatings on co-axial glass capillaries in order to selectively form hydrophilic and hydrophobic parts on the device. 2-[Methoxy(polymethyleneoxy) propyl]-9,12 trimethoxysilane was used as a hydrophilic coating for the device walls in contact with the aqueous phase, whereas the oily phase flowed in a capillary coated with trimethoxy(octadecyl) silane as a hydrophobic treatment.

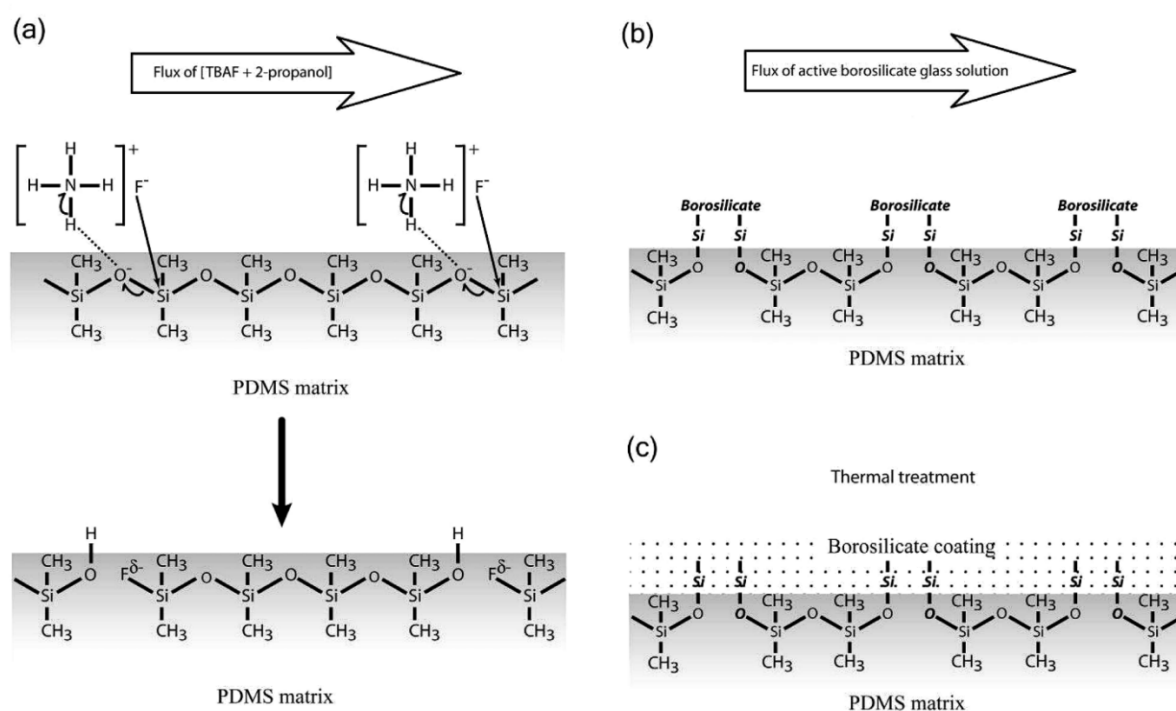


Fig. 10. Schematic view of the PDMS modification process by sol-gel grafting of a hydrophilic coating: (a) activation step by flowing a TBAF/2-propanol mixture through the microchannel, (b) coating step by flowing through the active solution, and (c) final coating after thermal treatment. Reproduced from ref. 71. Copyright 2008 American Chemical Society.

Another approach explored by some authors was to pretreat the PDMS with oxygen plasma prior to grafting silylated compounds. The pretreatment aimed to form free silanols on the surface that can react with the silylated compounds via a sol-gel process. Papra *et al.*⁷² oxidized the surface of a molded PDMS network and then immersed it in a 1 mM PEG-silane acidic aqueous solution for 2 h (bi-silylated PEG, MW = 3400). A stable water contact angle of about 40° resulted from the grafting treatment. Sharma *et al.*⁷³ tried the same treatment using a 5mM toluene solution of PEG-silane (mono-silylated PEG, MW = 450-600) and obtained a stable water contact angle of less than 10° over 200 min of air exposure. For their part, Hellmich and colleagues⁷⁴ screened in acidic aqueous solutions several PEG-silanes with various chain

lengths to treat PDMS microchannels after oxygen plasma exposure. They obtained 23, 47 and 46° water contact angles with PEG₍₈₎-Si, Si-PEG₍₇₀₎-Si and PEG₍₁₀₉₎-Si, respectively.

4.4. Photo-initiated grafting of hydrophilic compounds

The photo-initiated grafting consists of covalent incorporation, induced by light in the presence of a photo-initiator, of functional molecules into a polymer matrix or on its surface. Rohr *et al.*⁶⁵ studied the functionalization of microfluidic devices made of several materials (e.g., PDMS, polystyrene (PS), polycarbonate (PC), poly(methyl methacrylate) (PMMA) or cyclic olefin copolymer (COC)) with acrylamide (AA) as a hydrophilic compound and obtained water contact angles of 46, 52, 53 and 68° on COC-, PS-, PMMA-, and PDMS-AA coatings, respectively. However, the authors pointed out the limit of the material transparency in the wavelength range of photoactivation, which restricts the nature of materials used. As an example, polycarbonate and to a lesser degree poly (methyl methacrylate) are opaque in the wavelength range of 230-330 nm, whereas quartz and PDMS are almost transparent. Seo and colleagues²⁶ used the method to graft acrylic acid on PDMS device microchannels and recorded a water contact angle of 73°. Moreover, a spatial patterning aiming at the generation of double emulsions was developed by protecting the parts that will remain hydrophobic from UV light. In contrast, Liao and Su⁶⁴ used the same photo-grafting protocol to develop a spatially patterned PDMS device but filled the parts that will remain hydrophobic with a liquid immiscible to the grafting solution. Abate *et al.*⁵¹ coated the PDMS channels of their device with a glassy agent prior to photo-grafting acrylic acid. The aim was to develop a device that is physically resistant to mechanical deformation and chemically resistant to organic solvents while being hydrophilic. They obtained a water contact angle of 22° after treatment. On other hand, Allbritton and his team^{88,89} underlined the inconvenience of bulk polymerization that occurs in the lumen of device channels during the grafting process. They pre-adsorbed benzophenone as a photo-initiator on the device walls and successfully focused the photo-grafting reaction on the PDMS surface (Figure 11).

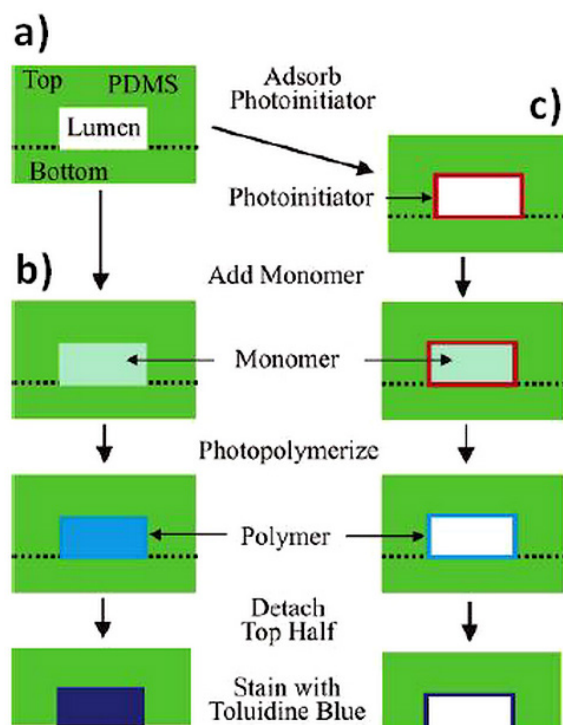


Fig. 11. Photo-initiated grafting of hydrophilic compounds on the PDMS microchannel walls: (a) Schematic of an intact microchannel composed of PDMS, (b) Schematic of the one-step photo-grafting method in an enclosed microchannel, (c) Schematic of the two-step photo-grafting method in an enclosed microchannel. Reproduced from ref. 88. Copyright 2004 American Chemical Society.

Recently, an ingenious photo-grafting concept of a thermo-responsive compound has led to the development of versatile PDMS microfluidic devices for the generation of single or double emulsions with aqueous or oily continuous phases. Indeed, Li *et al.*⁹⁰ were able to photo-graft poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), a thermo-responsive polymer that exhibit a hydrophilic nature below 32 °C and a hydrophobic one above the same temperature, on the device channels following the protocol of benzophenone preadsorption (Figure 11.c). Thus, the water contact angle on the channels was varied from 25 to 106° simply by adjusting the PNIPAAm-g-PDMS surface temperature between to 25 and 38 °C. Hence, a targeted heating on selected channels has resulted in spatially patterned devices that can generate either O/W or W/O emulsions for single emulsion devices, and W/O/W or O/W/O emulsions for double emulsion devices.

4.5. Dynamic surface modification

Dynamic surface modification is an approach for enhancing the affinity between the continuous phase and the walls of the microfluidic device based on the incorporation of a compound (usually a surfactant) into the phase in contact with the walls of the device in order to lower the interfacial energy. It was first aimed to overcome the poor electroosmotic flows

within PDMS channels in the electrophoresis field⁹¹ prior to its use in microdroplet generating systems. Xu *et al.*²⁵ worked with a droplet generating device made of poly(methyl methacrylate) and added rising concentrations of SDS to the aqueous continuous phase. At 0.05 % w/w surfactant, they were able to switch from a disordered state to ordered droplets of n-hexane in water. The transition boundary corresponded macroscopically to the transition over 90° of the oil contact angle on the device walls. Microscopically, it corresponded to the critical micellar concentration of SDS in water, thus the technique makes sense because the excess surfactant adsorbs on the device walls and prevents the adhesion of the discontinuous phase¹⁵ (Figure 12). However, the addition of surfactant also influences the interfacial tension between the continuous and discontinuous phases, which limits the use of such a technique in microfluidic systems.

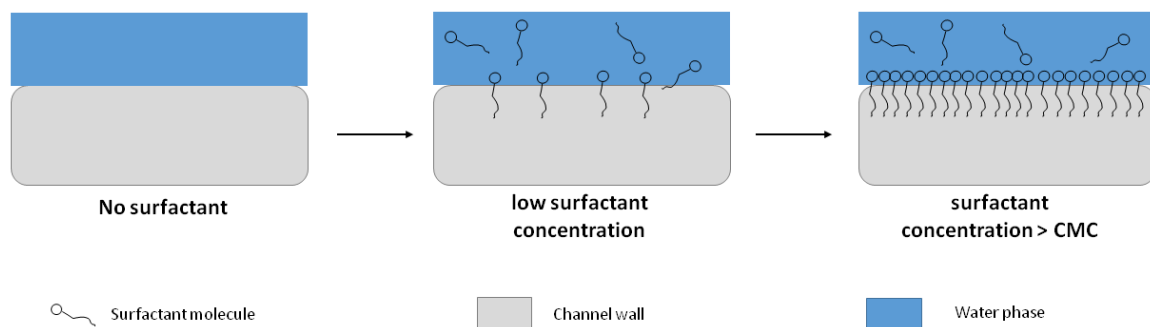


Fig. 12. Schematic that illustrates the effect of surfactant molecule adsorption on the wetting properties. Adapted with permission from ref. 15. Copyright 2006 Wiley Interscience.

5. Conclusion and perspectives

A literature overview shows that very important research was performed to modify the microfluidic channel surfaces in order to adapt them to the flowing phases. In the context of growing environmental constraints, particularly in terms of reducing the use of organic solvents and the emergence of bio-based lipid systems, changing the channel nature from hydrophobic to hydrophilic is the most highly met. Nevertheless, more complex chemical surface modifications were performed to induce a peculiar reaction with the flowing phases in biological applications, for example. In either case, surface modification is carried out on the final material of the device. Such modifications often involve problems of surface reaction control, treatment stability during storage, or durability during use.

Another innovative method is to use materials with *a priori* tuned chemical surfaces and other physical properties (mechanical, optical, etc.). In this trend, photoreactive hybrid organic-inorganic materials are promising candidates.^{92,93} Besides the advantage of achieving submicrometer resolutions, these materials are perfectly modular from the point of view of their bulk or surface properties simply by dealing with their composition.⁹⁴ It thus becomes possible to design the material according to the desired use in a "tailor-made" approach. Along with the biological "*transformisme*" stated by Jean Baptiste Lamarck, who said that function creates the organ, will we witness a chemical "*transformisme*" in microfluidics? Time will tell!

6. References

- Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
- Maan, A. A., Schroën, K. & Boom, R. Monodispersed water-in-oil emulsions prepared with semi-metal microfluidic EDGE systems. *Microfluid Nanofluid* **14**, 187–196 (2013).
- de Jong, J., Lammertink, R. G. H. & Wessling, M. Membranes and microfluidics: a review. *Lab Chip* **6**, 1125 (2006).
- Schroën, K., Bliznyuk, O., Muijlwijk, K., Sahin, S. & Berton-Carabin, C. C. Microfluidic emulsification devices: from micrometer insights to large-scale food emulsion production. *Current Opinion in Food Science* **3**, 33–40 (2015).
- Maeki, M., Kimura, N., Sato, Y., Harashima, H. & Tokeshi, M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **128**, 84–100 (2018).
- Sanjay, S. T. *et al.* Recent advances of controlled drug delivery using microfluidic platforms. *Advanced Drug Delivery Reviews* **128**, 3–28 (2018).
- Shang, L., Cheng, Y. & Zhao, Y. Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews* **117**, 7964–8040 (2017).
- Duncanson, W. J. *et al.* Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release. *Lab on a Chip* **12**, 2135 (2012).
- Pouton, C. W. & Porter, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 625–637 (2008).
- Doufène, K. *et al.* Tunable vegetable oil / silica hybrid microparticles for poorly water-soluble drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **118478** (2019) doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118478.
- Song, Y., Sauret, A. & Cheung Shum, H. All-aqueous multiphase microfluidics. *Biomicrofluidics* **7**, 61301 (2013).
- Nunes, J. K., Tsai, S. S. H., Wan, J. & Stone, H. A. Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis. *J Phys D Appl Phys* **46**, (2013).
- Utada, A. S. *et al.* Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device. *Science* **308**, 537–541 (2005).
- Lorenceanu, E. *et al.* Generation of Polymerosomes from Double-Emulsions. *Langmuir* **21**, 9183–9186 (2005).
- Xu, J. H., Li, S. W., Tan, J., Wang, Y. J. & Luo, G. S. Preparation of highly monodisperse droplet in a T-junction microfluidic device. *AIChE Journal* **52**, 3005–3010 (2006).
- Sun, B. J., Shum, H. C., Holtze, C. & Weitz, D. A. Microfluidic Melt Emulsification for Encapsulation and Release of Actives. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2**, 3411–3416 (2010).
- Meissner, M., Dong, J., Eggers, J., Seddon, A. M. & Royall, C. P. Oil-in-water microfluidics on the colloidal scale: new routes to self-assembly and glassy packings. *Soft Matter* **13**, 788–794 (2017).
- Pessi, J. *et al.* Microfluidics-assisted engineering of polymeric microcapsules with high encapsulation efficiency for protein drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **472**, 82–87 (2014).
- Nie, Z. *et al.* Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids. *Microfluidics and Nanofluidics* **5**, 585–594 (2008).
- Seo, M. *et al.* Continuous Microfluidic Reactors for Polymer Particles. *Langmuir* **21**, 11614–11622 (2005).

21. Berthier, J. *et al.* Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices. *Sensors and Actuators A: Physical* **158**, 140–148 (2010).
22. Carneiro, J., Campos, J. B. L. M. & Miranda, J. M. High viscosity polymeric fluid droplet formation in a flow focusing microfluidic device – Experimental and numerical study. *Chemical Engineering Science* **195**, 442–454 (2019).
23. Tan, Y.-C., Cristini, V. & Lee, A. P. Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device. *Sensors and Actuators B: Chemical* **114**, 350–356 (2006).
24. Dreyfus, R., Tabeling, P. & Willaime, H. Ordered and Disordered Patterns in Two-Phase Flows in Microchannels. *Physical Review Letters* **90**, (2003).
25. Xu, J. H., Luo, G. S., Li, S. W. & Chen, G. G. Shear force induced monodisperse droplet formation in a microfluidic device by controlling wetting properties. *Lab on a Chip* **6**, 131–136 (2006).
26. Seo, M., Paquet, C., Nie, Z., Xu, S. & Kumacheva, E. Microfluidic consecutive flow-focusing droplet generators. *Soft Matter* **3**, 986 (2007).
27. Cheung Shum, H., Varnell, J. & Weitz, D. A. Microfluidic fabrication of water-in-water (w/w) jets and emulsions. *Biomicrofluidics* **6**, 12808–128089 (2012).
28. Okushima, S., Nisisako, T., Torii, T. & Higuchi, T. Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices. *Langmuir* **20**, 9905–9908 (2004).
29. Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H. & Quake, S. R. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters* **86**, 4163–4166 (2001).
30. Kim, S. H. *et al.* Simple Route to Hydrophilic Microfluidic Chip Fabrication Using an Ultraviolet (UV)-Cured Polymer. *Advanced Functional Materials* **17**, 3493–3498 (2007).
31. Bartolo, D., Degré, G., Nghe, P. & Studer, V. Microfluidic stickers. *Lab Chip* **8**, 274–279 (2008).
32. Wägli, Ph., Homsy, A. & de Rooij, N. F. Norland optical adhesive (NOA81) microchannels with adjustable wetting behavior and high chemical resistance against a range of mid-infrared-transparent organic solvents. *Sensors and Actuators B: Chemical* **156**, 994–1001 (2011).
33. McDonald, J. C. *et al.* Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* **21**, 27–40 (2000).
34. Comunian, T. A., Abbaspourrad, A., Favaro-Trindade, C. S. & Weitz, D. A. Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique. *Food Chemistry* **152**, 271–275 (2014).
35. Comunian, T. A., Ravanfar, R., Alcaine, S. D. & Abbaspourrad, A. Water-in-oil-in-water emulsion obtained by glass microfluidic device for protection and heat-triggered release of natural pigments. *Food Research International* **106**, 945–951 (2018).
36. Zhao, Y. *et al.* Enhanced Encapsulation of Actives in Self-Sealing Microcapsules by Precipitation in Capsule Shells. *Langmuir* **27**, 13988–13991 (2011).
37. Shum, H. C., Kim, J.-W. & Weitz, D. A. Microfluidic Fabrication of Monodisperse Biocompatible and Biodegradable Polymersomes with Controlled Permeability. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 9543–9549 (2008).
38. Ravanfar, R., Comunian, T. A., Dando, R. & Abbaspourrad, A. Optimization of microcapsules shell structure to preserve labile compounds: A comparison between microfluidics and conventional homogenization method. *Food Chemistry* **241**, 460–467 (2018).
39. Nisisako, T., Torii, T. & Higuchi, T. Novel microreactors for functional polymer beads. *Chemical Engineering Journal* **101**, 23–29 (2004).

40. Nabavi, S. A., Vladislavljević, G. T., Gu, S. & Ekanem, E. E. Double emulsion production in glass capillary microfluidic device: Parametric investigation of droplet generation behaviour. *Chemical Engineering Science* **130**, 183–196 (2015).
41. Hung, L.-H., Lin, R. & Lee, A. P. Rapid microfabrication of solvent-resistant biocompatible microfluidic devices. *Lab on a Chip* **8**, 983 (2008).
42. Barbier, V. *et al.* Stable modification of PDMS surface properties by plasma polymerization: application to the formation of double emulsions in microfluidic systems. *Langmuir* **22**, 5230–5232 (2006).
43. Trantidou, T., Elani, Y., Parsons, E. & Ces, O. Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsystems & Nanoengineering* **3**, 16091 (2017).
44. Bauer, W.-A. C., Fischlechner, M., Abell, C. & Huck, W. T. S. Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions. *Lab on a Chip* **10**, 1814 (2010).
45. Bauer, W.-A. C. *et al.* Microfluidic production of monodisperse functional o/w droplets and study of their reversible pH dependent aggregation behavior. *Soft Matter* **7**, 4214 (2011).
46. Holtze, C. *et al.* Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab Chip* **8**, 1632 (2008).
47. Yan, J. *et al.* Monodisperse Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Double Emulsion Droplets as Uniform Compartments for High-Throughput Analysis via Flow Cytometry. *Micromachines* **4**, 402–413 (2013).
48. Saeki, D., Sugiura, S., Kanamori, T., Sato, S. & Ichikawa, S. Microfluidic preparation of water-in-oil-in-water emulsions with an ultra-thin oil phase layer. *Lab on a Chip* **10**, 357–362 (2010).
49. Xu, Q. *et al.* Preparation of Monodisperse Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device for Controlled Drug Delivery. *Small* **5**, 1575–1581 (2009).
50. Hung, L.-H., Teh, S.-Y., Jester, J. & Lee, A. P. PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches. *Lab on a Chip* **10**, 1820 (2010).
51. Abate, A. R. *et al.* Photoreactive coating for high-contrast spatial patterning of microfluidic device wettability. *Lab on a Chip* **8**, 2157 (2008).
52. Thiele, J. *et al.* Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. *Small* **6**, 1723–1727 (2010).
53. Abate, A. R. *et al.* Synthesis of Monodisperse Microparticles from Non-Newtonian Polymer Solutions with Microfluidic Devices. *Advanced Materials* **23**, 1757–1760 (2011).
54. Hutter, T., Bauer, W.-A. C., Elliott, S. R. & Huck, W. T. S. Formation of Spherical and Non-Spherical Eutectic Gallium-Indium Liquid-Metal Microdroplets in Microfluidic Channels at Room Temperature. *Advanced Functional Materials* **22**, 2624–2631 (2012).
55. Duncanson, W. J. *et al.* Monodisperse Gas-Filled Microparticles from Reactions in Double Emulsions. *Langmuir* **28**, 6742–6745 (2012).
56. Zhang, M.-J. *et al.* Microfluidic fabrication of monodisperse microcapsules for glucose-response at physiological temperature. *Soft Matter* **9**, 4150 (2013).
57. Domansky, K. *et al.* Clear castable polyurethane elastomer for fabrication of microfluidic devices. *Lab Chip* **13**, 3956 (2013).
58. Abbasi, N., Navi, M. & Tsai, Scott. S. H. Microfluidic Generation of Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions. *Langmuir* **34**, 213–218 (2018).

59. Capretto, L., Mazzitelli, S. & Nastruzzi, C. Design, production and optimization of solid lipid microparticles (SLM) by a coaxial microfluidic device. *Journal of Controlled Release* **160**, 409–417 (2012).
60. Piccin, E. *et al.* Generation of water-in-oil and oil-in-water microdroplets in polyester-toner microfluidic devices. *Sensors and Actuators B: Chemical* **196**, 525–531 (2014).
61. Huang, S.-H., Tan, W.-H., Tseng, F.-G. & Takeuchi, S. A monolithically three-dimensional flow-focusing device for formation of single/double emulsions in closed/open microfluidic systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **16**, 2336–2344 (2006).
62. Yu, K. & Han, Y. A stable PEO-tethered PDMS surface having controllable wetting property by a swelling–deswelling process. *Soft Matter* **2**, 705–709 (2006).
63. Yao, M. & Fang, J. Hydrophilic PEO-PDMS for microfluidic applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **22**, 025012 (2012).
64. Liao, C.-Y. & Su, Y.-C. Formation of biodegradable microcapsules utilizing 3D, selectively surface-modified PDMS microfluidic devices. *Biomed Microdevices* **12**, 125–133 (2010).
65. Rohr, T., Ogletree, D. F., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Surface Functionalization of Thermoplastic Polymers for the Fabrication of Microfluidic Devices by Photoinitiated Grafting. *Advanced Functional Materials* **13**, 264–270 (2003).
66. Chen, I.-J. & Lindner, E. The Stability of Radio-Frequency Plasma-Treated Polydimethylsiloxane Surfaces. *Langmuir* **23**, 3118–3122 (2007).
67. Eddington, D. T., Puccinelli, J. P. & Beebe, D. J. Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane. *Sensors and Actuators B: Chemical* **114**, 170–172 (2006).
68. Bodas, D. S. & Khan-Malek, C. Fabrication of long-term hydrophilic surfaces of poly(dimethyl siloxane) using 2-hydroxy ethyl methacrylate. *Sensors and Actuators B: Chemical* **120**, 719–723 (2007).
69. Samandari, M., Alipanah, F., Haghjooy Javanmard, S. & Sanati-Nezhad, A. One-Step Wettability Patterning of PDMS Microchannels for Generation of Monodisperse Alginate Microbeads by In Situ External Gelation in Double Emulsion Microdroplets. *Sensors and Actuators B: Chemical* S0925400519306239 (2019) doi:10.1016/j.snb.2019.04.100.
70. Roman, G. T., Hlaus, T., Bass, K. J., Seelhammer, T. G. & Culbertson, C. T. Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic mobilities and hydrophilic channel wall characteristics. *Anal. Chem.* **77**, 1414–1422 (2005).
71. Orhan, J.-B., Parashar, V. K., Flueckiger, J. & Gijs, M. a. M. Internal modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels with a borosilicate glass coating. *Langmuir* **24**, 9154–9161 (2008).
72. Papra, A. *et al.* Microfluidic Networks Made of Poly(dimethylsiloxane), Si, and Au Coated with Polyethylene Glycol for Patterning Proteins onto Surfaces. *Langmuir* **17**, 4090–4095 (2001).
73. Sharma, V., Dhayal, M., Govind, Shivaprasad, S. M. & Jain, S. C. Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS for micro fluidic applications. *Vacuum* **81**, 1094–1100 (2007).
74. Hellmich, W. *et al.* Poly(oxyethylene) Based Surface Coatings for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels. *Langmuir* **21**, 7551–7557 (2005).
75. Fritz, J. L. & Owen, M. J. Hydrophobic Recovery of Plasma-Treated Polydimethylsiloxane. *The Journal of Adhesion* **54**, 33–45 (1995).
76. Tóth, A. *et al.* Oxidative damage and recovery of silicone rubber surfaces. I. X-ray photoelectron spectroscopic study. *Journal of Applied Polymer Science* **52**, 1293–1307 (1994).

77. Owen, M. J. & Smith, P. J. Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *Journal of Adhesion Science and Technology* **8**, 1063–1075 (1994).
78. Hillborg, H. & Gedde, U. W. Hydrophobicity recovery of polydimethylsiloxane after exposure to corona discharges. *Polymer* **39**, 1991–1998 (1998).
79. Hillborg, H. *et al.* Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques. *Polymer* **41**, 6851–6863 (2000).
80. Hemmilä, S., Cauich-Rodríguez, J. V., Kreutzer, J. & Kallio, P. Rapid, simple, and cost-effective treatments to achieve long-term hydrophilic PDMS surfaces. *Applied Surface Science* **258**, 9864–9875 (2012).
81. Ginn, B. T. & Steinbock, O. Polymer Surface Modification Using Microwave-Oven-Generated Plasma. *Langmuir* **19**, 8117–8118 (2003).
82. Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N. & Hahn, J. H. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels. *ELECTROPHORESIS* **24**, 3607–3619 (2003).
83. Ma, K., Rivera, J., Hirasaki, G. J. & Biswal, S. L. Wettability control and patterning of PDMS using UV–ozone and water immersion. *Journal of Colloid and Interface Science* **363**, 371–378 (2011).
84. Bodas, D. & Khan-Malek, C. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation. *Sensors and Actuators B: Chemical* **123**, 368–373 (2007).
85. Wu, D., Luo, Y., Zhou, X., Dai, Z. & Lin, B. Multilayer poly(vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation. *ELECTROPHORESIS* **26**, 211–218 (2005).
86. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237 (1997).
87. Liu, Y., Fanguy, J. C., Bledsoe, J. M. & Henry, C. S. Dynamic Coating Using Polyelectrolyte Multilayers for Chemical Control of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis Microchips. *Analytical Chemistry* **72**, 5939–5944 (2000).
88. Hu, S. *et al.* Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels. *Analytical Chemistry* **76**, 1865–1870 (2004).
89. Wang, Y. *et al.* Covalent Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) by Photografting through a Mask. *Analytical Chemistry* **77**, 7539–7546 (2005).
90. Li, L. *et al.* In-Channel Responsive Surface Wettability for Reversible and Multiform Emulsion Droplet Preparation and Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 16934–16943 (2019).
91. Dou, Y.-H., Bao, N., Xu, J.-J. & Chen, H.-Y. A dynamically modified microfluidic poly(dimethylsiloxane) chip with electrochemical detection for biological analysis. *Electrophoresis* **23**, 3558–3566 (2002).
92. Mechref, E. *et al.* Synthesis and characterization of a photosensitive organic–inorganic, hybrid positive resin type material: application to the manufacture of microfluidic devices by laser writing. *RSC Advances* **6**, 3951–3959 (2016).
93. Mechref, E. *et al.* New organic–inorganic hybrid material based on a poly(amic acid) oligomer: a promising opportunity to obtain microfluidic devices by a photolithographic process. *RSC Advances* **6**, 90666–90673 (2016).
94. Blanco, B. *et al.* Preparation of a hybrid organic–inorganic material containing macrocyclic triolefinic 15-membered palladium(0) complexCatalytic activity in Suzuki cross-coupling and butadiene telomerization reactions. *Applied Catalysis A: General* **297**, 117–124 (2006).

Chapitre V

**La Microfluidique
Appliquée à la Formulation
des Microparticules Hybrides**

Avec l'avènement de la microfluidique et son extension à des domaines variés de la recherche allant jusqu'à la production industrielle, le concept du *Lab-on-a-Chip*¹ (traduit littéralement par « laboratoire embarqué sur puce ») fait fasciner bien des scientifiques. Qu'il soit destiné aux *microelectromechanical systems* (MEMS),² aux microsystèmes de bioanalyse,³ ou bien aux systèmes générateurs de microgouttelettes,⁴ ce concept a pour but ultime d'injecter dans la puce des *inputs* (ex. échantillons de sang pour analyse, phases liquides pour la génération de gouttelettes, onde électromagnétique pour les MEMS) et de récupérer en sortie un *output* fini (ex. résultat de l'analyse sanguine, gouttelettes / particules fonctionnelles, signal traité), avec un processus complet de transformation se déroulant au sein de la puce.

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés de près au concept du *lab-on-a-chip*, et plus particulièrement à la génération de gouttelettes d'huile fonctionnalisée pour la synthèse finale de microparticules hybrides. En effet, l'adaptation d'un procédé de synthèse par microfluidique nous apporterait des avantages certains, dont les plus importants sont :

- La maîtrise fine des contraintes physicochimiques régissant la formation des microparticules hybrides ;
- La modulation du design (structures matricielles, ou en cœur/couronne. Illustration ci-dessous) ;
- La modulation de la taille et la maîtrise de la monodispersité des microparticules hybrides ;
- L'économie d'énergie et de réactifs.

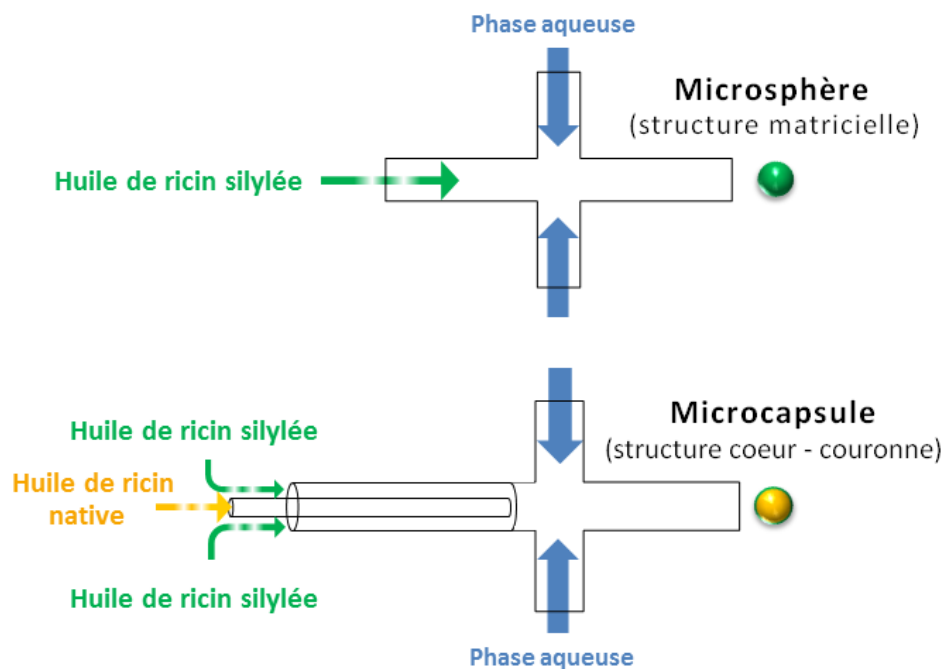


Illustration du design microfluidique pensé pour la génération de microsphères (en haut) et de microcapsules (en bas) à base d'huiles de ricin native & silylée.

L'application du concept *lab-on-a-chip* à notre projet a nécessité deux études distinctes, néanmoins complémentaires. La première a concerné l'adaptation du dispositif microfluidique aux contraintes énoncées dans le chapitre IV liées à l'utilisation de phases continues aqueuses ; les premier et deuxième volets de ce chapitre, intitulés respectivement « Essais préliminaires sur dispositifs microfluidiques en polydiméthylsiloxane modifié au laboratoire » et « Conception d'un dispositif microfluidique innovant compatible avec les phases continues aqueuses » retracent de façon détaillée nos différents essais de modification du PDMS, ainsi que la prospection de nouveaux matériaux hydrophiles compatibles avec les systèmes microfluidiques à phases continues aqueuses pour la génération de microgouttelettes. La deuxième étude a été celle de l'adaptation de la chimie-sol gel aux contraintes de la microfluidique ; le troisième volet de ce chapitre, intitulé « Adaptation de la catalyse sol-gel pour une synthèse In-a-chip des microparticules hybrides » décrit en détail ces travaux.

Références bibliographiques

1. Ahn, C. & Choi, J.-W. Microfluidics and Their Applications to Lab-on-a-Chip. in *Springer Handbook of Nanotechnology* (ed. Bhushan, B.) 523–548 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-29857-1_19.
2. Verpoorte, E. & De Rooij, N. F. Microfluidics meets MEMS. *Proc. IEEE* **91**, 930–953 (2003).
3. Jayamohan, H. *et al.* Advances in Microfluidics and Lab-on-a-Chip Technologies. in *Molecular Diagnostics* 197–217 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802971-8.00011-0.
4. Shang, L., Cheng, Y. & Zhao, Y. Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews* **117**, 7964–8040 (2017).

1^{er} volet

Essais préliminaires sur dispositifs microfluidiques en polydimethylsiloxane (PDMS) modifié au laboratoire

Sommaire

1. Introduction	218
2. Résolution des contraintes liées aux caractéristiques des phases circulantes	219
2.1. Contraintes liées à la viscosité.....	220
2.2. Contraintes liées aux tensions interfaciales et de surfaces	221
3. Résolution des contraintes liées à l'incompatibilité entre la phase aqueuse continue et le matériau.....	222
3.1. Incorporation d'un composé hydrophile au cœur du PDMS.....	223
3.2. Traitement du PDMS en surface	225
4. Conclusion	228
5. Références bibliographiques.....	228

Figures

Fig. 1. Schéma représentatif du système microfluidique utilisé dans notre étude	219
Fig. 2. Schémas représentatifs des régimes de (a) dripping , (b) jetting et (c) coflowing , au sein d'un dispositif en <i>flowfocusing</i>	219
Fig. 3. Schéma représentatif du design des canaux du dispositif microfluidique utilisé dans notre étude, avec zoom sur la jonction.....	221
Fig. 4. Observation microscopique du phénomène d'inversion de phase d'émulsion en rapport avec l'incompatibilité du PDMS hydrophobe avec la phase continue aqueuse de notre système ...	222
Fig. 5. En haut, Mesure d'angles de contact de l'eau sur des surfaces de PDMS contenant différentes concentrations de PDMS- <i>b</i> -PEG. En bas, Mesure d'angles de contact de l'eau sur des surfaces de PDMS contenant différentes concentrations de PDMS- <i>b</i> -PEG	224
Fig. 6. Evolution du dispositif microfluidique en PDMS traité à la PVA durant son utilisation pour la génération de gouttelettes en milieu continu aqueux.....	226
Fig. 7. Structure chimique du Si-PEG-Si utilisé dans notre étude	226
Fig. 8. Génération de gouttelettes d'huile silylée en phase continue aqueuse dans un dispositif microfluidique en PDMS <i>thermal aged</i> , plasma-oxydé, et stocké sous H ₂ O à 4 °C.....	228

Tableau

Tableau 1. Tensions de surface et interfaciales des phases continues et discontinues.....	222
--	-----

1. Introduction

La synthèse de particules hybrides au sein d'un dispositif microfluidique requiert l'optimisation spatio-temporelle d'une panoplie de paramètres physicochimiques. En effet, il est utile de distinguer non seulement une séparation temporelle entre l'étape de formation des gouttelettes et l'étape consécutive de solidification par réticulation sol-gel, mais également une séparation spatiale faisant en sorte que certains paramètres optimaux soient critiques au niveau des jonctions où se forment les gouttelettes (ex. mouillabilité des parois, force de cisaillement, tension interfaciale, et rapport de viscosités) tandis que d'autres le sont davantage dans la partie où la réticulation, ou tout du moins son amorce, a lieu (ex. température, pH, et pouvoir catalytique du milieu). Dans ce premier volet nous allons nous intéresser à l'étape initiale de la synthèse des particules hybrides à savoir celle de la formation des gouttelettes d'huile silylée, ainsi qu'aux paramètres influents sur ce processus.

Nous avons soulevé de façon détaillée, dans le chapitre IV, les verrous liés à la génération de gouttelettes dans des phases continues aqueuses en microfluidique. Etant donné que la formation de nos particules hybrides se fait sur la base d'une émulsification Huile/Eau, nous avons en toute logique fait face aux mêmes obstacles : d'une part, une solution devait être trouvée à l'incompatibilité des deux phases circulantes en terme de viscosité et de tension interfaciale, et de l'autre, il a fallu travailler sur les propriétés de surface du polydiméthylsiloxane (PDMS : SYLGARD™ 184), matériau de base des dispositifs microfluidiques, de sorte à le rendre hydrophile et compatible avec notre système microfluidique. En effet, ce matériau couramment utilisé au sein de notre laboratoire et du laboratoire partenaire de l'Institut d'Electronique et des Systèmes (IES) présente une multitude d'avantages mais est naturellement hydrophobe (angle de contact de l'eau = 109°). Plusieurs études, détaillées dans le chapitre précédent, ont été menées afin de lui conférer des propriétés hydrophiles.

Dans ce volet, nous aborderons les stratégies mises en place pour concevoir un dispositif microfluidique (puce en PDMS collée sur lame en verre, Figure 1) apte à générer des microgouttelettes d'ICO en phase continue aqueuse, et ce de façon stable et continue.

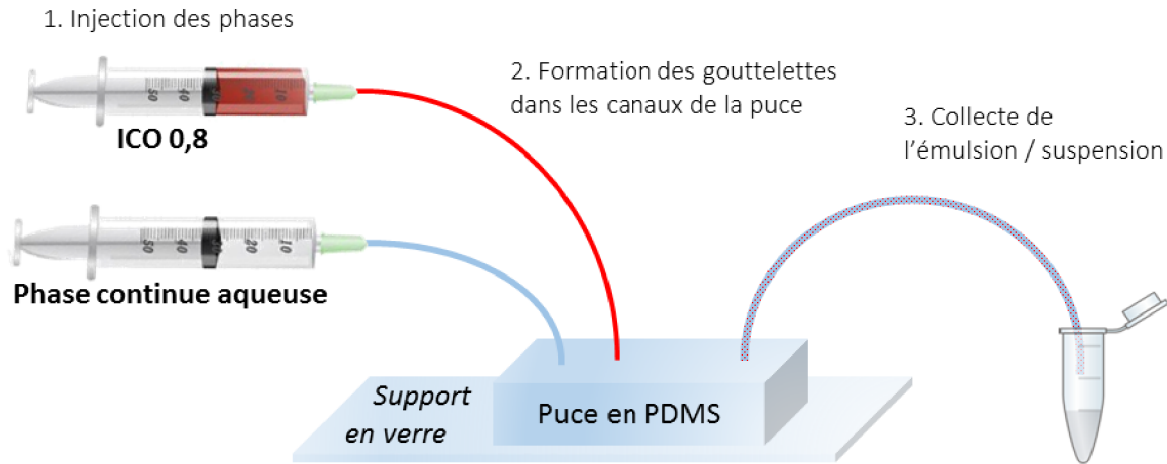


Fig. 1. Schéma représentatif du système microfluidique utilisé dans notre étude. Les fluides sont injectés à l'aide d'un pousse-seringues double (Harvard Apparatus). Dessin non à l'échelle.

2. Résolution des contraintes liées aux caractéristiques des phases circulantes

La formation de gouttelettes au sein d'un dispositif microfluidique peut se faire suivant deux régimes distincts, mais pouvant évoluer l'un vers l'autre (Figure 2) :

- Un régime dit de *jetting*, qui décrit un filet de phase discontinue après la jonction, suivi d'une rupture des gouttelettes. Ce régime est exploité quand une haute fréquence de génération de gouttes est recherchée ;
- Un régime de *dripping*, décrivant une rupture nette de la gouttelette en post-jonction. Ce second régime est exploité lorsqu'il y a besoin d'une maîtrise fine des dimensions des gouttelettes (taille et monodispersité).

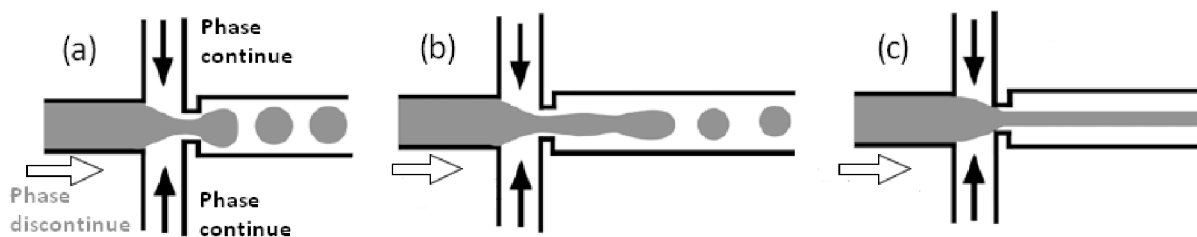


Fig. 2. Schémas représentatifs des régimes de (a) *dripping*, (b) *jetting* et (c) *coflowing*, au sein d'un dispositif en *flowfocusing*. Le régime de *coflowing* (à ne pas confondre avec les dispositifs en *coflowing*, cf. chapitre IV - Fig. 1) est exploité pour la réalisation de fibres par microfluidique, mais est plutôt indésirable durant la génération de gouttelettes. Adapté à partir de la réf. 1.

D'un point de vue physique, la formation des gouttelettes (suivant l'un ou l'autre des deux régimes précités) est la résultante d'un équilibre entre trois forces majeures : la force visqueuse, la force de tension superficielle et interfaciale, et la force inertielle. De ces trois forces, certains

auteurs ont pu déduire des nombres sans dimensions qui aident à prévoir le comportement des phases au sein des dispositifs et à maîtriser le processus de formation des gouttelettes.¹⁻³ On distingue notamment :

- Le nombre de Reynolds (Re), qui décrit l'importance des forces inertielles comparées aux forces visqueuses ;
- Le nombre capillaire (Ca), qui décrit l'effet relatif des forces visqueuses sur les forces de tension interfaciales ;
- Le nombre de Weber (We), qui compare les forces inertielles aux forces de tension de surface.

D'un point de vue pratique, ces forces se retrouvent regroupées dans trois paramètres :

- La géométrie des canaux, dont dépend l'angle d'attaque de la phase continue sur la phase discontinue (de 0° en *coflowing*, jusqu'à 90° en *flowfocusing*), et par conséquent le cisaillement capable « d'arracher » les gouttelettes ;
- Les propriétés intrinsèques des phases, qui englobent la viscosité et la tension de surface / interfaciale précitées ;
- Les conditions de flux des phases, dont va dépendre non seulement le cisaillement, mais également la laminarité du flux en aval de la jonction, assurant la stabilité des gouttelettes après leur formation.

2.1. Contraintes liées à la viscosité

Pour ce qui est de notre système, un grand écart de viscosité des phases circulantes a été constaté de prime à bord. En effet, la viscosité de la phase discontinue (ICO 0,8) étant de 764 mPa·s, elle était plus de 700 fois supérieure à celle de la phase continue aqueuse (aux alentours de 1 mPa·s), et le phénomène de cisaillement à l'origine du *dripping* n'aurait pas pu se produire. Afin de parer à cela, il nous fallait réduire cet écart en augmentant la viscosité de la phase continue. Nous avons donc ajouté des concentrations croissantes de glycérol jusqu'à un ratio eau / glycérol de 50 / 50 ($\eta = 6$ mPa·s),⁴ permettant ainsi de réduire le ratio de 764 à moins de 130. A côté de cela, il était intéressant d'assurer un cisaillement important à la jonction en optant pour un dispositif en *flowfocusing*. Aussi, et comme nous l'avions rapporté dans le chapitre IV, il y a intérêt à utiliser un dispositif doté d'une constriction suivie d'un bec allongé en post-jonction (cf. chapitre IV - Fig. 2). Par conséquence, nous nous sommes arrêtés sur le design décrit en Figure 3, pour une puce microfluidique en PDMS destinée aux essais préliminaires.

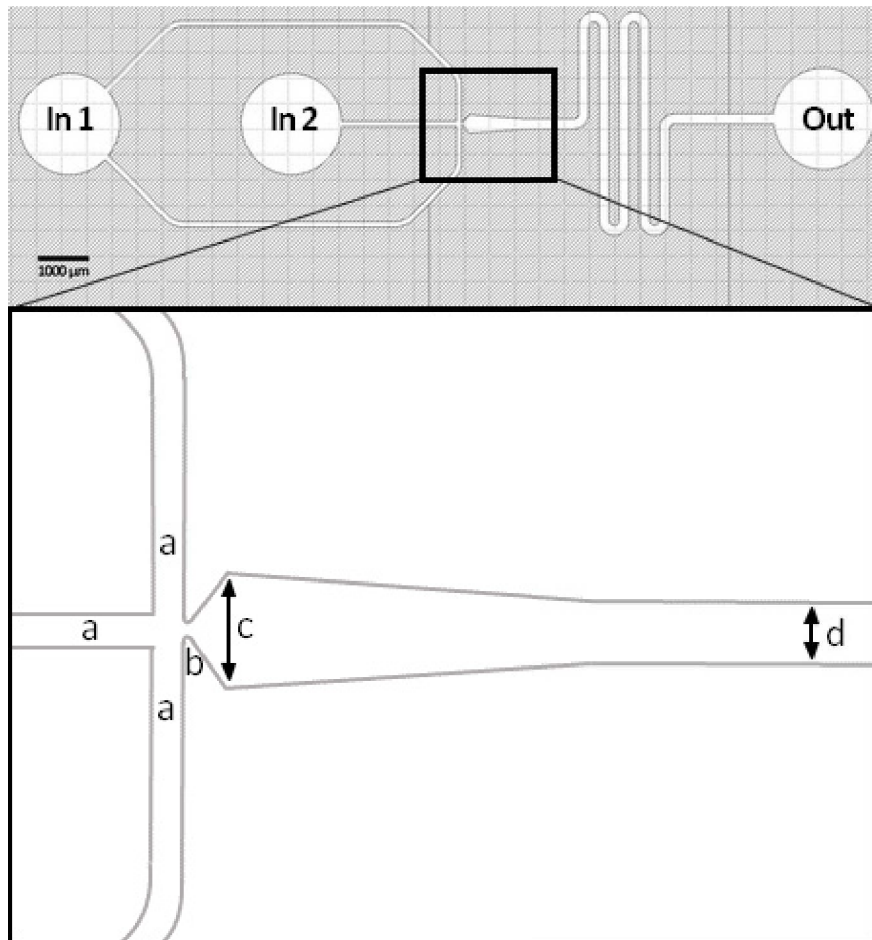


Fig. 3. Schéma représentatif du design des canaux du dispositif microfluidique utilisé dans notre étude, avec zoom sur la jonction.

(**a**) = 100 µm, (**b**) = 30 µm, (**c**) = 360 µm, et (**d**) = 200 µm. **In 1 et 2** : orifices d'injection de la phase continue aqueuse et de la phase discontinue huileuse, respectivement ; **Out** : orifice de sortie de l'émulsion / suspension. Le design a été conçu au sein de l'IES à Montpellier.

2.2. Contraintes liées aux tensions interfaciales et de surfaces

L'une des clés ayant mené à la réussite de la première partie du projet a été la conception du système de thermostabilisation des émulsions, qui a servi de base à la formulation de nos particules hybrides (cf. chapitres II et III). En effet, ce système nous avait permis d'éviter l'utilisation de tensioactifs qui auraient potentiellement attiré dans la phase continue aqueuse les PAs encapsulés au sein des gouttelettes d'huile, réduisant par ce fait les rendements d'encapsulation.

Pour ce qui est de cette deuxième partie en microfluidique appliquée, il fallait s'y prendre autrement. Les tensions de surface des phases citées plus haut, ainsi que leurs tensions interfaciales ont été d'abord mesurées par la technique à la lame de Wilhelmy (tensiomètre Kruss K100).

Tableau 1. Tensions de surface et interfaciales des phases continues et discontinues

Phase	Tension de surface (mN·m ⁻¹)
Eau milli-Q	73
Eau milli-Q + 50 % Glycérol	53
ICO 0,8	28
Phases	Tension interfaciale (mN·m ⁻¹)
ICO 0,8 / Eau milli-Q	17
ICO 0,8 / Eau milli-Q + 50 % Glycérol	13

Les résultats retranscrits dans le tableau 1 démontrent une diminution nette de la tension de surface de la phase aqueuse (de 73 à 53 mN·m⁻¹) quand 50 % de glycérol y sont ajoutés. En toute logique, la tension interfaciale entre l'ICO 0,8 et la phase aqueuse se retrouve également diminuée par cet ajout (de 17 à 13 mN·m⁻¹). Cette baisse de tension interfaciale est non seulement avantageuse pour la formation des gouttelettes à la jonction, évitant ainsi l'utilisation de tensioactifs, mais elle aide également à la stabilité des gouttelettes formées en sortie de puce (15 minutes de stabilité constatée en condition de non-réticulation). En définitive, l'ajout de glycérol a servi non seulement à épaissir la phase aqueuse mais également à réduire ses forces de tension interfaciale, participant ainsi grandement à la formation des gouttelettes d'huile silylée et à leur stabilité le temps que leur réticulation ait lieu.

3. Résolution des contraintes liées à l'incompatibilité entre la phase aqueuse continue et le matériau

L'incompatibilité des matériaux hydrophobes (parmi eux le PDMS) avec les phases continues aqueuses a été expliquée dans le chapitre précédent, et confirmée par l'observation ci-dessous s'agissant de notre système.

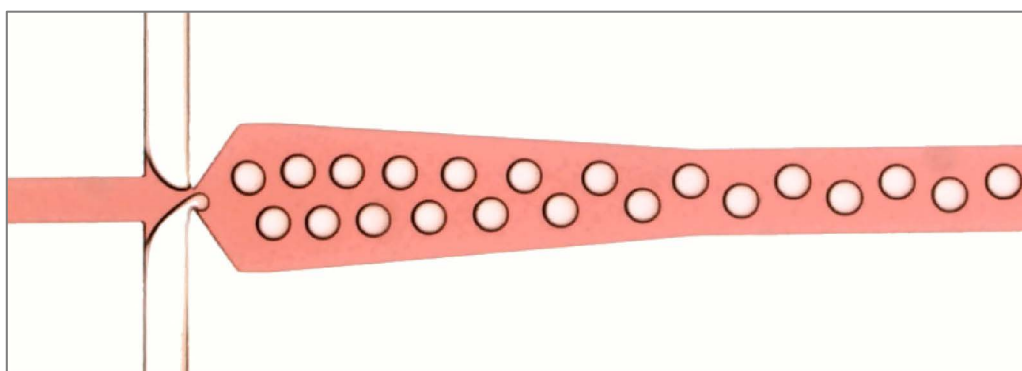


Fig. 4. Observation microscopique du phénomène d'inversion de phase d'émulsion en rapport avec l'incompatibilité du PDMS hydrophobe avec la phase continue aqueuse de notre système. L'huile de ricin silylée est coloré au rouge soudan pour plus de clarté, tandis que la phase continue aqueuse est transparente.

Cette incompatibilité a été contournée dans différentes études dans la littérature, soit par l'ajout de composés hydrophiles au cœur du matériau, ou bien par la mise en place de différents traitements de surface pour la plupart basés sur l'adjonction d'un composé hydrophile après activation de la surface par plasma-oxydation. Ces deux stratégies ont été étudiées dans le cadre de notre projet.

3.1. Incorporation d'un composé hydrophile au cœur du PDMS

Lors du chapitre précédent, nous avons cité les travaux de Yao et Fang⁵ qui avaient incorporé un additif amphiphile, le PDMS-*b*-PEG (35:65, MW = 600, *Polysciences*), à différentes concentrations dans le PDMS avant polymérisation. Cet additif a la capacité de se lier de façon covalente au PDMS durant sa réticulation, et d'abaisser la tension de surface du matériau final grâce à ses chaînes de polyéthylène glycol. Les auteurs avaient notamment pu réduire l'angle de contact de l'eau de 109° à moins de 22° en incorporant 1,9 % PDMS-*b*-PEG, tout en maintenant la capacité du PDMS à coller au support en verre après traitement au plasma d'O₂. Par ailleurs, ils avaient décrit un phénomène d'angle de contact évolutif, qu'ils avaient expliqué par le repositionnement progressif des chaînes de PEG vers la phase aqueuse conduisant à une diminution progressive de l'angle de contact au cours du temps. Nous avons repris ces expériences de notre côté, avec le même additif fourni par *Gelest* (référence : DBE-712). Les résultats d'angle de contact obtenus sont compilés dans la figure 5 (schéma du haut), et comparés à ceux de l'étude précédente (schéma du bas).

Comme attendu, le PDMS pur a montré un angle de contact stable de 109° durant les 5 min de l'expérience. Pour les échantillons contenant du PDMS-*b*-PEG comme additif, l'angle de contact initial était inversement proportionnel au taux de d'additif ajouté, allant de 60° avec 1 %, à moins de 10° avec 2,5 % d'additif. Tel que rapporté dans l'étude précitée, une décroissance de l'angle de contact a également été observée au cours du temps pour ces échantillons, avec une stabilisation après 2 à 3 min autour de 18° pour l'échantillon contenant 1 % d'additif, et autour de 10° pour les autres (1,5 ; 1,9 et 2,5 % d'additif). Un meilleur résultat final a donc été obtenu concernant l'hydrophile du matériau.

Cependant, les essais de collage moléculaire sur lame de verre par traitement au plasma (Diener Electronic, RFG 13.56/300) se sont avérés peu fructueux. En effet, différents temps d'exposition (allant de 10 à plus de 60 secondes) à deux différents plasmas (O₂ pur, et 75% N₂ / 25% O₂) et à deux différentes puissances (50 et 100 W) ont été étudiés, sans pour autant arriver à coller de façon étanche les deux parties du dispositif microfluidique. De ce fait, cette piste a été abandonnée.

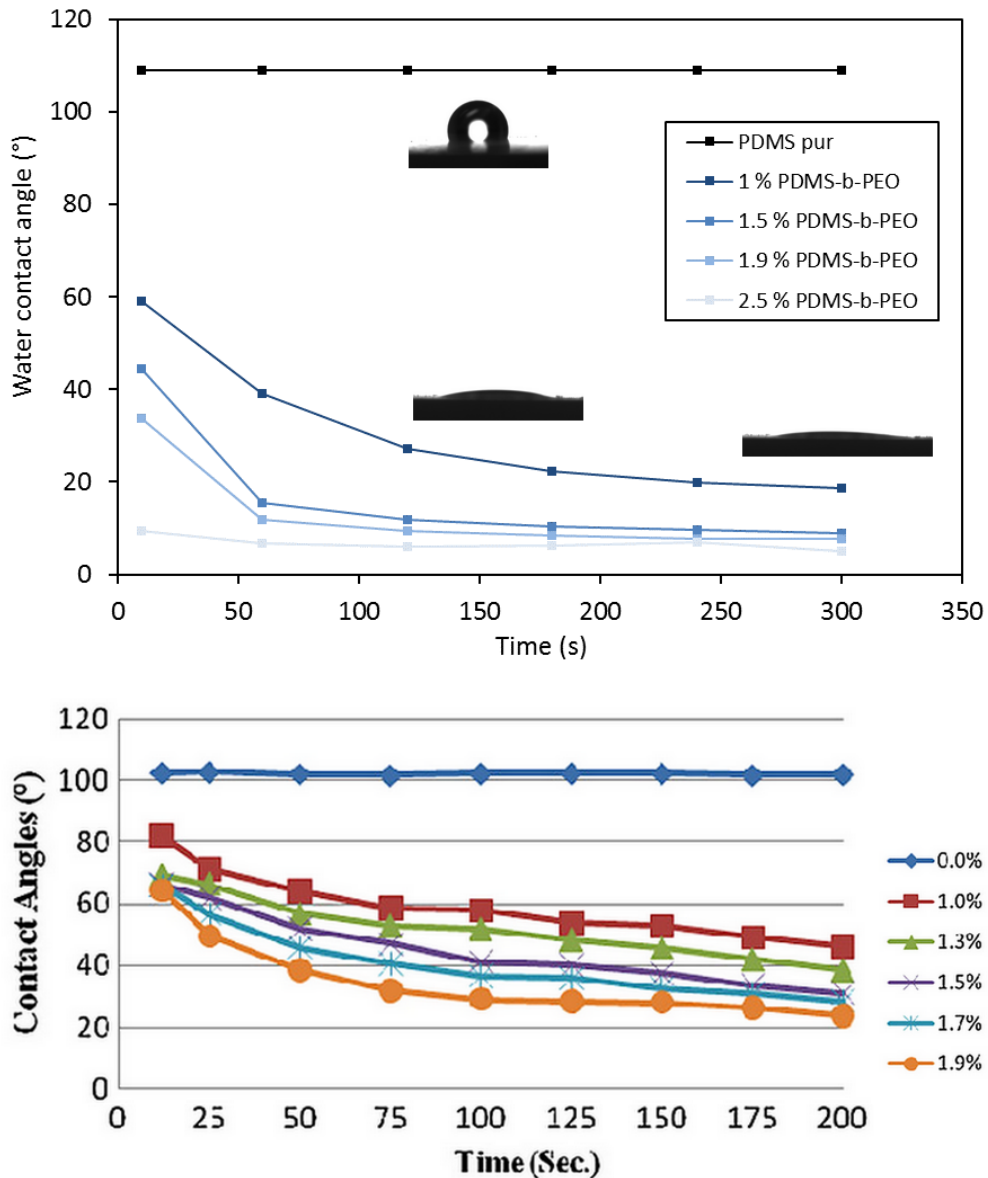


Fig. 5. En haut, Mesure d'angles de contact de l'eau sur des surfaces de PDMS contenant différentes concentrations de PDMS-*b*-PEG. Les trois illustrations représentent un état de non mouillabilité sur PDMS pur, un état transitoire sur PDMS + PDMS-*b*-PEG, et enfin un état de mouillabilité optimal (< 10°) sur ce dernier matériau.

En bas, Mesure d'angles de contact de l'eau sur des surfaces de PDMS contenant différentes concentrations de PDMS-*b*-PEG. Adapté à partir de la réf. 5.

3.2. Traitement du PDMS en surface*

Différents traitements de surface du PDMS, retrouvés dans la littérature et compilés au sein du chapitre précédent, ont été repris dans le cadre de notre étude.

3.2.1. Traitement à l'alcool polyvinylique (PVA)

Etant données la réversibilité et la fugacité de l'hydrophilie créée à la suite d'un traitement oxydant au plasma sur le PDMS, l'adjonction de molécules hydrophiles capables de se lier chimiquement aux groupements hautement réactifs en surface a été une alternative très étudiée dans la littérature. Parmi ces molécules, le PVA de formule chimique $-(CH_2CHOH)_n-$ a été largement utilisé comme agent hydrophilisant de dispositifs microfluidiques en PDMS⁶⁻⁸; nous avons donc étudié cela de plus près.

Nous avons utilisé du PVA hydrolysé à 88 % (PolyScience) tel que préconisé par Wu et al.⁹ Notre protocole était comme suit :

- Lavage des puces en PDMS et des lames en verre à l'isopropanol et séchage à l'azote ;
- Traitement au plasma d'O₂ (100 w, 80 sccm[†], 1 min) ;
- Collage moléculaire des deux surfaces ;
- Injection de PVA (1 % en solution aqueuse) dans les canaux. Laisser se déposer durant 10 min avant de sécher à l'azote ;
- Chauffage à 110°C pendant 10 min ;
- Répétition de la procédure à partir de l'injection de PVA 3 fois.

Les dispositifs ainsi obtenus ont montré un collage optimal et une excellente étanchéité lors de la circulation des phases. Néanmoins, et comme le démontre la Figure 6, le régime de *dripping* qui assure la formation de gouttelettes de taille homogène n'est stable que durant les 5 premières minutes d'utilisation du dispositif. Le traitement s'est alors avéré incapable d'apporter une hydrophilie prolongée suffisante pour permettre la formation d'une quantité importante de gouttelettes d'huile. D'autres pistes ont donc été explorées.

* Les traitements de surface impliquant l'utilisation de plasma ont été réalisés au sein de l'IES.

† SCCM (Standard Cubic Centimeters per Minute) est une unité physique de débit massique d'un fluide, typiquement un gaz. Cette unité correspond au débit du fluide en question en cm³/min, à une densité définie par des conditions standards de température et de pression.

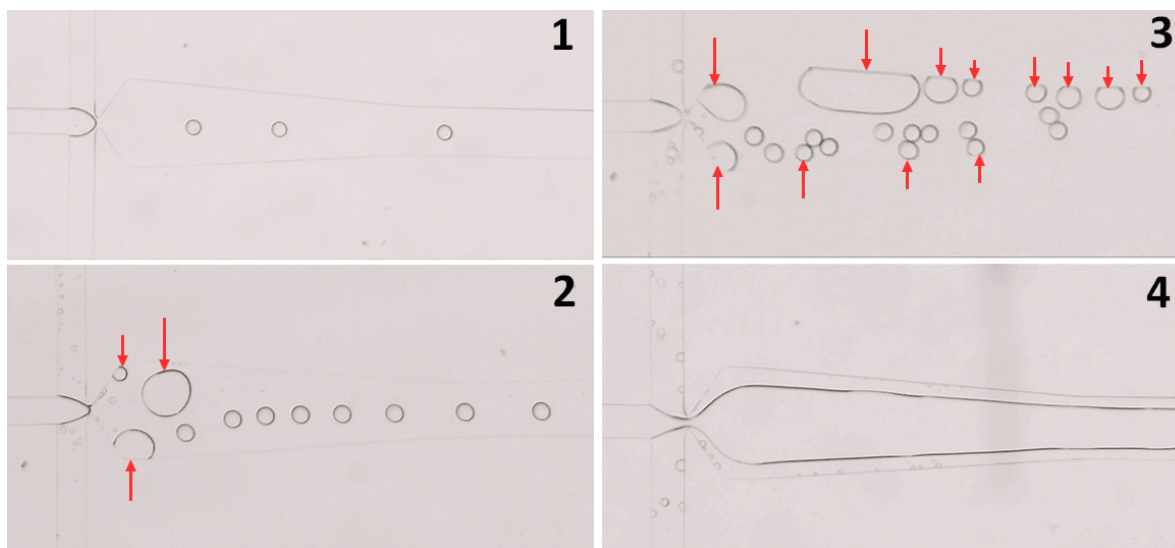


Fig. 6. Evolution du dispositif microfluidique en PDMS traité à la PVA durant son utilisation pour la génération de gouttelettes en milieu continu aqueux : **(1)** régime de *dripping* régulier pendant les 5 premières minutes d'utilisation, **(2)** adhésion des premières gouttelettes d'huile sur les parois, **(3)** coalescence des gouttelettes ayant adhéré, et **(4)** régime de *co-flowing*. Les flèches rouges indiquent les dépôts statiques d'huile. Les débits de phases continue et discontinue étaient de 200 et 20 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivement, durant toute l'expérience.

3.2.2. Traitement au polyéthylène glycol bisilylé (Si-PEG-Si)

L'un des composés hydrophiles que nous avons essayé de greffer en post plasma-oxydation était le PEG, fonctionnalisé par greffage d'alcoxysilane sur ses deux chaînes terminales (Si-PEG-Si), tel que rapporté dans la littérature.^{10,11} Le Si-PEG-Si (Figure 7) a été synthétisé en suivant le protocole décrit par Echalié et *al.*^{12,13}, avec un PEG 2000 et de l'IPTES comme réactifs de départ. L'idée a été d'ancrer le Si-PEG-Si par réaction sol-gel sur les différentes entités oxygénées formées à la surface des canaux en PDMS après plasma-oxydation, parmi elles des silanols (Si-OH).

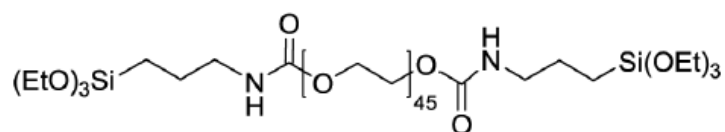


Fig. 7. Structure chimique du Si-PEG-Si utilisé dans notre étude. Adapté à partir de la réf. 12.

Deux solutions ont été préparées à partir du Si-PEG-Si produit, sur la base des études précitées : 3mM dans du toluène, et 3mM dans une solution aqueuse, toutes deux acidifiées à l'HCl. Les solutions ont été utilisées en infusion durant 2 h dans les canaux des dispositifs en PDMS après plasma-oxydation et collage sur lame en verre.

Les résultats obtenus étaient diamétralement opposés : d'un côté, la solution toluénique a montré une réactivité très difficilement contrôlable avec une réticulation sol-gel obstruant la

lumière des canaux. De l'autre, la solution aqueuse n'a pas permis un greffage adéquat, compte tenu de l'inversion de l'émulsion formée (cf. Figure 4). De ces faits, le traitement de surface par greffage sol-gel de molécules hydrophiles a été abandonné.

3.2.3. Traitement plasma-oxydant avec stabilisation de l'hydrophilie

L'hydrophilie du PDMS traité en surface par plasma-oxydation est bien connue pour être non seulement réversible, mais également très fugace. Des travaux ont été menés afin de mieux comprendre les mécanismes induisant ce retour rapide d'hydrophobie, et deux phénomènes majeurs ont été mis en cause : d'un côté, la migration en surface des chaînes légères de PDMS due à l'élasticité du matériau apportant non seulement une surface chimiquement hydrophobe mais également rugueuse et incompatible avec la circulation de fluides aqueux. De l'autre, l'air ambiant à constante diélectrique faible aurait un effet déstabilisant sur les entités oxydées formées en surface après plasma-oxydation.

De ces constatations ont alors découlées deux stratégies afin de maintenir l'hydrophilie créée après traitement au plasma oxydant : d'une part, le *thermal aging* consistant en le chauffage prolongé des puces en PDMS afin de faire polymériser les chaînes courtes résiduelles,¹⁴ et de l'autre l'immersion des canaux dans un milieu à constante diélectrique forte, tel que l'eau, à basse température afin de stabiliser les entités chimiques responsables de l'hydrophilie en surface.¹⁵

Nous avons alors entrepris de compiler les deux stratégies afin d'obtenir un traitement le plus stable possible. Le protocole final a comporté les étapes suivantes :

- Chauffage à 80 °C du PDMS coulé sur les moules en silicium comportant les gravures des puces. Démoulage et chauffage des puces formées durant 5 jours à la même température ;
- Lavage des puces en PDMS et des lame-supports en verre ;
- Traitement au plasma O₂ (100 W, 1 min) des deux surfaces, et collage moléculaire suivi d'un traitement thermique à 90 °C durant 2 min ;
- Injection d'H₂O dans les canaux et stockage à 4 °C jusqu'à utilisation.

Les dispositifs ainsi obtenus ont présenté une hydrophilie très intéressante, mais stable seulement durant les 20 premières minutes d'utilisation. En conditions de stockage par contre, le traitement hydrophile est stable au-delà d'une semaine. Les résultats sont montrés en figure 8.

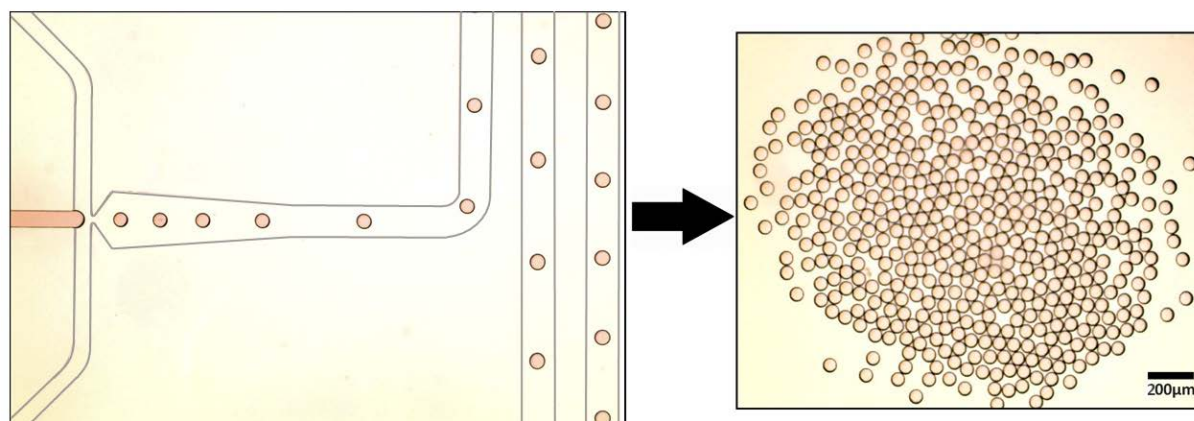


Fig. 8. Génération de gouttelettes d’huile silylée en phase continue aqueuse dans un dispositif microfluidique en PDMS *thermal aged*, plasma-oxydé, et stocké sous H₂O à 4 °C.

4. Conclusion

Ce premier volet du chapitre V a été consacré à l’optimisation des paramètres nécessaires à la génération de gouttelettes d’huile de ricin silylée en microfluidique. Ainsi, le design d’une jonction particulière (i.e. constriction + bec allongé), ajouté à l’utilisation de glycérol à 50 % en phase aqueuse afin de compenser la différence de viscosité entre les phases circulantes, se sont avérés nécessaires au processus de formation des gouttelettes. Nous avons réussi à générer des émulsions homogènes de taille micrométrique le temps de la stabilité du dispositif.

Ce même dispositif a pu être réalisé à partir du PDMS qui a subi de multiples modifications au laboratoire afin de lui procurer une certaine hydrophilie. Le protocole ayant donné les résultats les plus satisfaisants a été celui impliquant un *thermal aging* du PDMS, suivi d’un traitement au plasma oxydant et d’un stockage sous H₂O. Cependant, ce protocole, bien que suffisant pour établir la preuve de concept de la génération de gouttelettes d’huile de ricin silylée par microfluidique, ne permettait la génération de gouttelettes que durant 20 min, temps considéré insuffisant pour l’étude de la réticulation *in-a-chip* et pour une application industrielle adéquate. De ce fait, nous nous sommes intéressés à d’autres matériaux naturellement hydrophiles pour concevoir des dispositifs microfluidiques compatibles avec des phases continues aqueuses.

5. Références bibliographiques

1. Nunes, J. K., Tsai, S. S. H., Wan, J. & Stone, H. A. Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis. *J. Phys. Appl. Phys.* **46**, (2013).
2. Christopher, G. F. & Anna, S. L. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *J. Phys. Appl. Phys.* **40**, R319–R336 (2007).
3. Zhao, C.-X. & Middelberg, A. P. J. Two-phase microfluidic flows. *Chem. Eng. Sci.* **66**, 1394–1411 (2011).

4. Takamura, K., Fischer, H. & Morrow, N. R. Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J. Pet. Sci. Eng.* **98–99**, 50–60 (2012).
5. Yao, M. & Fang, J. Hydrophilic PEO-PDMS for microfluidic applications. *J. Micromechanics Microengineering* **22**, 025012 (2012).
6. Hung, L.-H., Teh, S.-Y., Jester, J. & Lee, A. P. PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches. *Lab. Chip* **10**, 1820 (2010).
7. Trantidou, T., Elani, Y., Parsons, E. & Ces, O. Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsyst. Amp Nanoeng.* **3**, 16091 (2017).
8. Samandari, M., Alipanah, F., Haghjooy Javanmard, S. & Sanati-Nezhad, A. One-Step Wettability Patterning of PDMS Microchannels for Generation of Monodisperse Alginate Microbeads by In Situ External Gelation in Double Emulsion Microdroplets. *Sens. Actuators B Chem.* S0925400519306239 (2019) doi:10.1016/j.snb.2019.04.100.
9. Wu, D., Luo, Y., Zhou, X., Dai, Z. & Lin, B. Multilayer poly(vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation. *ELECTROPHORESIS* **26**, 211–218 (2005).
10. Papra, A. *et al.* Microfluidic Networks Made of Poly(dimethylsiloxane), Si, and Au Coated with Polyethylene Glycol for Patterning Proteins onto Surfaces. *Langmuir* **17**, 4090–4095 (2001).
11. Hellmich, W. *et al.* Poly(oxyethylene) Based Surface Coatings for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels. *Langmuir* **21**, 7551–7557 (2005).
12. Echalié, C. *et al.* Easy Synthesis of Tunable Hybrid Bioactive Hydrogels. *Chem. Mater.* **28**, 1261–1265 (2016).
13. Tourné-Péteilh, C. *et al.* Combining sol–gel and microfluidics processes for the synthesis of protein-containing hybrid microgels. *Chem. Commun.* **55**, 13112–13115 (2019).
14. Eddington, D. T., Puccinelli, J. P. & Beebe, D. J. Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane. *Sens. Actuators B Chem.* **114**, 170–172 (2006).
15. Chen, I.-J. & Lindner, E. The Stability of Radio-Frequency Plasma-Treated Polydimethylsiloxane Surfaces. *Langmuir* **23**, 3118–3122 (2007).

2^e volet

***Conception d'un dispositif microfluidique innovant compatible avec
les phases continues aqueuses***

Sommaire

1.	Introduction	232
2.	Matériel et méthodes	235
2.1.	Description de l'appareillage	235
2.2.	Description du dessin	236
2.3.	Description de la résine	236
2.4.	Préparation et structuration de la couche	237
3.	Résultats	237
3.1.	Verrous	237
3.2.	Stratégies	238
4.	Conclusion	239
5.	Références bibliographiques	240

Figures

Fig. 1.	Procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique en verre par photomasquage	233
Fig. 2.	Schéma du procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique PDMS-verre	234
Fig. 3.	Principe de la photolithographie sur résine en utilisation positive et négative	234
Fig. 4.	Photographie et caractéristiques de la DILASE 650	235
Fig. 5.	Fichier au format LWO contenant un dessin de zones « vertes » à insoler par le laser et de zones « rouges » à ne pas insoler	236
Fig. 6.	Précurseur silylé composant de la résine (le EETMOS)	236
Fig. 7.	Dépôt de la couche de résine par un procédé de spin-coating à l'aide d'une tournette (ou spinner) avec couvercle de type Gyrset	237
Fig. 8.	Schéma descriptif des trois stratégies adoptées pour la conception d'un dispositif microfluidique innovant compatible avec les phases continues aqueuses	238

1. Introduction

Suite aux obstacles rencontrés tout au long de nos travaux préliminaires pour la conception et l'utilisation d'un dispositif microfluidique en PDMS, nous avons entrepris de concevoir un dispositif naturellement hydrophile qui permette de générer des gouttelettes d'ICO en phase continue aqueuse de façon stable et continue.

Pour ce faire, nous avons mis en place une collaboration avec le Professeur Pascal Etienne, responsable de l'équipe « matériaux hybrides et nanostructurés » du Laboratoire Charles Coulomb (L2C) et de la plateforme d'optomicrofluidique de Montpellier (POMM)*, avec son ingénieur Sami Bouzid. Le but de notre projet a été de réaliser un dispositif microfluidique hydrophile à géométrie facilement modulable. Cependant, la géométrie décrite dans le second volet de ce chapitre a été sélectionnée pour la phase de conception initiale.

Pour concevoir ce dispositif microfluidique, nous avons choisi d'utiliser un matériau hybride organique-inorganique apte à réticuler par procédé sol-gel, et nous nous sommes servis d'une technologie de photolithographie par écriture laser pour le mettre en forme. Notre choix s'est porté sur un matériau hybride car ce type de matériaux présente généralement, du fait de sa composition particulière, une stabilité chimique remarquable vis-à-vis des solvants non seulement aqueux mais également organiques. De plus, certaines caractéristiques des matériaux hybrides, telle que l'hydrophilie, peuvent être facilement modulées en faisant varier le ratio des parties organique et inorganique au sein du réseau. Enfin, ces matériaux offrent une bonne résistance mécanique liée à leur rigidité, et une résistance remarquable aux rayons UV comparés aux polymères couramment utilisés.

Le matériau que nous avons utilisé, que nous nommerons résine, est élaboré par réticulation sol-gel d'un précurseur dont la synthèse est protégée par un brevet (Brevet Essilor : P. Etienne, F. Deliane, J. Ballet, C. Biver, J-P. Cano "Procédé de fabrication d'une composition photoréticulable" Brevet International N°PCT/FR2009/050640, Essilor-CNRS-UM2), qui a par ailleurs subi des optimisations depuis son dépôt. Cette résine présente naturellement une hydrophilie assez satisfaisante caractérisée par un angle de contact de l'eau proche de 70 °, alors que le PDMS préalablement utilisé à un angle de contact de 105 °. La résine est également sensible à un traitement au plasma O₂ permettant une augmentation de son hydrophilie (angle

* POMM est dédiée au prototypage rapide de systèmes optomicrofluidiques intégrant les composants optiques et microfluidiques afin de développer des outils d'analyse innovants et sensibles, ou plus généralement tout type de dispositif nécessitant une ou plusieurs étapes de microstructuration additive de matériaux. Les compétences mises en jeu portent sur le développement de matériaux structurables sous irradiation laser UV ou visible (matériaux polymères et hybrides organiques-inorganiques).

de contact de l'eau = 30 °) de façon plus prolongée que sur le PDMS (une semaine pour la résine contre quelques minutes pour le PDMS).

Pour ce qui est de la technologie, la photolithographie par écriture laser offre une grande modularité et souplesse lors du prototypage rapide de nouveaux objets, et présente donc un intérêt majeur en recherche et développement. Elle s'affranchit de l'utilisation de masques comme c'est le cas durant la conception classique de puces en verre (Figure 1), et s'affranchit de la fabrication de moules dits « wafers » comme c'est le cas pour ce qui est de la conception de puces en PDMS (Figure 2). Les coûts sont donc fortement réduits à l'étape de prototypage. Par ailleurs, la technologie de photolithographie par écriture laser sur résine peut tout aussi bien être utilisée en mode positif ou négatif (Figure 3). Le précurseur que nous avons utilisé étant photoréticulable, nous avons travaillé en mode négatif, c'est-à-dire que le précurseur sera insolé dans les zones de contours des microcircuits de nos dispositifs tandis que le précurseur non insolé sera éliminé à l'aide de solvants adéquats.

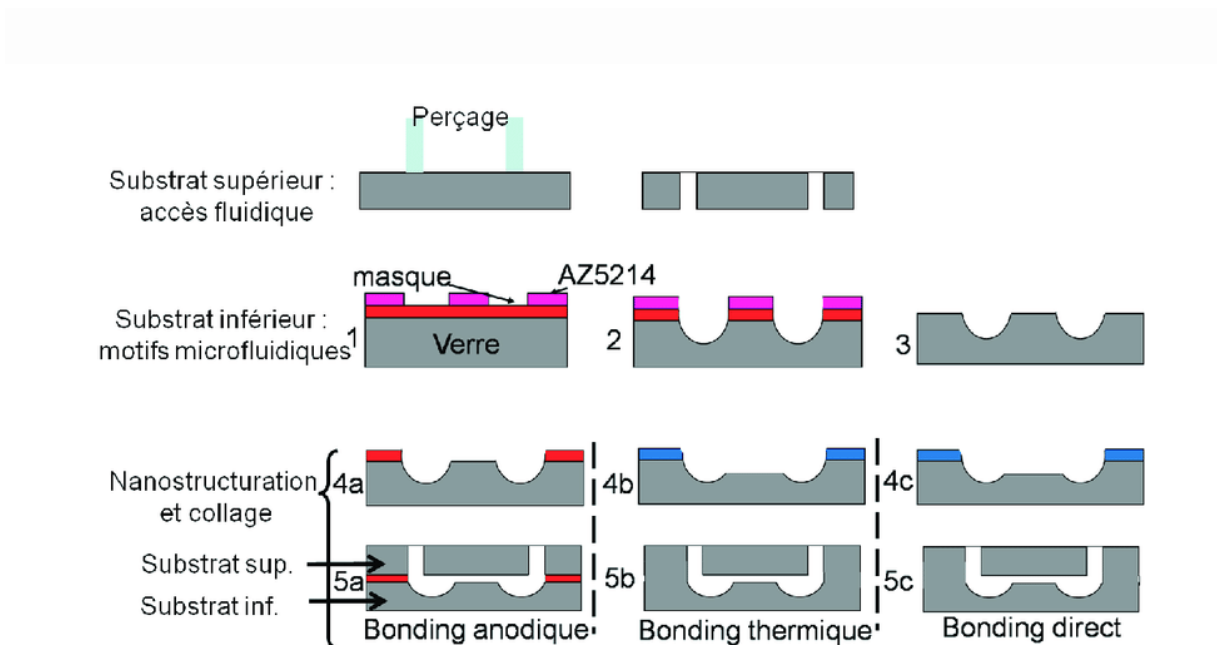


Fig. 1. Procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique en verre par photomasquage : **(1)** Dépôt d'un masque et lithographie optique pour usiner le masque. **(2)** Transfert du masque et gravure des microcanaux. **(3)** Elimination du masque. **(4a)** dépôt et gravure d'un film mince diélectrique. **(4b et c)** dépôt d'un masque pour réalisation de la gravure du nanocanal. Scellement de deux substrats par : **(5a)** collage anodique ; **(5b)** collage thermique ; **(5c)** collage direct. Adapté à partir de la réf. 1.

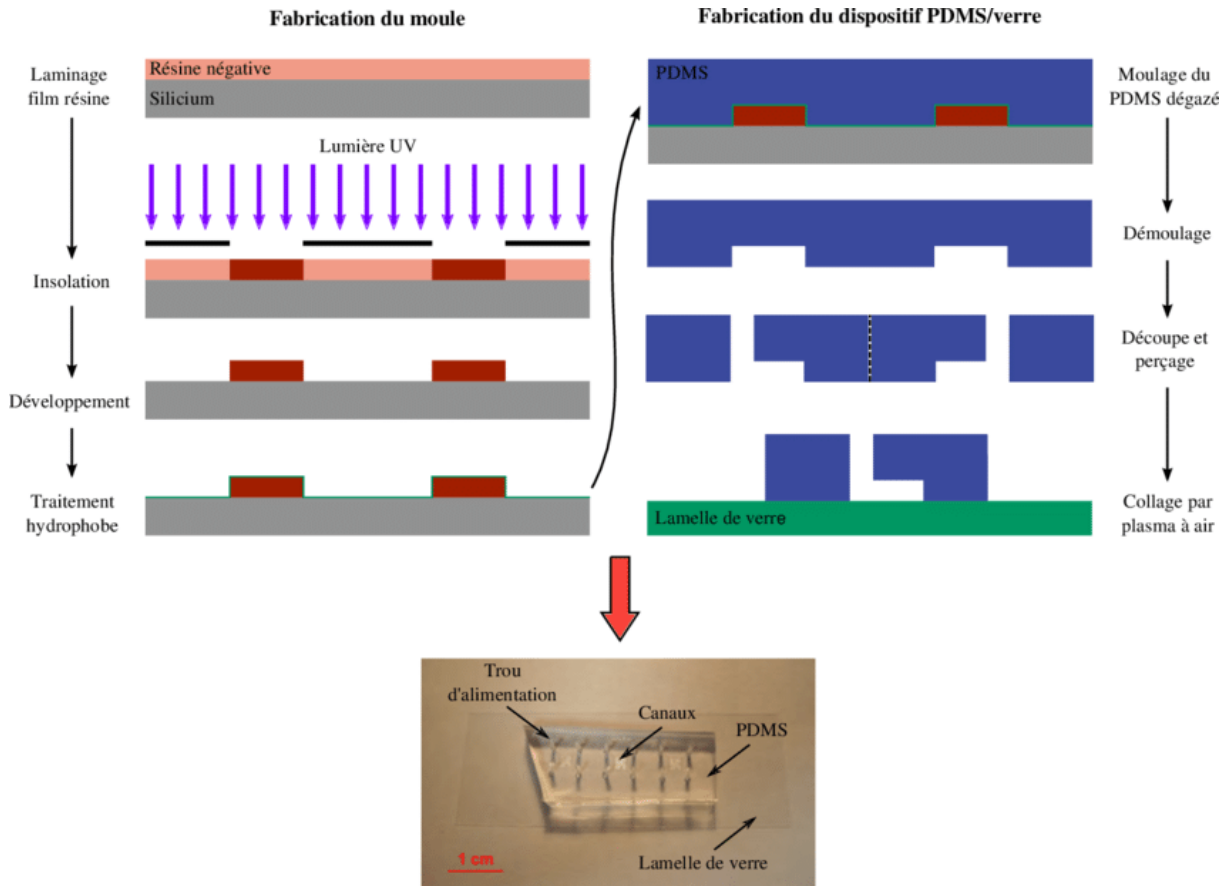


Fig. 2. Schéma du procédé de fabrication d'un dispositif microfluidique PDMS-verre. Adapté à partir de la réf. 2.

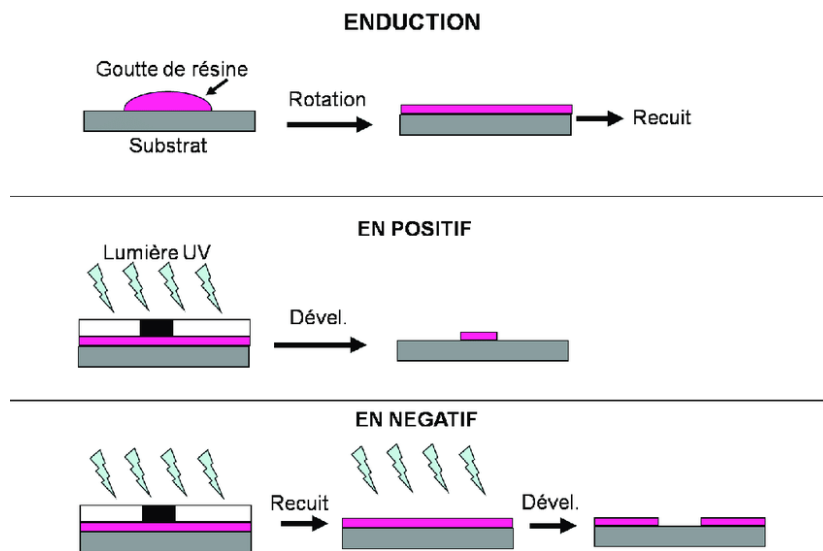


Fig. 3. Principe de la photolithographie sur résine en utilisation positive et négative. Sur cette illustration, l'insolation se fait par photomasquage et non par écriture laser. Adapté à partir de la réf. 1.

2. Matériel et méthodes

2.1. Description de l'appareillage

L'équipement utilisé est la Dilase 650 (KLOÉ, Montpellier. Figure 4) qui est un appareil de photolithographie par écriture directe. Cet appareil permet de fabriquer des dispositifs en résine avec une résolution spatiale très fine (de l'ordre du micron) et permet de surmonter les effets d'effondrement grâce à un haut rapport d'aspect (rapport largeur sur hauteur de l'objet, de l'ordre de 5), et faisant de la Dilase 650 l'appareil idéal pour la micro-fabrication. D'autres appareils utilisant la même technologie existent sur le marché, notamment la DLW66⁺ (Heidelberg Instrument, Allemagne), mais des différences dans la profondeur de champ de leurs lasers respectifs ont été pointées du doigt, mettant la Dilase 650 en tête avec un système innovant de traitement optique du faisceau breveté par KLOÉ.

La Dilase 650 comporte une platine motorisée, et deux lasers à 375 nm et à 405 nm. Pour un fonctionnement optimal, elle nécessite un environnement à atmosphère contrôlée (salle blanche ou grise suivant la norme ISO 14644-4, un éclairage muni de filtres UV afin d'éviter une photo-réaction des précurseurs utilisés). L'appareil est capable de façonner des pièces avec des dimensions de l'ordre de 1 à 15 cm.

La Dilase 650 est interfaçable à l'aide de deux logiciels, un de design (i.e. conception assistée par ordinateur, CAO) et un autre de processing (travaillant au format Light Wave Object, LWO).

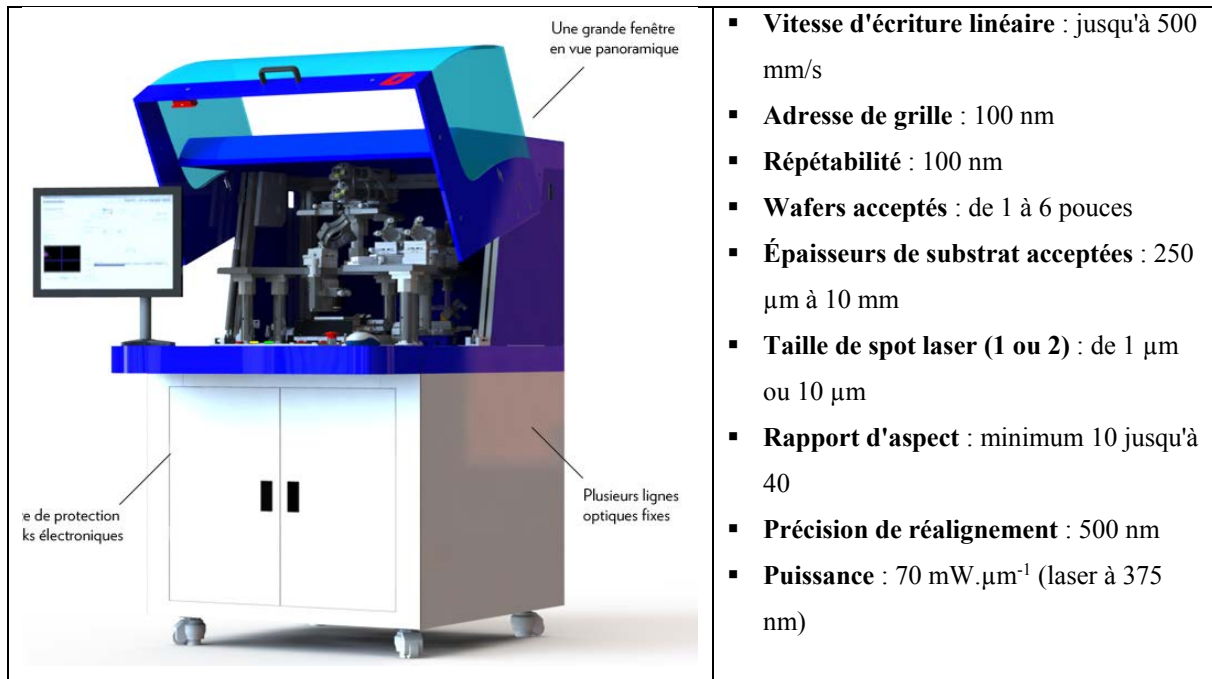


Fig. 4. Photographie et caractéristiques de la DILASE 650.

2.2. Description du dessin

Le logiciel de design permet la génération d'un fichier au format LWO. Ces fichiers contiennent des objets stockés sous forme de maillages et comprennent des polygones, des points et des surfaces qui décrivent l'apparence du modèle. Le logiciel de processing s'occupe ensuite de transposer les données du fichier en écriture laser, permettant d'insoler la zone « verte » (Figure 5) de contours afin de réticuler la résine négative qui s'y trouve.

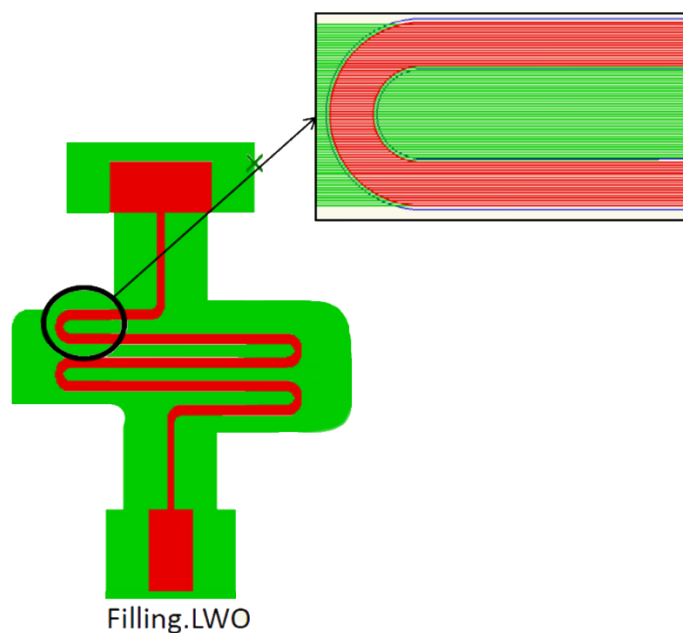


Fig. 5. Fichier au format LWO contenant un dessin de zones « vertes » à insoler par le laser et de zones « rouges » à ne pas insoler.

2.3. Description de la résine

Dans le cadre de cette collaboration nous avons commencé nos recherches et travaux à partir de l'exploitation d'un brevet Essilor (P. Etienne, F. Deliane, J. Ballet, C. Biver, J-P. Cano "Procédé de fabrication d'une composition photoréticulable" Brevet International N°PCT/FR2009/050640, Essilor-CNRS-UM2). Le précurseur utilisé est le 2-(3,4 epoxy cyclohexylethyl)triméthoxysilane (EETMOS, Figure 6), qui subit dans un premier temps une hydrolyse sol-gel à l'aide d'une solution acide. Une quantité définie de photoamorceur y est ensuite ajoutée, avant que le tout ne soit concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif afin d'évaporer les solvants pouvant être gênant lors des étapes suivantes.

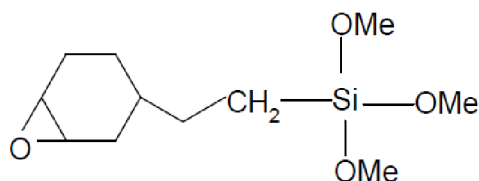


Fig. 6. Précurseur silylé composant de la résine (EETMOS).

2.4. Préparation et structuration de la couche

Le dépôt de la couche sur un substrat en verre est réalisé par spin-coating à l'aide d'une tournette (spinner) munie d'un couvercle (Gyrset) pour limiter le séchage pendant le dépôt (Figure 7). Cette couche est ensuite placée dans une étuve à 50 °C durant 15 min (étape dite de « soft bake ») afin de permettre l'évaporation de l'eau résiduelle ainsi que du méthanol issu de l'hydrolyse sol-gel.

La couche est positionnée sur une platine motorisée et le vide est réalisé. Elle est par la suite structurée sous laser 375 nm réglé à 50 % de puissance et muni d'un atténuateur à 5 %, pendant que la vitesse de la platine est de 10 mm·s⁻¹. La hauteur du plan focal est déterminée en fonction de l'épaisseur mesurée de la puce et de la hauteur de la couche de résine, et la durée d'écriture est d'environ 2 à 4 heures. Une fois l'insolation terminée, la couche est placée de nouveau dans une étuve à 80 °C (étape dite de « post-exposure bake ») afin de poursuivre la réticulation des zones insolées et de finir l'évaporation des solvants résiduels. Les zones insolées sont ensuite révélées en plongeant la couche dans un bain d'isopropanol qui permet de dissoudre toutes les zones non insolées (i.e. la lumière des canaux). Pour finir, une étape de « hard bake » est ajoutée au process, durant laquelle l'échantillon est placé dans une étuve à 120 °C afin de figer complètement la structure.

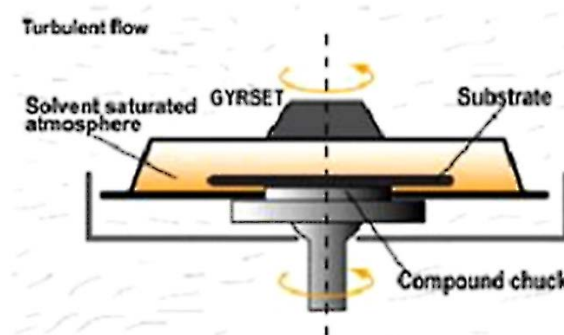


Fig. 7. Dépôt de la couche de résine par un procédé de spin-coating à l'aide d'une tournette (ou spinner) avec couvercle de type Gyrset. La couche se forme sur un substrat (ex. lame en verre) posé sur un élément rotatif.

3. Résultats

3.1. Verrous

Trois verrous majeurs ont été identifiés durant le développement de ce dispositif microfluidique, à savoir :

- **La maîtrise de l'épaisseur de la puce en résine**, qui impacte directement la hauteur des canaux (Figure 3). Afin d'atteindre la hauteur prédéfinie, il est nécessaire d'adapter les

conditions d'étalement de la résine sur le support par spin-coating. Pour ce faire différents paramètres sont testés, tout en s'assurant que le film final soit insolé avec une résolution correcte :

- La concentration de la solution en précurseur sol-gel, sachant que plus elle est importante, plus la couche sera épaisse. Ce paramètre joue aussi de façon indirecte sur la viscosité de la solution ;
- Les paramètres techniques du spinner (vitesse de rotation, accélération et temps).
- **La maîtrise du collage de la puce en résine avec un support.** Ce collage doit être très résistant car la circulation des liquides au sein des canaux génère de hautes pressions. Le collage classiquement utilisé est le collage moléculaire à l'aide de plasma O₂.
- **Le perçage des orifices de la puce en résine pour la connexion aux canaux.** Il s'agit de percer sans casser le dispositif, sans créer de débris, le tout en assurant une connexion étanche.

3.2. Stratégies

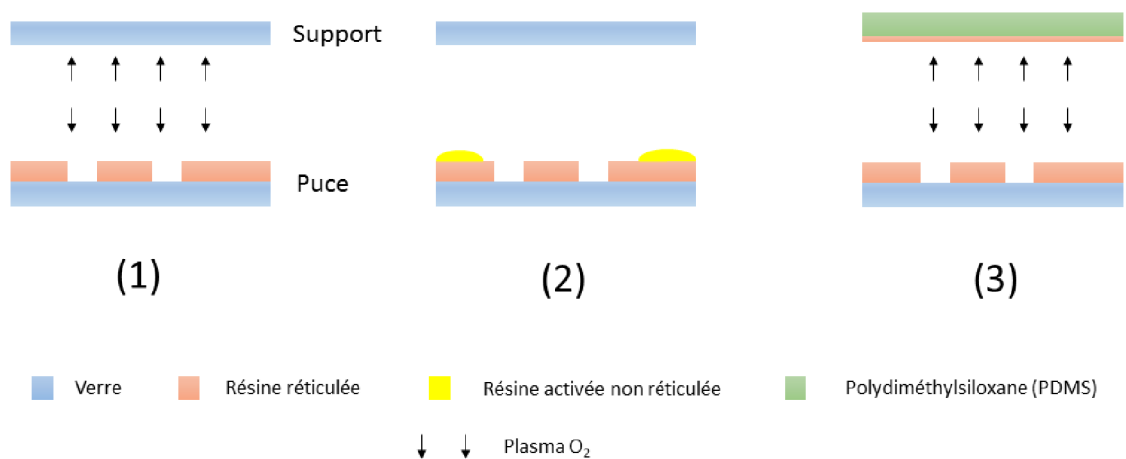


Fig. 8. Schéma descriptif des trois stratégies adoptées pour la conception d'un dispositif microfluidique innovant compatible avec les phases continues aqueuses.

Trois stratégies de collage ont été envisagées tout au long de cette étude :

- **Résine coulée sur un substrat en verre, le tout refermé par un support en verre avec collage moléculaire (Figure 8.1).** Le support en verre a montré une très bonne aptitude au collage moléculaire avec la structure en résine, mais des problèmes de fuite ont été constatés en raison de la rigidité du verre qui empêche de colmater les microbrèches créées par les imperfections des surfaces à coller.
- **Résine coulée sur un substrat en verre, le tout refermé par un support en verre à l'aide de la résine comme colle (Figure 8.2).** Dans ce cas, des soucis de colmatage des canaux ont

été observés après dépôt manuel de la colle. La disposition de la colle à l'aide d'imprimantes à jet pourrait résoudre ce problème à l'avenir.

- **Résine coulée sur un substrat en verre, le tout refermé avec collage moléculaire par un support composé d'une fine couche de résine (10 à 30 μm) sur la face interne, et de PDMS sur la face externe (Figure 8.3).** Cette stratégie, toujours en cours de développement, s'avère la plus prometteuse car elle permettrait également de lever le verrou de la création des orifices vu la souplesse du PDMS.

4. Conclusion

La conception de dispositifs microfluidiques par photolithographie par écriture laser est très peu décrite dans la littérature et les quelques études publiées ne l'ont été que récemment (2017-2020). Dans ce domaine, la photolithographie par écriture laser est présentée comme une technologie de choix car elle possède des capacités de structuration tridimensionnelle uniques, une résolution extrême et une polyvalence lui permettant d'être combinée avec d'autres technologies de microfabrication.³⁻⁵ Toutefois, les challenges à relever ont été nombreux, et nous nous en sommes aperçus durant notre étude collaborative. L'un d'eux reposait sur le fait que la résine sélectionnée pour son hydrophilie n'avait jamais été exploitée pour cet usage auparavant et, à notre connaissance, aucune équipe dans la littérature n'a d'ailleurs travaillé sur la conception par photolithographie par écriture laser de dispositifs microfluidiques destinés à travailler avec des phases continues aqueuses. Sami Bouzid, en charge des expériences et pionnier dans ce domaine, nous a fait part de ses avancées et des résultats encourageants, même si la progression a été fortement ralentie par la crise sanitaire du covid-19 qui a empêché notre pleine implication au sein de la plateforme POMM.

Au final, le motif a pu être reproduit aux bonnes dimensions, des hauteurs convenables de canaux ont pu être atteintes, tandis que le collage et le perçage des orifices devraient être résolus grâce à l'utilisation de PDMS comme support présentant une importante souplesse. Il s'agira également d'optimiser le traitement au plasma O_2 nécessaire à la réduction de l'angle de contact de l'eau sur les parois du dispositif afin d'assurer une hydrophilie stable. La dernière étape consistera à évaluer la résistance du dispositif aux hautes pressions créées par le passage des phases circulantes, ainsi que sa stabilité vis-à-vis de catalyseurs qui seront probablement présents dans la phase continue aqueuse.

5. Références bibliographiques

1. Nanteuil, C. Etude du transport ionique à travers un nanocanal fluide : vers l'électropréconcentration sélective. (Université Paris Sud - Paris XI, 2010).
2. Naillon, A. *et al.* Dynamics of particle migration in confined viscoelastic Poiseuille flows. *Phys. Rev. Fluids* **4**, 053301 (2019).
3. van der Velden, G., Fan, D. & Stauffer, U. Fabrication of a microfluidic device by using two-photon lithography on a positive photoresist. *Micro and Nano Engineering* **7**, 100054 (2020).
4. Bragheri, F., Martínez Vázquez, R. & Osellame, R. Microfluidics. in *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization* 493–526 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-817827-0.00057-6.
5. Brower, K., White, A. K. & Fordyce, P. M. Multi-step Variable Height Photolithography for Valved Multilayer Microfluidic Devices. *JoVE* 55276 (2017) doi:10.3791/55276.

3^e volet

Adaptation de la catalyse sol-gel pour une synthèse In-a-chip des microparticules hybrides

Sommaire

1.	Introduction	243
2.	Conception du modèle statique de réticulation.....	244
3.	Evaluation des cinétiques de réticulation sur le modèle statique.....	245
3.1.	Essais de catalyse sol-gel par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans l'huile silylée.....	246
3.2.	Essais de catalyse sol-gel par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse	247
4.	Conclusion.....	250
5.	Références bibliographiques	251

Figures

Fig. 1.	Adaptation de la catalyse sol-gel pour les conditions microfluidiques.....	243
Fig. 2. (a)	Représentation schématique et photographies du modèle statique (b) avant et (c) après réticulation sol-gel	244
Fig. 3.	Observation en microscopie électronique d'une coupe de particule hybride réticulée en présence de TBAF en phase aqueuse.....	249
Fig. 4.	Taux de viabilité cellulaire en présence d'extraits à partir de concentrations croissantes en particules hybrides réticulées avec du TBAF en phase aqueuse ou huileuse	249

Tableaux

Tableau 1.	Screening des différents gélifiants étudiés dans la conception du modèle statique de réticulation	245
Tableau 2.	Catalyseurs étudiés sur modèle statique pour la réticulation des gouttelettes d'huile silylée par voie sol-gel.....	246
Tableau 3.	Comparaison des catégories de danger du tétra-butylammonium (TBAF, catalyseur fluoré) et de l'octanoate d'étain (SnOct, catalyseur métallique)	247
Tableau 4.	Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICO 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans l'huile silylée	247
Tableau 5.	Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICO 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse gélifiée, à 50° C	248

Tableau 6. Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICOM 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse gélifiée 250

1. Introduction

Après l'étape de la conception d'un dispositif compatible avec les phases continues aqueuses, la seconde étape nécessaire à l'adoption d'un concept *Lab-on-a-chip* pour la synthèse des microparticules hybrides a été d'adapter la chimie sol-gel afin d'accélérer sa cinétique de réticulation. En effet, les cinétiques de réticulation longues (de 8 à 15 jours) observées lors de la formulation par le procédé d'émulsion thermostabilisée (cf. chapitres II et III), n'étaient pas compatibles avec les temps de résidence dans les puces de microfluidique qui, eux, se comptent en minutes. En d'autres termes, dans les conditions de réactivité sol-gel développées jusque-là, les microgouttelettes d'huile silylée formées dans la puce risquaient de subir des phénomènes de déstabilisation (coalescence et floculation) avant leur solidification en microparticules hybrides. Ce risque est d'autant plus important que notre cahier des charges exclue l'utilisation de tensioactifs afin de prévenir le relargage dans la phase aqueuse du PA encapsulé. Le but a donc été d'optimiser les conditions catalytiques permettant la réticulation partielle ou complète de l'huile silylée avant déstabilisation des microgouttelettes formées (Figure 1).

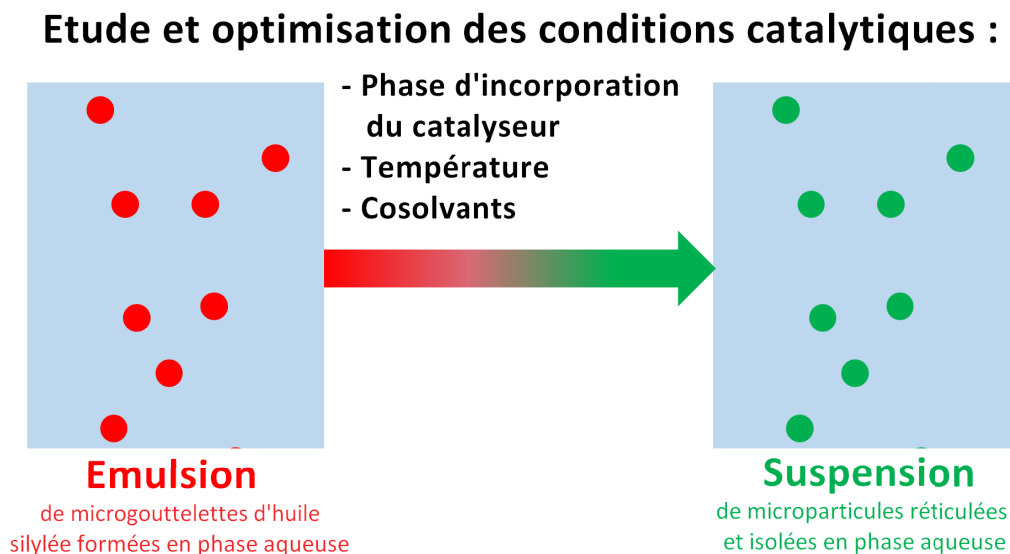


Fig. 1. Adaptation de la catalyse sol-gel pour les conditions microfluidiques.
N.B : Le code couleur utilisé est fictif.

Le dispositif microfluidique adéquat n'étant pas encore au point, nous avons conçu un modèle provisoire pour l'étude de la cinétique de réticulation sol-gel des gouttelettes d'huile silylée dans différentes conditions de catalyse ; nous l'avons ainsi nommé le « modèle statique de réticulation ».

2. Conception du modèle statique de réticulation

Comme son nom l'indique, ce modèle vise à cribler les conditions optimales (énumérées dans la Figure 1) nécessaires à la réticulation sol-gel de gouttelettes statiques d'huile silylée. Un cahier des charges portant sur la conception d'un modèle gélifié a été établi.

Le gel devait être :

- Transparent, afin de pouvoir évaluer visuellement l'état des gouttelettes en suspension ;
- Résistant à des pH acides (autour de 3), afin d'être potentiellement compatible avec la présence d'acide acétique (catalyseur sol-gel, cf. chapitre II) ;
- Résistant à de hautes températures et à la présence de catalyseurs sol-gel, afin de permettre potentiellement une activation thermique ou chimique de la réticulation de l'huile ;
- Visqueux, pour que les gouttelettes d'huile silylée ne puissent ni s'étaler, ni remonter à la surface après formation.

Un schéma du modèle est illustré ci-dessous : des seringues BD Micro-Fine™ (munies d'aiguilles 30G avec un diamètre extérieur de 0,3 mm) ont été utilisées pour la formation de gouttelettes par injection de l'huile silylée, colorée au rouge soudan III, directement dans la phase aqueuse gélifiée. Ces seringues ont permis la formation de gouttelettes de taille comprise entre 500 et 1500 μm . Il est également utile de noter que l'huile étudiée sur modèle statique est l'ICO 0,8 (i.e. huile de ricin silylée avec l'IPTES à un ratio de 0,8), car même si sa réactivité sol-gel est inférieure à celle de l'ICOM (i.e. huile de ricin silylée avec l'IPTMS à un ratio de 0,8), cette dernière a montré une viscosité trop élevée (3180 mPa·s pour l'ICOM 0,8, contre 764 mPa·s pour l'ICO 0,8 à 25 °C ; cf. chapitre III), ce qui aurait pour conséquence de freiner sa circulation dans les circuits microfluidiques.

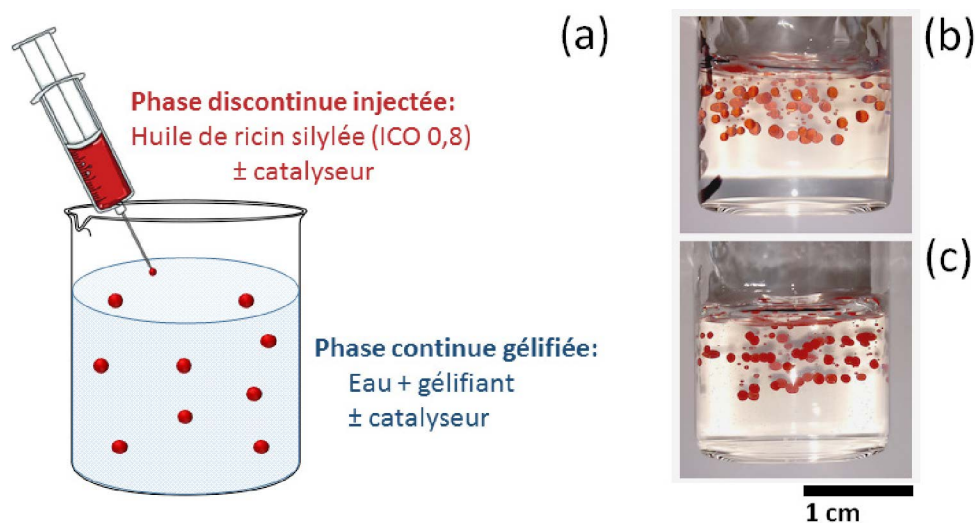


Fig. 2. (a) Représentation schématique et photographies du modèle statique (b) avant et (c) après réticulation sol-gel. L'huile de ricin silylée a été colorée au rouge soudan III.

Afin d'adhérer au cahier des charges établi, un gélifiant optimal devait être sélectionné. Un criblage a dès lors été effectué sur 6 différents gélifiants aqueux transparents : 3 copolymères d'acrylates (Aqua[®] SF1, Carbopol[®] Ultrez 21, et Carbopol[®] 980 de Lubrizol), 1 copolymère d'acrylates/vinyl isodecanoate (Stabylen[®] 30 de 3V), et 2 gélifiants hémi-synthétiques (la carboxyméthyl cellulose et la gomme xanthane de Cooper Pharmaceutique). Ces gélifiants ont été soumis à un stress acide (baisse de pH aux environs de 3) et ont subi un test de résistance thermique (50°C pendant une nuit). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Criblage des différents gélifiants étudiés dans la conception du modèle statique de réticulation. CMC : carboxyméthyl cellulose

Gélifiant	Concentration utilisée (wt.%)	Réaction au stress thermique (50° C)	Réaction au stress acide (pH ≈ 3)
CMC	4	Gel dénaturé	Structure maintenue
Aqua [®] SF1	5	Liquéfaction	Liquéfaction
Stabylen [®] 30	0,7	Structure maintenue	Liquéfaction
Carbopol [®] 980	0,4	Structure maintenue	Liquéfaction
Carbopol [®] Ultrez 21	0,7	Structure maintenue	Liquéfaction
Gomme xanthane	1,5	Structure maintenue	Structure maintenue

Au vu de sa résistance à l'acidité et aux températures élevées, la solution gélifiée à base de gomme xanthane a été retenue pour la suite de l'étude.

3. Evaluation des cinétiques de réticulation sur le modèle statique

La cinétique de réticulation de l'huile silylée, injectée sous forme de gouttelettes dans le gel aqueux, a été étudiée dans différentes conditions expérimentales. Plusieurs catalyseurs non métalliques ont été testés et incorporés soit dans l'huile silylée, soit dans la phase continue aqueuse : le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), l'acide paratoluènesulfonique (PTSA), et le TBAF (Tableau 2). Le premier n'avait exprimé aucune activité catalytique pour la réticulation de l'huile silylée tandis que le second exprimait une acidité très importante capable d'altérer les PAs encapsulés, malgré son activité catalytique intéressante. Seuls les résultats obtenus avec le TBAF sont, de ce fait, décrits.

Tableau 2. Catalyseurs étudiés sur modèle statique pour la réticulation des gouttelettes d'huile silylée par voie sol-gel.

Nom	Abbréviation	Caractéristiques	Concentration utilisée
1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane	DABCO	pureté \geq 98 %, Alfa Aesar	0,2 ; 0,5 ; 1 wt.% en phase huileuse.
Acide paratoluènesulfonique	PTSA	Forme monohydratée, pureté \geq 98.5 %, Sigma Aldrich	1 – 5 wt.% en phase aqueuse.
Fluorure de tétra-butylammonium	TBAF	Forme trihydratée, pureté \geq 98 %, Alfa Aesar	0,2 – 1 wt.% en phase huileuse. 1 – 5 wt.% en phase aqueuse.

Afin d'estimer le degré de réticulation de l'huile, les gouttelettes injectées ont été récupérées à la spatule à des temps déterminés, et leur état a été évalué suivant trois critères : (a) la facilité de récupération à la spatule, (b) la résistance à l'application d'une force, et (c) le degré de dureté. Sur cette base, une échelle empirique de réticulation allant de **0** (absence de réticulation) à **3** (réticulation optimale) a été mise en place. Cette échelle sera reprise tout au long de ce chapitre.

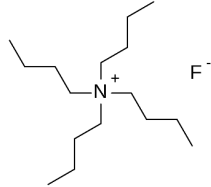
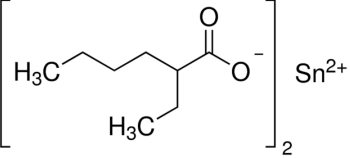
3.1. Essais de catalyse sol-gel par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans l'huile silylée

Tel que rapporté dans le chapitre I, l'ion fluorure contenu dans le HF ou dans ses sels (KF, NaF, TBAF) peut jouer un rôle analogue aux ions hydroxydes (OH^-) en attaquant le centre silicique et en facilitant le départ de l'alcoyle protecteur d'une l'entité silylée. Ainsi, il peut catalyser de façon prononcée la réaction sol-gel.^{1,2}

Des essais préliminaires effectués avec le fluorure de sodium (NaF, le plus couramment utilisé) n'ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes tournés vers le fluorure de tétra-butylammonium (TBAF), un sel organique pouvant *a priori* mieux se dissoudre dans l'huile silylée et mieux s'introduire au sein des chaînes hydrophobes de cette dernière afin de catalyser la réticulation sol-gel des groupements alcoxy silane. De plus, il présente une toxicité bien moindre que les catalyseurs métalliques utilisés en chimie sol-gel, tel que l'octanoate d'étain utilisé en début de thèse (Tableau 3). En procédé d'émulsion thermostabilisée, le brassage créé lors de l'émulsification mécanique rendait la réaction de réticulation sol-gel incontrôlable en présence de TBAF. Nous avons émis l'hypothèse que sous l'effet de la forte agitation mécanique et de la chaleur dégagée, le TBAF catalysait instantanément la réaction sol-gel avant que les gouttelettes ne se soient formées, et ce même à de faibles concentrations.

Tableau 3. Comparaison des catégories de danger du tétra-butylammonium (TBAF, catalyseur fluoré) et de l'octanoate d'étain (SnOct, catalyseur métallique).

N.B : Les toxicités sont données pour le produit pur.

 <p style="text-align: center;">TBAF</p>	<p>H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.</p>
 <p style="text-align: center;">SnOct</p>	<p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée H318 : Provoque de graves lésions des yeux H361 : Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p>

Différentes conditions ont été étudiées en modèle statique de réticulation, et sont récapitulées dans le tableau 4. A température ambiante, le TBAF incorporé dans l'huile semble catalyser de façon optimale à des concentrations de 0,5 et 1 wt.%. En effet, un score de 3/3 a été atteint après 1h seulement. S'agissant de plus basses concentrations (0,2 wt.%), il a fallu ajouter au système une activation thermique (chauffage à 50 °C) afin d'enclencher la réticulation sol-gel. Toutefois, la réticulation n'a pas pu être complète dans ces conditions (score : 2/3).

Tableau 4. Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICO 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans l'huile silylée.

Concentration en TBAF (wt.%)	Température	Temps		
		1h	3h	24h
0,2	ambiante	0/3	0/3	0/3
0,2	50 °C	2/3	2/3	2/3
0,5	ambiante	3/3	3/3	3/3
1	ambiante	3/3	3/3	3/3

3.2. Essais de catalyse sol-gel par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse

Le TBAF a démontré un pouvoir catalytique intéressant quand il est incorporé dans l'huile silylée. Etant un sel organique, ce catalyseur peut se dissoudre tout aussi bien dans les huiles qu'en milieu aqueux (solubilité dans l'eau > 750 mg·ml⁻¹). Dans le but de réduire ses concentrations résiduelles à l'intérieur des particules hybrides une fois réticulées, nous avons

incorporé le TBAF dans la phase aqueuse gélifiée. Il devait ainsi amorcer une catalyse en surface qui se prolongerait au cœur de la particule sans présence du catalyseur. Aussi, nous avons étudié l'intérêt d'y ajouter un alcool aliphatique à chaîne courte (méthanol, éthanol). En effet, la littérature rapporte que des mélanges eau + alcool tendent à améliorer l'activité catalytique du TBAF, entre autres.^{3,4} Par ailleurs, l'ajout d'alcool a pu être validé sur le gel à base de gomme xanthane qui a conservé toutes ses propriétés citées plus haut, même après ajout de 20 % de méthanol ou d'éthanol.

Tableau 5. Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICO 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse gélifiée, à 50° C.

Concentration en TBAF (wt.%)	Cosolvant (à 20%)	Temps		
		3h	24h	72h
1	-	1/3	1/3	1/3
1	Méthanol	1/3	1/3	1/3
1	Ethanol	1/3	1/3	3/3
5	-	0/3	3/3	3/3
5	Méthanol	1/3	3/3	3/3
5	Ethanol	3/3	3/3	3/3

A une concentration de 1 wt.% en phase aqueuse, la réticulation sol-gel de l'huile silylée n'a pu être complète qu'en présence d'éthanol, et cela après 72 h. A une concentration de 5 wt.%, le TBAF a pu assurer une réticulation complète au bout de 24 h en l'absence d'alcool, tandis que le temps de réticulation était réduit à 3h en présence de 20% d'éthanol. S'agissant du méthanol, sa présence n'a eu aucun effet notable sur la cinétique de réticulation, quelle que soit la concentration de TBAF utilisée.

Afin de mettre en évidence l'intérêt d'incorporer le TBAF en phase aqueuse dans le but d'éviter les résidus de catalyseur dans les particules, une analyse EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) avec détection de l'atome de fluor a été effectuée sur des coupes de particules hybrides obtenues avec les plus fortes concentrations aqueuses en TBAF (5 wt.%). Trois coupes ont subi 5 échantillonnages chacune, allant de la périphérie au cœur de la particule (Figure 3).

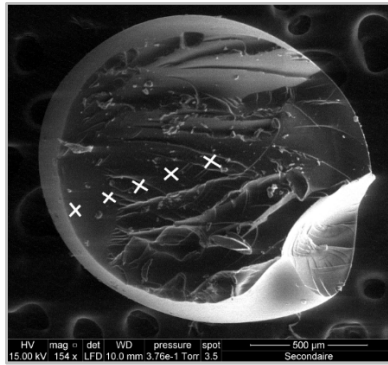


Fig. 3. Observation en microscopie électronique d'une coupe de particule hybride réticulée en présence de TBAF en phase aqueuse, avec mise en évidence des points d'échantillonnage EDX (croix blanches).

La première constatation a été faite sur la structure interne, de nature matricielle, soulignant une propagation de la réticulation sol-gel sur toute la profondeur des particules. Les résultats EDX exprimés en masse d'atome de fluor ont été de 0,12 % ($\pm 0,04$), 0,09 % ($\pm 0,07$) et 0,11 % ($\pm 0,07$), résultats jugés très faibles et proches du seuil minimal de détection. Ceci prouve que le piégeage du catalyseur au sein des particules hybrides peut être réduit en assurant une catalyse « externe » via la phase continue aqueuse.

Afin d'appuyer ces résultats, un test de viabilité de cellules NIH3T3 durant 48 h a été effectué en présence d'extraits de particules réticulées avec du TBAF en phase aqueuse vs. en phase huileuse (protocole détaillé dans les chapitres II et III).

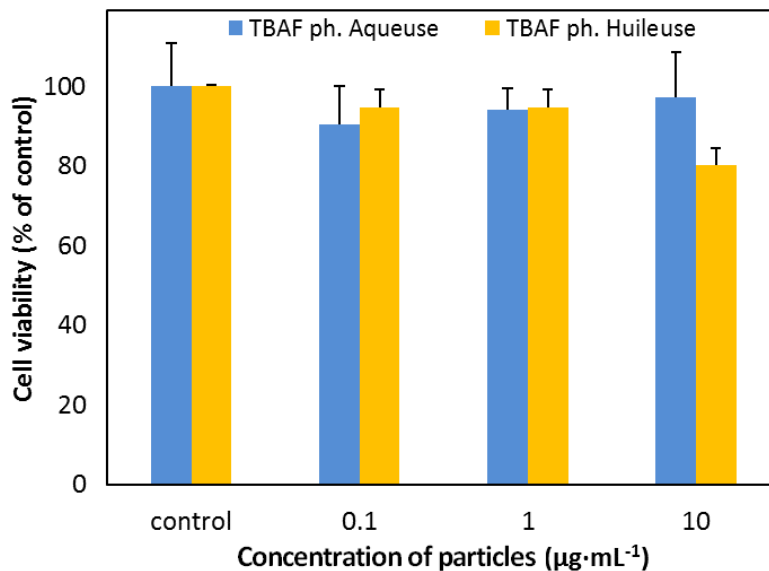


Fig. 4. Taux de viabilité cellulaire en présence d'extraits à partir de concentrations croissantes en particules hybrides réticulées avec du TBAF en phase aqueuse ou huileuse.

Les résultats présentés en Figure 4 montrent que pour les particules hybrides réticulées par le TBAF aqueux, des viabilités cellulaires très satisfaisantes ont été enregistrées sur toute la plage

de concentrations étudiée (jusqu'à $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Au contraire, les particules réticulées avec du TBAF incorporé dans l'huile ont démontré un début d'effet cytotoxique à partir de $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($80 \pm 4 \%$ de viabilité).

Au vu des résultats intéressants établis, nous avons jugé utile de procéder également à des essais de catalyse sur l'ICOM 0,8, quand bien même sa viscosité élevée puisse être un obstacle pour son exploitation en microfluidique. Compte tenu de sa meilleure réactivité sol-gel, différentes concentrations de TBAF ont été étudiées sans la présence d'alcool dans la phase aqueuse. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6. Evaluation de la catalyse sol-gel de l'ICOM 0,8 par incorporation de fluorure de tétra-butylammonium (TBAF) dans la phase continue aqueuse gélifiée.
Légendes : réticulation (*) assez anarchique, (**) anarchique, (***) très anarchique, (#) en comètes.

Concentration en TBAF (wt.%)	Température	Temps		
		3h	24h	48h
1	ambiante	1/3	2/3 #	2/3 #
1	50 °C	1/3	3/3*	3/3*
2	ambiante	1/3	2/3 #	2/3 #
2	50 °C	2/3	3/3**	3/3**
5	ambiante	2/3	3/3***	3/3***
5	50 °C	3/3***	3/3***	3/3***

En présence de 1 et 2 wt.% de TBAF à 50 °C, les particules tendent à perdre leur forme sphérique à des degrés proportionnels aux concentrations de catalyseur utilisées. Toutefois, à température ambiante ces échantillons ont présenté un effet de comètes (i.e. particules solides avec des trainées liquides) sans pouvoir atteindre une réticulation complète. A des concentrations élevées en TBAF (5 wt.%), les particules tendent à perdre leur forme sphérique de manière brutale. Ceci est probablement dû à une libération brusque de méthanol issu de l'hydrolyse rapide des méthoxysilanes, détériorant la structure sphérique de la gouttelette.

4. Conclusion

Trois résultats sont à retenir de ce troisième et dernier volet, destiné à adapter la chimie de réticulation sol-gel aux caractéristiques de la microfluidique :

- Le premier est que le temps de réticulation sol-gel de l'ICO 0,8 peut être réduit de façon importante (1 h pour une réticulation complète, contre 10 jours avec le SnOct) en utilisant une concentration optimale de 0,5 wt.% de TBAF incorporé dans l'huile silylée ;

- Le deuxième est que ce même catalyseur peut être incorporé dans la phase continue aqueuse (3 h pour une réticulation complète), et quand bien même les conditions catalytiques sont plus drastiques (5 wt.% + présence de 20 % d'éthanol), les concentrations de TBAF résiduel au sein des particules sont à la fin négligeables ;
- Le troisième est que l'ICOM réagit de façon incontrôlée en présence de TBAF. Ceci, rajouté à sa viscosité très élevée, nous ont fait abandonner son utilisation en microfluidique.

En outre, le modèle statique de réticulation a été développé en tant qu'outil de travail simple pour cribler différents catalyseurs, et seuls les résultats les plus intéressants ont été présentés. Il est à noter que l'une des limites du modèle reste la taille importante des gouttelettes formées (entre 500 et 1500 μm) et qu'en conditions microfluidiques, on peut émettre l'hypothèse que les gouttelettes de plus petite taille présenteront une meilleure réactivité sol-gel.

Ces résultats seront à associer à ceux précédemment obtenus durant la conception du dispositif microfluidique, où l'utilisation de glycérol s'est avérée nécessaire à la formation des gouttelettes. Nous avons préféré attendre de travailler en conditions dynamiques afin de mener ces ultimes expériences d'optimisation qui consisteront à utiliser une phase aqueuse avec une viscosité ajustée à l'aide de glycérol et réactive à l'aide du couple TBAF/éthanol.

5. Références bibliographiques

1. Audebert Pierre & Miomandre Fabien. Procédé sol-gel de polymérisation. *Techniques de l'ingénieur base documentaire : TIB329DUO*, (2005).
2. Pope, E. J. A. & Mackenzie, J. D. Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst. *Journal of Non-Crystalline Solids* **87**, 185–198 (1986).
3. Oostendorp, D. J., Bertrand, G. L. & Stoffer, J. O. Kinetics and mechanism of the hydrolysis and alcoholysis of alkoxy silanes. *Journal of Adhesion Science and Technology* **6**, 171–191 (1992).
4. *Activating Agents and Protecting Groups*. (Wiley, 1999).

Discussion générale
&
Conclusion

Sommaire

1. Discussion générale du projet.....	256
1.1. Pourquoi avoir choisi l'huile de ricin ?	256
1.2. Qu'en est-il de la stabilité / dégradabilité de ces particules hybrides ?.....	258
1.3. D'autres études pharmaceutiques pourraient être effectuées sur ces particules hybrides ? et d'autres voies d'administration pourraient être envisagées ?	260
1.4. D'autres applications pourraient être envisagées pour ces particules hybrides ?	261
1.5. Qu'apporte réellement la microfluidique au projet ?	262
2. Conclusion	263
3. Références bibliographiques.....	264

Figures

Fig. 1. Photographies représentatives de deux variétés de <i>Ricinus communis</i> : la variété <i>zanzibariensis</i> avec (a) un feuillage et des fruits verts et (b) des graines de 9 mm de long en moyenne, et la variété <i>impala</i> avec (c) un feuillage, des tiges et des fruits rougeâtres, et (d) des graines de 13 mm de long en moyenne.....	257
Fig. 2. Schéma récapitulatif des différentes formes pharmaceutiques basées sur l'huile de ricin et formulées tout au long de notre projet.....	257
Fig. 3. Particules commerciales (technologie Eusolex® UV-Pearls®, MERCK) piégeant des filtres solaires pour assurer une absorption des UV sans que la molécule ne soit en contact avec la peau, afin d'éviter une potentielle pénétration cutanée	261
Fig. 4. Exemples d'architectures de gouttelettes pouvant être obtenues par microfluidique.....	262

Tableau

Tableau 1. Huiles végétales comme alternatives potentiellement silylables à l'huile de ricin.....	258
--	-----

Tout au long de ce manuscrit, nous avons exploré en premier lieu les problèmes de solubilité en milieu aqueux propres aux PA actuellement développés avant de nous intéresser à l'état de l'art quant aux stratégies adoptées pour y faire face. Nous avons ensuite exposé nos travaux axés sur le développement de particules hybrides huile végétale/silice comme alternative « green » et biocompatible à ce qui se fait actuellement. Avant de conclure, il nous est paru utile de discuter, de façon succincte, certains points-clés à même de justifier nos choix techniques et d'ouvrir un ensemble de perspectives pour la continuité du projet.

1. Discussion générale du projet

1.1. Pourquoi avoir choisi l'huile de ricin ?

Le ricin (*Ricinus communis L.*, arbuste de la famille des euphorbiacées poussant en zones tempérées, Figure 1), est exploité à 95 % pour ses graines qui servent à l'extraction d'une huile non siccative et non comestible. Le marché mondial est largement dominé par l'Inde qui fournit près de 70 % des graines disponibles dans le monde. Le procédé d'extraction de l'huile de ricin est classique, similaire à celui des autres huiles (i.e. broyage → pressage → décoloration → désodorisation), à l'exception du caractère non-alimentaire du ricin qui impose des conditions d'hygiène et de sécurité particulières, à savoir une ligne de production dédiée.

La composition très homogène de cette huile (90 % de ricinoléine, i.e. triglycéride de l'acide ricinoléique) lui confère des propriétés physico-chimiques intéressantes.¹ D'un point de vue physique, l'huile de ricin possède une grande affinité pour les surfaces métalliques, son point éclair est de seulement 229 °C tandis qu'elle ne s'enflamme qu'à 449 °C. Aussi, elle possède une viscosité très élevée et est la plus dense des huiles végétales. D'un point de vue chimique, l'huile de ricin présente une stabilité remarquable à l'oxydation de son insaturation² grâce à l'effet électroattracteur du groupement hydroxyle en β . Ce groupement procure à l'huile une réactivité chimique particulière permettant notamment des réactions d'halogénéation, d'estérification ou de formation d'uréthanes par réaction hydroxy-isocyanate.¹ Cette dernière voie nous a permis de concevoir une huile fonctionnalisée de sorte à lui procurer une aptitude à la réticulation sol-gel. Le choix de cette huile s'est avéré judicieux dès lors que nous avons pu, en l'absence de solvants et de catalyseurs, maîtriser la silylation de l'huile de ricin à des ratios de 1,05 ; 0,8 ; 0,6 et 0,4 à l'aide de l'IPTES, et à un ratio de 0,8 à l'aide de l'IPTMS. Ces réalisations ont par la suite permis de concevoir différents systèmes particuliers pour la délivrance de PA (Figure 2).

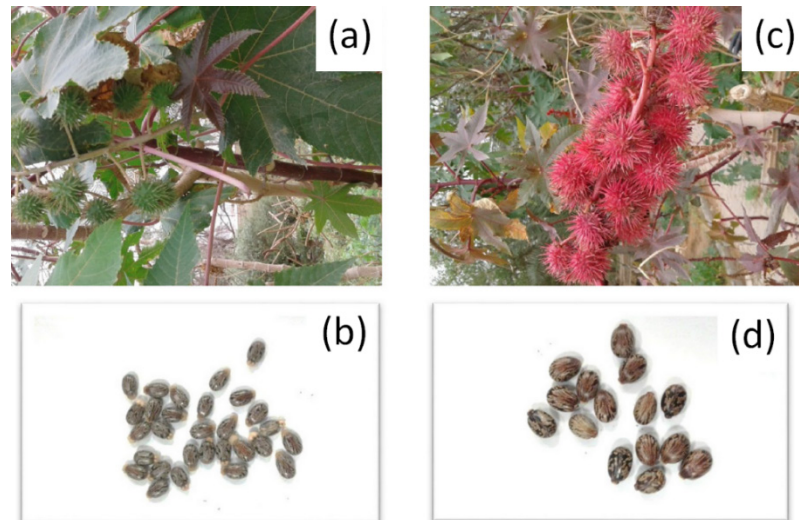


Fig. 1. Photographies représentatives de deux variétés de *Ricinus communis* : la variété *zanzibariensis* avec (a) un feuillage et des fruits verts et (b) des graines de 9 mm de long en moyenne, et la variété *impala* avec (c) un feuillage, des tiges et des fruits rougeâtres, et (d) des graines de 13 mm de long en moyenne. Adapté à partir de la réf. 3.

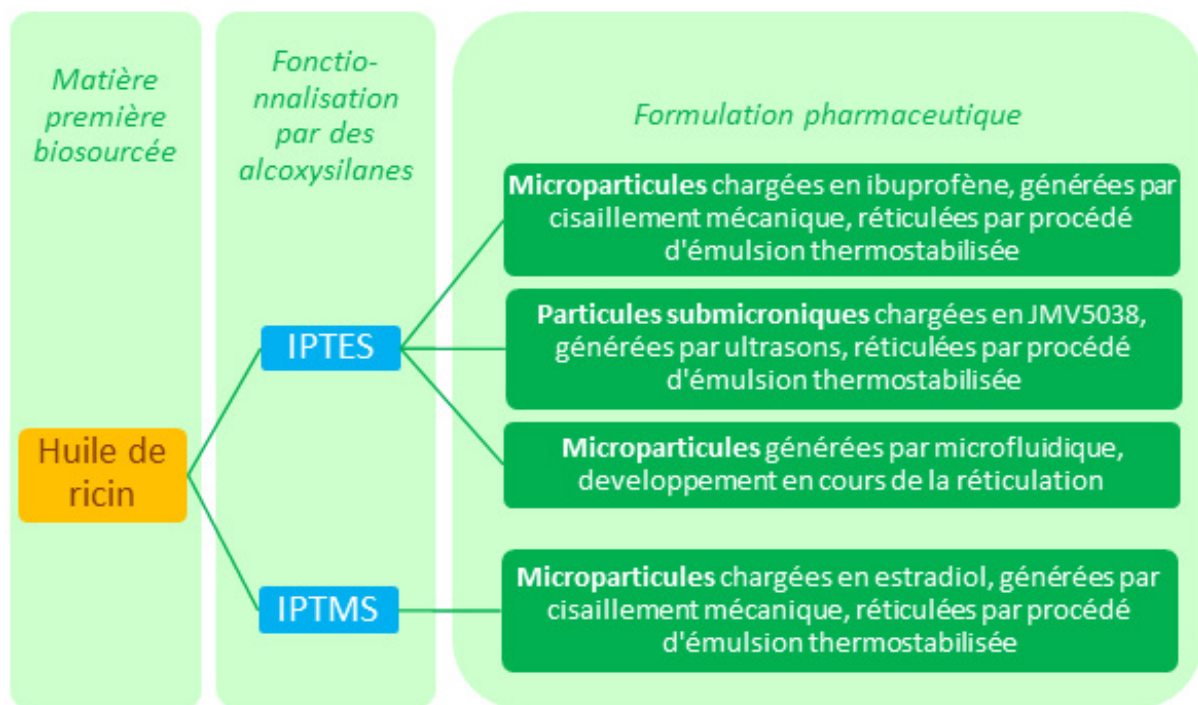


Fig. 2. Schéma récapitulatif des différentes formes pharmaceutiques basées sur l'huile de ricin et formulées tout au long de notre projet.

IPTES : (3-Isocyanatopropyl) triéthoxysilane ; IPTMS : (3-Isocyanatopropyl) triméthoxysilane.

Le seul bémol constaté lors de l'utilisation de l'huile silylée a été sa forte viscosité (à 25 °C : 661 mPa·s pour l'huile native ; 764 mPa·s pour l'ICO 0,8 ; 3180 mPa·s pour l'ICOM 0,8) qui limite drastiquement son utilisation en microfluidique. En effet, une phase circulante à forte viscosité soulève deux problèmes, car non seulement il faudra des pressions d'injection très

importantes afin de la « pousser » dans les canaux (d'autant plus quand les parois du canal sont hydrophiles), mais également des forces de cisaillement conséquentes à la jonction du dispositif afin de « couper » la phase en microgouttelettes. Par conséquent, des huiles silylées moins visqueuses auraient plus de facilité à être adaptées en microfluidique afin de générer des gouttelettes réticulables en particules hybrides. Dans ce sens, des alternatives ont été rapportées dans la littérature notamment par réaction dite « Alder ène »⁴ entre une insaturation portée par certaines huiles et un agent énoophile silylé (ex. huiles de soja et de colza, silylées par du vinyltriméthoxysilane) ou bien par réaction « thiol-ène »^{5,6} (ex. huile de lin silylée par du γ -mercaptopropyltriméthoxysilane) qui aboutit le plus souvent à des produits présentant une excellente biocompatibilité.⁷

Tableau 1. Huiles végétales comme alternatives potentiellement silylables à l'huile de ricin.

Huile végétale	Viscosité (mPa·s)	Usage médical actuel
Huile de colza	63 / à 23 °C	Solvant, voie orale
Huile de soja	57 / à 23 °C	Solvant, voie parentérale
Huile de lin	33 / à 26 °C	Aucune

1.2. Qu'en est-il de la stabilité / dégradabilité de ces particules hybrides ?

Un système de délivrance de PA devrait idéalement respecter un compromis optimal entre (a) la stabilité de la forme pharmaceutique avant son administration, et (b) sa dégradabilité *in vivo* une fois administrée. A cela s'ajoute, pour ce qui est des systèmes « green », la contrainte de dégradabilité environnementale si la forme pharmaceutique est appelée à être excrétée (ex. par les fèces après une administration orale).

Les particules hybrides huile de ricin/silice que nous avons développées au laboratoire ont présenté une stabilité remarquable lorsqu'elles sont stockées à l'air ambiant. En effet, la réaction sol-gel fait subir à l'huile silylée un processus de « vitrification » qui aboutit à des particules très solides, quand bien même leur partie minérale ne représente qu'environ 10 % de leur masse. Cette stabilité propre aux particules leur confère à leur tour une propriété de stabilisation du PA encapsulé, que nous avons observée pendant au moins 12 mois sur l'estradiol qui n'a subi aucune perte d'activité biologique (cf. 2^e volet du chapitre III). Les travaux précédents de Gallon et *al.*⁸ avaient également démontré une bonne stabilité des particules immergées pendant 1 mois dans de l'eau distillée ($2,4 \pm 1,7$ % de perte en masse à pH = 5) ou acidifiée par ajout d'HCl ($4,1 \pm 2,4$ % de perte en masse à pH = 1,2).

S'agissant de la dégradabilité *in vivo* de nos particules hybrides, nous l'avons évaluée suivant deux voies d'administration. En premier lieu, nous avons simulé une administration orale des

particules en évaluant leur degré de digestibilité par des lipases en milieu intestinal (cf. 1^{er} volet du chapitre II). Les résultats obtenus ont clairement montré une digestion limitée en surface, ainsi qu'une relation inverse entre le ratio de silylation et le taux de digestibilité des particules hybrides. Ainsi donc, les particules les moins silylées (ratio 0,4) ont présenté le taux de digestion le plus avancé, bien qu'insuffisant pour réduire la totalité de la structure hybride en acides gras silylés et en glycérol élémentaire. On pourrait dès lors prétendre que ces particules les moins silylées seraient les plus aptes à être dégradée une fois dans la nature, et que de toute façon, les produits de dégradation (i.e. acides gras, glycérol, silice) ne devraient engendrer aucune toxicité. D'autres études devront être menées dans ce sens pour appuyer l'hypothèse.

En second lieu, nous avons administré par voie sous-cutanée les particules chez des souris et avons étudié leur devenir après 4 et 28 jours (cf. 2^e volet du chapitre III). Les coupes histologiques pratiquées sur les tissus des animaux ont montré la persistance des particules après 28 jours, avec une immunogénicité remarquablement faible qui laisse présager une persistance bien plus longue. Par ailleurs, les particules hybrides ont montré des profils de libération s'étalant sur 7 jours pour l'estradiol et allant jusqu'à 1 mois concernant le JMV5038. Les cinétiques de libération sont donc intimement liées aux propriétés des PAs encapsulés, et elles pourraient être, concernant certains PAs, aussi lentes que la vitesse de dégradation des particules hybrides. Ceci dit, les applications non médicales des huiles silylées dans la littérature mettent plutôt en avant l'amélioration de la résistance et de la solidité des matériaux formés, tandis que l'aspect biodégradabilité a été très peu étudié.⁹

Afin de valoriser la grande stabilité de nos particules hybrides, l'huile silylée pourrait également servir à la conception de systèmes monolithiques implantables / explantables pour la délivrance de PA si la biodégradation des systèmes particuliers s'avère trop lente. La preuve de concept de systèmes macroscopiques à base d'huile de ricin silylée a été mise en place au laboratoire avec nos essais de réticulation sol-gel en modèle statique (cf. 1^{er} volet du chapitre V) qui ont abouti à la synthèse d'objets sphériques atteignant 8 mm de diamètre, ou encore les travaux de Theodoratou et al.^{10,11} qui avaient porté sur la conception de films destinés à un usage médical. De nombreuses formes pourraient être envisagées (ex. anneaux, cylindres), cela étant, des recherches plus approfondies devront être menées sur ces objets macroscopiques tridimensionnels implantables / explantables pour la délivrance de PA.

1.3. D'autres études pharmaceutiques pourraient être effectuées sur ces particules hybrides ? et d'autres voies d'administration pourraient être envisagées ?

La conception d'une forme pharmaceutique polyvalente a été l'un des points fondamentaux de notre projet. Notre choix s'est porté ainsi sur la forme microparticulaire (à l'exception du JMV5038 pour lequel nous avons développé des particules submicroniques) qui offre une multitude de voies envisageables. Nous avons par la suite exploré deux voies d'administration : la voie orale et la voie sous-cutanée. Pour la voie orale, des modèles *in vitro* ont été mis en place afin de suivre les cinétiques de libération du PA encapsulé ainsi que le devenir des microparticules en présence d'un milieu intestinal simulé. Un modèle mathématique mécanistique a également été appliqué avec succès pour simuler la libération de l'ibuprofène (cf. 1^{er} volet du chapitre II). Ce modèle devra par ailleurs être mis à l'épreuve en synthétisant des particules de diamètres différents et en essayant de prédire, avec succès, leur cinétique de libération. Pour la voie sous-cutanée, un modèle *in vitro* a également été mis en place pour l'étude des cinétiques de libération, avant que des particules non chargées en PA ne soient injectées *in vivo* pour étudier leur devenir. La prochaine étape s'agissant de l'exploration de cette voie consistera donc à injecter des particules chargées en PA et à effectuer une étude pharmacocinétique, suivie d'une étude de corrélation « *in vivo* / *in vitro* » afin d'appuyer la validité du modèle de système biphasique mis en place lors des libérations de PA.

Pour ce qui est des autres voies potentiellement intéressantes, nous avons évoqué la voie topique lors de la formulation du JMV5038 pour laquelle les particules micrométriques ou submicroniques présenteraient un intérêt certain pour une libération prolongée du PA. Il s'agirait ainsi d'intégrer les microparticules dans un pansement ou système transdermique, pour engendrer une libération prolongée (la peau, par exemple, peut tolérer jusqu'à une semaine de libération continue) ; ce système est peu décrit dans la littérature, seul un brevet en fait mention (Ribeiro Dos Santos et al. 2012, WO2013127929A1). Aussi, nous avons abordé le sujet de la voie intraveineuse à la condition que la taille des particules soit réduite en deçà des 200 nm. L'utilisation d'une sonde à ultrasons plus puissante, d'un homogénéisateur à haute pression ou de la technologie microfluidique pourraient contribuer à atteindre ces tailles nanométriques. Des modifications de surface pourraient être envisagées, le cas échéant, dans un souci de furtivité ou de vectorisation (cf. 1^{er} volet du chapitre III). Cette voie d'administration a été également abordée lors de la synthèse des micelles de PCO qui auront naturellement la capacité d'être furtive grâce aux PEG présents en surface (cf. 2^e volet du chapitre II). Des études plus

approfondies devront être menées dans ce sens afin de justifier l'intérêt de nos systèmes particuliers hybrides une fois administrés par voie intraveineuse.

1.4. D'autres applications pourraient être envisagées pour ces particules hybrides ?

Les travaux effectués lors de cette thèse ont été axés sur la conception de particules capables non seulement d'encapsuler une molécule d'intérêt thérapeutique, mais également de pouvoir la relarguer en temps et en lieu voulu. Néanmoins, certaines applications ne requièrent qu'une aptitude à l'encapsulation sans pour autant nécessiter la libération des molécules d'intérêt. Il nous est alors paru intéressant d'étudier l'encapsulation de filtres solaires lipophiles. En effet, plusieurs molécules dites « filtres » contre les UVA ou UVB sont actuellement commercialisées (Figure 3) ou en développement, mais présentent les mêmes soucis rencontrés lors de la formulation des PA (ex. instabilité, défaut de solubilité). Certains auteurs, à l'image de Scalia *et al.*^{12,13}, ont exploré des pistes dans ce sens en développant des microparticules d'alginate qui encapsulent du 2-éthylhexyl 4-méthoxycinnamate, ou encore des microparticules lipidiques à base d'esters de glycérol et d'acide béhénique qui encapsulent du butyl méthoxydibenzoylméthane (filtre UVA) combiné à de l'octocrylène (filtre UVB).

L'avantage majeur de notre huile silylée est son pouvoir solubilisant très prononcé sur les molécules lipophiles, et une fois réticulée en microparticules hybrides, ces dernières présentent une transparence remarquable. Nous avons également observé que ces microparticules sous forme lyophilisée avaient une texture des plus douces rappelant celle des talcs, et peuvent facilement se disperser dans des crèmes à usage topique. En somme, un triple intérêt réside dans cette approche destinée à une application cosmétique.



Fig. 3. Particules commerciales (technologie Eusolex® UV-Pearls®, MERCK) piégeant des filtres solaires pour assurer une absorption des UV sans que la molécule ne soit en contact avec la peau, afin d'éviter une potentielle pénétration cutanée.

1.5. Qu'apporte réellement la microfluidique au projet ?

Deux procédés de formulation des particules hybrides ont été mis en place dans ce projet. L'un consiste en la mise en place d'émulsions thermostabilisées grâce aux propriétés thermogélifiantes du carraghénane qui laisse la phase continue à l'état liquide à haute température le temps de l'émulsification, puis la solidifie quand le manipulateur baisse la température du système, ce qui a pour conséquence de « figer » les gouttelettes d'huile silylée le temps que la réaction sol-gel ait lieu. Le second procédé est basé sur la microfluidique, avec les caractéristiques qu'on lui connaît. Bien qu'on ne soit pas encore arrivé à produire des particules solidifiées ainsi, ce procédé peut apporter dans le futur, en plus des avantages connus et énumérés dans les chapitre IV et V, une grande modularité et une transposition plus facile à l'échelle industrielle. Nous avons conçu un dispositif microfluidique pour générer des gouttelettes simples monocompartimentales, mais une fois le système validé, il sera possible d'envisager d'autres architectures plus complexes. Ainsi en travaillant avec des géométries en *coflowing* et en *flow focusing* combinés, il sera possible d'introduire dans les gouttelettes un liquide différent, comme par exemple une huile végétale non silylée qui servira de réservoir de PA et permettra l'obtention de profils de libération originaux (Figure 4). Par ailleurs, la transposition à l'échelle industrielle d'une production est une étape critique mais qui sera facilitée par l'exploitation de la microfluidique. En effet, ce procédé permet non seulement une production en continue, mais également une multiplication à guise des chaînes de production par l'installation en parallèle de plusieurs dispositifs microfluidique.

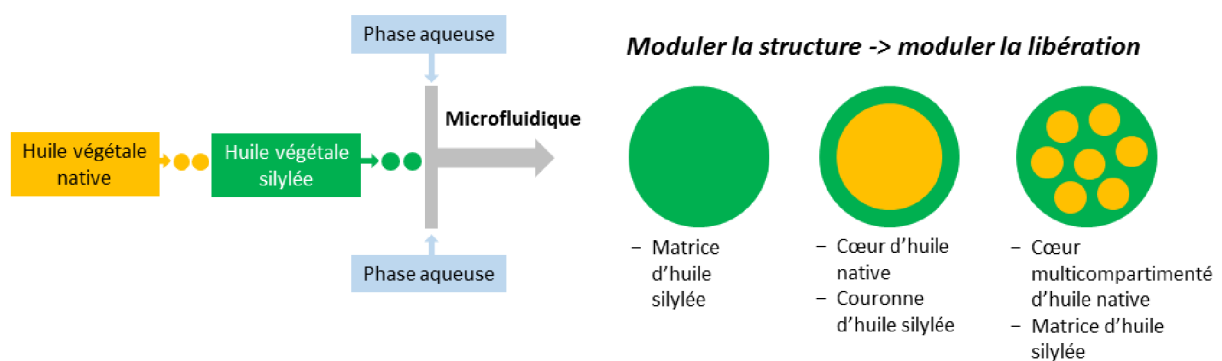


Fig. 4. Exemples d'architectures de gouttelettes pouvant être obtenues par microfluidique.

2. Conclusion

Ce projet a pris naissance avec deux objectifs principaux : d'une part, nous avons voulu offrir une dimension écoresponsable et durable à des formulations microparticulaires en exploitant une ressource végétale renouvelable et en utilisant des procédés « green » durant leur préparation. En conséquence, cela devrait à terme apporter des solutions concrètes pour l'industrie pharmaceutique qui est régulièrement pointée du doigt pour son impact environnemental néfaste. D'autre part, la recherche et le développement de nouveaux systèmes pour la délivrance de PA peu hydrosolubles, qui représentent près de 70 % des PA en cours d'étude, se sont avérés nécessaires au sein d'une industrie pharmaceutique dynamique et sans cesse évolutive.

C'est ainsi que nous avons développé des microparticules hybrides organique/inorganique à base d'huile de ricin silylée au laboratoire, formulée par émulsification suivie d'une réticulation par procédé sol-gel. Le procédé de silylation de l'huile de ricin que nous avons développé a démontré sa robustesse en milieu non solvato et non catalysé, que ce soit en utilisant un agent silylant protégé par des groupements éthyles (i.e. IPTES) ou par des méthyles (i.e. IPTMS). Il est certes question de particules micrométriques dans le projet initial, mais des particules millimétriques aussi bien que submicroniques ont pu être synthétisées par la suite. Cela a été permis par la mise en place de trois procédés différents de formulation : les émulsions thermostabilisées dans ses deux variantes (par agitation mécanique ou par ultrasons), l'injection à la seringue dans des gels préformés, et la microfluidique. Afin de valoriser la capacité de réservoirs de ces systèmes dispersés, trois PAs présentant des problèmes de solubilité en milieu aqueux, à savoir l'ibuprofène, l'estradiol et le JMV5038, ont pu y être incorporés à des taux satisfaisants. Les profils de libération de ces PAs ont souligné l'impact de l'interface entre les particules et le milieu physiologique ainsi que celui des propriétés intrinsèques du PA sur la modulation des cinétiques de libération à partir des particules. Par ailleurs, ces particules hybrides ont montré une stabilité remarquable à la dégradation chimique et enzymatique, tout en offrant une stabilisation optimale du PA encapsulé. Elles ont également démontré leur innocuité tout au long des études menées au cours de ce projet, tant *in vitro* sur des lignées cellulaires intestinales et fibroblastiques, qu'*in vivo* après injection sous-cutanée sur des souris. Ce projet, avant-gardiste par son cahier des charges et prometteur par ses aboutissements, a été le fruit de riches collaborations qui ont vu le jour au gré de nos avancées successives, jusqu'à nous conduire sur des territoires scientifiques qu'on n'aurait pas pensé explorer. Au final, notre

projet a ouvert la porte sur une nouvelle approche écoresponsable, biocompatible et efficace d'encapsulation et de délivrance de molécules d'intérêt thérapeutique.

3. Références bibliographiques

1. Dumeignil, F. Propriétés et utilisation de l'huile de ricin. *OCL* **19**, 10–15 (2012).
2. Zuleta, E. C., Rios, L. A. & Benjumea, P. N. Oxidative stability and cold flow behavior of palm, sacha-inchi, jatropha and castor oil biodiesel blends. *Fuel Processing Technology* **102**, 96–101 (2012).
3. Sbihi, H. M., Nehdi, I. A., Mokbli, S., Romdhani-Younes, M. & Al-Resayes, S. I. Hexane and ethanol extracted seed oils and leaf essential compositions from two castor plant (*Ricinus communis* L.) varieties. *Industrial Crops and Products* **122**, 174–181 (2018).
4. Tambe, C., Dewasthale, S., Shi, X., Graiver, D. & Narayan, R. Silylation of Non-Terminal Double Bonds of Natural Oils. *Silicon* **8**, 87–98 (2016).
5. Ionescu, M., Radojčić, D., Wan, X., Petrović, Z. S. & Upshaw, T. A. Functionalized vegetable oils as precursors for polymers by thiol-ene reaction. *European Polymer Journal* **67**, 439–448 (2015).
6. Türünç, O. & Meier, M. A. R. The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant oil derived polymers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 41–54 (2013).
7. Machado, T. O., Sayer, C. & Araujo, P. H. H. Thiol-ene polymerisation: A promising technique to obtain novel biomaterials. *European Polymer Journal* **86**, 200–215 (2017).
8. Gallon, G. *et al.* Cross-Linked Castor Oil-Based Hybrid Microparticles as Drug Delivery Systems. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **5**, 4311–4319 (2017).
9. Tsujimoto, T., Uyama, H. & Kobayashi, S. Green Nanocomposites from Renewable Resources: Biodegradable Plant Oil-Silica Hybrid Coatings. *Macromol. Rapid Commun.* **24**, 711–714 (2003).
10. Theodoratou, A. *et al.* Vegetable oil hybrid films cross-linked at the air-water interface: formation kinetics and physical characterization. *Soft Matter* **13**, 4569–4579 (2017).
11. Theodoratou, A. *et al.* Physico-chemical properties and surface characterization of renewable hybrid nanofilms interacting with model proteins. *European Polymer Journal* **111**, 161–169 (2019).
12. Scalia, S. & Mezzena, M. Incorporation in lipid microparticles of the UVA filter, butyl methoxydibenzoylmethane combined with the UVB filter, octocrylene: effect on photostability. *AAPS PharmSciTech* **10**, 384–390 (2009).
13. Duarte, J. *et al.* Alginate microparticles as carriers for the UV filter 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate: Influence on photostability. *Int J Cosmet Sci* **41**, 585–593 (2019).

