



HAL
open science

Particules colloïdales multifonctionnalisées pour la vectorisation d'un principe actif: vers une nouvelle formulation pour la dermatologie

Maëla Choimet

► To cite this version:

Maëla Choimet. Particules colloïdales multifonctionnalisées pour la vectorisation d'un principe actif: vers une nouvelle formulation pour la dermatologie. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT: 2016INPT0129 . tel-04261668

HAL Id: tel-04261668

<https://theses.hal.science/tel-04261668v1>

Submitted on 27 Oct 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

Mme MAËLA CHOIMET

le lundi 19 décembre 2016

Titre :

Particules colloïdales multifonctionnalisées pour la vectorisation d'un principe actif: vers une nouvelle formulation pour la dermatologie

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (C.I.R.I.M.A.T.)

Directeur(s) de Thèse :

M. CHRISTOPHE DROUET

MME AUDREY TOURRETTE

Rapporteurs :

M. JEAN-CHRISTOPHE HORNEZ, UNIVERSITE DE VALENCIENNES

Mme MARIE-ALEXANDRINE BOLZINGER, UNIVERSITE LYON 1

Membre(s) du jury :

M. PATRICK SAULNIER, UNIVERSITE D'ANGERS, Président

M. CHRISTOPHE DROUET, INP TOULOUSE, Membre

Mme AUDREY TOURRETTE, UNIVERSITE PAUL SABATIER, Membre

Mme MARIA INES RE, ECOLE NLE SUP DES MINES ALBI CARMAUX, Membre

A ma grand-mère, Suzanne...

Remerciements

Ces travaux de recherches se sont déroulés au Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT) au sein de l'équipe Phosphates, Pharmacotechnie et Biomatériaux (PPB) à l'Institut National Polytechnique (INP) de Toulouse.

Je souhaite en premier lieu remercier mes 2 encadrants de thèse, mon directeur **Christophe Drouet** et ma co-directrice **Audrey Tourrette**, pour m'avoir accueillie, aidée et soutenue au cours de ces 3 années de thèse.

Christophe, (à lire avé l'accent...) j'aimerais te faire part de mes sincères remerciements par un petit « discours chiadé », pour ces 3 années de thèse passées au CIRIMAT. Macarel ! que le temps est passé vite. Plus sérieusement (et aussi parce qu'il est difficile pour moi de continuer dans ce langage que tu maîtrises si bien !), j'ai vraiment apprécié travailler avec toi et m'enrichir de tes conseils. Merci vraiment pour ta disponibilité et ton enthousiasme qui m'ont permis d'évoluer dans les meilleures conditions qui soient.

Audrey, grazie mille ! Malgré un petit séjour là-bas, je ne vais malheureusement pas pouvoir poursuivre en Italien, scusate ! Sincèrement merci pour ta joie de vivre et ton altruisme qui donnent vraiment l'envie de travailler avec toi. Tes nombreux conseils et ta patience m'ont été d'une grande aide.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse :

- Monsieur **Patrick Saulnier**, professeur de l'Université d'Angers et praticien hospitalier, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour avoir examiné ce travail,
- Madame **Marie-Alexandrine Bolzinger**, professeur de l'Université de Lyon, et Monsieur **Jean-Christophe Hornez**, maître de conférences à l'Université de Valenciennes pour avoir jugé ce travail en qualité de rapporteurs,
- Madame **Maria Inês Ré**, directeur de recherche à l'Ecole des Mines d'Albi, pour avoir examiné ce travail et pour vos conseils,
- Madame **Muriel Golzio**, chargée de recherche CNRS à l'Université de Toulouse et Madame **Giovanna Rasso**, maître de conférences à l'Université de Sassari, pour avoir participé à ce jury. Je tiens particulièrement à remercier Madame Muriel Golzio, pour le temps consacré à l'IPBS pour mes recherches et pour les quelques discussions enrichissantes que nous avons pu échanger. Un grand merci également à Madame Rasso de m'avoir accueillie durant deux mois au sein de son équipe, où j'ai pu être formée à l'utilisation des cellules de Franz en mode dynamique. Ce fût un réel plaisir de découvrir le laboratoire et cette magnifique île qu'est la Sardaigne.

Durant la thèse, j'ai eu la chance de pouvoir être accueillie dans plusieurs laboratoires :

- au CENBG de Bordeaux : Merci à l'équipe de pour leur accueil et leur implication dans ce travail et en particulier mes remerciements vont à Monsieur **Hervé Seznec**, Madame **Marina Simon** Monsieur **Guillaume Devès** et Madame **Giovanna Muggiolu**
- au CPTP de Toulouse - Purpan : Merci à Monsieur **Talal Al Saati** pour son accueil et Madame **Florence Capilla** pour les nombreuses colorations histologiques effectuées

Mes remerciements vont bien sûr au CIRIMAT et en particulier à l'équipe PPB, qui est une équipe chaleureuse avec une ambiance de travail des plus plaisantes, dans laquelle les éclats de rires ont fait partie du quotidien (et en particulier les miens, et je pense également à une autre personne que je n'oserais citer, n'est-ce pas Christèle ?). Je souhaite remercier le personnel technique et en particulier **Olivier Marsan**, pour les nombreuses cartographies réalisées. Merci pour tout ce temps passé et ces discussions très enrichissantes, ce fût un réel plaisir d'en apprendre plus sur ce domaine. Merci également à **Françoise Bosc** pour les mesures d'absorption atomiques, qui ont donné des résultats très intéressants. Je tiens également à remercier **Cédric Charvillat** pour son aide précieuse sur les analyses DRX lors de la dernière année.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé durant ces trois années de thèse au CIRIMAT : **David Grossin** (désolée pour mes qualités de cuisinière médiocres... je compte bien m'améliorer par la suite), **Ghislaine Bertrand** (merci pour toutes ces discussions partagées), **Christèle Combes** (nos rires resteront dans les mémoires...), **Agnès Dupret-Bories** (merci encore pour m'avoir initiée aux biopsies sur peaux d'oreilles de porc, je n'aurais jamais cru faire ça un jour), **Jérémy Soulié** (merci pour ta bonne humeur, et milles merci pour le prêt du casque qui m'a été d'une très grande aide pour cette période de rédaction), **Christian Rey** (vos précieuses histoires et expériences étaient une bouffée d'air frais pour moi), toute l'équipe de la faculté de pharmacie et en particulier **Sandrine Cavalié** (merci pour ta joie de vivre et pour ton implication dans ces travaux), mais aussi **Fabien Brouillet**, **Sophie Cazalbou**, **Sophie Giraud**, enfin merci également à **Stéphanie Sarda**, **Carole Thouron** et **Nicolas Abi Chebel**, en espérant ne pas avoir fait d'oubli et en m'en excusant d'avance.

Mes remerciements vont également à tous les doctorants (PPB, MEMO et SURF) que j'ai pu côtoyer lors de ces 3 années (en espérant n'oublier personne) : **Hassan et Mariane**, la distance n'atténue pas l'affection que je vous porte, **Guillaume et Sylvain**, ce fût 2 bonnes années à vos côtés en espérant en passer d'autres, **Camille**, nos parties de ping-pong clochettes Lindt vont me manquer, à quand le prochain concert ?? (si tes nouveaux colloques ne te prennent pas trop de temps...), **Kemie**, nos petites pauses café m'ont fait le plus grand bien, tu sais vraiment me redonner la pêche merci, **Emmanuelle** et **Frédéric**, la Bretagne et le Québec réunis au bureau merci et les dernières venues, **Laëtitia**, **Marine** et **Clémentine**, votre bonne humeur permettra de continuer à égayer le bureau.

Je tiens également à remercier **Alix**, **Alice**, **Yosra** et **Manon**, pour leur implication dans ce travail en tant que stagiaires.

Merci à **Domi**, **Jany**, **Katia** et **Caroline** pour votre aide et votre disponibilité.

Une grosse pensée aux « gros tas » de Toulouse : merci **Maxime** de m'avoir fait découvrir cette équipe de choc ! Un gros gros merci à **Aurore**, ma poule, d'avoir été toujours là pour moi, je te dois beaucoup, accessoirement un gros merci à son chéri « **Smu** », ça y est le torchon est devenu serviette (tu me

réexpliqueras ta théorie la dessus), mais aussi à « **Toto** » et **Elyse**, « **Dub** » et **Agnès**, **Céline** et **Vincent**, **Sam** et **Chetan**, **Tristan** et **Claire**.

Winnie et **Quentin**, une belle rencontre, des belles soirées et « glissades » passées ensemble, d'ailleurs à quand la prochaine ?

Un merci tout spécial pour « **Mimine** » et **Marie**, je n'ai aucun doute que jamais on ne se perdra de vue, notre amitié est plus forte que tout et merci vraiment d'être là.

Perrine, nos nombreux coups de fil me donnent l'impression que tu es toujours avec moi, merci d'être là. **Nadège**, malgré les années notre amitié est intacte, ne change surtout pas. « **Mouloudine** », quand est-ce que tu m'emmènes en Australie (ou autre destination)?? Qui aurait pu prédire ton goût pour le voyage, que je partage également.

Une attention particulière à **Fred**, merci d'avoir été là ces derniers mois de thèse et de m'avoir fait découvrir le Gers et cet accent que j'adore...

Enfin j'aimerais remercier ma famille, et en particulier **mes parents** pour être toujours attentifs et à l'écoute, mes sœurs **Julie**, **Sara** et **Corentine**, et leurs familles respectives, avec bien entendu tous les petits neveux et nièces que j'adore et le(s) futur(s) à venir. Julie, Sara, Corentine, nos liens resteront toujours aussi forts. Un dernier merci à **Patson**, mon fidèle « saucissong ».

« On ne peut jamais savoir pourquoi certains événements arrivent et d'autres non, ce qui provoque quoi, ce qui détruit quoi. Quelles choses permettent à d'autres de naître, de mourir ou de changer de cours. »

Cheryl Strayed,
Wild

Sommaire

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. LA PEAU	7
1. Structure.....	7
A. La peau	7
B. Les annexes cutanées.....	13
C. Vascularisation et innervation.....	16
2. Fonction de la peau	16
3. Absorption cutanée	17
A. Mécanismes.....	17
B. Facteurs influençant l'absorption.....	19
C. Evaluation de la pénétration cutanée	20
4. Conclusion	24
II. L'ACNE	24
1. Définition et origine	24
2. Microbiologie de l'acné	27
3. Altération du sébum à l'origine de plusieurs symptômes de l'acné	28
A. Acide gras	29
B. Squalène	29
4. Facteurs externes ayant un rôle sur la pathologie de l'acné.....	29
5. Classification.....	30
6. Traitements	30
A. Voie topique	31
B. Voie générale.....	31
C. Précautions des associations de traitements.....	32
D. Autres procédures	33
E. Traitements anti-acnéiques en France.....	34
III. ENJEUX DE CES TRAVAUX DE RECHERCHE	36
IV. LES VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS UTILISES EN DERMATOLOGIE	37

1.	Les vecteurs couramment utilisés	38
A.	Les particules souples.....	38
B.	Les particules rigides	39
C.	Intérêts pour application dermatologique.....	39
2.	Application à la pathologie de l'acné	42
3.	Ciblage folliculaire – caractéristiques des vecteurs de PA	46
V.	LES APATITES PHOSPHO-CALCIQUES NANOCRISTALLINES.....	47
1.	Composition et structure	47
2.	Caractérisations physico-chimiques.....	51
A.	Diffraction des rayons X (DRX)	51
B.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	53
C.	Dosages chimiques	55
D.	Microscopies.....	55
3.	Fonctionnalisation	55
A.	Modèle de Langmuir	57
B.	Modèle de Freundlich	57
C.	Modèle de Temkin.....	58
D.	Modèle de Sips (Langmuir-Freundlich)	58
E.	Paramètres influençant l'adsorption.....	59
4.	Propriétés	59
5.	Utilisations biomédicales.....	60
VI.	PRESENTATION DU SUJET DE THESE	61

CHAPITRE II : ELABORATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DES COLLOÏDES

I.	CONTRÔLE DE LA TAILLE DES PARTICULES COLLOÏDALES D'APATITES PHOSPHO-CALCIQUES.....	67
1.	Synthèse des colloïdes.....	67
A.	Protocole de référence.....	67
B.	Variation des paramètres de synthèse.....	68
2.	Influence des paramètres de synthèse sur la taille des particules.....	70
A.	Influence de l'agent dispersant sur les tailles obtenues	71
B.	Influence des autres paramètres de synthèse : temps de maturation, pH, moment d'ajout de l'agent dispersant	74
C.	Bilan.....	76
3.	Purification du colloïde choisi	76

4.	Caractérisations physico-chimiques complémentaires des particules colloïdales obtenues par le protocole sélectionné.....	77
A.	DRX	78
B.	IRTF	79
C.	RMN ³¹ P du solide.....	82
D.	DLS.....	83
E.	MET.....	84
5.	Séchage redispersion.....	84
II.	ADSORPTIONS MOLECULAIRES ET SUBSTITUTIONS IONIQUES.....	85
1.	Mise au point d'un protocole d'adsorption via une molécule modèle.....	86
A.	Choix de la molécule modèle : la cytidine-5'-monophosphate (CMP).....	86
B.	Choix du substrat apatitique	87
C.	Caractérisations physico-chimiques	87
D.	Etude des interactions entre le substrat apatitique et la CMP	89
E.	Conclusion	94
2.	Choix de l'actif anti-acnéique et étude d'adsorption.....	94
A.	Choix de l'agent anti-acnéique : le phosphate de clindamycine (ClindP)	94
B.	Etude de l'adsorption du ClindP sur une apatite non colloïdale	96
C.	Etude de l'adsorption du ClindP sur un colloïde apatitique.....	107
3.	Dopage en différents ions biologiquement actifs	111
A.	Les propriétés du zinc en dermo-cosmétique.....	111
B.	Les propriétés du cuivre en dermo-cosmétique	112
C.	Etude des enrichissements de particules d'apatite colloïdales en ions zinc et/ou cuivre ..	112
III.	CONCLUSION	116

CHAPITRE III : EVALUATION ET SUIVI BIOLOGIQUE : VERS L'ELABORATION D'UNE FORMULATION

I.	Etude de l'hémocompatibilité des colloïdes	119
A.	Introduction.....	119
B.	Matériels et méthodes	120
C.	Résultats et discussion	122
D.	Conclusion	130
II.	Etude de la localisation des particules colloïdales au niveau cutané.....	131
1.	Premiers essais de suivi des particules colloïdales par microscopie biphotonique	132
A.	Présentation de la technique	132

B.	Matériels et méthodes	132
C.	Résultats et discussion	134
D.	Conclusion	135
2.	Interaction avec les cellules par analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission) et RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)	135
A.	Présentation des deux techniques	136
B.	Matériels et méthodes	136
C.	Résultats et Discussion	139
D.	Conclusion	141
3.	Suivi de la pénétration cutanée par coupes histologiques et analyse par microscopie confocale Raman.....	142
A.	Présentation de la technique	142
B.	Matériels et méthodes	144
C.	Résultats et Discussion	146
D.	Conclusion	155
4.	Bilan du suivi de la pénétration cutanée et perspectives	156
III.	Etude des cinétiques de diffusion à travers des membranes synthétiques et des modèles cutanés	156
1.	Présentation de la technique	157
2.	Matériels et méthodes	157
A.	Préparation des échantillons.....	157
B.	Caractérisation des échantillons	158
C.	Etude de diffusion in vitro et ex vivo.....	159
3.	Résultats et Discussion	162
A.	Caractérisation des particules colloïdales.....	162
B.	Suivi cinétique en mode statique.....	162
C.	Suivi cinétique en mode dynamique	167
D.	Etude de l'influence de la formulation sur la cinétique de diffusion des particules colloïdales 174	
4.	Conclusion	176
IV.	Formulation	177
1.	Introduction.....	177
2.	Etude de l'interaction d'un conservateur avec la surface apatitique	178
A.	Matériel et méthodes.....	178
B.	Résultats et Discussion	179

C. Conclusion	180
3. Formulation et premiers essais de suivi de libération du ClindP	180
A. Matériels et méthodes	181
B. Résultats et Discussion	183
C. Conclusion	189
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	197
ANNEXES.....	217

Abréviations

AEP	2 amino-éthyl phosphate
AF	Acide folique
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
A(PEG)P	Amino-poléthylène glycol phosphonaté
CENBG	Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan
Clind	Clindamycine
ClindP	Phosphate de clindamycine
CMP	Cytidine-5'-monophosphate
CSA	Consumer Science and Analytics
D_h	Diamètre hydrodynamique
DHT	Dihydrotestostérone
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
DPBS	Tampon phosphate Dulbecco
DRX	Diffraction des rayons X
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
HAPst	Hydroxyapatite stœchiométrique
HE	Hématoxyline-éosine
HEKn	Kératinocytes de l'épiderme humain (Normal Human Epidermal Keratinocytes)
HMP	Hexaméthaphosphate
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IL-1α	Interleukine-1 α

IPBS	Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale
IRTF	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
JDE	Jonction dermo-épidermique
Linc	Lincomycine
MET	Microscopie électronique en transmission
MCR	Microscopie confocale Raman
NMF	Facteur naturel d'hydratation (Natural Moisturizing Factor)
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
PA	Principe actif
PB	Peroxyde de benzoyle
PdI	Indice de polydispersité
(PEG)P	Polyéthylène glycol phosphonaté
PhCol	Phosphocholine
PIXE	Particle Induced X-ray Emission
RBS	Rutherford Backscattering Spectrometry
TA	Tensio-actif
TL	De type Toll (« Toll like »)
UV	Ultra-violet
βTCP	Phosphate tricalcique β

INTRODUCTION GENERALE

Selon une étude réalisée par le CSA Santé (Consumer Science and Analytics) en 2012 sur plus de 10 000 personnes représentatives de la population française [1], l'**acné** touche 6 millions de français, dont 20 à 50 % présentent des symptômes dépressifs, et une personne sur quatre est âgée de plus de 25 ans. Selon une étude menée par l'ex-AFSSAPS (ANSM) en novembre 2007, en moyenne 70 % des adolescents en sont atteints et 61% de personnes touchées d'acné légère à modérée sont des femmes. Parmi les cas les plus sévères (200 000 français(es) atteints), 70% sont des adultes, ayant une moyenne d'âge de 26 ans. Ainsi, 18,7 millions de soins sont vendus chaque année en pharmacie pour le traitement contre l'acné du visage (Source Dorema, décembre 2011).

Cette pathologie de la peau, et en particulier des follicules sébacés, est caractérisée par 4 symptômes : une hypersécrétion sébacée, une hyperkératinisation, une colonisation bactérienne et une éventuelle inflammation. Elle représente **la dermatose la plus courante dans les pays industrialisés** (affectant plus de 50 millions de personnes aux Etats-Unis chaque année [2]). Elle apparaît en général au cours de l'adolescence et peut persister à l'âge adulte. Les origines de l'acné font l'objet de nombreuses recherches et d'hypothèses dans la littérature et sont toujours en cours d'étude. Pour lutter contre cette dermatose, des traitements par voie orale et locale existent, ayant une action principalement anti-séborrhéique, anti-inflammatoire et/ou antibactérienne.

Pour les patients atteints d'acné légère à modérée, la voie topique (application locale) est souvent envisagée, afin d'éviter au maximum la prise de médicaments par voie orale (celle-ci restant réservée aux conditions les plus sévères), plus sujette à des effets indésirables (toxicité hépatique, complications intestinales...). Cependant, la voie cutanée présente aussi des effets indésirables locaux (principalement des irritations et autres troubles éventuels). Le passage dans la voie systémique de certaines substances, appliquées par voie topique, reste une éventualité pour certains principes actifs (phosphate de clindamycine, sodium de sulfacetamide, acide azélaïque, peroxyde de benzoyle, acide salicylique) [3] et est dépendant de plusieurs facteurs (nature du principe actif (PA), formulation, état de la peau...). Ce passage peut induire, dans certains cas, des effets indésirables systémiques.

Pour une meilleure action des anti-acnéiques actuels, il est **nécessaire de développer de nouveaux traitements capables de cibler le follicule pileux**, et d'ainsi diminuer les concentrations en PA dans le produit fini. Cela pourrait permettre également de limiter la possibilité de passage de certains PA dans la circulation générale et ainsi de minimiser les effets

indésirables éventuels. La vectorisation de PA au niveau du follicule pileux fait l'objet de travaux de recherche entrepris dans la littérature depuis quelques années (liposomes, particules polymériques, fullerènes...) [4]–[7].

Le ciblage folliculaire implique cependant plusieurs contraintes pour le développement de systèmes destinés à être appliqués sur la peau :

- être composés de matériaux biocompatibles et biodégradables,
- avoir une taille adaptée au type de follicule visé et permettant d'éviter le passage transcutané (intercellulaire et intracellulaire) [8],
- permettre une association avec un agent thérapeutique et présenter une libération contrôlée.

L'objectif de cette thèse est d'explorer la possible utilisation de particules colloïdales d'apatites bio-inspirées dans le domaine de la dermatologie, en se focalisant en particulier sur la pathologie de l'acné. Notre approche vise à terme le développement d'une nouvelle formulation dermatologique facilitant un ciblage folliculaire et permettant possiblement de réduire la dose de PA administrée aux patients et de minimiser le passage du PA dans la voie systémique. L'excellente biocompatibilité des apatites nanocristallines – proches du minéral osseux, leur facilité de préparation, ainsi que leur possible multi-fonctionnalisation [9] (par le biais d'adsorption moléculaire et/ou de substitutions ioniques) apparaissent en effet comme des composés intéressants pour une application dermatologique. Toutes ces caractéristiques réunies permettent a priori d'espérer atteindre à terme une meilleure action face à cette dermatose.

Le premier chapitre de ce mémoire est une revue de la bibliographie sur la physiologie de la peau et la pathologie de l'acné, ses symptômes, ses origines, les traitements actuels et les recherches en cours. Un bilan comparatif sur les particules et nano-systèmes utilisées en dermatologie et leur intérêt y est établi. Enfin, ce premier chapitre introduit les phosphates de calcium, composés bio-inspirés sur lesquels ces travaux de recherche se sont focalisés. Le chapitre II est consacré à la synthèse et la caractérisation physico-chimique de particules colloïdales d'apatites nanocristallines, incluant notamment l'évaluation de leur taille. L'adsorption de différentes molécules (molécule modèle, agent anti-acnéique) sur des apatites non colloïdales et colloïdales, ainsi que leur dopage avec des ions Zn^{2+} et Cu^{2+} aux propriétés antibactériennes et/ou anti-inflammatoires sont également étudiés dans ce chapitre. Le chapitre III est quant à lui consacré à des tests de suivi des particules colloïdales par le biais de

différentes techniques, *in vitro* (notamment utilisant des membranes synthétiques) et *ex vivo* sur peaux d'oreilles de porcs, connues pour simuler la peau humaine. Une évaluation de l'hémocompatibilité des particules est également reportée. Les premiers essais de mise au point d'une formulation galénique sont aussi présentés dans ce chapitre. La discussion des résultats et l'évaluation des perspectives concluront ce mémoire.

Cette thèse, à fort caractère appliqué, fait ainsi l'objet d'une première étude sur l'utilisation de particules colloïdales d'apatites bio-inspirées et (multi)fonctionnalisées pour le traitement de la pathologie de l'acné. Selon l'analyse bibliographique, il ne semble pas y avoir de travaux actuels encore publiés sur l'utilisation de tels systèmes, hautement biocompatibles, à des fins thérapeutiques anti-acnéiques.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Une peau saine présente des fonctions, une composition ainsi qu'une capacité de renouvellement permanente qui lui est propre. La première partie de ce chapitre présente les généralités sur la peau, sa structure et sa fonction et les mécanismes d'adsorption. La deuxième partie est consacrée à la pathologie de l'acné, ses origines, les différentes formes de l'acné ainsi que les traitements actuels existants. La dernière partie de ce chapitre met en évidence les vecteurs utilisés en dermatologie et une étude plus détaillée sur les phosphates de calcium termine ce chapitre.

I. LA PEAU

1. Structure

A. La peau

La peau est constituée de 3 couches principales, de la plus profonde à la plus superficielle (Figure 1) :

- l'hypoderme
- le derme
- l'épiderme

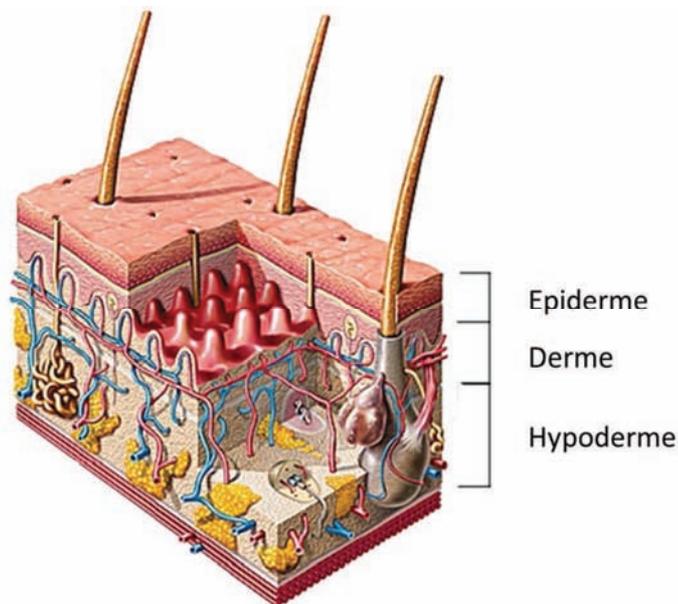


Figure 1 : Structure de la peau (adaptée de Larousse Médical)

a. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu adipeux conjonctif lâche situé au plus profond de la peau, la reliant aux organes sous-jacents. Il est constitué d'adipocytes groupés en lobules, et séparés par une matrice extracellulaire contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène. De nombreux capillaires sanguins et fibres nerveuses sont également présents entre ces cellules. Il existe 2 types de tissus adipeux [10] : le blanc (largement majoritaire chez l'adulte) et le brun (essentiellement présent chez le fœtus et le nouveau-né). Le tissu adipeux blanc sert de réserve énergétique pour l'organisme, par l'accumulation de triglycérides et d'acides gras, tandis que le brun est impliqué dans la thermogénèse [11], [12].

b. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif constitué de cellules de soutien, les fibroblastes, responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire. Celle-ci se compose principalement de fibres d'élastine et de collagène, conférant respectivement à la peau ses propriétés d'élasticité et de résistance à la traction [13]. Ces fibres se trouvent au sein d'une substance fondamentale, regroupant les composants sécrétés par les fibroblastes, protéoglycanes et glycosaminoglycanes, jouant un rôle dans l'hydratation et l'équilibre ionique de l'environnement cellulaire. Le derme héberge également les cellules du système immunitaire, plus précisément les macrophages, dont le rôle principal est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes ; les cellules dendritiques dermiques (ou dendrocytes dermiques), dont la fonction principale est de présenter des antigènes afin de déclencher des réactions immunitaires [14] ; et enfin les mastocytes, qui produisent des neuromédiateurs ayant un rôle dans divers processus (hypersensibilité, inflammation, défense bactérienne ou parasitaire...). Il est richement vascularisé (vaisseaux sanguins ou lymphatiques) et innervé (nerfs et terminaisons nerveuses spécialisées).

Le derme est formé de 2 couches : le derme réticulaire, la partie la plus profonde et la plus dense qui représente 80% de l'épaisseur totale de celui-ci, et le derme papillaire, le plus proche de l'épiderme, séparé de ce dernier par la jonction dermo-épidermique (JDE). Le derme réticulaire, également appelé derme profond, se différencie du reste du derme par son tissu conjonctif dense. La couche papillaire est un tissu conjonctif lâche situé dans la région supérieure du derme, formant les papilles dermiques entre les crêtes épidermiques au niveau de la JDE. Les fibroblastes y sont plus nombreux et plus actifs que dans le derme réticulaire. Certaines papilles dermiques sont pourvues de corpuscules tactiles encapsulés, les corpuscules

de Meissner, récepteurs sensoriels du toucher, formés de terminaisons encapsulées sensibles au toucher. Le derme renferme également d'autres types de corpuscules, comme ceux de Ruffini (récepteurs mécaniques sensibles à l'étirement, présents au niveau de la peau et des capsules articulaires), de Vater-Pacini (sensibles à la pression) ou de Krause (sensibles au froid), et des terminaisons nerveuses libres (sensibles à la douleur et à la température) [15].

c. La jonction dermo-épidermique (JDE)

Egalement appelée membrane basale, la JDE est la couche la plus superficielle qui recouvre le derme. Cette zone acellulaire se compose de 2 feuillets : la lame basale, composée essentiellement de fibres de collagène et de glycoprotéines, et la lame réticulaire, contenant du collagène [13]. Cette membrane assure un rôle d'ancrage aux cellules épithéliales, en favorisant leur maintien et leur survie, mais également un rôle de support mécanique et de barrière. Sa structure ondulée s'aplatit avec l'âge.

d. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié pavimenteux squameux recouvrant le derme au niveau de la JDE. Il possède une épaisseur moyenne d'environ 100 µm pouvant varier, selon les régions corporelles, d'environ 50 µm jusqu'à 1 mm [13]. Il est composé principalement de kératinocytes (à 90 %) qui, par leur différenciation, vont former différentes couches cellulaires d'épaisseurs variables, présentées en Figure 2. Ils sont responsables de la synthèse de kératine, protéine impliquée dans l'imperméabilité cutanée.

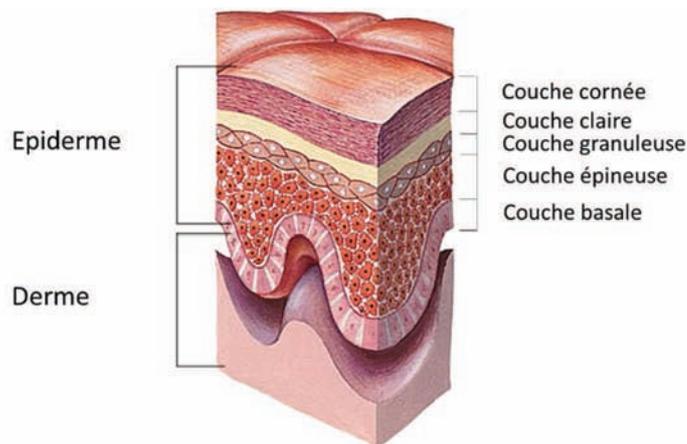


Figure 2 : Structure de l'épiderme (adaptée de Larousse Médical)

L'épiderme comprend aussi d'autres types cellulaires. Les mélanocytes produisent la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau. Les cellules de Langerhans, produites par la moelle osseuse et migrant vers l'épiderme, vont participer à la défense immunologique de la peau, en présentant les allergènes aux lymphocytes T [16]. L'épiderme contient enfin des récepteurs mécaniques, les cellules de Merkel, localisées au niveau de la couche la plus profonde de l'épiderme, la couche basale, et également au niveau du bulge des follicules pileux (sous la glande sébacée) [15]. Ces récepteurs sensitifs vont envoyer des neuromédiateurs aux fibres nerveuses avec lesquelles elles sont en lien. Le rôle de l'épiderme est d'assurer la fonction de protection de la peau.

La couche basale (ou germinative)

La couche germinative est la plus profonde de l'épiderme et repose sur la membrane basale. Elle est constituée d'une seule assise contenant des cellules de forme cubique ou prismatique. Ces dernières sont reliées entre elles par des desmosomes et à la lame basale par des hémidesmosomes, assurant ainsi une bonne cohésion. Elles se divisent pour former les kératinocytes des couches superficielles et dans un premier temps de la couche directement supérieure.

La couche épineuse (stratum spinosum)

Egalement appelée corps muqueux de Malpighi, elle est formée de plusieurs assises cellulaires dont le nombre peut varier en fonction des régions corporelles (5 à 15 couches environ). Les cellules des couches inférieures possèdent une forme plutôt polyédrique, qui s'aplatit dans les couches plus superficielles. Elles sont riches en filaments intermédiaires organisés en faisceaux, les tonofibrilles, qui s'étendent dans le cytoplasme sous forme d'épines, à l'origine de l'appellation *stratum spinosum*. Elles sont reliées entre elles par la présence de nombreux desmosomes. Les cellules de Langerhans se trouvent au niveau de cette couche [15].

La couche granuleuse (stratum granulosum)

Elle possède un nombre moindre de strates cellulaires que la couche épineuse (1 à 5 couches). Son nom lui vient de la présence de grains de kératohyaline et de l'apparition des corps lamellaires, les corps d'Odland ou kératinosomes. Ces granules sont très basophiles et formées de nombreux filaments de protéines : loricine, involucrine et profilaggrine. Elles libèrent un produit lamellaire lipidique dans les espaces intercellulaires conférant à la peau sa propriété de barrière imperméable [16].

La couche claire (stratum lucidum)

Elle n'est présente que dans les épidermes épais comme la paume ou la région plantaire. Il s'agit d'une couche intermédiaire entre la granuleuse et la couche cornée. Le caractère cytologique y est mal défini et est constitué de kératinocytes morts aux contours mal distincts.

La couche cornée (stratum corneum)

La couche cornée est composée d'une dizaine à une vingtaine de couches de cellules anucléées, les cornéocytes. Il s'agit de cellules mortes composées essentiellement de kératine et de substances hygroscopiques, le Natural Moisturizing Factor (NMF). Ces dernières comprennent principalement des acides aminés, de l'acide pyrrolidone carboxylique, de l'acide lactique, de l'urée, des sucres et des ions minéraux. Les cornéocytes sont reliés entre eux par des desmosomes et séparés par le ciment intercornéocytaire, formé principalement de cholestérol, d'acides gras libres et de céramides. La cohésion entre les cellules de la couche cornée est due à la présence de cadhérine desmosomales en surface, et à une protéine qui se loge au cœur des cornéodesmosomes, la cornéodesmosine. Sa dégradation par les enzymes protéolytiques, trypsine et chymotrypsine, engendre une desquamation superficielle de la peau. Cela permet un renouvellement constant de l'épiderme [13].

e. Le film hydrolipidique

Il se compose d'une partie hydrophile représentée par la sueur, et d'une partie hydrophobe, le sébum, provenant de la sécrétion des glandes sébacées et comprenant également d'autres lipides libérés lors de la kératinisation [13]. La sueur comprend de l'eau à 99% ainsi que la plupart des constituants plasmatiques (acides aminés, urée, ammoniac, chlorure de sodium, acide lactique et pyruvique). Le sébum est, quant à lui, composé à 50% de glycérides, d'acides gras libres (10 à 25%) provenant de la décomposition des triglycérides, de cires et esters (20%), de squalène (5 à 10%) et de cholestérol (5%). Le film hydrolipidique représente la première barrière vis-à-vis des agressions extérieures. Il maintient l'acidité cutanée (pH ~ 5,5) lui conférant un second rôle de barrière vis-à-vis des agressions microbiennes. Il permet le maintien de l'hydratation de la couche cornée par son effet occlusif.

f. La flore cutanée

Il est relativement difficile de déterminer une composition moyenne des micro-organismes résidants au niveau de la flore cutanée, celle-ci étant multi-facteurs dépendante. Sa composition varie en fonction de différents facteurs endogènes (physiologiques (sexe, âge,

site), système immunitaire (précédentes expositions, inflammation), pathologies (diabète)) et exogènes (environnement (pollution, climat, localisation géographique), style de vie (hygiène, consommation d'antibiotiques)). La flore cutanée est constituée de 2 types : la résidente, non pathogène en conditions physiologiques, et la transitoire. Elles se localisent au niveau de la couche desquamante, propice à la croissance, dont 25% des micro-organismes qui la constituent se situent au niveau du follicule pileux et des glandes cutanées. Elles se composent de micro-organismes, bactéries, levures, champignons, virus et acariens [17]. La flore résidente est constituée principalement de bactéries Gram positif, tel que les genres *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*), *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (*P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*). On retrouve principalement, dans la flore transitoire, le staphylocoque doré, *Staphylococcus aureus*, des protéobactéries¹, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et des *Bacillus* [18].

La flore cutanée fongique représente une part moindre par rapport aux bactéries présentes. Les levures lipophiles du genre *Malassezia* (anciennement *Pityrosporum*) en sont les principales représentatives. Enfin, des acariens de types *Demodex* (*D. folliculorum*, *D. brevis*) peuvent être présents.

Le nombre de bactéries à la surface de la peau peut atteindre près d'un million par cm². Cette densité microbienne varie en fonction de divers facteurs pouvant être liés les uns aux autres, comme le sexe, l'âge, la région corporelle, le pH cutané, l'épaisseur cutanée, l'humidité cutanée, la densité folliculaire, la densité des glandes sébacées... Elle diffère d'un individu à l'autre, formant une empreinte microbienne individuelle. La flore cutanée microbienne représente une barrière préventive permettant de défendre la peau contre les microbes potentiellement infectieux. La desquamation de la couche cornée élimine continuellement ces bactéries évitant ainsi leur colonisation.

g. Le pH cutané

Il est en moyenne compris entre 4,5 et 5,5 à la surface cutanée (4,5 chez l'homme et plus alcalin chez la femme). Son acidité est due à la présence d'acides sécrétés par les glandes sudorales eccrines : acide lactique, acide undécylénique et acide urocanique. Elle permet ainsi de défendre la peau des micro-organismes. Le pH peut varier de 4 à 7 en fonction des individus

¹ Bactéries à Gram négatif, pouvant arborer différents types de morphologie (coque, bâtonnet, spirale...), possédant un flagelle leur conférant leur mobilité. Elles regroupent les genres *Escherichia*, *Vibrio*, *Legionella* et *Salmonella*.

et de la région corporelle, et peut être influencé par des facteurs extérieurs comme l'application de produits cosmétiques et pharmaceutiques et le lavage [19].

B. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées correspondent à des invaginations qui prennent racine dans le derme ou l'hypoderme. Elles se manifestent principalement au sein du derme par la formation d'invaginations profondes : les glandes sudoripares eccrines et apocrines et les follicules pilosébacés accompagnés des glandes sébacées.

a. Les glandes sudoripares

Eccrines

Les glandes eccrines sont réparties sur l'ensemble du corps à l'exception des ongles, des lèvres et des organes génitaux externes. Elles sont surtout présentes au niveau des régions palmoplantaires et se manifestent au niveau de l'épiderme par la formation d'un pore sudoral. Chaque glande est formée d'un peloton sécrétoire, situé dans le derme profond voire dans la partie superficielle de l'hypoderme, débouchant à la surface de la peau grâce à un canal excréteur intra-épidermique [20]. Elles sont responsables de la production de la sueur, incolore et inodore, constituée à 99% d'eau et des composants du plasma : la sueur primitive. Elles participent à la perte en eau transépidermique, par la sécrétion plus ou moins continue d'une faible quantité de sueur, la perspiration insensible. Elles jouent un rôle dans la thermorégulation en particulier au niveau de la thermolyse, par la sudation thermique (augmentation de la température extérieure ou corporelle) et psychique (émotions).

Apocrines

Comme les glandes eccrines, les apocrines sont constituées d'une unité glandulaire sécrétrice et d'un canal, qui, à la différence des eccrines, débouche au niveau du follicule pileux. Situées principalement au niveau des régions axillaires (aisselles) et génitales [21], elles sécrètent une sueur légèrement jaunâtre et odorante principalement due à des stimulations extérieures et psychiques pouvant provoquer une augmentation d'adrénaline. Sa composition varie d'un individu à l'autre en fonction du sexe, de la pigmentation et des habitudes alimentaires et se compose principalement de lipoprotéines et de débris cellulaires.

b. Les follicules pilosébacés

Le follicule pilosébacé comprend le poil, les gaines épithéliales, la ou les glandes sébacées, le muscle arrecteur du poil et parfois la glande sudoripare apocrine (Figure 3). La

glande sébacée est reliée au follicule au niveau de l'isthme. Au-dessus de ce dernier se trouve la tige pileaire (partie visible du poil) et l'infundibulum (partie supérieure située entre l'ostium folliculaire et l'isthme). Le bulge se situe juste en dessous de l'abouchement de la glande. Cet amas de cellules keratinocytaires forme un point d'attache pour le muscle arrecteur du poil. La partie sous-isthmique comprend également la racine pileaire en contact avec la papille dermique, cette dernière apportant nutriments au follicule pileux. Cette région du poil, appelée également bulbe pileux, est constituée de cellules en croissance dont certaines produisent la tige pileaire [5]. Chaque poil est constitué d'une moelle centrale, d'une écorce et d'une cuticule, entourées de gaines épithéliales et d'une gaine fibreuse, et composé principalement de kératine avec plus ou moins de mélanine à l'origine de sa pigmentation [22]. Il est entouré par une gaine épithéliale interne formée de cellules riches en kératine, elle-même entourée d'une gaine épithéliale externe (invagination de l'épiderme). Le cycle pileaire se compose de 3 grandes phases : la phase anagène (croissance du poil), la phase catagène (régression pileaire), et la phase télogène (chute du poil).

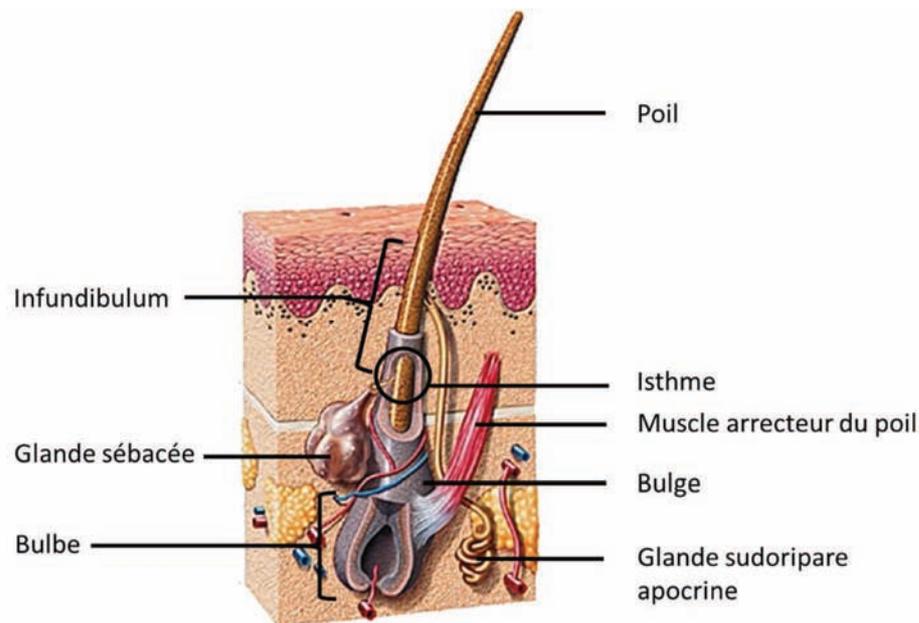


Figure 3 : Structure du follicule pilo-sébacé (adaptée de Larousse Médical)

Les orifices folliculaires représentent 10% de la surface cutanée au niveau du visage et du cuir chevelu, et environ 0,1% sur le reste du corps [23]. La densité folliculaire moyenne est largement plus importante au niveau du front (292 follicules / cm²) que sur le reste du corps (~15 à 30 follicules / cm²) [24]. Il existe 3 types de follicules pileux : les follicules terminaux, les velus (lanugineux) et les sébacés [25]. Les poils terminaux se situent au niveau des cheveux,

de la barbe, du pubis et des aisselles. Ils sont épais ($> 60 \mu\text{m}$ de diamètre), longs ($> 2 \text{ cm}$) et associés à une glande sébacée proportionnellement de taille moyenne. Le duvet se compose de poils velus et est présent sur quasiment l'ensemble du reste du corps à l'exception des muqueuses et des régions palmo-plantaires. Ils sont plutôt fins ($< 30 \mu\text{m}$) et courts ($< 2 \text{ cm}$) avec une glande sébacée proportionnellement plutôt développée [26]. Faiblement pigmentés, ils sont les plus nombreux et jouent un rôle important dans la production de sébum. Enfin les follicules dits « sébacés » sont présents sur le haut du visage et le tronc. Ils sont caractérisés par la présence d'une glande sébacée très volumineuse avec un poil fin ($< 30 \mu\text{m}$), de longueur variable, allant de celle d'un poil terminal à la taille de ceux constituant le duvet [13], [26], [27]. Lors d'une augmentation de sécrétion de sébum, cela peut créer un bouchon formé de sébum, cellules mortes et bactéries. Les follicules sébacés sont impliqués dans la pathologie de l'acné [13].

c. La glande sébacée

La glande sébacée, située dans la partie supérieure du follicule pileux, est constituée de cellules sébacées ou sébocytes qui vont se différencier à partir d'une couche basale germinative. Elle est holocrine² et multiacineuse³. Elle sécrète le sébum (cf. Tableau 1) qui va être libéré de la glande vers le canal pileux [15].

Tableau 1 : Composition du sébum humain chez un sujet sain

<i>Composition</i>	<i>Proportion (%)</i>
Mono-, di-, triglycérides de type oléique	50
Acides gras libres	10 – 25
Cires et esters	20
Squalène	5 – 10
Cholestérol estérifié	3
Cholestérol libre	1,5

La taille, le nombre et l'activité des glandes sébacées varient en fonction de la région corporelle (plus importante au niveau du visage et du cuir chevelu). Leur sécrétion peut différer en fonction de la température, des hormones (cycle menstruel), du sexe et de l'âge. La régulation de la sécrétion sébacée est principalement d'origine hormonale. Les œstrogènes

² Se dit d'une glande dont la sécrétion est le résultat de la séparation et de l'expulsion complète des cellules sécrétantes qui la constitue. Les cellules se remplissent en produit de sécrétion et se désintègrent ensuite.

³ Cavité épithéliale arrondie bordée par des cellules sécrétrices qui débouchent dans le canal excréteur d'une glande

auront tendance à freiner la sécrétion de sébum, tandis que la progestérone et les androgènes la favoriseront. Le rôle principal de cette annexe cutanée est de participer à l'hydratation cutanée en évitant l'évaporation de l'eau, tout en empêchant également l'entrée de substances exogènes comme par exemple les bactéries.

C. Vascularisation et innervation

a. Vascularisation

L'hypoderme et le derme sont richement vascularisés. L'épiderme est nourri et oxygéné au niveau des papilles dermiques, au niveau de la JDE. Cette vascularisation comprend le réseau lymphatique et artérioveineux. Des artérioles vont venir irriguer les follicules pilosébacés, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. Des plexus dermiques sont ainsi formés, l'un profond au niveau de la jonction dermo-hypodermique et l'un sous papillaire au niveau de la JDE.

b. Innervation

L'innervation cutanée concerne essentiellement le derme, l'épiderme ne recevant que des terminaisons nerveuses et ne possédant pas de réseau comme celui du derme. Comme cité précédemment, ce dernier est riche en terminaisons corpusculaires (Cf partie sur le derme) et en terminaisons nerveuses libres entourant le poil et les glandes sébacées.

2. Fonction de la peau

La principale fonction de la peau est son rôle de barrière qui se manifeste sous différents aspects [28]. Cette barrière va permettre, dans un premier temps, de limiter le passage d'éléments du milieu intérieur vers le milieu extérieur et inversement. Ainsi, la présence de lipides extracellulaires au niveau de la couche cornée permet de former une membrane lamellaire qui va empêcher l'eau, les substances hygroscopiques (composants du NMF) et les électrolytes de s'évaporer. Plusieurs facteurs confèrent à la peau son rôle de défense non spécifique contre les microorganismes pathogènes, comme son pH acide, la présence de cellules immunitaires ou encore la flore cutanée. Comme précisé précédemment, le renouvellement cellulaire (desquamation) est également un moyen d'empêcher la pénétration d'éléments extérieurs.

La présence de kératinocytes liés entre eux par des desmosomes et des hémidesmosomes, et de protéines réticulées au niveau des cornéocytes, font de la peau une barrière mécanique.

3. Absorption cutanée

A. Mécanismes

L'absorption cutanée d'un PA se déroule en 3 temps (Figure 4):

- la pénétration, c'est-à-dire l'entrée d'un PA au sein d'une couche particulière ou d'une structure, par exemple l'entrée d'un PA dans la couche cornée,
- la diffusion, c'est-à-dire le passage d'un PA d'une couche à une autre qui est différente de la première par sa fonction et sa structure,
- l'absorption, c'est-à-dire le passage du PA dans la circulation générale.

Il existe 3 principales voies de pénétration cutanée : intercellulaire, intracellulaire et annexielle (folliculaire et canal sudoripare).

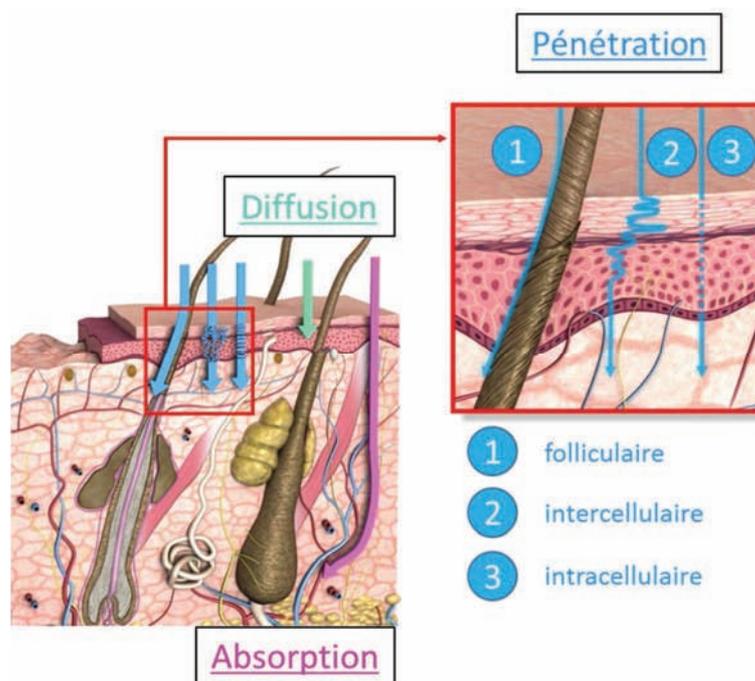


Figure 4 : Représentation schématique des différentes voies de pénétration, de diffusion et d'absorption cutanée adaptée de www.scf-online.com

La voie transcutanée (intercellulaire et intracellulaire) a longtemps été considérée comme la principale, les annexes ne représentant qu'une faible proportion de la surface cutanée. Le ciment intercellulaire représente environ 5 % du volume total de la couche cornée. Il est emprunté principalement par les molécules lipophiles ou amphiphiles [13], [29]. Le passage intracellulaire est réservé en grande partie aux molécules de petite taille. Il peut également

laisser la possibilité aux substances amphiphiles et plus ou moins lipophiles d'emprunter cette voie par la présence de cornéodesmosomes de nature protéique reliant les cellules entre elles.

Les phénomènes de pénétration de substances actives sont très complexes en raison de nombreux paramètres influents sur la capacité de pénétration de ces substances dans la peau. La couche cornée est l'un des principaux facteurs limitant la pénétration d'actifs. La capacité d'un PA à franchir la barrière cutanée dépend de plusieurs facteurs et en particulier de sa masse molaire et de sa solubilité. Les PA de faible masse molaire (< 500 g/mol) passent plus facilement et rapidement la barrière cutanée, contrairement aux PA de masse molaire plus élevée, où la pénétration est plus difficile [30]. Le flux de diffusion percutanée est proportionnel à la différence de concentration de chaque côté de la membrane (ici la peau) et répond à la première loi de Fick :

$$J = Kp \times \Delta C = \frac{Km \times D \times \Delta C}{e} \quad \text{Équation 1}$$

J représentant le flux percutané du PA (g/cm²/s), Kp le coefficient de perméabilité (cm/s), ΔC la différence de concentration de part et d'autre de la membrane (C1-C2) (g/cm³), D le coefficient de diffusion du PA (cm²/s), Km le coefficient de partage entre la couche et le système donneur et e l'épaisseur de la couche (cm).

La vitesse de diffusion à travers une membrane, traduite par le coefficient de perméabilité Kp , n'est pas dépendante de la concentration mais est plutôt liée à l'épaisseur de la membrane. Ainsi, plus la peau est fine, plus les substances actives seront aptes à diffuser rapidement au travers. Cependant il faut prendre en considération la solubilité de la substance diffusante dans la couche cornée. Le coefficient de partage Km met en évidence le rapport de la solubilité du PA dans la couche cornée et dans l'excipient. Plus il est élevé, plus le PA diffusera dans la couche cornée. Il est difficile d'obtenir des valeurs de Km pour un PA donné. Il est possible d'obtenir une approximation en regardant le coefficient de partage octanol/eau. Le coefficient de diffusion D traduit la mobilité du PA à travers la couche cornée. Plus les molécules sont grandes ou possèdent une masse moléculaire élevée plus la diffusion sera faible.

$$D = \frac{e^2}{6T_L} \quad \text{Équation 2}$$

avec T_L correspondant au temps de latence.

La voie folliculaire a été, dans un premier temps, considérée comme négligeable car elle ne représentait que 0,1% du total de la surface de la peau. Cependant, cette proportion a été revue, en prenant en considération les follicules comme des invaginations épidermiques ce qui augmente considérablement leur proportion au niveau de la surface d'échange [27]. Le passage de substance par la voie folliculaire est désormais la cible de vecteurs de PA [31]–[33] dont la modulation de taille et le type de particule permet un ciblage spécifique au sein du follicule, pouvant être intéressant pour le traitement de certaines dermatoses comme l'acné, la thérapie génétique de la peau et la médecine régénérative (par le ciblage des cellules souches au niveau du bulge pileux) [27].

Les glandes sudoripares eccrines peuvent représenter une voie de pénétration mais sont rarement considérées ni étudiées.

B. Facteurs influençant l'absorption

Il y a plusieurs facteurs pouvant influencer la pénétration cutanée. Au niveau biologique, une peau saine va constituer une très bonne barrière à toute substance exogène. Une peau lésée sera beaucoup plus apte à laisser passer des PA. Ainsi une peau vieillissante, moins épaisse, moins hydratée et moins grasse, sera plus sensible à la pénétration de substances. Certaines dermatoses favorisent également la sécheresse ce qui influence l'absorption.

Des facteurs pharmacologiques, comme la dose administrée, la fréquence et la durée de contact, peuvent engendrer une variabilité au niveau du passage cutané.

Les propriétés physico-chimiques du PA lui permettent de passer plus ou moins facilement la barrière. Au niveau de sa taille, la pénétration est facilitée pour des molécules de masse molaire inférieure à 500 g/mol [13]. Des molécules amphiphiles auront un passage plus aisé que des lipophiles ou des hydrophiles. Pour aider le passage ou pour l'empêcher, des véhicules de PA peuvent être utilisés. En fonction du but recherché, ils pourront être choisis en fonction de leur forme, taille et composition. Il existe également des excipients (solvant type éthanol ou propylène glycol) ou des outils qui améliorent la pénétration (ultrasons, patches, microaiguilles, ionophorèse). Ainsi, l'étude de l'absorption de PA favorise le développement d'innovations thérapeutiques par le « Drug design » pour augmenter l'efficacité et la tolérance, améliorer la libération et la biodisponibilité des médicaments.

C. Evaluation de la pénétration cutanée

L'administration de médicaments par voie cutanée nécessite un suivi de pénétration de l'actif. Plusieurs possibilités existent afin de réaliser cette évaluation. La méthode *in vivo* peut être menée sur l'animal ou l'Homme. Afin de parer à l'expérimentation animale *in vivo*, des techniques *ex vivo* et *in vitro* sont de plus en plus développées. Ainsi des études *ex vivo* sont réalisées sur des biopsies cutanées. La recherche de méthodes alternatives se poursuit et voit émerger de plus en plus de modèles de peaux reconstruites. Elles sont utilisées *in vitro*, afin de simuler au mieux la peau humaine. Toutes ces études sont menées afin d'évaluer également un éventuel effet irritant et sensibilisant des substances employées.

Plusieurs paramètres doivent être évalués et pris en compte, afin d'obtenir des résultats pertinents. Il est important d'évaluer la pertinence physiologique du modèle cutané choisi (espèce, structure de la peau, région corporelle...), sa prédictibilité (extrapolation à l'homme) et sa pertinence scientifique (fréquence d'études utilisant ce modèle cutané en fonction de l'application visée...). L'expérimentation animale étant au cœur de mœurs actuelles et faisant l'objet de nouvelle réglementation (mars 2013), les valeurs éthiques et réglementaires doivent être respectées.

a. Approches expérimentales

Méthodes in vivo

Le modèle animal a longtemps été étudié pour les tests de suivi *in vivo*, le rat étant l'espèce préconisée par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) car étant la plus étudiée. Cependant elle est reconnue comme ayant une morphologie et une composition enzymatique relativement différentes de la peau humaine, surestimant ainsi les résultats d'absorption par rapport à l'Homme [34]. Il est ainsi préférable de choisir des modèles de peau présentant un taux d'absorption cutanée plus proche de celui de l'Homme, comme par exemple le porc. En plus des études réalisées sur membranes synthétiques, De plus en plus d'études privilégient les tests sur l'Homme, sous surveillance médicale. L'interdiction totale de l'expérimentation animale pour les produits cosmétiques (produits finis et ingrédients) est entrée en vigueur en Europe le 11 mars 2013.

Les études *in vivo* pour l'évaluation de la pénétration cutanée consistent à appliquer uniformément une quantité de produit connue sur la peau de volontaire (ou d'animaux) sur une surface d'application définie, puis d'effectuer des dosages (sang, urines,...) afin de déterminer

le taux de passage dans la voie systémique. La quantité appliquée doit mimer une exposition humaine potentielle.

Des méthodes de suivi, autres que le dosage, permettent d'évaluer la pénétration cutanée. Le tape-stripping est une technique utilisée pour estimer la quantité de substance pénétrée en fonction de la profondeur de la couche cornée [35], [36]. Pour cela, on applique de manière répétitive plusieurs rubans adhésifs sur la peau ayant reçu la formulation à suivre, afin de prélever les différentes couches cellulaires de la couche cornée. Chaque ruban peut ensuite être analysé par microscopie pour évaluer la distribution des cornéocytes, mais surtout par des techniques analytiques comme par exemple la Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), pour doser la quantité de substance active au niveau de chaque assise cellulaire. Cette technique est délicate en raison de plusieurs paramètres pouvant influencer la reproductibilité des résultats comme par exemple le site d'application, la pression exercée, la vitesse d'arrachage....

Une technique, plus récente, pouvant réalisée *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* est la microdialyse [37]. Elle consiste à insérer une microsonde stérile, parallèle à la peau, en surface du derme, dans laquelle passe une solution physiologique. Cette microsonde est composée d'une membrane semi-perméable à l'eau et aux petits composés. Elle va récupérer ainsi le PA selon un gradient de concentration et permettre de le doser. Elle permet le suivi de la libération d'un PA à partir d'une formulation appliquée sur la peau.

Méthode ex vivo

La technique *ex vivo* permet d'obtenir des résultats très proches de l'application humaine, alternativement ou en complément des méthodes *in vivo*. L'OCDE ne différencie pas les méthodes *ex vivo* des méthodes *in vitro*. La différenciation que l'on peut faire entre les techniques *in vitro* et *ex vivo*, est que, respectivement, l'une utilise des modèles de peaux reconstituées, des cultures cellulaires et/ou des membranes synthétiques, alors que l'autre se sert de biopsies cutanées animales ou de peau humaine (en provenance de chirurgies) [38]. Ainsi, les techniques *in vitro* expliquées dans les lignes directrices de l'OCDE, sont des tests « *in vitro* sur peaux excisées ». Ces techniques appelées *in vitro* de l'OCDE peuvent ainsi être extrapolées pour les techniques *ex vivo*.

Il est ainsi indiqué que ces explants « frais » doivent être utilisés dans les 24h après l'excision. L'épiderme seul peut être prélevé ou des biopsies d'épaisseur ne dépassant pas le

millimètre pour un suivi de vitesse de pénétration, notamment dans le cas d'emploi de cellules de Franz. Si la finalité est d'observer le suivi de la formulation dans les couches de la peau, des explants supérieurs à 1 mm d'épaisseur peuvent être adaptés. Tout prélèvement cutané doit être contrôlé par la vérification de son intégrité. Tout modèle possédant des lésions ou présentant des irritations doit être écarté d'une étude de passage cutané.

Les cellules de Franz (Figure 5) sont des dispositifs permettant d'évaluer le passage d'un composé à travers une membrane naturelle ou synthétique. Il s'agit d'une cellule de diffusion constituée de deux compartiments : un donneur, qui contient le produit destiné à être appliqué sur la peau, et un receveur, dans lequel on va faire des prélèvements à intervalles de temps définis, afin d'évaluer la quantité libérée en fonction du temps.

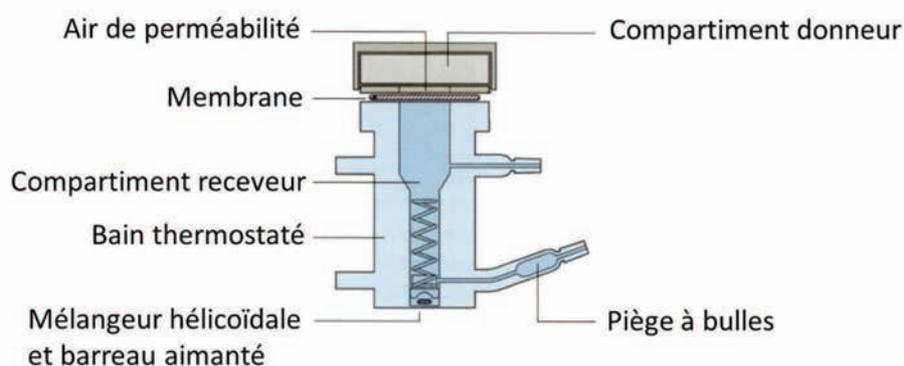


Figure 5 : Cellule de Franz

Les différents prélèvements peuvent ensuite être dosés par différentes techniques comme la spectroscopie Ultra-Violet (UV) ou encore la HPLC. Afin de s'affranchir d'un ralentissement de diffusion, il est important de s'assurer que la solubilité du PA ne sera pas un facteur limitant sa libération. Pour cela, il faut respecter les conditions « sink » : la concentration du PA dans le milieu receveur devra être 3 à 10 fois inférieure à celle de saturation du PA.

Le suivi de pénétration peut également se faire sur des coupes histologiques, par suivi par exemple de substances luminescentes, par microscopie à fluorescence ou confocale Raman.

Méthodes in vitro

Les modèles cellulaires sont utilisés pour étudier principalement l'interaction des PA avec les cellules cutanées de type kératinocytes, mélanocytes, et fibroblastes, mais également pour évaluer leurs données toxicologiques [39]–[42]. Cependant, les cultures cellulaires sont

des modèles relativement simples, où les cellules sont cultivées en monocouche. Elles ne reflètent donc pas vraiment les phénomènes *in vivo* (structure tridimensionnelle) et ne permettent pas d'étudier la diffusion et la distribution des PA dans la peau, ainsi que l'éventuel passage dans la circulation sanguine. Les études *in vitro* peuvent être réalisées à partir de membranes synthétiques. De plus en plus de modèles de peaux reconstruites *in vitro* sont développés, à partir de cellules humaines en culture, pour éviter l'expérimentation animale et pour compléter les études primaires de cultures cellulaires. Ces peaux reconstituées peuvent être composées uniquement d'épiderme (Episkin, SkinEthic, EpiDerm™, Mimetop®...), de derme (MimeDerm®) ou de structures dermo-épidermiques (Phenion®) [43] et servent à différentes applications comme par exemple le suivi du passage cutané ou encore l'immunohistochimie (MIMEDERM®, MIMESKIN®) [44], [45]. La start-up LabSkin Creations (LSC), fondée en juin 2014, produit une structure dermo-épidermique artificielle en ayant recours à la technologie de l'impression tridimensionnelle. Des groupes de recherche travaillent également sur le développement de substituts cutanés sains pour les grands brûlés, ou des substituts cutanés pathologiques, comme par exemple le psoriasis (groupe de recherche du Dre Pouliot [46]).

b. Modèles cutanés

En amont de l'évaluation de la pénétration cutanée de PA *in vivo*, des tests préalables sont nécessaires. Il est important de réaliser des premiers essais sur des modèles cutanés (d'origine animale ou humaine, sur peau excisée). Les modèles excisés de peau humaine proviennent généralement de chirurgie, mais leur disponibilité reste relativement limitée. Le modèle animal est ainsi souvent privilégié. Afin d'avoir une bonne reproductibilité et de minimiser le nombre d'études, le modèle cutané employé doit être le plus proche de la peau de l'Homme. Pour cela, il est essentiel de bien choisir l'espèce et la région corporelle. Les paramètres principaux à prendre en compte sont l'épaisseur de la peau, la composition du ciment intercornéocytaire de la couche cornée et le nombre d'appendices (follicule pilosébacé) [47]. Différentes espèces ont été évaluées : souris, rat, porc, cochon d'Inde et singe. Parmi ces espèces, le porc apparaît comme la plus proche de l'Homme, l'utilisation de certaines étant très restreinte (singe), contraignante (nécessite une épilation ou rasage (rongeurs)) ou certaines autres espèces surestimant l'absorption cutanée (rongeur). La peau d'oreille de porc, en particulier, possède une épaisseur épidermique et de la couche cornée, une morphologie folliculaire, une anatomie dermique (vascularisation et organisation des fibres de collagène) et une composition du ciment interconéocytaire similaires à l'Homme (Tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison modèle cutané de porc avec la peau humaine [48]

	Porc	Homme
Peau		
Couche cornée	17 – 28 μm	6 – 19 μm
Epiderme viable	60 – 85 μm	70 – 82 μm
Derme	~ 1,86 mm	1 – 1,9 mm
Follicule pilosébacé		
Densité	20 / cm^2	14 – 32 / cm^2 (sauf front : 292 / cm^2)
Diamètre du poil	58 – 97 μm	16 – 18 μm
Profondeur	0,96 – 1,38 mm	< 1 mm
Orifice	173 – 229 μm	66 – 78 μm
Profondeur isthme	0,5 mm	0,5 mm

4. Conclusion

L'étude de la physiologie de la peau, des différentes voies de passage cutanée pour l'administration de PA et le suivi de la pénétration des PA sur des modèles de peaux adaptés est une première étape nécessaire pour la compréhension et l'étude des traitements dermatologiques et en particulier, dans la pathologie de l'acné, représentant la dermatose étudiée dans ce sujet de thèse.

II. L'ACNE

1. Définition et origine

L'acné est une dermatose d'origine bactérienne caractérisée par l'éruption folliculaire de lésions non inflammatoires (comédons ouverts ou fermés) et/ou inflammatoires (papules, pustules, nodules) pouvant laisser des cicatrices. Elle est localisée principalement au niveau du visage, du cou et du dos, là où la densité des glandes sébacées est la plus forte. Les origines de l'acné sont diverses et variées : génétique (predisposition), hormonale (âge), environnementale/extérieure (stress, pollution, nourriture, cosmétique...). Cette dermatose se caractérise par plusieurs aspects : une augmentation de la sécrétion de sébum, une hyperkératinisation à l'origine de la formation de comédons, une colonisation bactérienne et/ou une inflammation.

L'*hyperproduction de sébum* ou hyperséborrhée est la conséquence d'un dérèglement de la glande sébacée. Son dysfonctionnement est principalement lié aux androgènes. Les

glandes sébacées présentent la densité la plus élevée en récepteur androgène dans la peau humaine. Deux types d'enzymes, les 5- α -reductase de type I, présentes au niveau du cuir chevelu, du visage et de la poitrine, et de type II (zones épargnées par l'acné : barbe, poitrine...) [49], convertissent la testostérone en dihydrotestostérone (DHT). La DHT va être reconnue par les récepteurs des glandes sébacées et va ainsi engendrer la production de sébum par les sébocytes. Leur prolifération est ainsi dose-dépendante et localisation-dépendante, la zone la plus touchée par l'hyperprolifération étant le visage.

L'**hyperkératinisation** correspond à un renouvellement trop rapide des cellules de la couche cornée. L'accumulation de cornéocytes desquamés peut entraîner une obstruction du canal excréteur du follicule pilosébacé. Ainsi, on peut observer une dilatation du follicule liée à l'hypersécrétion sébacée, conduisant à la formation de microcomédons, puis de comédons par l'accumulation de lipides, bactéries et fragments cellulaires.

La ou les causes à l'origine de l'hyperkératinisation restent à déterminer précisément, cependant on retrouve plusieurs théories dans la littérature : une déficience en acide linoléique au niveau du sébum et du ciment intercellulaire [50], la production d'androgènes (production de la dihydrotestostérone par la 5- α -reductase, participant à l'hyperkératinisation) [51], les bactéries impliquées dans l'acné et la présence de cytokines. Guy et al. [52], ainsi que Downie et al. [53], ont montré que l'exposition des follicules pilosébacés aux cytokines, les interleukines-1 α (IL-1 α , médiateurs pro-inflammatoires produits par les cellules des tissus infectés (kératinocytes) au niveau du canal sébacé), engendre un hyperkératinisation folliculaire et peut provoquer une perturbation de l'intégrité du follicule. En effet, les kératinocytes produisent des IL-1 α qu'ils vont libérer suite à une lésion ou une irritation. Ces IL-1 α vont se fixer sur les cellules voisines, ce qui va activer leur hyperprolifération dans le but de réparer le tissu endommagé [54]. Ingham et al. [55] ont reporté un fort taux d'IL-1 α au niveau des lésions acnéiques. Plus récemment, Selway et al. [56] ont voulu éclaircir le rôle des récepteurs type Toll (« Toll like », TL), présents sur les kératinocytes de la lame basale et de l'infundibulum mais aussi au niveau des glandes sébacées, dans cette desquamation folliculaire anormale. Ces récepteurs sont capables de reconnaître la présence de motifs pathogéniques, appelés PAMPs, à la surface des micro-organismes. Pour cela, ils ont exposé des PAMPs à des glandes sébacées maintenues *ex vivo* et évalué l'activité des récepteurs TL (de type 2 au niveau des kératinocytes basaux et infundibulaires et au niveau de la glande sébacée). Ils ont mis en évidence l'activation de ces récepteurs par les PAMPs, et ainsi la libération d'IL-1 α . Après 7 jours d'exposition, ils ont observé une hyperkératinisation qui serait à l'origine de la formation de comédons.

Il existe deux types de lésions non inflammatoires (Figure 6) : les comédons ouverts (ou points noirs) et les comédons fermés (ou points blancs). L'origine de la comédogenèse serait en partie due à une modification de la composition du sébum chez les sujets atteints d'acné (contrôlée par la production d'androgène) : une diminution de la concentration en acide linoléique et une augmentation de la concentration en autres acides gras libres du sébum chez le sujet acnéique, mais aussi la peroxydation du squalène, favorisent la formation de comédons [57].

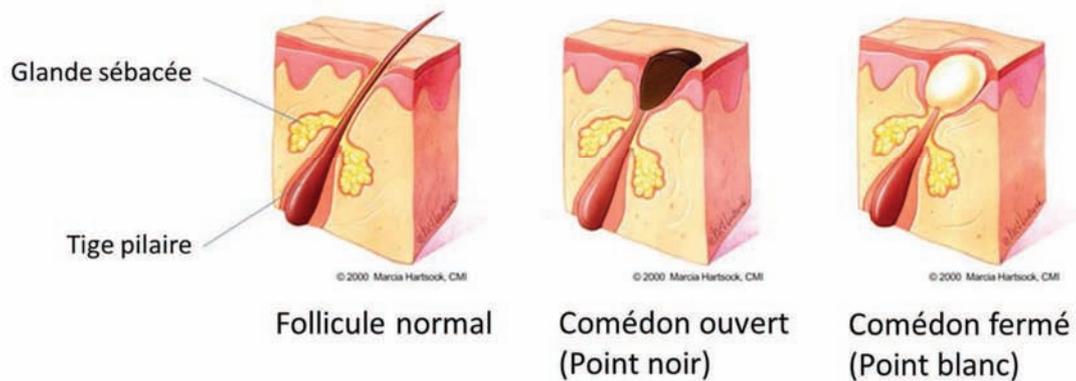


Figure 6 : Lésions non inflammatoires (adaptée de [58])

La **colonisation bactérienne** au sein des follicules infectés se compose principalement de bactéries propioniques (*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *avidum* et *granulosum*), de staphylocoques (*Staphylococcus aureus*, *epidermidis* et *vulgaris*) et de levures de type *Malassezia*. La formation de lésions inflammatoires superficielles (papules et pustules) et profondes (nodules), est due principalement à une bactérie, *P. acnes*. La présence de lésions rétentionnelles (comédogenèse) entraîne la prolifération de la bactérie qui libère des substances inflammatoires.

L'**inflammation** correspond à une réaction de défense de l'organisme suite à une agression chimique ou physique. Elle peut être d'origine extérieure ou provenir de l'organisme lui-même. Elle conduit à la formation de lésions inflammatoires dont les dites élémentaires de l'acné sont les papules, les pustules et les nodules (Figure 7). Les papules sont des petites lésions rouges, solides et avec un léger relief, résistantes à la palpation et qui ne laissent pas de cicatrices. Elles possèdent une taille comprise entre 1 et 5 mm et peuvent évoluer vers la formation de pustules. Ces dernières se distinguent des papules par leur contenu purulent blanc

à jaunâtre. Souvent d'origine infectieuse, elles sont fréquemment centrées sur un follicule pileux. Enfin, les nodules correspondent à une masse ferme enchâssée dans la peau, plus en profondeur que les papules (pouvant être dermo-hypodermiques), ayant une taille supérieure à 5 mm.

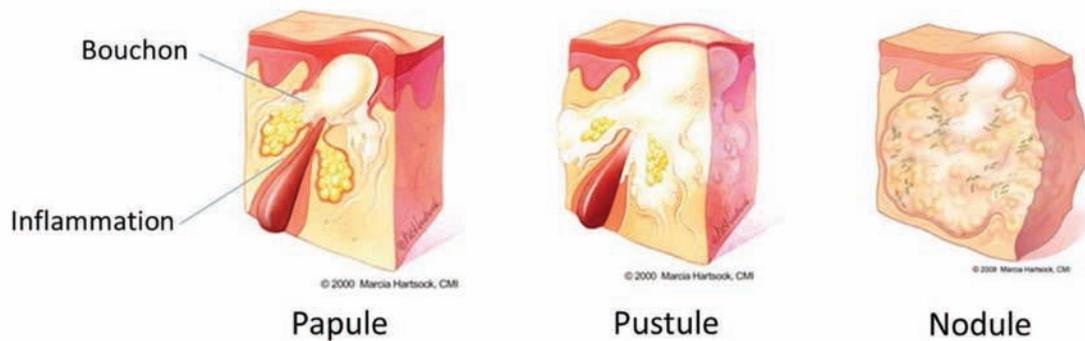


Figure 7 : Lésions inflammatoires (adaptée de [58])

P. acnes prolifère au niveau des lésions rétentionnelles et joue un rôle au niveau du processus inflammatoire. Elle favorise la production de substances impliquées dans la réaction inflammatoire, comme des cytokines inflammatoires (en particulier l'interleukine-1- α), des peptides antimicrobiens (défensines, cathelicidines), des métalloprotéinases matricielles ou autres produits, par les sébocytes, les kératinocytes et les leucocytes [58]. Ces produits vont diffuser au travers de la paroi folliculaire, ce qui va engendrer la stimulation des cellules du système immunitaire. On observe alors une invasion de lymphocytes T CD4 (anti-corps anti-*P.acnes* circulant) et de macrophages dans la région péri-folliculaire. Cela entraîne également un afflux de polynucléaires neutrophiles conduisant à la destruction de la paroi folliculaire et ainsi à une diffusion de l'inflammation [59].

2. Microbiologie de l'acné

Comme indiqué précédemment, plusieurs micro-organismes sont présents dans la dermatose de l'acné. L'aspect microbiologique de cette maladie est d'autant plus difficile à déterminer qu'il varie d'un individu à l'autre, et les causes et facteurs restent sujets à controverses. Depuis un peu plus d'une cinquantaine d'années, plusieurs recherches ont été menées afin de déterminer une tendance de la flore saprophyte impliquée dans l'acné [60].

Sur un sujet atteint d'acné, les principales bactéries présentes au sein des follicules infectés (la plupart mais pas tous [61], [62]) sont du genre *Propionibacterium*, *Staphylococcus* et *Malassezia* [61]–[63]. Pour les lésions infectées, le type de microorganismes peut varier selon

la lésion. Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer le microbiote des comédons ouverts et fermés. Certains comédons ne sont pas colonisés par des bactéries ce qui tendrait à confirmer que la comédogénèse n'aurait pas d'origine bactérienne [64]–[66]. Il peut en être de même pour les lésions inflammatoires (papules et pustules). Selon une étude réalisée par Leeming et al. [67], certaines papules ayant une maturation d'une journée peuvent être stériles, et le développement bactérien est observé après plusieurs jours. Ceci laisse penser que les lésions inflammatoires ne seraient pas uniquement d'origine bactérienne.

La plupart des études faites sur la microbiologie de l'acné se focalisent principalement sur une bactérie, *Propionibacterium acnes*, celle-ci étant dominante au niveau du follicule pilo-sébacé [68]. Il s'agit d'une bactérie gram positif, anaérobie, principalement présente au niveau de la peau et des cheveux, zones riches en glandes sébacées. Sa densité est fonction de la quantité de sébum présent au niveau de la peau. Son implication dans cette dermatose est connue mais encore sujette à plusieurs controverses [69], [70]. En premier lieu, Unna a reconnu *P. acnes* comme étant à l'origine de la maladie de l'acné [71]. Cette hypothèse a été reconsidérée par la mise en évidence de l'équivalence de densité de cette bactérie au niveau folliculaire, chez un sujet sain et un sujet atteint d'acné. La pathogénicité de la bactérie reste également en débat. *P. acnes* jouerait un rôle essentiellement au niveau inflammatoire [72]. En effet, cette bactérie produit des enzymes, principalement des lipases, qui vont hydrolyser les triglycérides présents dans le sébum en glycérols et acides gras libres, qui ont une action comédogène et irritante pour la peau. Cependant, la quantité de bactéries présentes ne serait pas proportionnelle au degré d'inflammation.

Récemment, l'existence de différentes souches au sein de *P. acnes* (différence au niveau de leur génome [68] et de leur phénotype [73]), pourrait justifier certaines contradictions au niveau de la littérature. Fitz-Gibbon et al. ont identifié des souches *P. acnes* uniquement présentes chez des sujets acnéiques et d'autres uniquement présentes chez des sujets sains. Cette avancée pourrait permettre de mieux comprendre la pathogénicité de la bactérie en fonction des différentes souches, pour ainsi mieux traiter cette maladie. Les recherches sur les différentes souches de *P. acnes* sont toujours en cours, associées avec l'étude de l'éventuelle résistance de la bactérie aux antibiotiques, pour permettre de mieux appréhender la pathologie de l'acné.

3. Altération du sébum à l'origine de plusieurs symptômes de l'acné

La composition séborrhéique diffère d'un sujet sain à un sujet acnéique [74], [75]. Comme indiqué précédemment, elle comprend principalement du squalène, des esters cires et

des triglycérides qui vont être métabolisés par les lipases de la peau en acide gras libres. Chez la personne atteinte d'acné, le sébum est plus pauvre en acide gras libre (acide linoléique) et plus riche en squalène (peroxydé) que chez un sujet sain.

A. Acide gras

Les principaux acides gras présents dans le sébum sont l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide oléique.

a. Acide linoléique

Une diminution en acide linoléique peut être à l'origine de certains symptômes de la maladie, comme l'hyperkératinisation et la formation de comédons. Une faible quantité en acide linoléique (linoléate) engendre une déficience en acide gras au niveau des cellules de l'épithélium folliculaire qui devient écailleux et provoque ainsi une hyperkératinisation [50]. Cette déficience représente un des facteurs à l'origine de la diminution de l'imperméabilité de l'épiderme et ainsi de l'augmentation de la perméabilité de substances inflammatoires au niveau des comédons [57].

b. Autres acides gras

La concentration de la plupart des autres acides gras saturés diminue, sauf pour l'acide palmitique, dont l'augmentation favorise l'hyperkératinisation. Le rapport acides gras saturés / insaturés diminue au profit de l'augmentation des insaturés et peut entraîner une augmentation de la sécrétion séborrhéique.

B. Squalène

Le squalène, plus abondant chez les personnes ayant de l'acné, s'oxyde en peroxyde de squalène sous l'action des UV. Ce peroxyde favorise l'hyperkératinisation et ainsi la formation de comédons. En plus de cette action comédogène, il a un effet sur la régulation et la libération de médiateurs inflammatoires et est impliqué dans la réaction pro-inflammatoire [76].

4. Facteurs externes ayant un rôle sur la pathologie de l'acné

Plusieurs facteurs externes ont fait l'objet d'études sur l'influence qu'ils peuvent avoir sur le développement de l'acné, dont les principaux sont (enquête réalisée par le CSA Santé en 2012 [1]) : l'alimentation, le stress, les facteurs génétiques, le tabac, le soleil, l'hygiène et les produits cosmétiques. Les principaux pouvant favoriser l'acné sont le stress et l'alimentation, cette dernière pouvant être bénéfique en fonction du type d'aliments (oméga 3 et fibres). Le

rôle des facteurs génétiques est encore mal connu en raison d'un nombre d'études assez faible. Le soleil peut être favorable à la réduction des lésions acnéiques, cependant il n'est pas recommandé dans certains traitements anti-acnéiques en raison d'une éventuelle photosensibilisation. Le tabac, l'hygiène et les produits cosmétiques semblent avoir des effets moindres sur le développement de l'acné.

5. Classification

Il existe différents types d'acné qui peuvent être classés selon plusieurs critères comme l'âge et la sévérité [59], [77]. La classification selon l'âge démarre chez le nouveau-né. L'acné néonatale touche les bébés âgés d'une à six semaines. Elle se manifeste par l'apparition de petits comédons sur le nez, le front et les joues et disparaît généralement sans laisser de marques. L'acné infantile, chez l'enfant de 3 à 9 mois en moyenne, est moins fréquente que la néonatale. Elle se traduit par la présence de papules et pustules pouvant être inflammatoires. A l'adolescence surviennent les comédons ainsi que les papules et les pustules. On parle d'acné vulgaire. Il s'agit de la forme la plus fréquente liée à la production importante d'hormones. Elle s'atténue vers l'âge de 25 ans. Certains adultes peuvent avoir de l'acné plus inflammatoire que l'acné vulgaire et avec une présence de comédons beaucoup plus faible.

L'acné est également classée en fonction de la sévérité : légère, modérément sévère et sévère. Au niveau des formes sévères on retrouve l'acné nodulaire ou nodulokystique, caractérisée par des lésions rétentionnelles inflammatoires profondes de type nodules qui peuvent, par la suite, laisser des marques cicatricielles. L'acné conglobata et l'acné fulminans sont deux autres types d'acné sévère dont l'une se manifeste par des lésions très étendues et l'autre pouvant s'accompagner de fièvre et malaise général.

6. Traitements

Pour lutter contre l'acné, des traitements par voie générale et locale existent. Dans un premier temps, les traitements se focalisent principalement au niveau cutané (topique), afin d'éviter au maximum la prise de médicaments par voie orale (celle-ci restant réservée aux cas plus sévères), plus sujette à des effets indésirables. Différents types de médicaments sont employés pour combattre l'acné et ses symptômes. On y retrouve principalement les rétinoïdes, le peroxyde de benzoyle, des antibiotiques, des hormones et des anti-bactériens.

A. Voie topique

Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A. Ils favorisent la régulation et la croissance normale des kératinocytes. Ils facilitent ainsi l'élimination des cornéocytes en excès et l'excrétion du sébum : ils participent à l'élimination des comédons. Cependant ils restent assez agressifs pour la peau et leur application doit être limitée dans le temps pour éviter l'apparition d'effets néfastes comme un dessèchement trop important, une desquamation, l'apparition d'érythème ou encore une photosensibilisation. Les plus utilisés sont la trétinoïne, le tazarotène (Etats-Unis) ou encore l'adapalène.

Le peroxyde de benzoyle (2-10%) est un agent antibactérien, moins photosensibilisant que les rétinoïdes mais plus efficace que l'(iso)trétinoïne contre les inflammations. Il présente l'inconvénient d'être assez irritant [78].

L'acide azélaïque est utilisé dans la dermatose de l'acné. Il a une légère action antibactérienne ciblée sur *P. acnes* et *S. epidermidis* [13]. Il permet également de diminuer la quantité d'acides gras libres présents au niveau de la surface cutanée. Il aurait ainsi une légère action kératolytique, favorisant ainsi la comédolyse. Son utilisation peut provoquer en début de traitement une irritation locale (érythème, sensation de brûlures...) [79].

Les antibiotiques topiques sont indiqués dans les acnés inflammatoires légères à modérées. Ils sont utilisés pour leur activité contre *P. acnes* en inhibant sa croissance, en diminuant l'apparition de lésion et en diminuant de manière directe et/ou indirecte l'inflammation [58]. Le faible risque d'effets indésirables pour la plupart des antibiotiques topiques (à l'exception de phosphate de clindamycine qui présente un effet plus élevé par rapport aux autres antibiotiques antiacnéiques) justifie leur emploi préférentiel pour le traitement de l'acné [80]. Cependant, une des précautions à prendre en considération lors de l'utilisation d'antibiotiques est de minimiser la résistance de *P. acnes*. Pour cela, l'association des antibiotiques à d'autres molécules anti-acnéiques permet de réduire le développement de résistance bactérienne (peroxyde de benzoyle, rétinoïdes, gluconate de zinc...) [81], [82].

B. Voie générale

Dans le cas d'acné sévère, des prises en charge par voie orale peuvent être nécessaires. Ce mode d'administration est cependant sujet à plus d'effets indésirables que la voie cutanée. Les antibiotiques couramment prescrits par la voie générale sont principalement des cyclines : doxycycline, lymécycline, minocycline, tetracycline et clindamycine [49], [78], [83]. Ils

nécessitent des traitements longs (3 mois) et peuvent engendrer des effets indésirables. Au-delà de cette période, il est conseillé de continuer avec un traitement par voie locale (peroxyde de benzoyle, acide azélaïque ou rétinoïdes). La minocycline peut provoquer plus d'effets indésirables que les autres cyclines. Son utilisation n'est donc pas conseillée en premier lieu.

L'isotrétinoïne peut être indiquée par voie orale si l'administration cutanée n'est pas suffisante. Elle agit en réduisant la taille et l'activité sécrétrice de la glande sébacée et ainsi la formation de comédons [49]. Elle permet également d'éviter le développement bactérien au sein du follicule pileux. C'est un anti-acnéique relativement efficace mais qui présente de nombreux effets néfastes : douleur articulaire, maux de tête, sécheresse cutanée, démangeaison voir même dépression. Il peut avoir un effet tératogène et est contre-indiqué pour les femmes enceintes et en âge de procréer. L'isotrétinoïne ne doit pas être administrée avec des tétracyclines compte-tenu du risque de survenue d'hypertension intracrânienne bénigne. Il est donc préférable de le recommander uniquement en cas d'acné sévère.

Le traitement hormonal, prescrit uniquement chez les femmes, peut être requis si les antibiotiques par voie orale ne sont pas suffisants. Les contraceptifs de type œstrogène diminuent la production d'androgènes (DHT) et inhibent ainsi l'activité de la glande sébacée.

C. Précautions des associations de traitements

Il a été démontré que la combinaison de différents types de PA permet une meilleure efficacité de traitement, en particulier par voie topique, dont les principales sont résumées dans la Figure 8. Dans le cas d'utilisation d'antibiotiques locaux, l'association de traitement est bénéfique pour la réduction de résistance bactérienne aux antibiotiques.

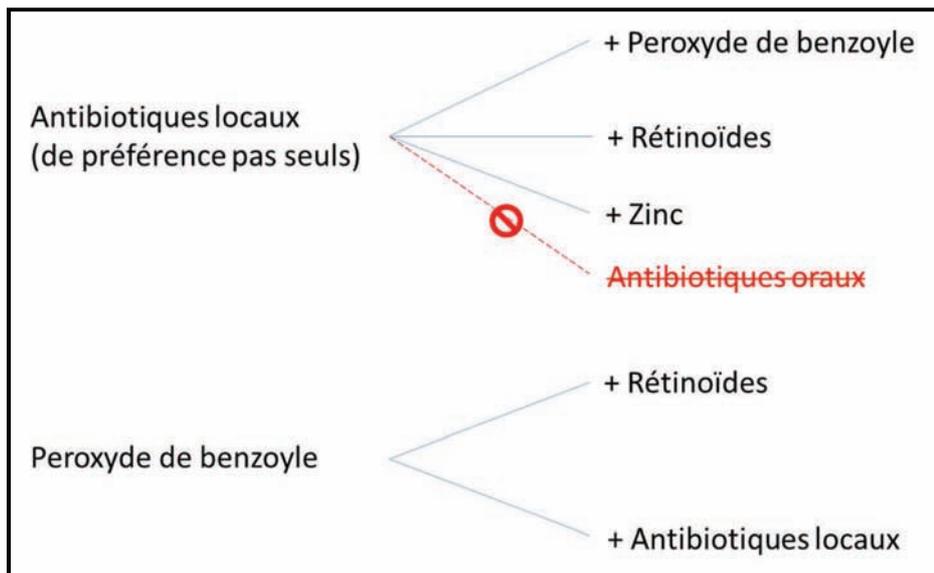


Figure 8 : Associations de PA anti-acnéiques recommandée par voie locale selon le rapport de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) [59]

D. Autres procédures

Au niveau topique, d'autres types de traitements dermo-cosmétiques peuvent être utilisés en complément des traitements pharmaceutiques, destinés à garder une peau saine et préparée pour ces traitements. Ils consistent à avoir une bonne hygiène cutanée par l'utilisation de gel nettoyant et de crèmes permettant essentiellement de limiter le développement bactérien et l'inflammation. Ce genre de traitement est disponible en parapharmacie et non soumis à prescription.

D'autres techniques utilisant la lumière (rouge et bleue) peuvent être employées pour les patients présentant une faible réponse (résistance de la bactérie aux antibiotiques) ou une mauvaise tolérance aux traitements topiques ou oraux. La lumière bleue (405 à 420 nm) permet d'avoir une action anti-bactérienne contre *P. acnes*. En effet, la bactérie produit des porphyrines (en particulier les coproporphyrine III) qui vont absorber la lumière. Leur photoexcitation engendre la production de radicaux libres (oxygène singulet) qui peut éliminer la bactérie. La lumière rouge (620 à 750 nm) pénètre plus profondément pour une meilleure action qui, à la différence de la lumière bleue, est anti-inflammatoire [84], par son action de modulation sur les cytokines inflammatoires. Cependant, l'utilisation de la lumière seule reste actuellement insuffisante pour un traitement complet de l'acné [85]. Des recherches étudiant l'association de ce type de traitement avec d'autres sont en cours de développement [86].

La photothérapie dynamique consiste à appliquer une substance photosensibilisante sur les lésions, d'appliquer un patch occlusif opaque à la lumière, puis de les exposer à la lumière rouge (634 nm) selon un temps pouvant varier d'environ 10 à 20 minutes selon le degré de sévérité de l'acné. La lumière rouge permet une meilleure pénétration de la substance photosensibilisante qui sous la lumière rouge va être excitée et qui va, en présence d'oxygène, aboutir à la formation de radicaux libres qui vont avoir une action bactéricide. Ce type de traitement présente des effets indésirables : poussée d'acné inflammatoire avec l'apparition de pustules.

La microchirurgie peut être recommandée en complément des traitements médicamenteux. Elle est réalisée par des dermatologues et consiste à élargir l'orifice du follicule pilosébacé (comédons ouverts) afin de pouvoir extraire les comédons, par pression ou à l'aide d'un tire-comédon, sans traumatiser le derme environnant [59].

D'autres produits et techniques additionnelles peuvent être employés comme l'homéopathie, la phytothérapie [87], les probiotiques [88] ou encore l'acupuncture [89].

E. Traitements anti-acnéiques en France

Les traitements actuels sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (ce tableau ne comprend pas les traitements dermo-cosmétiques).

Tableau 3 : Liste des anti-acnéiques topiques pharmaceutiques actuel en France

Types d'agent thérapeutique	Types de formulation	Quantité (%)	Nom commerciaux
<u>Antibactérien :</u> - Acide azélaïque - Phosphate de clindamycine (ClindP) - Erythromycine - Cuivre + Zinc + Soufre	- Gel, crème - Solution pour application cutanée, gel - Solution pour application cutanée, lotion, gel pour application locale - Pommade	15 à 20 1 2 à 4 -	Finacea, Skinoren Dalacine, Zindacline Eryfluid, Erythrogel, Erythromycine bailleul Dermo-sulfuryl
<u>Peroxyde de benzoyle (PB)</u>	- Crème, gel, gel pour application locale	2 à 10	Curaspot, Cutacnyl, Eclaran, Pannogel, Papclair
<u>Rétinoïdes :</u> - Adapalène - Trétinoïne - Isotrétinoïne	- Crème, gel, gel pour application cutanée - Crème - Gel pour application locale	0,1 0,025 à 0,05 0,05	Adapalène Teva, Adapalene Zentiva, Differine Effederm, Retacnyl, Ketrel, Locacid Roaccutane
<u>Associations :</u> - Adapalène + PB - Erythromycine + trétinoïne - ClindP + trétinoïne	- Gel - Gel pour application cutanée - Gel	0,1 + 2,5 4 + 0,025 1 + 0,025	Epiduo Erylik Zanea

III. ENJEUX DE CES TRAVAUX DE RECHERCHE

La voie orale, réservée au traitement de l'acné sévère, présente de nombreux effets indésirables dont les plus importants peuvent se retrouver au niveau intestinal et hépatobiliaire (inflammation intestinale, douleur de l'estomac, modification des fonctions du foie...). Dans le cas d'une acné légère à modérée, la voie cutanée est à préférer, restant cependant sujette à des effets indésirables locaux (principalement irritations cutanées). L'utilisation de certains PA anti-acnéiques par voie cutanée peut néanmoins engendrer des effets au niveau systémique (liés à un éventuel passage des PA dans le sang), comme par exemple dans le cas du phosphate de clindamycine, du peroxyde de benzoyle ou encore de l'acide azélaïque.

Ainsi, les enjeux de ces travaux de thèse sont multiples. Dans un premier temps, ils consistent à limiter le passage transdermique des PA pour éviter les effets indésirables systémiques lors d'une application cutanée. Un autre enjeu est d'augmenter l'efficacité d'une formulation anti-acnéique actuelle en ciblant les foyers infectieux par l'utilisation de véhicule de PA (particules). Un dernier objectif est de mettre en œuvre une libération « intelligente » au niveau de ces foyers infectieux (par exemple permettant une libération modulée par le niveau d'infection/inflammation).

Pour cela, nous proposons de mettre au point une nouvelle formulation utilisant des particules pour vectoriser le principe actif vers les follicules pileux tout en limitant les effets secondaires d'un PA libre. Dans ce cas, Pour cela, la formulation galénique et les particules permettant de véhiculer les PA doivent répondre à un certain nombre de spécificités :

- Être biocompatibles,
- Avoir une taille de particules permettant de limiter le passage transcutané et ainsi présenter une libération de PA plus « ciblée » au niveau de la surface cutanée et des follicules pileux,
- Avoir des particules multifonctionnalisables pour conférer potentiellement plusieurs propriétés anti-acnéiques : anti-bactérienne, anti-inflammatoire, anti-séborrhéique et kératolytique (dans ces travaux, nous nous sommes focalisés sur les aspects anti-bactériens et anti-inflammatoires),
- Avoir une formulation adaptée à la pénétration folliculaire (milieu riche en sébum).

Ainsi le concept de ces travaux de thèse a été le suivant (Schéma 1):

- synthétiser des particules biocompatibles (bio-inspirées), visant le ciblage des follicules pileux et une limitation de passage transcutané par un effet de taille (effet stérique),
- les multifonctionnaliser dans le but de leur conférer des propriétés anti-bactériennes et anti-inflammatoires,
- choisir un PA permettant d'envisager une libération « intelligente »,
- étudier leur localisation suite à une application cutanée,
- les incorporer dans une formulation galénique permettant de favoriser le ciblage folliculaire.

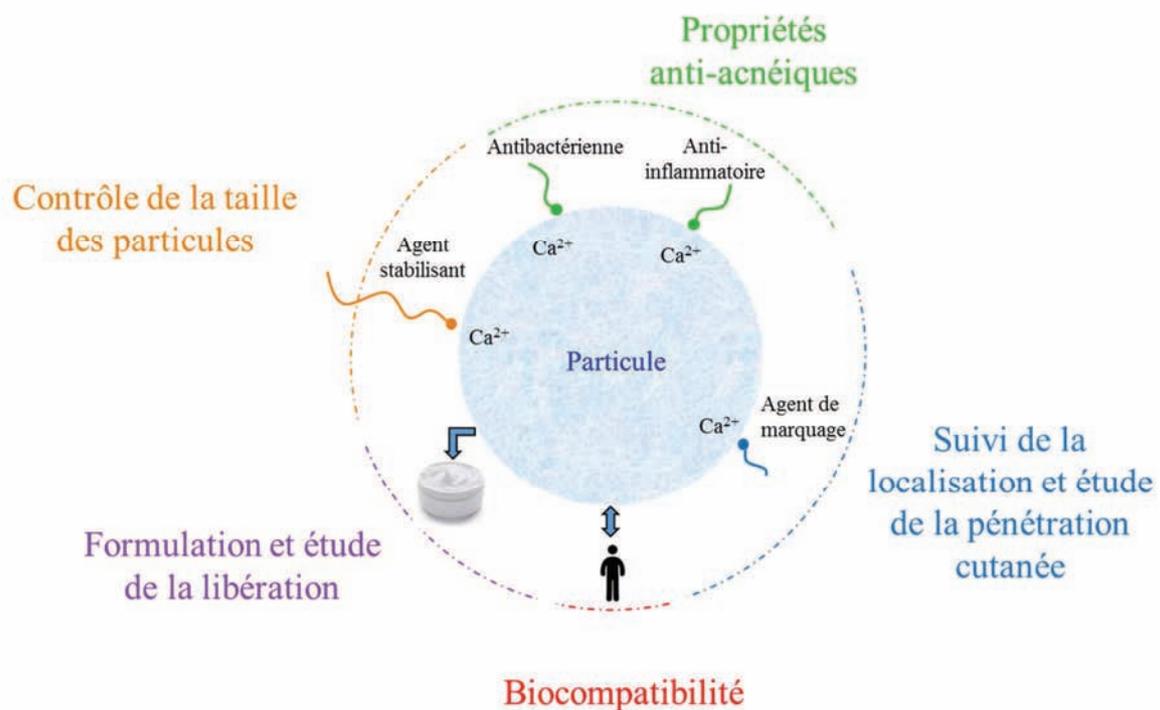


Schéma 1 : Concept des travaux de thèse

IV. LES VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS UTILISES EN DERMATOLOGIE

Afin de permettre un meilleur ciblage des PA administrés par voie topique et une libération contrôlée, le recours à des vecteurs de PA fait l'objet de nombreuses recherches et sont utilisés en dermatologie.

1. Les vecteurs couramment utilisés

Les vecteurs utilisés en dermatologie peuvent être classés en fonction de leur nature (organique / inorganique), de leurs caractéristiques physicochimiques (taille, forme, surface...) ou encore de leur malléabilité (mou / rigide). Pour présenter ces vecteurs, une classification en fonction de leur malléabilité a été choisie.

A. Les particules souples

Certaines particules peuvent être dites « souples » car leur structure peut être modifiée sous l'action d'une contrainte, par exemple en dermatologie par leur application à la surface de la peau. Elles sont constituées généralement de matière organique (lipides, polymères). Elles regroupent principalement les liposomes, les particules de polymère et les nanoparticules lipidiques solides ou oléosomes.

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs couches de phospholipides. Ils permettent d'encapsuler à la fois des PA lipophiles, au sein de la bicouche, et hydrophiles, au cœur de la vésicule. Leur taille peut varier d'une dizaine de nanomètres (liposomes de petite taille d'environ 20 nm (Small Unilamellar Vesicle SUV), de plus grande taille d'environ 200 nm (Large Unilamellar Vesicle LUV)) jusqu'au micromètre (liposomes multi-lamellaires (MultiLamellar Vesicle MLV)). Ils ont la particularité de pouvoir fusionner avec les cellules ou bactéries, ayant des propriétés structurales analogues à celles des membranes cellulaires. La modulation de leur diamètre, de leur composition lipidique et de leur charge de surface, peuvent favoriser le ciblage au niveau folliculaire [90]. Jung et al. ont montré que les liposomes possédant la plus profonde pénétration folliculaire possèdent une charge de surface positive ou neutre (liée à leur composition lipidique), sans influence réelle de leur taille. En faisant varier le type de phospholipides utilisés (saturés, insaturés) pour leur synthèse et par la présence ou l'absence de co-surfactant, les liposomes peuvent avoir des propriétés variables au niveau de leur structure (rigide ou élastique) leur permettant ainsi une libération ciblée (dermale ou transdermale) [91]. Ils sont cependant difficiles à produire à grande échelle en raison de leur instabilité physique et chimique, et de leur coût de production. Les niosomes possèdent une structure très similaire à celles des liposomes à l'exception de leur bicouche, constituée de tensio-actifs non ioniques à la place des phospholipides. Ils peuvent être une bonne alternative aux liposomes en raison de leur meilleure stabilité chimique et de leur faible coût de production, cependant ils présentent une plus grande pénétration cutanée non avantageuse pour le ciblage folliculaire.

Les particules polymériques peuvent présenter 2 types de structures : les sphères et les capsules. Les sphères sont constituées de polymères enchevêtrés formant un réseau poreux à surface discontinue. Le PA véhiculé est dispersé, absorbé dans le matériau polymérique et sera libéré par diffusion simple au sein du matériau ou par dissolution de celui-ci. Leur taille varie en moyenne de 100 à 200 nm. Elles ont l'avantage d'avoir une bonne stabilité lors de l'application cutanée, d'être faciles à préparer avec une taille moyenne bien définie et homogène [91]. Les nano- ou micro- capsules possèdent une structure différente de celle des sphères et leur taille est comprise entre 100 et 800 nm voire 1 μm [13]. Elles présentent une enveloppe de polymère qui entoure un cœur le plus souvent huileux mais pouvant également être aqueux. Elles sont appelées « réservoirs » de PA.

Les oléosomes, ou nanoparticules lipidiques solides, sont formés d'une enveloppe constituée de phospholipides, acides gras et cholestérol. Leur membrane est très proche de celle des cellules ce qui leur permet de fusionner avec celle-ci pour libérer le ou les PAs qu'ils contiennent, au sein de l'épiderme. Ils forment ainsi des particules dont l'enveloppe extérieure est hydrophile et renferme un contenu lipophile. Ils possèdent une taille moyenne d'environ 500 nm. Ils peuvent permettre une libération prolongée par la présence de leur enveloppe (si le principe actif se trouve dans la partie lipophile) mais présentent un faible taux d'encapsulation.

B. Les particules rigides

Les particules dites « rigides » regroupent les matériaux inorganiques comme les métaux (or, argent...), les oxydes métalliques (oxyde de zinc...), les céramiques (silice, apatite...) et aussi les structures constituées de carbone (fullerène). Certaines structures sont utilisées pour des applications dermatologiques comme les nanoparticules de silice revêtues d'or pour la photothermolyse des glandes sébacées dans les maladies de l'acné [86], comme les oxydes métalliques de types TiO_2 dans les produits cosmétiques ou encore comme les apatites pour le comblement des rides [92]. Ces particules présentent l'avantage d'avoir une bonne stabilité physique (application cutanée) comparée aux particules « souples ».

C. Intérêts pour application dermatologique

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de vecteurs permet un meilleur ciblage de la zone à traiter et une éventuelle libération contrôlée de la libération du PA. En fonction du type de particules utilisées et de l'application visée, certains avantages peuvent être préférés et sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients des particules pour application dermatologique

Particules « souples »	Avantages	Inconvénients
<i>Liposomes</i>	Libération localisée dans les couches de la peau (épiderme) en évitant le passage systémique Libération ciblée dans les annexes cutanées (follicule pileux) en augmentant la concentration de PA pour le passage dans la voie systémique [93]	Faible stabilité physique et chimique (oxydation des phospholipides) pouvant favoriser la rupture des liposomes et la libération des PA Faible capacité d'encapsulation d'agent lipophile Coût de production élevé
<i>Niosomes</i>	Bonne stabilité chimique comparée aux liposomes (TA vs phospholipides) Taux d'encapsulation élevé Faible coût de production	Problème de fusion, agrégation, sédimentation et rupture provoquant la libération des PA Faible capacité d'encapsulation
<i>Oléosomes</i>	Libération contrôlée (si PA dans le cœur) Bonne biocompatibilité Facilité de production industrielle Faible coût de production	Encapsulation limitée Possibilité de libération non contrôlée (rapide par éclatement (« burst release »)) Stabilité modérée (gélification...)
<i>Micro- Nano-sphères</i>	Bonne stabilité physique Multi-fonctionnalisation Libération contrôlée par diffusion ou autres facteurs (température, pH...) Facilité de préparation	Utilisation de solvants organiques Eventuelle cytotoxicité liées aux polymères Possibilité de résidus organiques liés à la synthèse
<i>Micro- Nano-capsules</i>	Libération contrôlée Facilité de préparation	Eventuelle cytotoxicité liée aux polymères Possibilité de résidus organiques liés à la synthèse

<i>Particules « souples »</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>Particules inorganiques</i>	Bonne stabilité physique Variabilité des avantages en fonction du type (apatite : bonne biocompatibilité ; apatite et silice : multi-fonctionnalisation...)	Variabilité des inconvénients en fonction du type (dioxyde de titane : éventuelle toxicité...)
<i>Particules de carbone</i>	Bonne stabilité physique Multi-fonctionnalisation Antioxydant (les fullerènes peuvent empêcher la peroxydation des lipides de la peau)	Problème de fusion, agrégation, sédimentation et rupture provoquant la libération des PA Faible capacité d'encapsulation

2. Application à la pathologie de l'acné

L'utilisation de vecteurs de PA contre l'acné présente de nombreux avantages de plus en plus recherchés pour traiter cette dermatose. Ils permettent d'avoir une action ciblée, notamment au niveau folliculaire, tout en essayant de réduire les effets indésirables. Ils peuvent également permettre de protéger les PA instables. Un nombre croissant et important d'études focalisent leurs travaux sur l'élaboration, la caractérisation, l'évaluation de l'efficacité et la biodégradation de différents types de vecteurs anti-acnéiques. Quelques exemples relativement récents (10 dernières années) des différents types de particules utilisées pour des applications anti-acnéiques sont présentés dans le Tableau 5.

Les liposomes sont très utilisés comme vecteurs pharmaceutiques. Yang et al. [94] étudient des liposomes pour véhiculer des acides gras libres type acide laurique, ayant un effet antimicrobien contre *P. acnes* [95]. Ce véhicule de PA présente l'avantage de fusionner directement avec la membrane de la bactérie dans le but de l'éradiquer. Les oléosomes, au départ développés pour des applications parentérales, sont également employés pour des applications dermatologiques comme par exemple par Castro et al. [96] comme vecteur de l'acide rétinoïque. Ils ont réussi à améliorer le taux d'encapsulation du principe actif au sein des nanoparticules lipidiques solides et à augmenter leur stabilité, par l'ajout d'un groupement amine lipophile favorisant l'interaction de l'acide rétinoïque avec la matrice solide de la particule [97]. Ils ont ensuite démontré l'action comédolytique et anti-irritante de leur formulation [98]. Au cours des dernières années, la recherche dans le domaine des vecteurs anti-acnéiques s'intensifie pour améliorer les vecteurs existant. C'est le cas par exemple de l'étude menée par Ridolfi et al. [99] sur la stabilisation d'oléosomes par un revêtement polymérique de chitosan, ou encore celle menée par Gao et al. [100] sur la stabilisation des liposomes par des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des groupements carboxyles. Ces travaux ont été réalisés afin d'éviter la rupture des liposomes avant d'être au contact de la bactérie. Cette nouvelle formulation permet la libération des particules d'or carboxylées suite au contact cutané ($\text{pH} > \text{pK}_{\text{a}}_{\text{carboxyle}}$), puis des liposomes et ainsi de favoriser la fusion liposome / bactérie au sein du foyer infectieux.

Les particules inorganiques suscitent également l'intérêt de chercheurs pour leur utilisation en dermatologie. Un nouveau procédé de photothermolyse sélective a récemment été publié par des chercheurs californiens associés à une entreprise américaine de dispositifs médicaux, Sebacia [86]. Ils ont élaboré des particules inorganiques à base de silices recouvertes d'une coquille d'or, ayant une taille avoisinant 150 nm. Sous l'action d'ultrasons, les

nanoparticules qui restaient en surface pénètrent le follicule pileux. Ce dernier est ensuite irradié sous lumière pulsée (laser), ce qui va engendrer une augmentation de température au niveau des particules (réaction de l'or avec le laser) et provoquer la destruction des glandes sébacées. D'autres matériaux de type organiques / inorganiques sont étudiés contre la pathologie de l'acné. La protection d'actifs, comme l'acide rétinoïque, a fait l'objet d'une étude réalisée par Perioli et al. [101], par l'utilisation d'un nouveau matériau de type hydrotalcite, c'est-à-dire constitué d'hydroxydes lamellaires bidimensionnels permettant d'intégrer des anti-inflammatoires [102].

Tableau 5 : Etude bibliographique des récentes recherches sur les NPs anti-acnéiques

Type de particules	Principe actif	Résumé	Références
Liposomes	Rhodamine B	Stabiliser des liposomes par des NPs d'or en vue d'une libération par fusion avec la membrane bactérienne en fonction du pH	[100], [103]
	Rhodomyrtone	Augmenter le ciblage et montrer l'efficacité antimicrobienne d'un nouveau PA contre <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[104]
	Phosphate de clindamycine	Etudier l'effet de la composition lipidique et la charge de surface sur la stabilité des liposomes et la libération du PA	[105]
	Adapalène	Améliorer la tolérance du PA en favorisant son ciblage folliculaire	[106]
Oléosomes	Acide rétinoïque, Acide laurique	Combiner des rétinoïdes et antimicrobiens au sein d'oléosomes	[107]
	Peroxyde de benzoyle	Améliorer la tolérance du PA en favorisant une libération contrôlée	[108]
	Isotrétinoïne	Améliorer le traitement thérapeutique de tous les types d'acné	[109]
	Peroxyde de benzoyle, trétinoïne	Combiner des PA afin d'améliorer l'efficacité antiacnéique et ainsi diminuer la dose de PA administrée	[110]
Niosomes	Trétinoïne	Etudier l'influence des caractéristiques physico-chimiques des niosomes sur la libération du PA	[111]

Type de particules	Principe actif	Résumé	Références
Polymériques	Acide azélaïque	Etudier les propriétés de NPs (taille, potentiel zêta, taux d'encapsulation, libération...)	[112]
	Peroxyde de benzoyle	Démontrer l'intérêt des NPs d'alginate et chitosan dopées en PA pour une action contre <i>P. acnes</i>	[113]
	Peroxyde de benzoyle	Obtenir une libération contrôlée du PA pour réduire ses effets indésirables	[114]
A base de carbone (fullerènes)		Utiliser des fullerènes pour leurs propriétés protectrices des kératinocytes (ils évitent leur apoptose)	[115]
Inorganiques		Détruire la glande sébacée par photothermolysse à l'aide de NPs de silice recouvertes d'or	[86]

3. Ciblage folliculaire – caractéristiques des vecteurs de PA

Le ciblage folliculaire peut avoir des effets bénéfiques dans diverses pathologies comme l'acné, l'alopécie, l'hirsutisme ou l'hypertrichose. Les follicules pileux représentent d'excellents réservoirs de PA, avec un temps de résidence dix fois supérieur, par rapport à la surface cutanée, la couche cornée [5]. Comme indiqué précédemment, les invaginations cutanées liées à la présence de follicules représentent environ 10% de la surface cutanée. Cependant il faut également prendre en considération que certains follicules sont actifs, c'est-à-dire que leur glande sébacée est active et produit du sébum et que le cycle pileux fonctionne correctement. D'autres restent inactifs (~30%). Leur pore est fermé en raison de sébum séché et par la présence de débris cellulaires, ce qui les rend moins aptes au passage de substance [116].

La voie folliculaire peut être favorisée par des vecteurs de PA en fonction de leurs propriétés. Plusieurs études ont été réalisées pour essayer de ressortir une tendance face à ce ciblage, tant au niveau des propriétés des matériaux et des formulations qu'au niveau des techniques d'applications. Pour étudier la pénétration folliculaire, il est important de bien connaître la morphométrie des systèmes pilosébacés humains. En moyenne, le follicule d'un poil terminal mesure environ 4 mm avec une ouverture de pore d'environ 170 μm , tandis que celui d'un poil velu mesure environ 650 μm avec un orifice de 90 μm [117].

Selon la littérature, les PA hydrophiles auront plus de difficultés à cibler le follicule que des PA lipophiles. D'un point de vue galénique, l'ajout de certaines matières premières, comme l'éthanol, ou certain type de formulation, comme l'encapsulation de PA hydrophiles dans une phase huileuse, peut favoriser la pénétration de PA hydrophile. Au niveau des particules, l'un des principaux facteurs jouant sur leur pénétration est leur taille. Wosicka et al. [26] ont reporté plusieurs travaux de recherche sur les différentes tailles étudiées pour la pénétration folliculaire. Les résultats ne sont pas toujours similaires et ne suivent pas forcément une tendance selon les tailles en raison des différentes techniques utilisées (modèles de peaux, techniques d'applications ...) et des variétés de matériaux employés. Par exemple, Vogt et al. [8] ont étudié la pénétration de microsphères polymériques fluorescentes et ont montré que les particules de petites tailles ($< 40 \text{ nm}$) pénètrent plus profondément au sein du follicule que des particules plus grandes ($\geq 750 \text{ nm}$). En revanche, Patzelt et al. [33] ont démontré que d'autres types de particules polymériques d'acide poly(lactique-co-glycolique) de tailles comprises entre 400 et 700 nm pénètrent plus profondément dans des peaux d'oreilles de porcs que des particules plus petites ou plus grandes.

En conclusion, le ciblage folliculaire est une réelle opportunité pour le traitement de l'acné. Cependant il dépend de plusieurs facteurs ce qui rend sa réalisation complexe. Il est nécessaire pour chaque étude de prendre en compte de nombreux facteurs comme le type de matériaux et leurs propriétés, le type de formulation galénique, le type de follicule pilosébacé, le modèle cutané employé, la technique d'application de la substance à étudier...

Ainsi, pour ces travaux de thèse, le choix du type de vecteur de PA s'est fait en fonction de la bonne biocompatibilité du vecteur utilisé pour une application cutanée, de sa facilité de préparation et de sa capacité à être multifonctionnalisé et s'est porté sur les apatites phospho-calciques nanocristallines.

V. LES APATITES PHOSPHO-CALCIQUES NANOCRISTALLINES

1. Composition et structure

Les phosphates de calcium sont des composés inorganiques dont la composition peut être très proche de celle de la partie minérale de l'os, ce qui favorise leur utilisation pour des applications médicales comme par exemple la réparation des tissus osseux. Ils appartiennent à une famille de composés, les orthophosphates de calcium, qui présentent différentes valeurs de rapports Ca/P (Tableau 6), permettant d'obtenir différents types de matériaux, par voie humide ou sèche, aux propriétés variées, intéressantes pour les utilisations biomédicales : l'hydroxyapatite stœchiométrique (HAPst) et le phosphate tricalcique β (β TCP) sont par exemple reconnus pour être de bons ostéoconducteurs ; le β TCP possède également des bonnes propriétés de résorption.

Tableau 6 : Principaux phosphates de calcium

<i>Nom</i>	<i>Formule chimique</i>	<i>Ca/P</i>
Phosphate monocalcique anhydre (MCPA) ¹	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,50
Phosphate monocalcique monohydraté (MCPM) ¹	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O	0,50
Phosphate dicalcique anhydre (monétite) (DCPA) ¹	CaHPO ₄	1,00
Phosphate dicalcique dihydraté (brushite) (DCPD) ¹	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	1,00
Phosphate octocalcique triclinique (OCPt) ¹	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , 5H ₂ O	1,33
Phosphate octocalcique apatitique (OCPa) ¹	Ca ₈ (PO ₄) _{3,5} (HPO ₄) _{2,5} (OH) _{0,5}	1,33
Phosphate octocalcique amorphe (OCPam) ¹	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , nH ₂ O	1,33
Phosphate tricalcique α ou β (α-, β- TCP) ²	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,50
Phosphate tricalcique apatitique (TCPa) ¹	Ca ₉ (PO ₄) ₅ (HPO ₄)(OH)	1,50
Phosphate tricalcique amorphe (ACP) ¹	Ca ₉ (PO ₄) ₆ , nH ₂ O	1,50
Apatite biomimétique non stœchiométrique (hap) ¹	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x (OH) _{2-x}	entre 1,33 et 1,67
Hydroxapatite stœchiométrique (HAPst) ^{1,2}	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67
Oxyapatite (OXA) ²	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	1,67
Phosphate tétracalcique (hilgenstockite) (TTCP) ²	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,00

¹ Obtenus par voie humide

² Obtenus par voie sèche, à haute température (>650°C)

La formule chimique générale des apatites (formule stœchiométrique) est la suivante :



avec *Me* : un cation métallique souvent bivalent, *XO₄* : un anion souvent trivalent et *Y* : un anion souvent monovalent.

La cristallisation de ces composés correspond à un empilement des anions trivalents XO₄³⁻ (tels que PO₄³⁻) de manière hexagonale (généralement dans le système hexagonal, groupement d'espace P_{63/m}). On distingue alors la formation de 2 types de tunnels parallèles à l'axe c (Figure 9). Chacun est typiquement occupé par des cations Me²⁺ dont le nombre est de 4 pour le tunnel I et 6 pour le tunnel II. Ces 2 tunnels possèdent des diamètres différents, respectivement de 2,5Å et 3 à 4,5Å. Les anions Y⁻ sont assez indépendants du reste de la structure et sont situés sur l'axe des tunnels II. Cette structure en tunnel permet de favoriser la mobilité des ions qu'elle renferme [118].

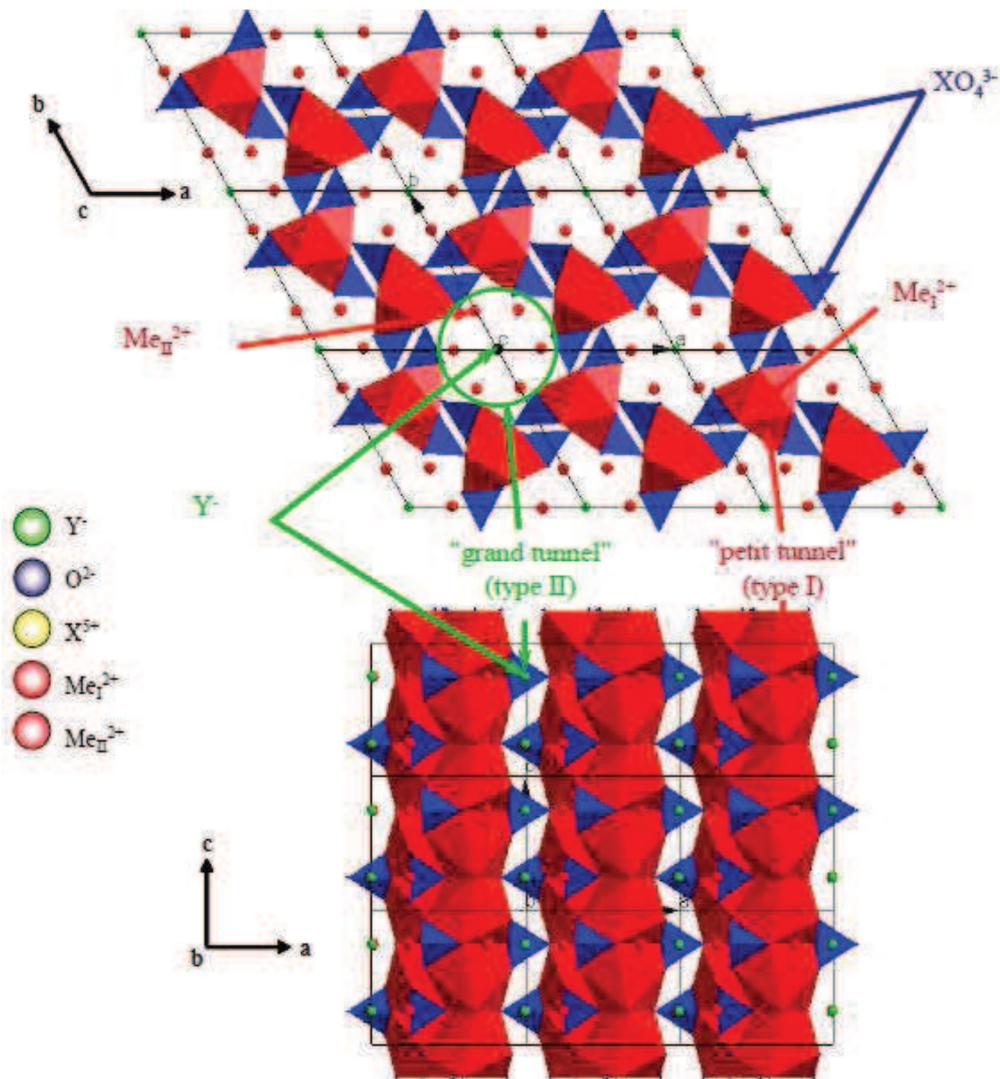


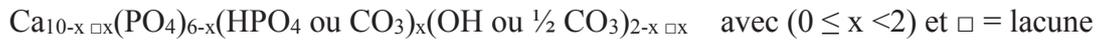
Figure 9 : Structure cristallographique de l'hydroxyapatite stœchiométrique [119]

La particularité de ces composés est leur possibilité de substitutions ioniques, que ce soit au niveau des métaux bivalents (substitution par des ions mono-, bi- et trivalents), des anions trivalents (substitution par des ions bi- ou tétravalents) ou des anions monovalents (substitution par des ions mono- ou bivalents) (Tableau 7). Ils peuvent également présenter des lacunes (notées □) au niveau des sites cationiques (Me) et anioniques (Y).

Tableau 7 : Exemples de substitutions au sein de l'apatite

Me ²⁺					XO ₄ ³⁻				Y-				
Ca ²⁺	Sr ²⁺	Cd ²⁺	Mg ²⁺	Ba ²⁺	PO ₄ ³⁻	AsO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	VO ₄ ³⁻	OH ⁻	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻
Pb ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Ni ²⁺	CrO ₄ ²⁻	MnO ₄ ⁻	CO ₃ ²⁻	HPO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	S ²⁻	O ²⁻	□	
Co ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Eu ³⁺	□	SiO ₄ ⁴⁻								

Les apatites nanocristallines biomimétiques sont très utilisées pour des applications biomédicales comme analogues au minéral osseux. Elles sont également étudiées comme vecteurs de principes actifs, ou sondes par leur dopage en agent luminescent par exemple [9]. Ces apatites biomimétiques regroupent 2 principales formes carbonatées et non carbonatées, et correspondent à la formule chimique générale suivante [120], [121] :



La composition non stœchiométrique est due à la présence de lacunes en site calcium (Ca^{2+}) et en site hydroxyde (OH^-). Elles sont formées de nanocristaux en forme de plaquettes dont les dimensions sont typiquement comprises entre 20 et 40 nm de longueur et 5 à 8 nm d'épaisseur [120], [122]. Chaque cristal est formé d'un cœur apatitique recouvert par une couche non-apatitique, la couche hydratée, représentée en Figure 10. Celle-ci favorise la mobilité des ions qui la constituent et leurs échanges avec le milieu environnant. Ces échanges peuvent être entre les ions calcium (Ca^{2+}) et par exemple le strontium (Sr^{2+}) et/ou le magnésium (Mg^{2+}) et entre les ions hydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) et par exemple des carbonates (CO_3^{2-}) [123]. Ces matériaux possèdent ainsi une bonne capacité d'adsorption.

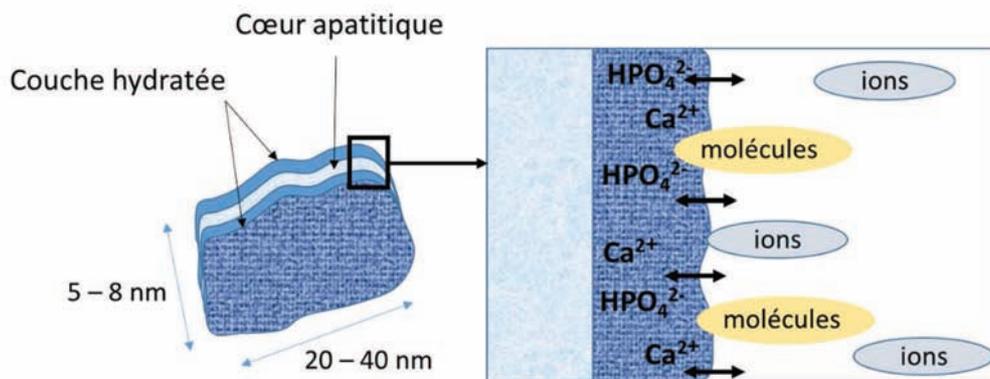


Figure 10 : Représentations schématisées des nano-cristaux d'apatites biomimétiques [124], [125]

Différents modes de synthèse de ces composés permettent d'obtenir des apatites biomimétiques nanocristallines aux propriétés physico-chimiques variées (au niveau de leur taille et de leur forme notamment) : coprécipitation, hydrolyse, procédé sol-gel, synthèse hydrothermale... [126]. Ces procédés impliquent différents milieux de synthèses : solutions aqueuses, hydro-alcooliques ou organiques. Nous nous intéresserons, dans cette thèse, à la méthode de coprécipitation en milieu aqueux à partir d'une solution d'ions calcium et une solution d'ions phosphate, permettant d'obtenir une apatite non stœchiométrique ($\text{Ca}/\text{P} < 1,67$), faiblement cristallisée (comme le minéral osseux). En faisant varier plusieurs paramètres au niveau de la synthèse (temps de maturation en solution, température de maturation, pH, type de

précurseur phosphate) et au niveau des traitements post-synthèse (procédé de séchage et de redispersion), il est possible de jouer sur les propriétés des apatites [122]. Les paramètres les plus importants à prendre en considération au niveau de la synthèse sont le temps de maturation en solution, la température de maturation et le pH [122]. Par exemple, en augmentant la température, il est possible d'augmenter la cristallinité du matériau [127]. En dessous de 80°C et à des pH voisins de la neutralité, les apatites sont de moins en moins cristallisées. Pour des températures comprises entre 80 et 100°C, afin de minimiser la présence de lacunes, il est préférable d'avoir un pH relativement élevé. Au niveau des traitements post-synthèse, une température de séchage élevée (~80°C) permet d'obtenir une meilleure cristallinité du matériau. Cependant cela peut faire varier la teneur en ions carbonates pour des apatites contenant à la fois des ions HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} [128]. De plus, pour par exemple la production industrielle, il est important de contrôler si la stérilisation par le séchage ou la redispersion après lyophilisation ne modifie pas les propriétés de l'apatite. Ainsi, en fonction des applications visées et des propriétés recherchées, les paramètres au niveau de la synthèse, des post-traitements et de la conservation des matériaux sont à prendre en considération.

2. Caractérisations physico-chimiques

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour caractériser plus spécifiquement les apatites nanocristallines [129] en particulier leur composition, leur structure cristallographique et leur morphologie. Les principales sont résumées ci-après.

A. Diffraction des rayons X (DRX)

Une analyse par DRX permet de renseigner sur la cristallinité des composés (Figure 11).

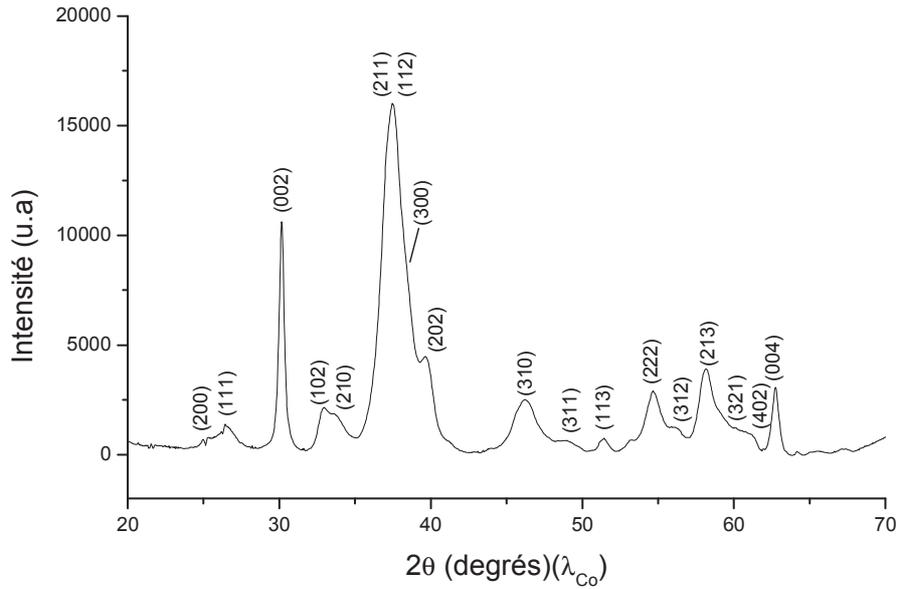


Figure 11 : Diagramme de diffraction des rayons X d'une apatite nanocristalline (proche du TCPa)

Les raies de diffraction obtenues sont caractéristiques d'une phase apatitique. Plus elles sont fines et intenses, meilleur est l'état de cristallinité. Dans le cas d'une apatite nanocristalline non stœchiométrique, les raies de diffraction sont relativement larges ce qui révèle une cristallinité faible.

La DRX renseigne également sur les dimensions moyenne des cristallites grâce par exemple à la formule de Scherrer, à partir de la largeur à mi-hauteur des raies (002) et (310) [130] :

$$L_{hkl} = \frac{K\lambda}{\cos \theta_{hkl} \sqrt{\beta_{hkl}^2 - \beta_0^2}} \quad \text{Équation 3}$$

avec :

- L_{hkl} , la dimension apparente des cristallites dans la direction perpendiculaire au plan (hkl) (Å)
- K , la constante de Scherrer ($K = 0.94$)
- λ , la longueur d'onde du rayonnement X (par exemple : $\lambda_{CoK\alpha} = 1.78892 \text{ \AA}$)
- θ_{hkl} , l'angle de diffraction correspondant à la raie (hkl) considérée (radians)
- β_{hkl} , la largeur à mi-hauteur des raies de diffraction du diagramme expérimental (radians)

- β_0 , la largeur à mi-hauteur des raies de diffraction due à la contribution de l'appareillage (radians)

Les raies (002) et (310) renseignent respectivement sur la longueur des cristallites des apatites selon l'axe (Oz) et sur leur largeur et épaisseur. Dans le cadre de cette thèse, cette formule sera utilisée afin de déterminer un premier ordre de grandeur de la taille des cristallites. D'autres modèles plus précis, prenant en compte notamment l'existence de micro-contraintes, permettent par ailleurs d'affiner ces estimations, mais les valeurs restent dans le même ordre de grandeur [131]–[134].

B. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les groupements chimiques tels que les ions orthophosphates, hydroxyles, carbonates, présents dans l'apatite (Figure 12) peuvent être identifiés par IRTF, en fonction du mode de vibrations des liaisons des atomes qui les constituent (Tableau 8) [135].

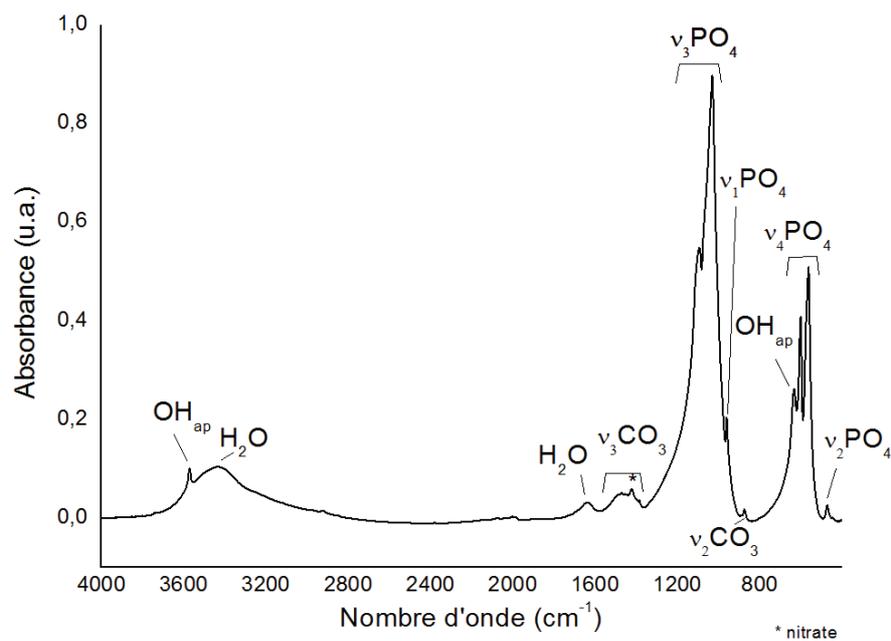


Figure 12 : Spectre IRTF d'une apatite nanocristalline partiellement carbonatée

Les bandes d'absorptions caractéristiques des groupements phosphate et hydroxyde présents dans l'apatite sont représentés sur la Figure 12 et dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Position des bandes IRTF des apatites nanocristallines dans le domaine 400 – 4000 cm^{-1}

Attribution des bandes	Position des bandes	Mode de vibration
PO_4^{3-}	470	ν_2 : déformation angulaire
	560, 575, 601, 617	ν_4 : déformation angulaire
	961	ν_1 : élongation symétrique
	1040, 1090	ν_3 : élongation antisymétrique
HPO_4^{2-}	534, 550, 870 – 875	ν : élongation
CO_3^{2-}	871 – 878	ν_2 : vibration hors du plan
	1415, 1450 – 1475, 1540	ν_3 : élongation
OH^-	630 – 632	ν_L : libration
	3570	ν_s : élongation

Comme indiqué précédemment, les apatites nanocristallines présentent à leur surface une couche hydratée constituée d'ions labiles et de molécules d'eau [136]. La décomposition spectrale du mode de vibration ν_4 des ions PO_4^{3-} permet d'identifier ces ions labiles, non apatitiques [137] (Figure 13).

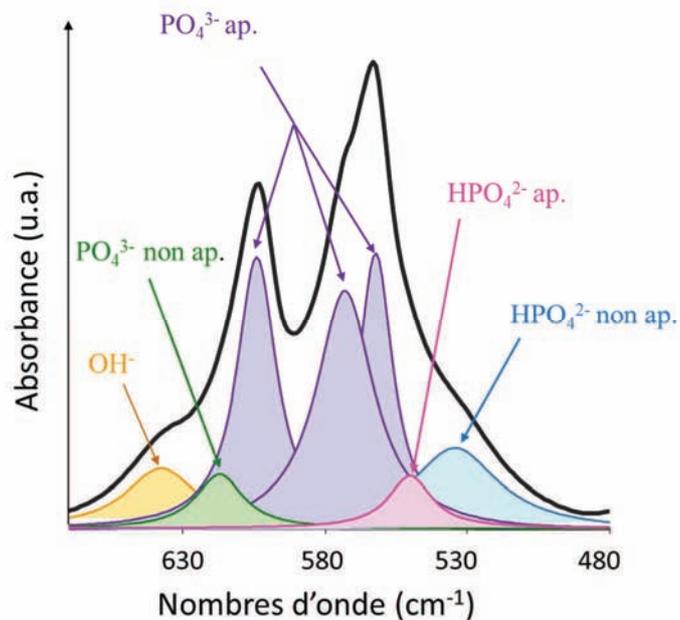


Figure 13 : Décomposition spectrale autour de la bande d'absorption ν_4 des (PO_4)

C. Dosages chimiques

Le suivi qualitatif et quantitatif de ces composés nécessite de connaître leur composition totale en ions phosphate et calcium. Pour cela des dosages chimiques simples et relativement rapides peuvent être entrepris : le dosage complexométrique des ions calcium par l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), la formation d'un complexe phospho-vanado-molybdique pour le dosage des ions orthophosphates [138]. On peut ainsi en déduire le rapport Ca/P (ou Ca/P+C pour des apatites carbonatées), souvent utilisé pour comparer les phosphates de calcium entre eux. D'autres méthodes plus précises peuvent être utilisées comme un dosage par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) ou par absorption atomique, cependant le dosage des ions orthophosphates peut être plus difficile en raison d'éventuelles interférences [120].

D. Microscopies

Le suivi de la morphologie des composés peut se faire par plusieurs techniques microscopiques : la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique en transmission (MET).

3. Fonctionnalisation

Les apatites nanocristallines présentent l'avantage de pouvoir adsorber des molécules organiques diverses, grâce notamment à la présence de la couche hydratée en surface des cristaux, et qui implique des ions de surface particulièrement mobiles/échangeables.

De manière générale, les phénomènes d'adsorption peuvent être décrits par des courbes « isothermes » représentant la quantité d'adsorbat fixée par unité de surface ou de masse d'adsorbant, en fonction de la concentration de l'adsorbat à l'équilibre. Plusieurs modèles d'isothermes d'adsorption ont été décrits dans la littérature [139], et diverses classifications de formes d'isothermes ont été reportées, inspirées notamment d'exemples d'adsorption de molécules gazeuses. Ces isothermes peuvent par exemple être classés en 4 types [140] : L, H, S et C, représentés en Figure 14.

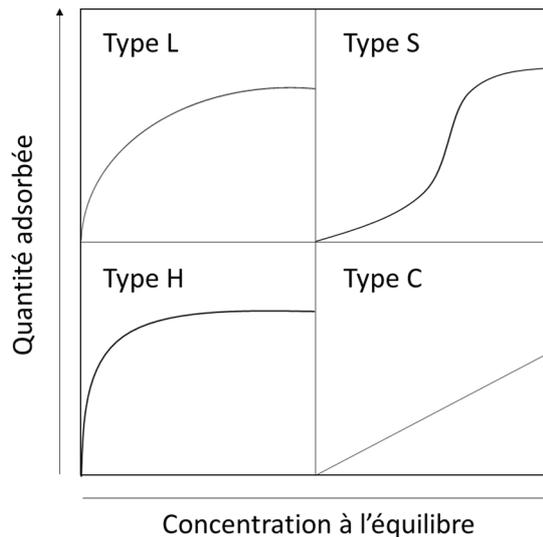


Figure 14 : Classification des isothermes d'adsorption selon leur allure

Les isothermes de type L traduisent une affinité notable entre l'adsorbant et l'adsorbé. Les forces d'attractions entre les molécules adsorbées sont considérées comme faibles. Ce type d'isotherme tend vers la formation d'une monocouche à la surface du solide.

Les isothermes de type H sont très proches de ceux de type L, mais avec une pente à l'origine très élevée, traduisant l'existence d'interactions fortes (plus importantes que dans le type L) entre l'adsorbant et l'adsorbé.

Les isothermes de type S possèdent une courbure, pour de faibles concentrations, traduisant une adsorption coopérative entre les molécules d'adsorbé, suivie d'une inflexion pouvant indiquer la formation de plusieurs couches à la surface du solide.

Les isothermes de type C représentent des cas où, dans une gamme de concentration donnée, l'affinité de l'adsorbé pour l'adsorbant demeure relativement constante, se traduisant par un isotherme quasi-linéaire.

Il est à noter qu'il s'agit là d'une classification parmi d'autres reportées dans la littérature, et que des cas intermédiaires entre les 4 définis ici peuvent être observés pour certains systèmes.

D'un point de vue pratique, il peut être intéressant de chercher à modéliser les courbes isothermes obtenues, à l'aide de modèles pouvant être décrits par une équation liant la quantité adsorbée à la concentration du soluté (dans le cas de solutions) à l'équilibre. Ainsi différents modèles existent pour décrire ces isothermes [141], dont certains ont notamment été déjà employés pour décrire l'adsorption de molécules diverses sur une surface apatitique [139],

[142], [143]. Les modèles de Langmuir, Freundlich, Temkin, et Sips sont plus particulièrement présentés dans ces travaux.

A. Modèle de Langmuir

Pour décrire les isothermes d'adsorption présentant une croissance importante de la quantité adsorbée dès les faibles concentrations, et aboutissant à une stabilisation à partir d'une valeur de concentration limite, le modèle de Langmuir est souvent utilisé. Ce modèle, initialement proposé pour décrire les processus de chimisorption de molécules gazeuses sur surfaces solides, repose sur plusieurs hypothèses. Il considère ainsi que :

- L'adsorption tend vers la formation d'une monocouche en surface de l'adsorbant,
- Les sites d'adsorption sont énergétiquement équivalents,
- Une seule molécule est adsorbée par site,
- Il n'y a aucune interaction entre les molécules adsorbées.

Ce modèle est décrit par une équation du type :

$$Q_{ads} = Q_m \left(\frac{K_L \cdot C_{eq}}{1 + K_L \cdot C_{eq}} \right) \quad \text{Équation 4}$$

avec (à une température T donnée) :

- Q_{ads} , la quantité d'adsorbat fixée par unité de surface d'adsorbant ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) ou de masse (mg/g)
- Q_m , la quantité adsorbée à saturation, c'est-à-dire le nombre maximum de sites d'adsorption occupés par unité de surface ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) ou de masse (mg/g)
- K_L , la constante d'affinité de l'adsorbat pour la surface de l'adsorbant (L/mmol)
- C_{eq} , la concentration d'adsorbat en solution à l'équilibre (mmol/L)

B. Modèle de Freundlich

Le modèle de Freundlich, contrairement au modèle de Langmuir, ne se limite pas systématiquement à la formation d'une monocouche bien définie. De plus, il prend en compte l'existence de différences énergétiques entre les sites d'adsorption : il définit ainsi des familles de sites d'adsorption, caractérisées par une énergie d'adsorption donnée (dépendante du taux de recouvrement). Les sites d'adsorption ne sont pas équivalents et la surface est donc considérée comme hétérogène du point de vue de l'adsorption. Le modèle de Freundlich correspond souvent à des processus d'adsorption considérés comme plus faibles que ceux suivant un isotherme Langmuirien. Il est décrit par la formule suivante:

$$Q_{ads} = K_F \cdot C_{eq}^{1/n} \quad \text{Équation 5}$$

avec (à une température T) :

- K_F et n ($n \geq 1$), deux constantes empiriques dépendantes de la température (elles diminuent quand la température augmente)

C. Modèle de Temkin

Le modèle de Temkin propose, comme pour le modèle de Freundlich, une distribution en énergie des sites d'adsorption (différences de chaleur d'adsorption selon les sites). La chaleur d'adsorption, dépendante de la température, diminuerait ici de façon linéaire (plutôt que logarithmique) au sein de la couche de molécules adsorbées. Le modèle de Temkin définit ainsi une relation linéaire entre le taux de recouvrement et le logarithme de la concentration :

$$Q_{ads} = B \cdot \ln(a_T) + B \cdot \ln C_{eq} \quad \text{Équation 6}$$

avec (à une température T) :

- $B = \frac{RT}{b_T}$, avec b_T , constante du modèle de Temkin liée à la chaleur d'adsorption (J/mol)
- a_T , constante d'affinité à l'équilibre correspondant à l'énergie de liaison maximale (L/mg)

D. Modèle de Sips (Langmuir-Freundlich)

L'isotherme de Sips est une combinaison des modèles Langmuir-Freundlich, prenant en compte les hétérogénéités de surface de l'adsorbant et l'existence possible d'interactions entre molécules adsorbées, mais tendant vers une stabilisation de type monocouche. Pour des concentrations faibles, l'isotherme suit une variation en fonction « puissance » de Q_{ads} , rappelant ainsi le modèle de Freundlich (bien qu'ici, l'exposant puisse avoir une valeur supérieure ou inférieure à 1), tandis que pour des concentrations élevées, l'adsorption tend vers la formation d'une monocouche en surface, rappelant alors le modèle de Langmuir. Il est décrit par la formule suivante :

$$Q_{ads,e} = Q_m \left(\frac{K_S \cdot C_{eq}^m}{1 + K_S \cdot C_{eq}^m} \right) \quad \text{Équation 7}$$

avec (à une température T) :

- K_S et m , deux constantes empiriques.
 m renseigne sur le type d'interactions qui peut exister entre l'adsorbat et l'adsorbant mais aussi sur les interactions latérales pouvant avoir lieu entre molécules adsorbées :
 - Si $m > 1$: la coopération entre les molécules adjacentes est souvent considérée comme « positive » (c'est-à-dire favorable),
 - Si $m < 1$: la coopération est plutôt considérée comme « négative »,
 - Si $m = 1$: on retrouve l'équation usuelle de Langmuir.

E. Paramètres influençant l'adsorption

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'adsorption de molécules organiques. La température, le pH ou encore la force ionique de la solution peuvent faire varier la quantité adsorbée. De plus, l'adsorption reste dépendante de l'adsorbat mais également de l'adsorbant [144].

4. Propriétés

Les apatites biomimétiques nanocristallines présentent de nombreux intérêts biomédicaux comme par exemple leur excellente biocompatibilité (cytocompatibilité, absence de réaction inflammatoire ou de réponse immunitaire [145]...) et leur biodégradation. Les particules d'apatites présentent certains avantages par rapport aux autres vecteurs particulaires [146], [147]. Elles sont présentes dans le corps humain contrairement à certains vecteurs (exemple : Cadmium – quantum dots) et sont donc bien tolérées. Elles sont plus stables, robustes, que les vecteurs micellaires ou vésiculaires comme par exemple les liposomes. Elles possèdent également une meilleure biocompatibilité et stabilité au pH que les particules de polymères [120], [148]. La présence de la couche hydratée en surface des nanocristaux d'apatite permet de favoriser les échanges avec le milieu environnant mais également de pouvoir multifonctionnaliser la surface de ces composés, et d'ainsi leur conférer de nombreuses propriétés en fonction de l'application visée. Enfin, leur simplicité et leur faible coût de préparation les rendent très intéressantes pour des applications industrielles.

5. Utilisations biomédicales

Les apatites biomimétiques nanocristallines sont étudiées principalement pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. On les retrouve sous trois principales formes : les granules, les pâtes injectables (ciment) et les dépôts [149], [150]. Les deux premiers sont utilisés pour le comblement osseux suite par exemple à une fracture ou à une maladie (ostéoporose, cancer de l'os...). Les poudres sont principalement utilisées pour le revêtement d'implants articulaires et dentaires. Les apatites biomimétiques nanocristallines ont ainsi des domaines d'application potentielle en chirurgie orthopédique, dentaire et maxillo-faciale. Elles peuvent être utilisées seules ou enrichies avec des molécules d'intérêt. Les matrices phosphocalciques peuvent être dopées en divers éléments chimiques en fonction des propriétés recherchées : le strontium, pour ces effets bénéfiques sur la prolifération et l'activité des ostéoblastes et pour limiter l'activité des ostéoclastes ; le zinc, pour favoriser la calcification osseuse et pour son action antibactérienne... Des associations thérapeutiques sont éventuellement possibles (antibiotiques, antalgiques, anti-inflammatoires, anticancéreux...) [151].

Ces apatites peuvent également servir comme outils pour le diagnostic et ainsi être utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie médicale. Ainsi, elles peuvent être suivies par luminescence [9], [152] ou magnétisme [142]. Elles peuvent être utilisées comme des « nanosondes » capables d'interagir avec les cellules ou tissus malades et ainsi de pouvoir localiser par exemple des tumeurs. Pour cela, des agents de ciblage peuvent être adsorbés en surface des particules pour leur permettre un meilleur adressage, comme par exemple l'acide folique pour le ciblage de cellules cancéreuses surexprimant des récepteurs folates au niveau de leur membrane (cellules cancéreuses du sein T-47-D) [9] . Leur suivi par imagerie peut permettre ainsi d'évaluer l'efficacité du ciblage de ces matériaux ou simplement de vérifier le devenir des particules suite à leur administration *in vivo*.

Enfin, ces composés peuvent être utilisés à différentes fins thérapeutiques par leur dopage en agents médicamenteux comme des antibiotiques [139] ou des anticancéreux [153], [154]. Ils présentent l'avantage d'être multifonctionnalisables, ce qui est potentiellement intéressant dans le cas de traitement de cancer, par l'ajout en plus de l'anticancéreux, par exemple, d'un agent de ciblage [9].

VI. PRESENTATION DU SUJET DE THESE

Ces travaux de recherche (Schéma 2) se sont portés sur la synthèse de systèmes submicroniques à base d'apatites biomimétiques (bio-inspirées car très proches des apatites présentes naturellement dans l'organisme, au niveau du minéral osseux). Des composés apatitiques (bien que différents de ceux proposés ici de par leur état de cristallinité et stœchiométrie) possèdent déjà une application reconnue en dermatologie pour le comblement des rides [92]. Les composés apatitiques apparaissent donc prometteurs pour des applications cutanées en raison de leur excellente biocompatibilité. Il a donc été intéressant d'évaluer leur potentiel dans le cas de la pathologie de l'acné. Ces travaux de thèse visent à établir de nouvelles formulations permettant un meilleur ciblage de foyers infectieux, par l'utilisation de vecteurs de principes actifs de taille définie, véhiculant des agents anti-acnéiques dont la libération sera contrôlée. L'un des objectifs est d'obtenir une meilleure libération du PA au niveau cutané et en particulier des follicules pileux, et d'ainsi pouvoir réduire sa concentration dans le produit fini. Cela pourrait ainsi également favoriser une diminution des effets indésirables en voie locale et systémique. De plus, une libération « intelligente » est également visée ici, par la sélection d'un PA présentant une fonction ester phosphate pouvant potentiellement être clivée par une action enzymatique (phosphatases) d'autant plus prononcée que le degré d'inflammation/d'infection est fort.

Des essais sur l'obtention de différentes tailles de particules colloïdales ont fait l'objet des premiers travaux de recherche de ce sujet de thèse. Suite à l'obtention de formules colloïdales stables, des essais de fonctionnalisation par adsorption d'un PA (tout d'abord avec une molécule modèle, puis avec un agent thérapeutique anti-acnéique, le phosphate de clindamycine) ont été entrepris ; en parallèle, l'étude de l'incorporation d'ions d'intérêt biologiques (cuivre et zinc) dans la composition des particules d'apatites colloïdales a été réalisée. L'hémocompatibilité de ces matériaux a ensuite été évaluée par l'intermédiaire d'une collaboration initiée ici avec un laboratoire de recherche de l'Université de Yonsei en Corée du Sud, comprenant un suivi de l'interaction entre ces particules et les globules rouges d'une part, et les protéines plasmatiques d'autre part. Ce suivi est en effet nécessaire pour toute application cutanée en cas de passage des composés dans la circulation sanguine suite à l'application sur une peau lésée. Des premières études biologiques concernant le suivi du passage de ces composés à travers un modèle de peau, ont été réalisées et ont fait l'objet de plusieurs

collaborations dont l'une en Sardaigne avec la faculté de pharmacie de l'université de Sassari, et une autre avec le laboratoire d'histologie de l'hôpital Purpan à Toulouse. Pour ce suivi de localisation de particules, nous avons testé plusieurs approches : via la microscopie optique moyennant un marquage au FITC (luminescent) des particules, via la technique PIXE grâce à l'incorporation d'ions europium ou strontium (par substitution partielle du calcium de l'apatite), en utilisant des cellules de Franz en utilisant des particules sur lesquelles était pré-adsorbée une molécule chromophore (l'acide folique, AF), ou encore par microscopie confocale Raman. Enfin, des premiers essais d'obtention d'une formulation dermatologique adaptée à la pathologie de l'acné et sa caractérisation ont fait l'objet de la dernière partie de ce travail.

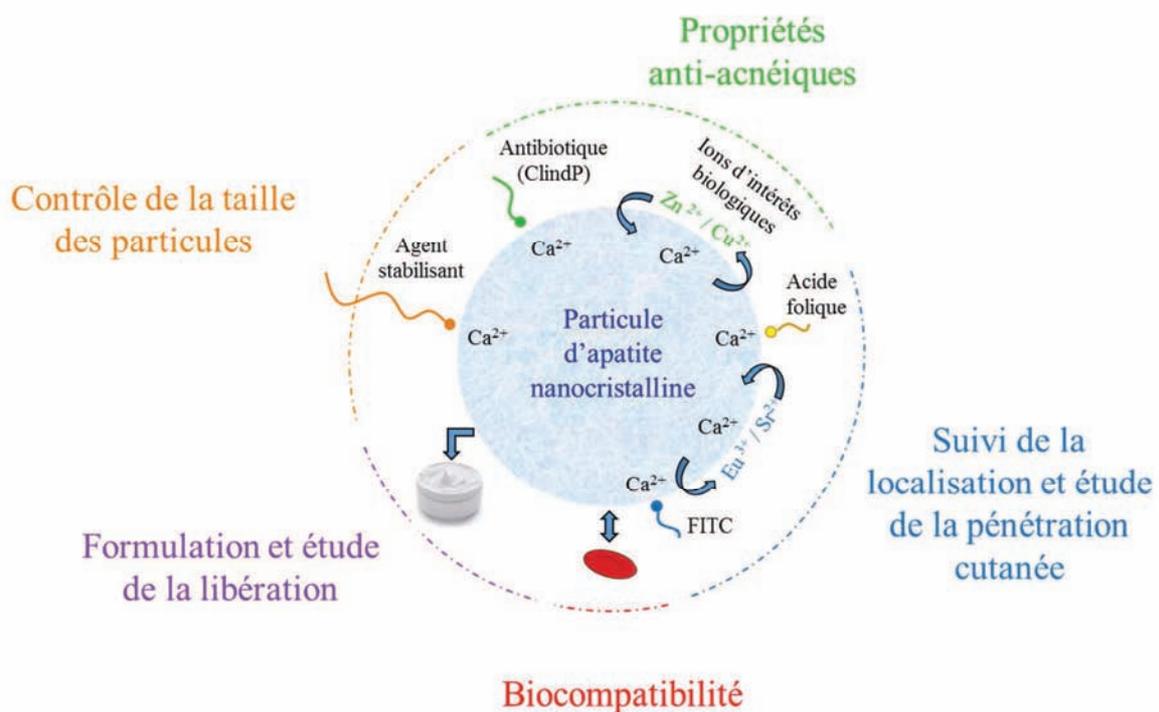


Schéma 2 : Principaux axes de recherches étudiés dans ces travaux de thèse

Ces travaux de recherches constituent ainsi un concept novateur. En effet, le phosphate de clindamycine (ClindP) est certes couramment employé contre le traitement de l'acné, mais aucune forme pharmaceutique actuelle contenant le ClindP véhiculé par des particules n'est commercialisée. Plusieurs études dans la littérature étudient le ClindP véhiculé au sein de différents types de particules (liposomes, particules polymériques, nanoparticules lipidiques solides (oléosomes)) mais pour des applications biomédicales très différentes (thérapie parodontale, infections osseuses). Par ailleurs, des composés apatitiques ont déjà été employés par voie topique mais principalement pour le comblement des rides et aucune étude n'a été publiée concernant l'emploi des particules d'apatites pour le ciblage folliculaire ou comme

véhicule de PA anti-acnéiques. Ainsi, ces travaux proposent un nouveau type de véhicule de PA, multi-fonctionnalisable, pour le traitement de l'acné, avec un potentiel ciblage des follicules pileux et une libération intelligente au niveau des foyers infectieux enflammés.

CHAPITRE II

***ELABORATION ET
CARACTERISATION PHYSICO-
CHIMIQUES DES COLLOIDES***

Comme indiqué dans le chapitre I, les apatites phosphocalciques nanocristallines constituent la partie minérale de l'os et de la dentine. Il est possible de synthétiser des analogues biomimétiques pour des applications biomédicales comme la régénération osseuse. Ces matériaux peuvent également être utilisés pour d'autres applications médicales, par exemple en nanomédecine comme outil de diagnostic cellulaire ou comme véhicule de PA par exemple en oncologie.

Les travaux de cette thèse sont axés sur une application dermatologique, et portent dans un premier temps sur l'élaboration de particules apatitiques submicroniques de différentes tailles, pour viser un ciblage folliculaire représentant le foyer infectieux de la pathologie de l'acné.

Des études d'adsorptions moléculaires et de substitutions ioniques font ensuite l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. L'adsorption d'une molécule modèle sur une apatite non colloïdale, puis d'un actif anti-acnéique (sur apatite non colloïdale puis colloïdale) a été étudiée. Un des intérêts des apatites nanocristallines, outre leur bonne biocompatibilité, est la possibilité de les multifonctionnaliser. Des essais de dopage en ions cuivre et zinc ont été entrepris. Ces ions présentent en effet des propriétés antibactériennes, anti-séborrhéiques (zinc uniquement) et anti-inflammatoires, intéressantes pour le traitement de l'acné.

I. CONTRÔLE DE LA TAILLE DES PARTICULES COLLOÏDALES D'APATITES PHOSPHO-CALCIQUES

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'une publication parue dans *Journal of General Practice and Medical Diagnosis* [147] (Annexe 1).

1. Synthèse des colloïdes

A. Protocole de référence

Dans un protocole de référence, inspiré d'un travail antérieur dans l'équipe [155], les colloïdes d'apatite nanocristalline ont été obtenus, à température ambiante, par co-précipitation en milieu aqueux de nitrate de calcium et d'hydrogénophosphate de di-ammonium à pH 9,5 [156]. Plus précisément, une solution A, contenant du nitrate de calcium (4,87 mmol, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et un agent dispersant (type et concentration variables) dans un volume total de 18,75 mL (pH = 9,5), est mélangée à une solution B, contenant du di-ammonium hydrogénophosphate (1,62 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans 6,25 mL d'eau déminéralisée (pH = 9,5). Après

homogénéisation du mélange, le pH de la solution est ramené à 9,5, grâce à l'ajout quelques gouttes d'ammoniaque concentré. Le mélange est ensuite placé dans une étuve préréglée à 100°C pendant 16h pour une étape de maturation. L'ajout d'un agent dispersant directement dans la solution de nitrate de calcium favorise l'obtention de ces particules sous forme colloïdale en limitant les phénomènes d'agglomération. Cette synthèse sera considérée comme le protocole de « référence » pour le reste de l'étude.

B. Variation des paramètres de synthèse

a. Rappels préliminaires

Les agents dispersants agissent principalement en contrôlant l'agglomération des particules entre elles, par leur ajout pendant ou après la synthèse. Ces agents doivent présenter des groupements fonctionnels ayant une forte affinité avec la surface des apatites, riche en ions calcium, comme par exemple des carboxylates, des phosphates ou des phosphonates [157]. Le contrôle de l'agglomération des particules peut se faire de manière électrostatique, par l'ajout de molécules chargées ; de façon stérique, par l'intermédiaire de molécules organiques présentant une chaîne carbonée relativement longue et /ou ramifiée ; et/ou de façon couplée (électrostérique).

b. Paramètres testés

Comme indiqué dans le chapitre I, les intérêts des apatites nanocristallines pour une application dermatologique sont, principalement, leur excellente biocompatibilité, leur facilité de production et leur multi-fonctionnalisation potentielle (à adapter en fonction de la pathologie visée). Dans le cas de l'acné, la vectorisation folliculaire apparaît particulièrement judicieuse pour cibler les foyers infectieux afin de limiter la dose administrée au patient, et donc les effets indésirables. Pouvoir moduler la taille des particules d'apatite pour évaluer laquelle est la plus adaptée pour le ciblage folliculaire était un des enjeux de ces travaux de recherche. Différents paramètres au niveau de la synthèse ont été testés en évaluant leur impact sur la taille et les propriétés des particules obtenues. Des travaux sur la taille et la morphologie des apatites ont déjà été réalisés dans la littérature [158]–[161]. Sadat-Shojai et al. [158] ont détaillé différentes techniques pouvant être utilisées pour la synthèse d'apatite ayant une taille allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres voire au millimètre et possédant différentes morphologies : méthodes de synthèse en voie sèche, humide, les procédés à haute température, les synthèses issues de sources biogéniques et une combinaison de toutes ces procédures. Une étude de 2013 par Uskoković et al. [162] montre l'obtention de différentes

morphologies et tailles de particules d'apatites submicroniques, par la variation de différents paramètres au niveau de la synthèse : concentrations en ions calcium et phosphates, la présence ou non d'urée lors de la synthèse, la température, l'agitation (sonication), le temps et le pH final. Au niveau colloïdal, la taille des particules en suspension peut être modifiée en fonction du type d'agent dispersant, de sa concentration, de la température, du temps de maturation, du pH et de l'agitation et a fait l'objet de recherches précédemment réalisées au sein du laboratoire [156]. La présence d'un agent dispersant électrostatique, le 2-amino-éthyl phosphate (AEP), permet l'obtention de colloïdes relativement stables, ayant un diamètre hydrodynamique (D_h) moyen d'une trentaine de nanomètres [156]. En faisant varier la concentration d'AEP, le D_h peut être modulé entre 30 et 100 nm.

Pour notre étude, il est important d'obtenir des particules par un procédé simple, peu coûteux et facilement transposable industriellement. Ainsi, un procédé de préparation par coprécipitation a été retenu. Dans le but d'obtenir une échelle de taille de particules d'apatite allant quelques dizaines de nanomètre au micromètre pour le ciblage folliculaire, différents types de molécules carboxylées, phosphatées et phosphonées ont été testés, comme le montre la Figure 15. Ces agents dispersants peuvent être classés en différents groupes :

- des électrostatiques, permettant une répulsion entre les particules de même charge et ainsi peut éviter les phénomènes d'agglomération (molécules testées : 2 amino-éthyl phosphate (AEP), phosphocholine (PhCol), glutamine, lysine et arginine),
- des stériques, permettant de limiter la formation d'agglomérats par encombrement stérique (molécules testées : des polyéthylène glycol phosphonés (PEG)P avec des longueurs de chaîne et des poids moléculaires décroissants (5800, 5200 et 530 g/mol)),
- et des électrostériques, permettant de coupler les 2 effets (molécules testées : un amino-poléthylène glycol phosphoné (A(PEG)P), alginate).

Les dispersants au (PEG)P et à l'A(PEG)P ont été préparés sur demande par SEPCIFIC POLYMERS (Montpellier, France).

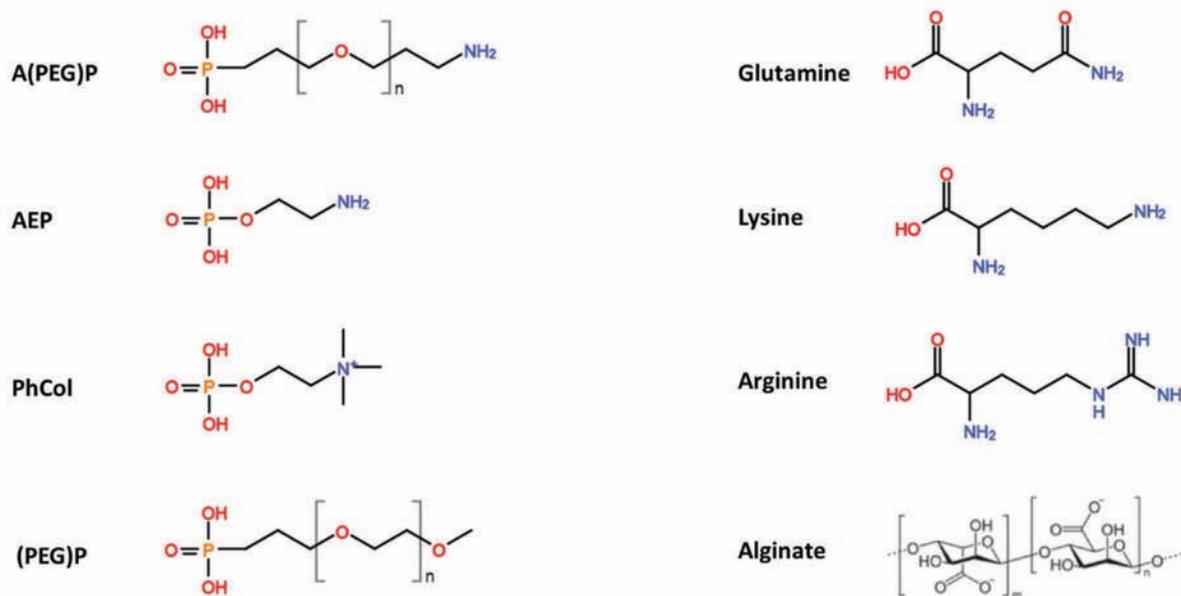


Figure 15 : Différents agents dispersants testés

Pour chaque agent, différentes concentrations ont été testées, ce qui a permis d'évaluer la plus adaptée pour l'obtention d'un colloïde monomodal, avec un indice de polydispersité (Pdl) relativement faible. Des combinaisons entre différents agents dispersants ont également été réalisées.

L'effet de différents paramètres au niveau de la synthèse, comme le temps de maturation, la température de maturation, le moment d'ajout du dispersant et le pH a été évalué. Dans un premier temps, des variations au niveau de la température de maturation ont été réalisées sur 2 types de colloïdes (dont l'analyse du D_h , présentée ci-après, a donné des résultats monomodaux potentiellement intéressants) : avec le (PEG)P 5800 et avec la PhCol. Différentes températures de maturation ont été testées : 100°C, 70°C et 37°C, tout autre paramètre étant maintenu inchangé (rapports dispersant/Ca fixes, établis à partir des résultats obtenus avec le protocole de référence et permettant d'obtenir pour chaque dispersant la taille la plus stable ((PEG)P 5800 / Ca = 0,016 et PhCol / Ca = 0,25)). Dans un second temps, l'effet du pH de synthèse a été évalué (diminué de 9,5 au pH physiologique), sur ces mêmes colloïdes au (PEG)P et à la PhCol.

2. Influence des paramètres de synthèse sur la taille des particules

Afin d'évaluer le protocole de synthèse le plus adapté pour le traitement de l'acné, le D_h des particules colloïdales a été mesuré à l'aide d'un granulomètre laser, le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, $\lambda = 633 \text{ nm}$), sans dilution des échantillons.

La diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering (DLS)) s'appuie sur la relation de Stokes-Einstein suivante, en se basant sur l'hypothèse que les particules observées sont des sphères :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad \text{Équation 8}$$

avec :

- D_h , le diamètre hydrodynamique
- K_B , la constante de Boltzmann
- T , la température
- η , la viscosité dynamique
- D_t , le coefficient de diffusion transversal

Il est important de noter que les mesures de D_h des particules ont été réalisées, dans un premier temps, avant purification des colloïdes par dialyse, afin de balayer une large gamme de tailles. La dialyse peut cependant avoir un impact sur la taille des particules ; ainsi, un suivi de celle-ci après dialyse a également été effectué, pour les colloïdes retenus pour le reste de l'étude.

A. Influence de l'agent dispersant sur les tailles obtenues

Les différents agents dispersants ont d'abord été utilisés à partir du protocole de référence, c'est-à-dire avec un pH de synthèse de 9,5, un temps et une température de maturation de 16h et 100°C.

Les essais avec la glutamine, l'arginine, la lysine et l'alginate, ont donné des tailles submicroniques mais des échantillons significativement polydisperses, pas ou peu stables. Ils n'ont donc pas été retenus pour la suite des travaux. Les autres agents dispersants, A(PEG)P, AEP, PhCol et (PEG)P, ont permis l'obtention de tailles moyennes intéressantes, présentées en Figure 16 (D_h mesuré par DLS).

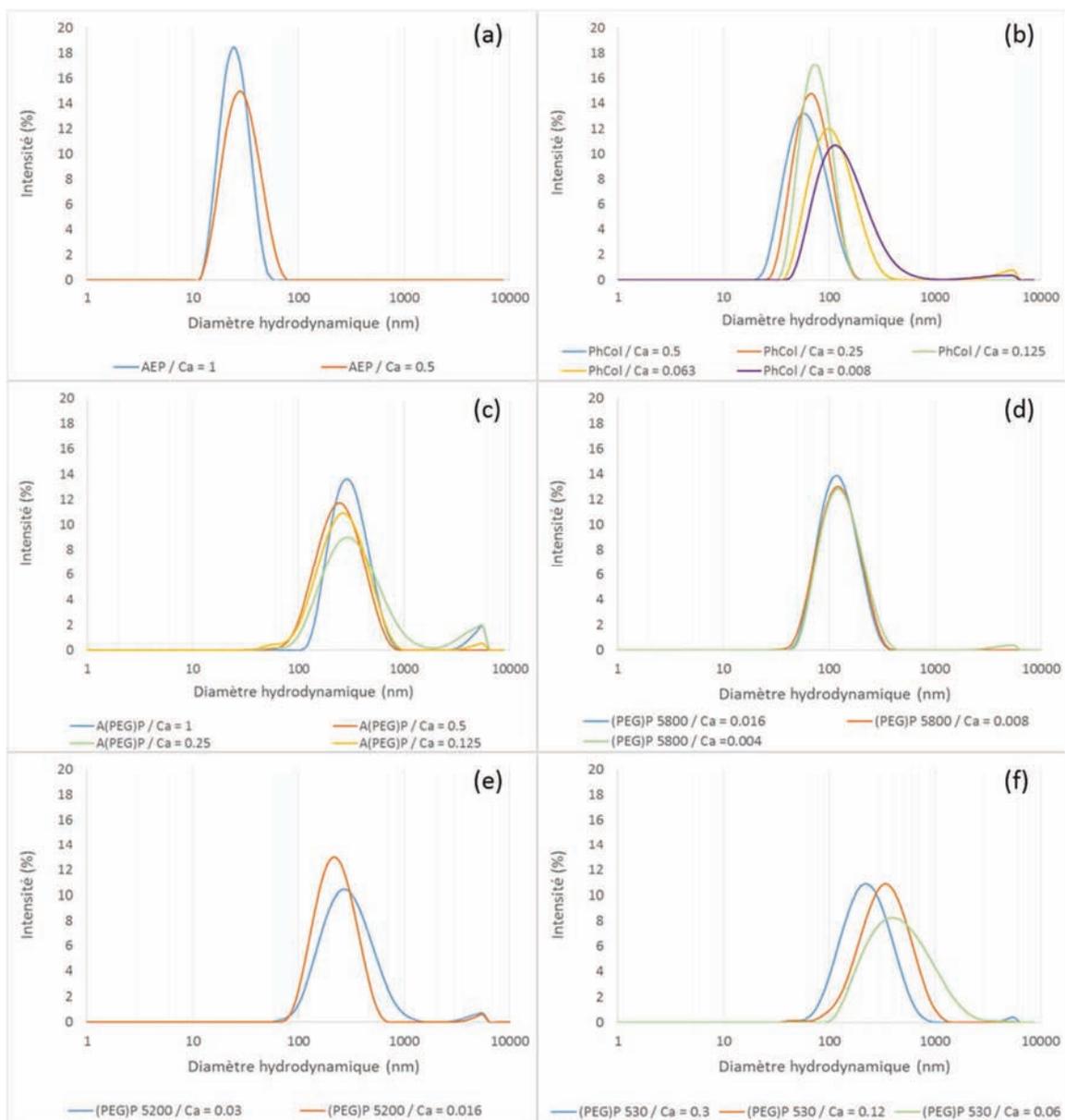


Figure 16 : Diamètre dynamique moyen des particules de colloïdes d'apatite en fonction du type d'agent dispersant : électrostatiques ((a) AEP, (b) PhCol) ; électrostérique ((c) A(PEG)P) et stériques ((d) (PEG)P 5800, (e) (PEG)P 5200, (f) (PEG)P 530), et pour différents rapports molaires initiaux par rapport au calcium

Comme indiqué dans le chapitre I, la taille des particules la mieux adaptée pour le ciblage folliculaire semble être fonction du type et de la nature des particules (organique, inorganique, polymérique, souple, rigide...). A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur l'utilisation d'apatite nanocristalline pour le ciblage folliculaire. Il est donc intéressant de tester différentes tailles de particules colloïdales pour évaluer à terme celle qui serait la plus adaptée pour une libération du PA au niveau des foyers infectieux.

Les essais à l'AEP et la PhCol donnent des particules de D_h moyen en dessous de 100 nm. L'utilisation de (PEG)P de différentes tailles et d'A(PEG)P ont permis l'obtention de

D_h plus élevés. Le Tableau 9 présente les principaux D_h obtenus pour chaque type d'agent dispersant.

Tableau 9 : Principaux D_h obtenus en fonction du type d'agent dispersant avant dialyse

<i>Agent dispersant (X)</i>	<i>X / Ca initiale</i>	<i>Diamètre hydrodynamique moyen (nm)</i>	<i>Indice de polydispersité (PDI)</i>
AEP	1	25	0,07
PhCol	0,25	70	0,11
(PEG)P 5800	0,016	130	0,14
(PEG)P 5200	0,016	240	0,22
A(PEG)P 4000	0,5	270	0,19
(PEG)P 530	0,12	350	0,33

Le Tableau 9 présente des D_h moyens compris entre 25 et 350 nm. On remarque que, dans le cas des (PEG)P, plus le poids moléculaire du (PEG)P diminue, plus le D_h des particules augmente, comme le représente la Figure 17.

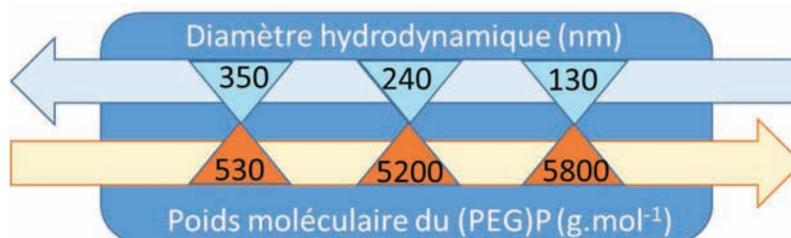


Figure 17 : Représentation schématique du D_h moyen des nanoparticules colloïdales d'apatite en fonction du poids moléculaire de l'agent dispersant (PEG)P avant dialyse

Ceci est en accord avec le fait que les plus grosses molécules de (PEG)P peuvent limiter plus efficacement l'agglomération interparticulaire, comme représenté en Figure 18.

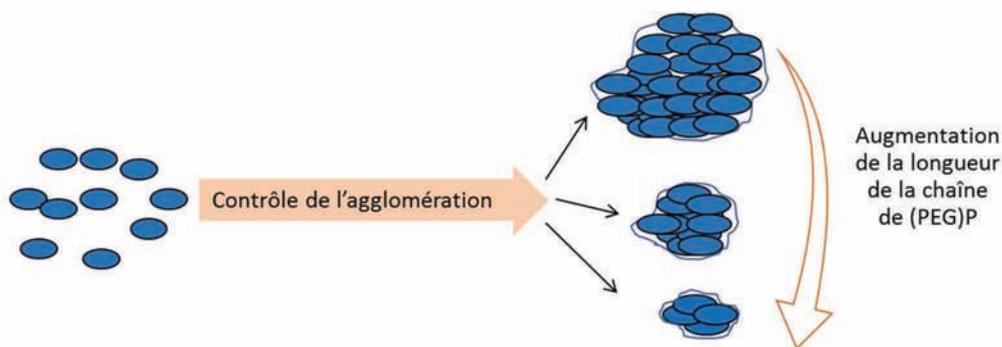


Figure 18 : Représentation schématique des colloïdes au (PEG)P observés par MET et DLS

Les D_h obtenus avec l'A(PEG)P, qui présente en outre une fonction amine terminale en extrémité de chaîne, sont quasiment similaires à ceux observés avec le (PEG)P 5200. Les essais à l'A(PEG)P n'ont pas été dupliqués en raison d'une faible quantité et d'un coût trop élevé de matière première. Ils n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude.

B. Influence des autres paramètres de synthèse : temps de maturation, pH, moment d'ajout de l'agent dispersant

Dans un premier temps, des variations au niveau de la température de maturation (100, 70 et 37°C) ont permis de montrer qu'en fonction du type d'agent dispersant ((PEG)P 5800 et PhCol) le D_h moyen des particules peut être influencé (Tableau 10). Ainsi, ces variations de température sont sans effet sur les colloïdes au (PEG)P 5800, tandis qu'elles influencent ceux à la PhCol. Dans ce dernier cas, plus la température diminue, plus le D_h moyen des particules augmente, jusqu'à perdre le caractère colloïdal à 37°C.

Tableau 10 : Influence de la température de maturation sur la taille des particules colloïdales (mesures effectuées avant dialyse)

	<i>(PEG)P 5800</i>		<i>PhCol</i>	
	Taille (nm)	PdI	Taille (nm)	PdI
100°C	130	0,14	78	0,11
70°C	127	0,15	140	0,19
37°C	135	0,13	Non colloïdal	

Afin d'explorer plus avant ces observations réalisées sur les particules à la PhCol, une analyse DRX a été menée (Figure 19). Les résultats obtenus mettent en évidence à 37°C une diminution significative de l'état de cristallinité de la phase apatitique, pouvant s'expliquer par un effet inhibiteur de croissance cristalline joué par la PhCol (d'autant plus marqué à plus basse

température). Ces résultats rappellent ainsi le cas de l'AEP préalablement étudié au laboratoire [156] et présentant une composition chimique très proche. Par conséquent, l'utilisation de PhCol pour la préparation de colloïdes apatitiques ne peut être envisagée que dans une fenêtre de température limitée.

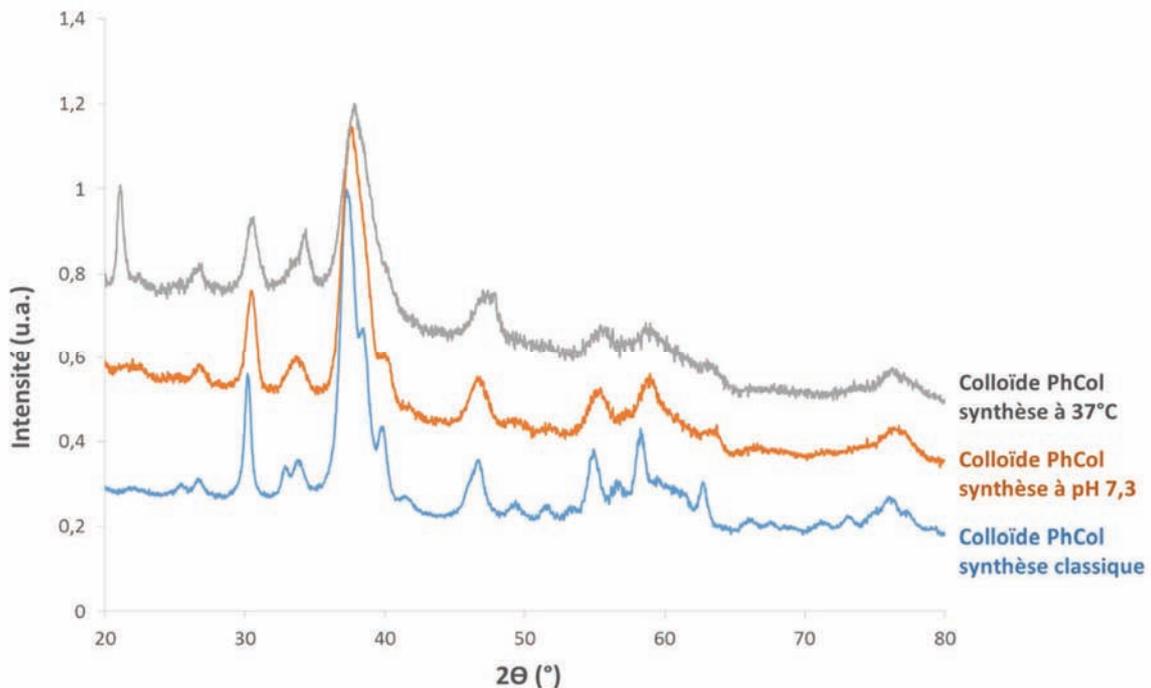


Figure 19 : Diffractogrammes des apatites nanocristallines obtenues en présence de PhCol en faisant varier différents paramètres au niveau de la synthèse (pH, température)

Dans un second temps, l'effet du pH de synthèse a également été évalué, sur ces mêmes colloïdes au (PEG)P et à la PhCol. Une diminution du pH de synthèse jusqu'à une valeur proche du pH physiologique n'a pas permis d'obtenir de suspensions colloïdales, pour les deux types d'agents dispersants. L'analyse DRX réalisée dans le cas de la PhCol est reportée sur la Figure 19. La phase apatitique obtenue est significativement moins bien cristallisée à pH 7,3 que dans les conditions de référence (pH final de l'ordre de 8-8,5). En effet, la phase apatitique est un composé de type hydroxyde et sa cristallisation est donc favorisée en milieu alcalin plutôt que neutre. Ainsi, l'utilisation d'un pH proche de la neutralité pour la synthèse des particules colloïdales d'apatite n'apparaît pas judicieuse, tout au moins dans le cas des agents dispersants (PEG)P et PhCol.

Enfin, afin d'augmenter la taille des particules stabilisées à l'AEP, une nouvelle méthodologie a été testée, consistant à introduire l'AEP dans le milieu non pas en début de précipitation mais à un instant déterminé en cours de maturation. Ainsi, l'ajout d'une solution d'AEP a été testé après 3 et 7 heures de maturation. Ces essais n'ont cependant pas donné de

résultats reproductibles (variabilité importante des tailles de particules obtenues) : ils n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude.

C. Bilan

En conclusion, tous ces essais ont permis d'obtenir une échelle de D_h moyen des particules colloïdales d'apatite compris entre 25 et 350 nm (avant dialyse des échantillons), à l'aide de différents agents dispersants (électrostatiques, stériques et électrostérique) et la combinaison de paramètres expérimentaux. La suite des travaux de thèse s'est portée sur une taille en particulier, choisie en combinant plusieurs paramètres :

- une distribution de taille monomodale,
- une reproductibilité satisfaisante des essais (D_h moyen avant dialyse de 240 ± 15 nm),
- un faible coût des matières premières (incluant l'agent dispersant).

Afin de minimiser le passage transépidermique des particules et donc un passage des PA dans le sang, un D_h moyen relativement élevé a été retenu. Ainsi, les particules de D_h moyen inférieure à 100 nm n'ont pas été sélectionnées pour un suivi cutané. Comme précisé précédemment, les particules stabilisées à l'A(PEG)P n'ont pas fait l'objet d'une étude approfondie en raison du coût de la matière première relativement élevé. Parmi les 3 D_h moyens obtenus avec les différentes longueurs de chaîne de (PEG)P, celle de 240 nm ((PEG)P 5200) a été retenue avec le protocole de référence, en raison de sa bonne reproductibilité et de son relativement faible indice de polydispersité. Les autres essais n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude, cependant ceux-ci pourraient s'avérer également intéressants : l'évaluation de leur passage au niveau cutané pourrait être comparée aux résultats obtenus ici.

3. Purification du colloïde choisi

Pour une application biomédicale, il est indispensable de purifier les particules afin d'éliminer les réactifs utilisés pendant la synthèse. Pour cela, un procédé de dialyse, permettant le passage des substances dissoutes selon un gradient de concentration, a été mis en place, dont l'efficacité a été démontrée lors d'une étude précédente réalisée au laboratoire [163].

La dialyse de chaque préparation a été réalisée à l'aide d'une membrane tubulaire de cellulose, de 3 cm de diamètre et d'environ 15 cm de longueur ayant un seuil de coupure compris entre 12 000 et 14 000 g/mol, pour un colloïde de 25 mL et est représentée en Figure

20. La purification consiste à introduire le colloïde (25 mL) dans la membrane de dialyse puis de placer l'ensemble dans un bécher contenant environ 800 mL d'eau distillée. La purification se déroule en 3 cycles de 4 heures et un cycle de 16 heures (cycle de nuit). A l'issue des 4 premières heures, l'eau de dialyse est renouvelée. Il s'en suit alors deux autres cycles de 4 heures et un de 16 heures, dont l'ordre est présenté en Figure 20. Ce procédé a été élaboré par Ahmed Al-Kattan et al. [163], et a démontré l'obtention de colloïdes à l'AEP purifiés à l'issue de ces quatre cycles.

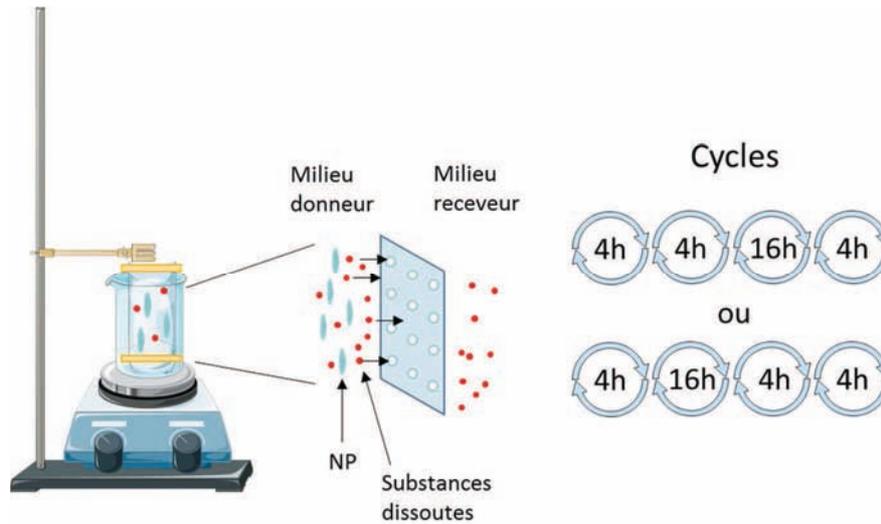


Figure 20 : Schéma de la dialyse des colloïdes (adapté de [163])

4. Caractérisations physico-chimiques complémentaires des particules colloïdales obtenues par le protocole sélectionné

Comme indiqué ci-dessus, le protocole de référence sélectionné pour la suite des expérimentations est basé sur l'utilisation de (PEG)P 5200 comme agent stabilisant, en partant d'un rapport molaire (PEG)P 5200/Ca = 0,0016, à un pH initial de 9,5 et des conditions de maturation de 16h à 100°C, suivi d'une étape de purification par dialyse. L'analyse par spectroscopie d'absorption atomique couplée à des résultats de gravimétrie (mesure de la masse de poudre sèche obtenue après lyophilisation complète d'un colloïde de 25 mL) a permis de déterminer le rapport molaire entre le (PEG)P 5200 et l'apatite dans ces colloïdes, de l'ordre de (PEG)P / apatite = 0,12.

Afin de compléter la caractérisation physico-chimique des particules colloïdales obtenues via ce protocole, différentes techniques ont été employées : diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), spectroscopie de résonance

magnétique nucléaire (RMN), diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie électronique en transmission (MET).

A. DRX

La nature des phases cristallines a été étudiée à l'aide d'un diffractomètre INEL Equinox 1000, équipé d'un compteur courbe (temps d'acquisition 2 heures) muni d'une anticathode de cobalt ($\lambda_{Co} = 1,78892 \text{ \AA}$). Pour ces analyses, le colloïde dialysé a été préalablement lyophilisé. Les diffractogrammes sont présentés en Figure 21.

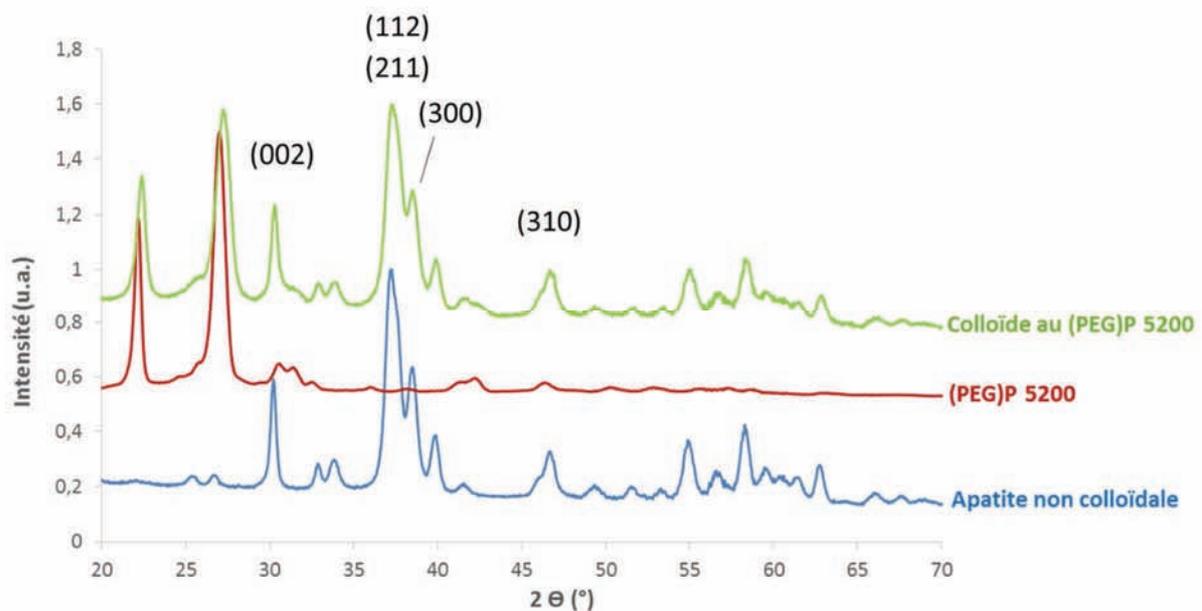


Figure 21 : Diffractogrammes d'apatites nanocristallines : colloïdale (stabilisée au (PEG)P 5200) et non colloïdale, et du (PEG)P 5200 seul

Le diffractogramme des particules stabilisées via le (PEG)P 5200 a été obtenu sur le colloïde après dialyse (et lyophilisation). La comparaison avec un diagramme X de référence obtenu sur un échantillon non colloïdal (voir Figure 21), préparé dans des conditions identiques mais en absence d'agent dispersant, indique dans les deux cas la présence d'un composé cristallisé de structure apatitique (système hexagonal, groupe d'espace $P6_3/m$), dont l'indexation complète des pics correspond à celle de la Figure 11 du chapitre I.

On peut noter néanmoins une légère diminution de l'état de cristallinité pour les particules d'apatite colloïdale comparé à l'échantillon non colloïdal, ce qui est illustré par une moindre définition des raies de diffraction (visible notamment au niveau des pics (211), (112) et (300)). Cette diminution d'état de cristallinité liée à la présence de (PEG)P 5200 lors de la précipitation d'apatite peut être évaluée, en première approximation, par application de la

norme ISO 13779-3 : 2008. Cette norme consiste à comparer l'aire cumulée des 10 pics de diffraction (002), (102), (210), (211), (112), (300), (202), (310), (222) et (213) pour la phase apatitique de l'échantillon à analyser avec l'aire cumulée obtenue pour les mêmes pics mais sur une hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée (préparée préalablement au laboratoire par précipitation de di-ammonium hydrogénophosphate et de chaux, en proportions stœchiométriques, suivi d'une calcination à 1000°C sous air pendant 15 h) et pour laquelle le taux de cristallinité est considéré comme valant 100%. L'application de cette norme mène à un taux de cristallinité d'environ 82% pour le colloïde, en comparaison avec 89% pour l'apatite non colloïdale de référence.

Le diffractogramme relatif au colloïde (lyophilisé) met également en évidence les raies caractéristiques de l'agent dispersant (PEG)P 5200 comme l'indique la comparaison avec le diagramme obtenu sur le réactif (PEG)P 5200 pur (Figure 21).

L'application de la formule de Scherrer aux pics de diffraction (002) et (310) met en outre en évidence les dimensions nanométriques des cristallites composant l'échantillon colloïdal, avec une longueur moyenne le long de l'axe c de l'apatite de l'ordre de 24 ± 2 nm et une largeur/épaisseur d'environ 12 ± 2 nm.

Cette étude par DRX permet donc de valider la nature apatitique des particules présentes dans le colloïde stabilisé au (PEG)P 5200, avec des cristallites de tailles nanométriques comme dans le cas du minéral osseux (caractère biomimétique).

B. IRTF

Les analyses IRTF viennent compléter les résultats de DRX. Comme indiqué dans le chapitre I, elles permettent de renseigner sur les groupements chimiques (actifs en IR) présents dans les apatites et leurs environnements chimiques, en fonction des modes de vibrations des liaisons entre les différents atomes qui les composent et dont les valeurs sont référencées, pour les phosphates de calcium, dans la littérature [121], [137], [164]. Les analyses ont été réalisées en utilisant un spectromètre Thermo-Nicolet 5700 (gamme d'analyse dans le moyen infrarouge $400-4000$ cm^{-1} , résolution 4 cm^{-1} , 64 scans, méthode de pastillage utilisant le bromure de potassium, KBr).

Comme l'indique la Figure 22, les bandes caractéristiques des groupements phosphates localisés dans des apatites phosphocalciques, et en particulier les modes de vibrations $\nu_3(\text{PO}_4)$ et $\nu_4(\text{PO}_4)$, peuvent aisément être identifiés pour les particules colloïdales stabilisées au

(PEG)P 5200, par comparaison avec le spectre obtenu sur une apatite non colloïdale. De plus, les bandes caractéristiques du (PEG)P 5200 se retrouvent également sur le spectre IR des particules colloïdales, ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus par DRX.

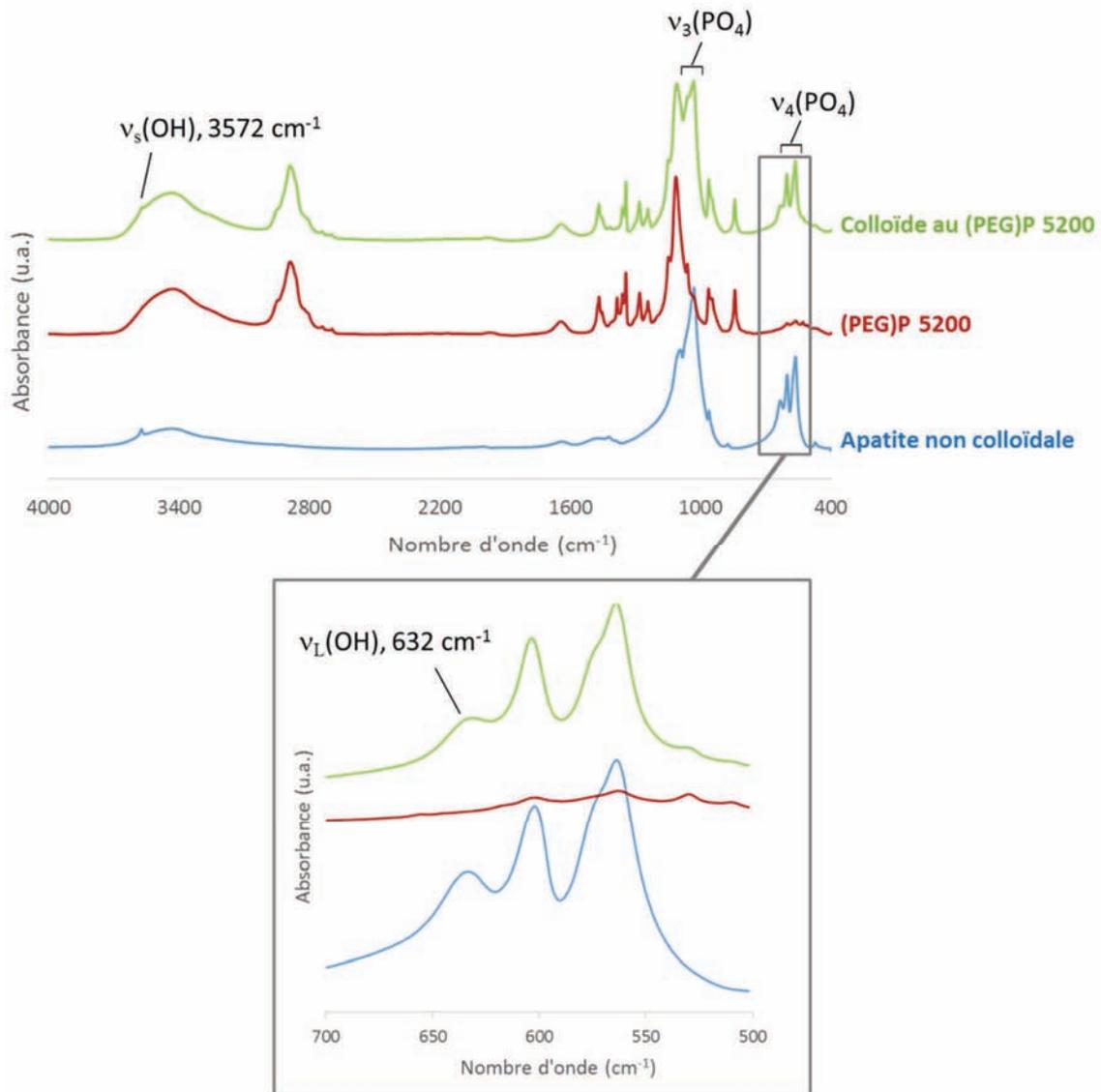


Figure 22 : Spectres d'absorption infrarouge d'apatites nanocristallines : colloïdale (stabilisée au (PEG)P 5200) et non colloïdale, et du (PEG)P 5200 seul, et zoom sur le domaine de vibration 500-700 cm^{-1}

Une observation plus fine des données IR indique néanmoins des modifications entre le spectre relatif aux particules colloïdales et celui correspondant à l'apatite non colloïdale. La signature spectrale des ions hydroxydes à 3572 cm^{-1} ($\nu_s(\text{OH}_{\text{ap}})$) semble moins intense pour le colloïde au (PEG)P 5200, ce qui pourrait être relié à une teneur moindre en ions OH^- apatitiques pour l'apatite obtenue par voie colloïdale. Cependant, cette observation pourrait être biaisée de par la quantité plus importante d'eau résiduelle dans cette dernière, attestée par des bandes plus intenses centrées sur 3440 cm^{-1} relative au mode de vibration $\nu_s(\text{OH})$ de l'eau et 1640 cm^{-1}

relative au mode de déformation angulaire $\nu_b(\text{HOH})$. Une seconde bande d'absorption relative aux ions OH^- apatitiques (bande de libration) peut cependant être également détectée à une position proche de 632 cm^{-1} [129]. De nouveau, cette bande apparaît moins intense dans le cas des particules colloïdales que pour l'apatite non colloïdale prise pour référence (voir zoom sur Figure 22). Afin d'explorer ce point plus avant, une décomposition du massif d'absorption observé entre 500 et 700 cm^{-1} a été réalisée en utilisant une méthodologie développée précédemment au laboratoire pour l'étude d'apatites nanocristallines biomimétiques [122] (Figure 23).

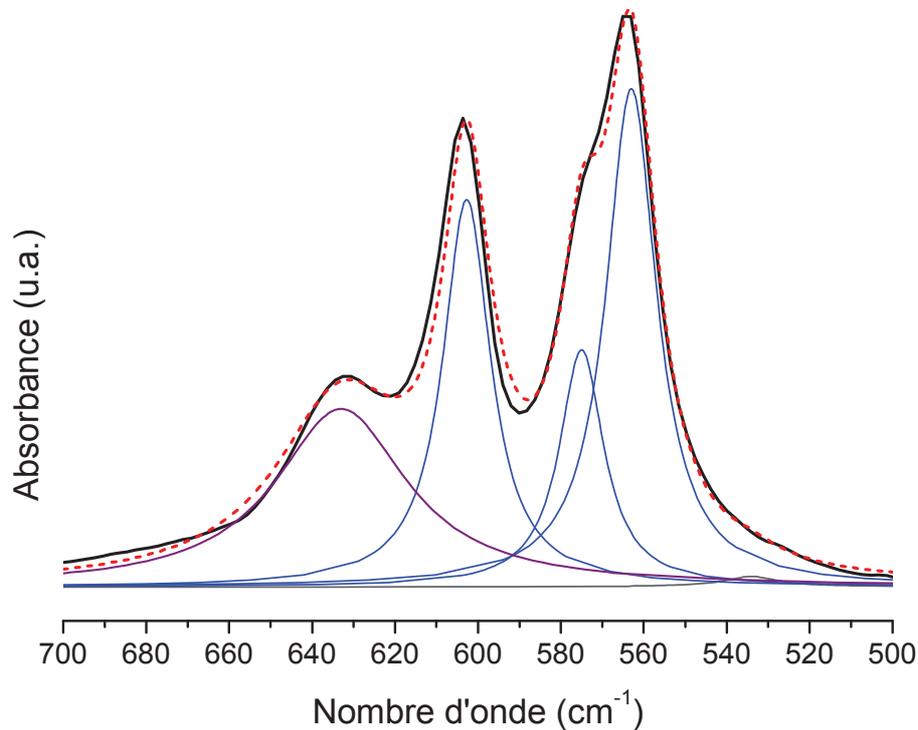


Figure 23 : Décomposition spectrale dans la région $500\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$, autour de $\nu_4(\text{PO}_4)$, pour une apatite colloïdale stabilisée au (PEG)P 5200

Ce massif comporte en effet plusieurs contributions liées à la vibration d'ions PO_4^{3-} (apatitiques typiquement à 560 , 575 et 601 cm^{-1} , et non apatitiques à 617 cm^{-1}), HPO_4^{2-} (apatitiques à 550 cm^{-1} et non apatitiques à 534 cm^{-1}), et OH^- (632 cm^{-1}). Un exemple de décomposition spectrale dans la région $500\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$, relatif aux particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200, est notamment donné en Figure 23. A partir de cette décomposition, l'aire de chaque contribution est évaluée. Il est alors possible de déterminer la proportion relative occupée par un type d'ion dans un échantillon donné. Le rapport R des intensités intégrées pour les ions OH^- apatitiques, défini par :

$$R = \frac{OH^{-}ap}{OH^{-}ap + PO_4^{3-}ap + HPO_4^{2-}ap} \quad \text{Équation 9}$$

permet ainsi de comparer les proportions relatives en ions OH^{-} apatitiques contenus dans les échantillons, menant à une valeur de 0,39 pour l'apatite non colloïdale de référence, et de 0,29 (après soustraction de la contribution du (PEG)P 5200) pour l'apatite colloïdale. Ces valeurs témoignent d'une diminution significative de la proportion en ions OH^{-} dans la phase apatitique obtenue par voie colloïdale par rapport à l'apatite non colloïdale préparée dans les mêmes conditions mais en absence de (PEG)P 5200.

Par ailleurs, les échantillons, préparés ici à 100°C pendant 16 h (que ce soit en absence ou en présence de (PEG)P 5200), ne présentent pas de contribution spectrale significative pour les ions HPO_4^{2-} , comme en témoigne la très faible aire des pics centrés sur 534 et 550 cm^{-1} , suggérant que dans ce travail de thèse les apatites rencontrées ne présentent pas une couche ionique hydratée étendue.

Au final, l'étude couplée par DRX et IRTF indique que, outre un état de cristallinité sensiblement plus faible pour les particules colloïdales, l'apatite obtenue présente également un écart plus important à la stœchiométrie que l'apatite non colloïdale, indiqué par un plus faible taux d'hydroxylation. Ces résultats peuvent s'expliquer par un rôle inhibiteur de croissance cristalline joué par le (PEG)P 5200. Néanmoins ce rôle est significativement moins marqué que celui obtenu avec l'AEP [119], agent stabilisant de plus petite taille.

C. RMN ^{31}P du solide

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide du noyau ^{31}P a été utilisée afin d'explorer l'interaction entre la terminaison phosphonatée des molécules de (PEG)P 5200 et les phosphates apatitiques. Les expériences ont été menées au service commun de RMN du laboratoire de chimie de coordination de Toulouse, à l'aide d'un spectromètre BRUKER Avance 400 (9,4 T) opérant à 161,76 MHz, en mode rotation à angle magique MAS. Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 3,2 mm tournant à 14 kHz. Les expériences ont été effectuées à température ambiante. Les déplacements chimiques ont été déterminés par rapport à H_3PO_4 à 85%. La Figure 24 reporte les spectres obtenus pour une colloïde stabilisé au (PEG)P 5200 et pour le (PEG)P 5200 seul.

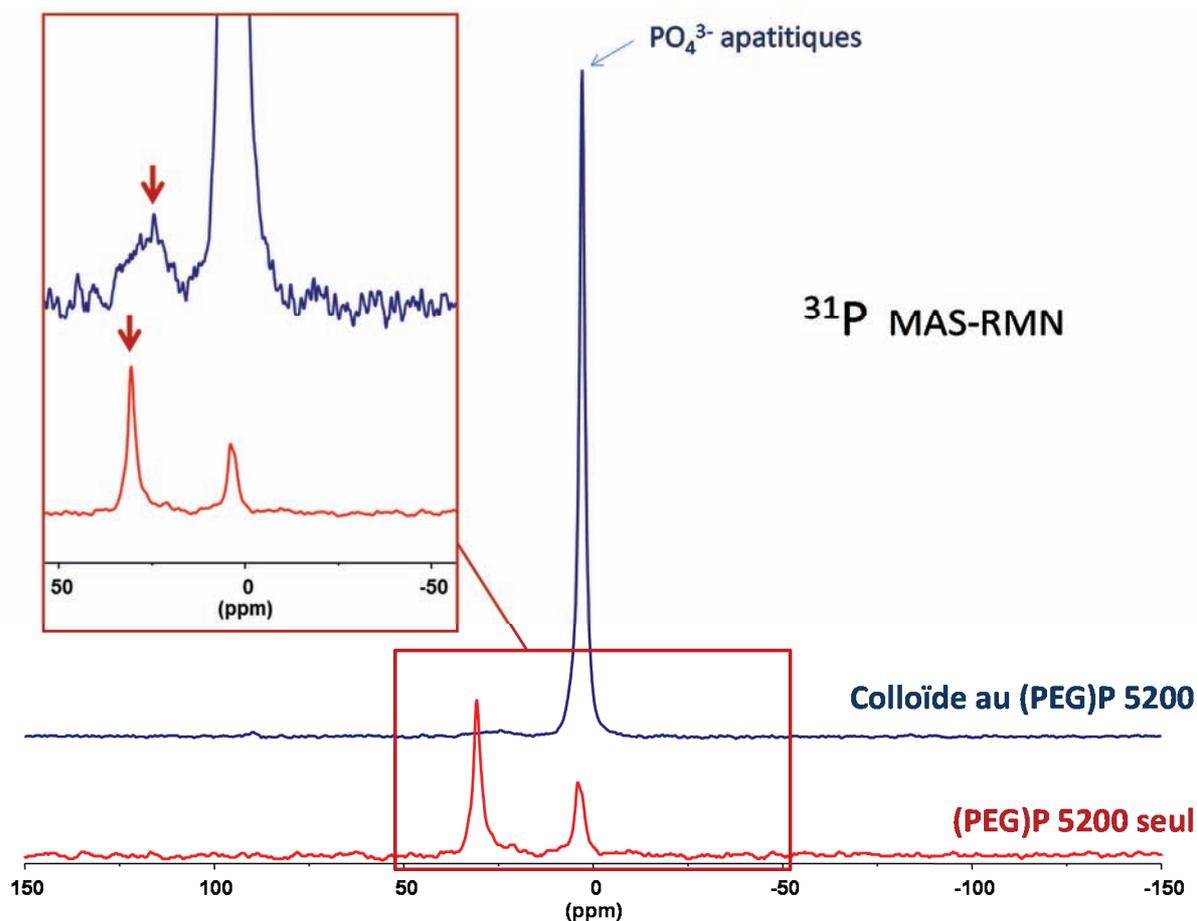


Figure 24 : Spectres RMN ^{31}P MAS pour une apatite nanocristalline colloïdale stabilisée au (PEG)P 5200 et pour le (PEG)P 5200 seul

Le spectre ^{31}P relatif au (PEG)P 5200 seul met en évidence la présence de 2 pics principaux à 30,6 et 3,9 ppm. Le colloïde quant à lui présente un pic intense localisé à 2,7 ppm et un pic large mais d'intensité plus faible avec un maximum à 24,2 ppm. Le pic à 2,7 ppm est attribué aux phosphates apatitiques [129]. Le second pic (à 24,2 ppm) ne peut quant à lui pas être imputé aux ions phosphates de l'apatite. Il est raisonnablement attribuable à la présence du (PEG)P 5200, indiquant une modification de la signature spectrale du (PEG)P 5200. Le pic à 30,6 ppm semble ainsi élargi et décalé vers les plus bas déplacements chimiques, témoignant de l'existence d'une interaction entre le groupement phosphonate du (PEG)P 5200 et l'apatite.

D. DLS

Après sélection du colloïde au (PEG)P 5200, dont le D_h moyen avant dialyse avoisinait les 240 nm avec un indice de polydispersité de 0,22, une vérification de celle-ci après dialyse a montré que ce D_h moyen des particules colloïdales (donc supposées sphériques) est décalée à

environ 180 nm avec un indice de polydispersité de 0,17. Le D_h moyen et la polydispersité de l'échantillon ont ainsi été légèrement diminués.

E. MET

Les mesures de D_h moyen par DLS ont été couplées à une analyse microscopique des échantillons réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi HT-7700. Pour cette analyse, les échantillons ont simplement été préparés par dépôt d'une goutte de suspension sur grille MET et séchage rapide sous air.

La Figure 25 présente l'observation microscopique du colloïde au (PEG)P 5200 à différents grossissements, dont le D_h moyen, indiqué par la DLS et après dialyse, était d'environ 180 nm.

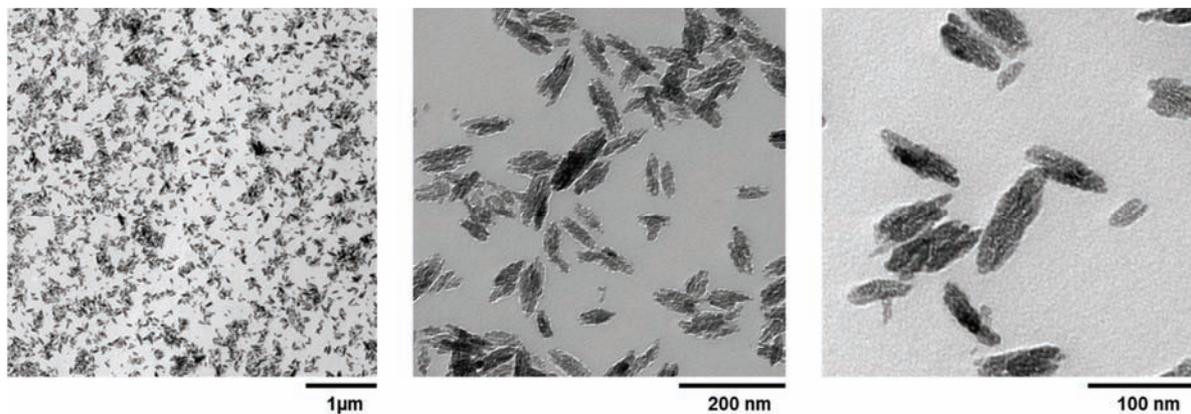


Figure 25 : Observations microscopiques d'un colloïde au (PEG)P 5200 à différents grossissements

Les observations microscopiques (Figure 25) montrent uniquement des fragments particuliers d'une centaine de nanomètres de long et de quelques nanomètres voire dizaines de nanomètres d'épaisseur. Les tailles des objets visualisés par microscopie électronique sont donc nettement plus petites que les résultats de DLS. Il semble ainsi que la préparation des échantillons réalisée ici par séchage rapide n'ait pas été optimale : seuls des fragments de particules sont observables ici, alors que les particules agglomérées semblent détectables par DLS (Figure 18). Il sera intéressant de compléter ces résultats par d'autres analyses microscopiques partant d'échantillons colloïdaux liquides, possiblement en mode cryogénique, afin d'observer les particules colloïdales intactes, voire en évaluer la morphologie.

5. Séchage redispersion

La possibilité de stocker ces colloïdes sous forme sèche, pour une bonne conservation, puis de les redisperser tout en conservant les propriétés du colloïde, a été investiguée. En effet,

une forme sèche peut être plus appréciable dans le cadre d'une application industrielle pour des raisons de stockage de matière première de longue durée sans dégradation de la matière première, mais aussi pour pouvoir concentrer les particules dans le produit fini. Lors du séchage et de la lyophilisation d'apatite biomimétique, une forte tendance à l'agglomération irréversible des particules entre elles est observée. Une étude précédente sur les colloïdes à l'AEP, montre qu'il est possible d'ajouter une matrice hydrosoluble (glucose) avant séchage et lyophilisation permettant de parer à ce phénomène [9]. Des essais ont ainsi été entrepris sur les colloïdes au (PEG)P 5200. Un premier test a été réalisé de séchage, lyophilisation et redispersion sans ajout de matrice hydrosoluble. Pour cela, un colloïde au (PEG)P 5200 a été préparé, dialysé, congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et lyophilisé. La forme sèche a ensuite été redispersée dans de l'eau distillée avec le même volume qu'avant séchage. Afin de s'assurer que les propriétés du colloïde ont été conservées, des mesures de taille des particules colloïdales après dialyse et après lyophilisation et redispersion sont présentées en Tableau 11.

Tableau 11 : Conservation du D_h moyen des particules colloïdales après lyophilisation et redispersion

<i>Colloïde au (PEG)P 5200</i>	<i>Diamètre hydrodynamique (nm)</i>	<i>PdI</i>
Après dialyse	176,2	0,15
Après redispersion	176,2	0,144

Le Tableau 11 met en évidence la conservation de la taille des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 suite à leur séchage et redispersion dans un même volume d'eau. Contrairement au colloïde à l'AEP, le (PEG)P 5200 forme une couronne relativement neutre à la surface des particules ($\zeta = 6 \pm 5\text{ mV}$ à $\text{pH} \sim 7$), évitant les phénomènes d'agglomération lors du séchage. En complément des mesures de taille, un contrôle du non changement la structure et de la composition a été vérifié par DRX et IR. La présence de (PEG)P 5200 permet ainsi d'obtenir un D_h moyen contrôlé des particules d'environ 180 nm et de parer au phénomène d'agglomération lors du séchage, sans nécessité d'ajout d'une matrice hydrosoluble.

II. ADSORPTIONS MOLECULAIRES ET SUBSTITUTIONS IONIQUES

Suite à l'obtention d'une taille de particules colloïdales reproductible et relativement stable, des essais d'adsorption avec une molécule d'intérêt et un dopage en ions biologiquement actifs ont été entrepris. Pour cela, un premier essai d'adsorption (et de désorption) d'une

molécule modèle sur de l'apatite non colloïdale a été réalisé afin de valider le protocole d'adsorption pour la molécule d'intérêt choisie par la suite, afin de minimiser les essais avec cette dernière (dont le coût est relativement important). Le choix d'une apatite non colloïdale, dans un premier temps, a été décidé afin de bien comprendre les mécanismes d'adsorption et de désorption des molécules étudiées sur la surface apatitique, sans gêne pouvant être occasionnée par la présence d'un agent dispersant. Dans le cas de la molécule d'intérêt pour l'application visée (traitement anti-acnéique), l'adsorption sur le non colloïdale a été comparée avec l'adsorption sur les particules colloïdales au (PEG)P 5200.

Des essais de substitutions ioniques (d'ions calcium par des ions cuivre et/ou zinc) ont été réalisés sur une apatite non colloïdale, basés sur des résultats déjà obtenus au laboratoire [165]. Ces substitutions ont ensuite été entreprises sur les colloïdes au (PEG)P 5200.

1. Mise au point d'un protocole d'adsorption via une molécule modèle

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans *Journal of Colloid and Interface Science* [166] (Annexe 2).

A. Choix de la molécule modèle : la cytidine-5'-monophosphate (CMP)

La cytidine-5'-monophosphate (CMP), ou l'acide 5'-cytidylique, fait partie de la composition de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et/ou de l'acide ribonucléique (ARN). Sa formule chimique est présentée en Figure 26. Elle a été choisie comme molécule modèle dans ces travaux car elle possède un groupement phosphate et une composition et taille de molécule relativement proche de la molécule d'intérêt choisie pour le traitement de l'acné dans ces travaux de thèse.

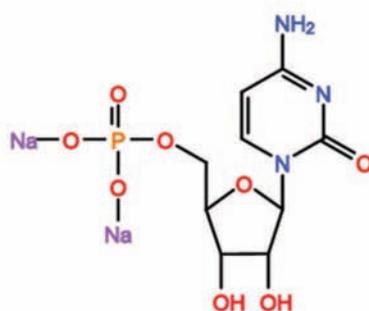


Figure 26 : Formule chimique du sel disodique de la cytidine 5'-monophosphate

B. Choix du substrat apatitique

Le choix du type d'apatite s'est porté sur une apatite biomimétique carbonatée ayant une structure cristalline proche de celle des particules colloïdales. Elle a été obtenue précédemment au laboratoire, en précipitant une solution de nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 52,2g dans 750 mL d'eau distillée) avec une solution d'hydrogénophosphate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 90g) et une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , 90g de chaque dans 1500 mL d'eau distillée) à température ambiante (20°C). Dans la seconde solution, un excès d'ions phosphates a été utilisé pour tamponner la solution proche du pH physiologique (7,4). Le mélange a ensuite été laissé pour une étape de maturation à 20°C pendant une semaine, suivie d'une filtration sur Büchner et d'un lavage à l'eau distillée. L'échantillon a ensuite été lyophilisé pendant 3 jours, tamisé en fractions de différentes tailles : la fraction utilisée pour l'étude d'adsorption de la CMP est comprise de 0 à 100 μm (stockage à -18°C).

C. Caractérisations physico-chimiques

La nature de la phase cristalline a été déterminée comme précédemment, à l'aide d'un diffractomètre INEL Equinox 1000, muni d'une anticathode de cobalt ($\lambda_{\text{Co}} = 1,78892\text{\AA}$). Le diagramme de DRX, présenté en Figure 27, présente les raies caractéristiques d'une apatite phosphocalcique de nouveau faiblement cristallisée. L'analyse IRTF, réalisée à l'aide du spectromètre infrarouge Thermo-Nicolet 5700, avec une résolution de 4cm^{-1} , met en évidence l'obtention d'une apatite nanocristalline carbonatée (domaine du mode de vibration $\nu_3(\text{CO}_3)$: $1350\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ et $\nu_2(\text{CO}_3)$: $840\text{-}910\text{ cm}^{-1}$). L'application de la formule de Scherrer aux pics de diffraction (002) et (310) montre la dimension nanométrique de l'échantillon et une taille de cristallite d'environ $16 \pm 2\text{ nm}$ de longueur et $5 \pm 2\text{ nm}$ de largeur.

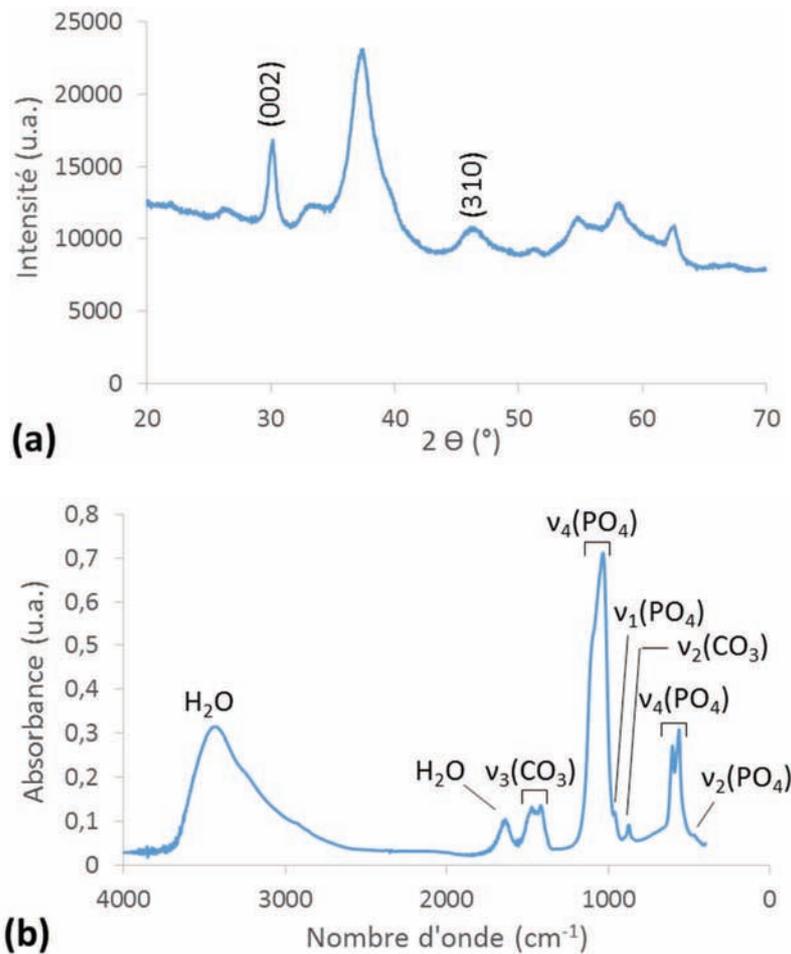


Figure 27 : (a) Diagramme de DRX et (b) spectre IRTF du substrat apatitique

L'analyse de la surface spécifique a été menée sur un Microtrac BELSORP mini II (méthode BET basée sur l'adsorption d'azote). Elle indique une surface spécifique de 122 ± 1 m²/g pour ces matériaux. Le potentiel zêta a été mesuré à l'aide du Zetasizer Nano ZS de Malvern, à 25°C, sur le substrat apatitique redispersé dans de l'eau désionisée et filtré à 1 µm pour éviter la sédimentation des agrégats. L'analyse a été réalisée sur une gamme de pH comprise entre 6 et 9,5, et indique un potentiel zêta proche de -30 ± 2 mV, ce qui correspond à la valeur moyenne relevée pour les apatites nanocristallines non stœchiométriques [167]. Cette surface négative n'implique pas qu'uniquement des charges négatives sont exposées à la surface de l'apatite, celle-ci présentant à la fois des ions calcium et phosphates, mais indique une charge nette effectivement négative dans ces conditions. La teneur en calcium et phosphate a été évaluée par dosage complexométrique à l'EDTA et par spectrophotométrie (Shimadzu UV 1800, $\lambda = 460$ nm), et le titrage des carbonates a été réalisé par coulométrie (Coulomètre CM5014 avec une unité d'acidification CM5130). Le taux de carbonate mesuré correspond à un pourcentage massique 3,6 %. Le ratio molaire Ca/(P+C) de cette apatite est de 1,36, soit

inférieur à celui l'apatite stœchiométrique (1,67). Ceci met en évidence la non stœchiométrie de cette apatite, et confirme sa nature biomimétique.

D. Etude des interactions entre le substrat apatitique et la CMP

Pour toute l'étude des interactions entre le substrat apatitique et la CMP (adsorption et désorption), 20 mg de poudre d'apatite ont été dispersés dans 5 mL d'une solution de CMP à température ambiante. La concentration de CMP dans le surnageant a été mesurée par spectrophotométrie (Shimadzu UV 1800, $\lambda = 272$ nm). La quantité de CMP adsorbée a été calculée grâce à la formule suivante :

$$Q_{ads} = \frac{Q_i - Q_{sngt}}{m_{substrat}} \quad \text{Équation 10}$$

avec :

- Q_{ads} , la quantité de CMP adsorbée ramenée à 1g de substrat (mg/g d'apatite)
- Q_i , la quantité initiale de CMP dans la solution mère (mg)
- Q_{sngt} , la quantité à l'équilibre dans le surnageant (mg)
- $m_{substrat}$ en g

Il est a noté que Q_{ads} peut également être exprimée en $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, afin de comparer l'adsorption de différents PA ramenée par unité de surface.

a. Cinétique d'adsorption

La cinétique d'adsorption de la CMP sur l'apatite biomimétique préparée a été suivie en mesurant la quantité de CMP adsorbée en fonction du temps. Cette étape est importante pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. Une fois celui-ci obtenu, l'étude de l'adsorption de la CMP à différentes concentrations a été menée, en utilisant un temps d'adsorption légèrement supérieur au temps d'équilibre préalablement déterminé pour chaque concentration de l'isotherme, afin de s'assurer que l'équilibre est atteint.

Pour l'étude de la cinétique d'adsorption, une concentration initiale de 300 mg/L de CMP dans une solution de KCl à 0,01M a été employée (pour faciliter la mobilité des ions en solution), à température ambiante et au pH physiologique. Différents temps de contact ont été

testés, compris entre 5 minutes et 3 heures. Après dispersion de l'apatite pendant différents temps de contact, les échantillons ont été centrifugés pendant 2 minutes à 5000 rotations par minute (rpm). Le surnageant a ensuite été prélevé et analysé par spectrophotométrie. La Figure 28 indique que l'équilibre est atteint très rapidement, en moins de 10 minutes, et pour une concentration à l'équilibre de 224 mg/L, ce qui correspond à une quantité adsorbée de 7,5 mg de CMP/g d'apatite.

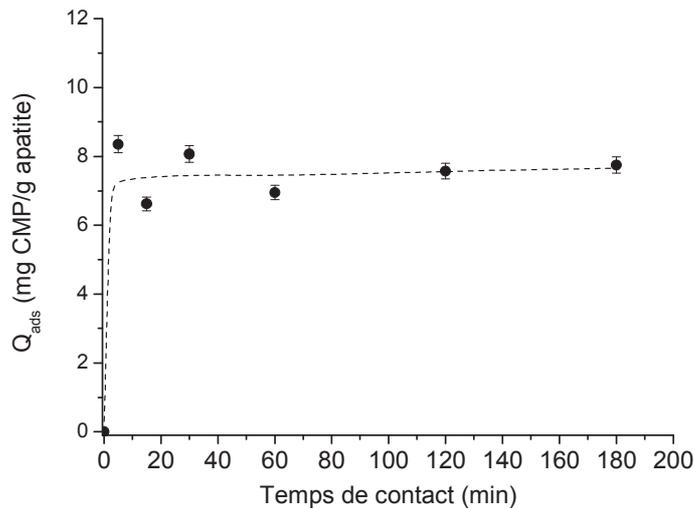


Figure 28 : Cinétique d'adsorption de la CMP sur de l'apatite biomimétique nanocristalline, à température ambiante et pH physiologique

La rapidité d'adsorption de la CMP sur l'apatite biomimétique (<10 minutes) met en évidence une haute affinité de la CMP pour la surface de cette apatite. Cependant, il est nécessaire de réaliser une étude d'adsorption et de désorption de la CMP pour quantifier la quantité adsorbée en fonction de la concentration initiale, et pour inspecter plus avant la nature des interactions adsorbant / adsorbé.

b. Isotherme d'adsorption

Afin d'être de s'assurer que l'équilibre ait été atteint, le temps choisi pour établir l'isotherme d'adsorption a été d'une heure de contact entre l'apatite et la solution mère. Comme indiqué précédemment, les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 2 minutes à 5000 rpm. Le prélèvement des surnageants a permis d'établir l'isotherme d'adsorption (à 25°C) présenté en Figure 29.

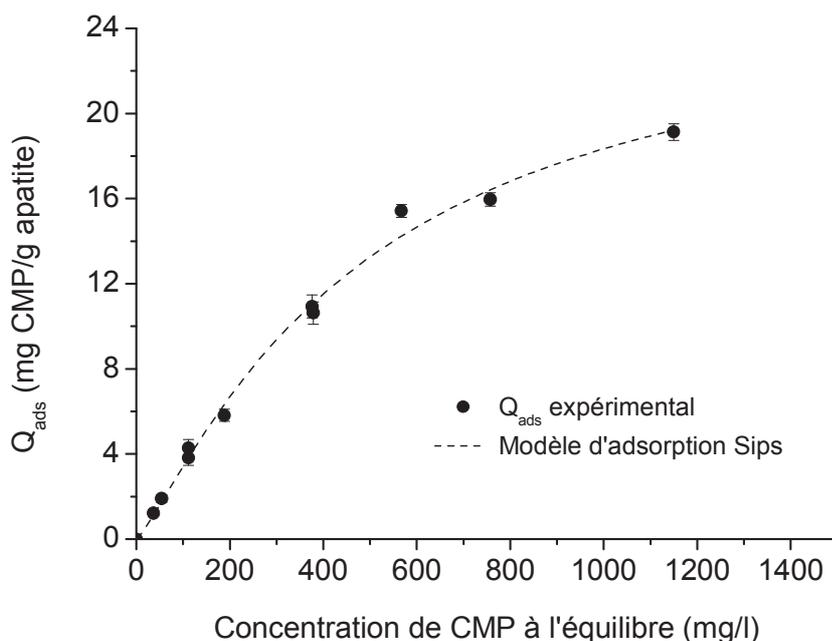


Figure 29 : Isotherme d'adsorption de la CMP sur l'apatite biomimétique à 25°C (non colloïdale)

La courbure de l'isotherme d'adsorption indique que la quantité de CMP adsorbée augmente progressivement pour des concentrations croissantes de CMP à l'équilibre. Dans le but d'explorer plus avant le mécanisme d'adsorption de la CMP sur l'apatite biomimétique, les résultats ont été comparés avec différents modèles mathématiques couramment utilisés pour les études d'adsorption en général et notamment pour les substrats apatitiques [168]–[170]. Dans un premier temps, les modèles de Langmuir, Freundlich et Temkin ont été considérés, dont les équations ont été décrites dans le premier chapitre de cette thèse. Une récente étude d'adsorption de la tétracycline sur de l'apatite biomimétique, a cependant aussi montré l'intérêt de tester un autre modèle mathématique, l'équation de Sips (ou modèle Langmuir-Freundlich) décrit dans le chapitre I.

Le Tableau 12 indique les coefficients de corrélation (R^2) obtenus en fonction du modèle mathématique appliqué.

Tableau 12 : Détermination du coefficient de corrélation en fonction du modèle mathématique

<i>Modèle mathématique</i>	<i>Coefficient de corrélation (R^2)</i>
<i>Temkin</i>	0,9453
<i>Freundlich</i>	0,9637
<i>Langmuir</i>	0,9916
<i>Sips</i>	0,9933

Parmi les 3 premiers modèles testés (Langmuir, Freundlich, Temkin), l'équation de Langmuir est la mieux adaptée par rapport aux points expérimentaux obtenus (avec $Q_m = 32,33 \pm 2,41$ mg/g soit $0,82 \pm 0,06$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, et $K_L = 0,0017 \pm 0,0002$ L/mg). Toutefois, l'application de l'équation de Sips à ce modèle expérimental permet d'obtenir un meilleur coefficient de corrélation R^2 de 0,9933. Cela indique que le modèle de Sips permet de décrire de manière adéquate le processus d'adsorption de la CMP sur de l'apatite biomimétique, suggérant des interactions non négligeables entre les molécules adsorbées et/ou les sites d'adsorption différenciés. Les valeurs des paramètres de l'équation de Sips calculés sont $m = 1,20 \pm 0,11$, $Q_m = 26,1 \pm 2,6$ mg/g (soit $0,66 \pm 0,07$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) et $K_S = 0,00052 \pm 0,00027$. L'application de l'équation de Sips mène à une quantité maximale adsorbée de 26,1 mg/g soit $0,66$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. La valeur de m , significativement supérieure à 1, confirme que l'isotherme d'adsorption ne doit pas être considéré comme totalement Langmuirien. Cette valeur renseigne également sur le type d'interactions intermoléculaires [171]. Elle apporte une indication sur l'existence d'interactions latérales entre les molécules adsorbées, non considérées dans le modèle de Langmuir. Si m est supérieur à 1, la coopération entre les molécules adsorbées adjacentes est dite positive, démontrée pour d'autres molécules par des études réalisées au laboratoire [139], [172] (tandis que si elle est inférieure à 1, la coopération est négative). Pour la CMP, m est proche de 1,20 ce qui suggère une coopération positive entre les molécules.

Afin d'améliorer la compréhension des mécanismes d'adsorption de la CMP, d'éventuelles libérations d'ions calcium et phosphates dans le surnageant ont été recherchées. Des études précédentes ont en effet montré que l'adsorption de certaines molécules, comme par exemple les bisphosphonates [170], [173] sur apatite biomimétique, provoquait la libération d'ions phosphates (sans impact significatif sur les ions calcium) de la surface des apatites, assurant donc un ancrage physique de la molécule sur son substrat. Dans notre étude, l'analyse des surnageants a cependant montré une présence d'ions calcium et phosphates dans des proportions très faibles. Après avoir pris en considération la quantité naturellement libérée due à la dissolution partielle de l'apatite dans le milieu, comme tout composé ionique, il a été possible de déterminer si une libération supplémentaire d'ions s'est effectuée. Ici, aucune tendance de libération supplémentaire n'a été observée lors de l'adsorption de différentes concentrations en CMP, laissant supposer qu'il n'y a pas d'échange ionique dans le cas de l'adsorption de la CMP.

c. Etude de la désorption

Afin d'affiner l'étude d'adsorption, un suivi de la désorption par dilution a été réalisé pour quelques points de l'isotherme : 250, 600 et 1000 mg/L. Après une heure d'adsorption, un volume connu de surnageant a été prélevé et remplacé par le même volume d'une solution de KCl (0,01 M). Après une heure d'immersion, le mélange a été centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm et le surnageant prélevé et mesuré par spectrophotométrie. L'addition d'ions phosphates lors de l'étude de désorption de la CMP a également été suivie par ajout de phosphate de potassium, KH_2PO_4 (concentration finale 18 mM). L'étude de désorption est présentée en Figure 30. Des points hypothétiques mimant aucun effet de la dilution, c'est-à-dire pas de désorption, ont été représentés entre parenthèses pour information.

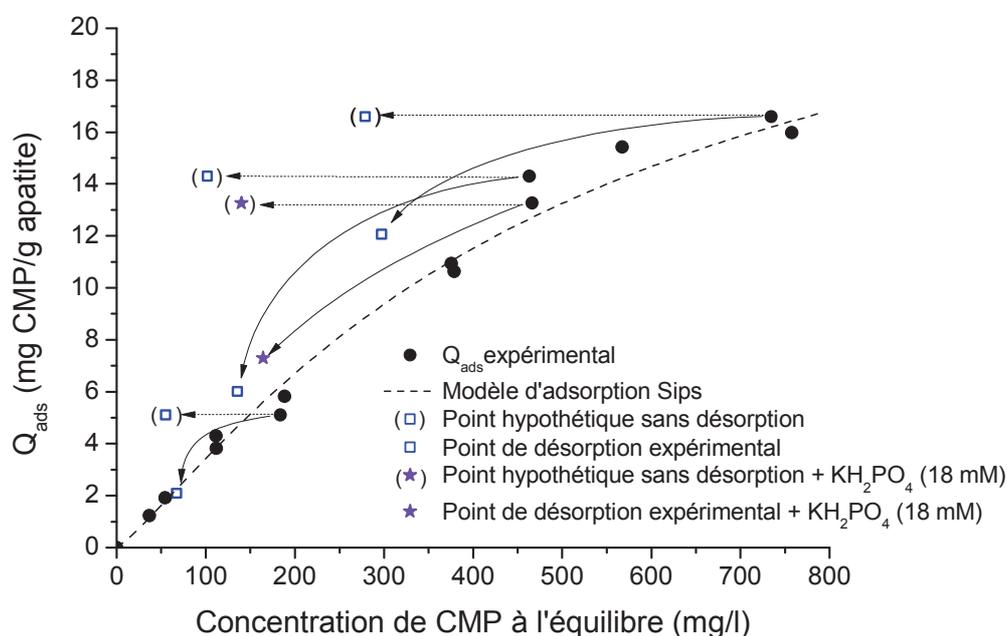


Figure 30 : Etude de la désorption de la CMP par dilution et effet de l'ajout d'ions phosphates

Pour chaque point étudié, la dilution provoque la désorption partielle de la CMP. Ce phénomène est représenté par les flèches arrondies. S'il s'agit d'une adsorption totalement réversible par simple dilution, les points de désorption devraient suivre l'isotherme d'adsorption. Dans cette étude de désorption de la CMP, les points ont tendance à suivre l'isotherme. Ils approchent clairement l'isotherme sans être parfaitement superposés à celui-ci. Dans l'ensemble, il peut être conclu que l'adsorption de la CMP sur cette apatite biomimétique apparaît réversible par dilution. Ces résultats sont en accord avec le fait que l'adsorption n'est pas accompagnée par une libération significative en ions phosphates dans le surnageant : ceci

met en évidence une fois de plus qu'il n'y a pas d'ancrage physique de la molécule à son substrat.

E. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence les mécanismes d'adsorption d'une molécule phosphatée modèle, la CMP, sur un substrat nanocristallin apatitique. L'isotherme d'adsorption suit le modèle de Sips (Langmuir-Freundlich), et suggère une adsorption coopérative entre les molécules de CMP. L'étude de la désorption par dilution et l'analyse des surnageants indiquent que l'adsorption est réversible, sans libération d'ions de la surface apatitique. Cette étude d'adsorption d'une molécule phosphatée à la surface d'une apatite biomimétique a servi de première étape pour la mise au point d'un protocole opératoire d'étude d'adsorption et l'exploration du mécanisme d'adsorption et de désorption.

2. Choix de l'actif anti-acnéique et étude d'adsorption

A. Choix de l'agent anti-acnéique : le phosphate de clindamycine (ClindP)

Le choix de l'actif pour l'application dermatologique visée ici s'est fait selon plusieurs critères principaux : avoir des propriétés anti-acnéiques reconnues (antibactérien, anti-séborrhéique, anti-inflammatoire...), pouvoir être administré par voie topique et avoir une bonne capacité d'interaction avec la surface de l'apatite (en lien avec des études précédentes d'interaction entre apatite et molécules phosphatées [156], [172], [174], [175]).

Parmi les anti-acnéiques actuellement employés, le phosphate de clindamycine est un bon candidat. Sa structure chimique est représentée en Figure 31a. Son groupement phosphaté laisse supposer une bonne affinité avec la surface apatitique.

Le phosphate de clindamycine (ClindP) n'est pas ou moins actif contre l'acné contrairement à la clindamycine, cependant il reste l'un des plus utilisés en raison de son passage dans la voie systémique plus faible que sa forme active, la clindamycine [176]. Les microorganismes présents à la surface cutanée ne permettent pas la déphosphatation du ClindP [176]. Cependant, son hydrolyse par des phosphatases alcalines et acides présentes au niveau de la peau (synthétisées par les polynucléaires neutrophiles lors de l'inflammation) permet de le transformer en molécule active, la clindamycine (Clind), dont la formule chimique est représentée en Figure 31b. Cette déphosphatation peut se produire sur une échelle de pH large (d'environ 4 à 8) [176].

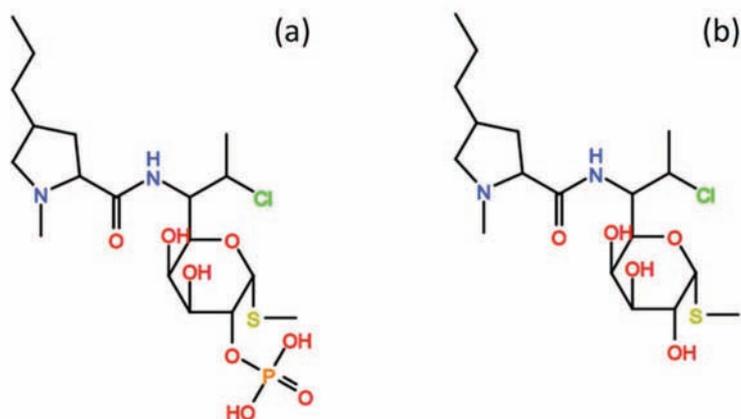


Figure 31 : Formules chimiques (a) du phosphate de clindamycine et (b) de la clindamycine

La clindamycine est un antibiotique utilisé comme anti-acnéique, indiqué pour le traitement de l'acné vulgaire légère à modérée, et plus généralement comme anti-infectieux. Elle peut être administrée par voie topique, orale et parentérale. Son utilisation par ces deux dernières voies peut entraîner des colites pseudomembraneuses graves. Les principaux effets néfastes liés à l'utilisation de la clindamycine par voie cutanée, dans les formulations actuelles, sont l'érythème, la desquamation, la sécheresse cutanée et les brûlures. Lors de son application topique, le risque d'absorption systémique partielle et la possibilité de survenue d'effets indésirables au niveau gastro-intestinal reste cependant à considérer.

Parmi les anti-acnéiques topiques existants, un effet de passage systémique chez l'Homme reste limité, à l'exception de la clindamycine qui peut provoquer des diarrhées et des colites pseudomembraneuses [3].

Une utilisation prolongée d'antibiotique peut engendrer une résistance bactérienne. La résistance bactérienne de *P. acnes* représente un réel problème d'enjeu mondial au niveau du traitement de la pathologie de l'acné [177] et peut varier en fonction de la géographie et du temps pour certaines espèces. Cette résistance se manifeste par une altération du site cible de la bactérie (altération de la séquence nucléotidique au niveau de la région peptidyltransferase de l'ARNr 23S) [178]. La résistance de *P. acnes* est plus élevée pour l'érythromycine, la tétracycline et la minocycline, et reste cependant plus faible pour la clindamycine.

L'utilisation des antibiotiques n'est pas à bannir car ils mènent à des résultats cliniques indéniables, mais des précautions sont à prendre en compte. Il est ainsi recommandé de ne pas utiliser d'antibiotique seul mais plutôt en combinaison avec d'autres antimicrobiens, comme le peroxyde de benzoyle [177], [179] ou encore l'acide azélaïque, permettant de réduire la résistance bactérienne tout en ayant une action complémentaire.

Dans le cadre de ces travaux de recherche, des essais ont été menés afin d'incorporer des antimicrobiens, tels que les ions zinc et/ou cuivre, au sein de la structure apatitique afin, à terme, de pouvoir multifonctionnaliser les particules avec du ClindP et ces ions et d'évaluer à terme leurs effets sur la diminution de la résistance bactérienne.

B. Etude de l'adsorption du ClindP sur une apatite non colloïdale

Dans la littérature, une première étude d'adsorption du ClindP a été réalisée sur des nanosphères composites à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) PLGA (90 %), associé à une apatite bien cristallisée (contenant 10% en masse de Clind) pour le traitement d'infections osseuses [180], [181]. Cette première étude renseigne sur la faisabilité d'adsorber du ClindP sur un substrat apatitique – bien que différent de par sa cristallinité et stœchiométrie des apatites biomimétiques utilisées dans ce travail – et sur l'étude de sa libération sur un mois [181].

a. Choix de l'apatite non colloïdale

Afin de se rapprocher le plus possible des caractéristiques de l'apatite contenue dans le colloïde, différents paramètres au niveau de la synthèse de l'apatite non colloïdale ont été modifiés, par rapport à la synthèse colloïdale, comme le temps de maturation ainsi que le pH de synthèse [122], [182], [183]. Les paramètres de synthèse ont en effet une influence sur les caractéristiques physico-chimiques des apatites nanocristallines en termes de non stœchiométrie, de présence de couche hydratée et d'état de cristallinité. L'influence de ces différents paramètres a été mise en évidence par la thèse de Nicolas Vandecandelaère [122], [165], illustrée par la Figure 32.

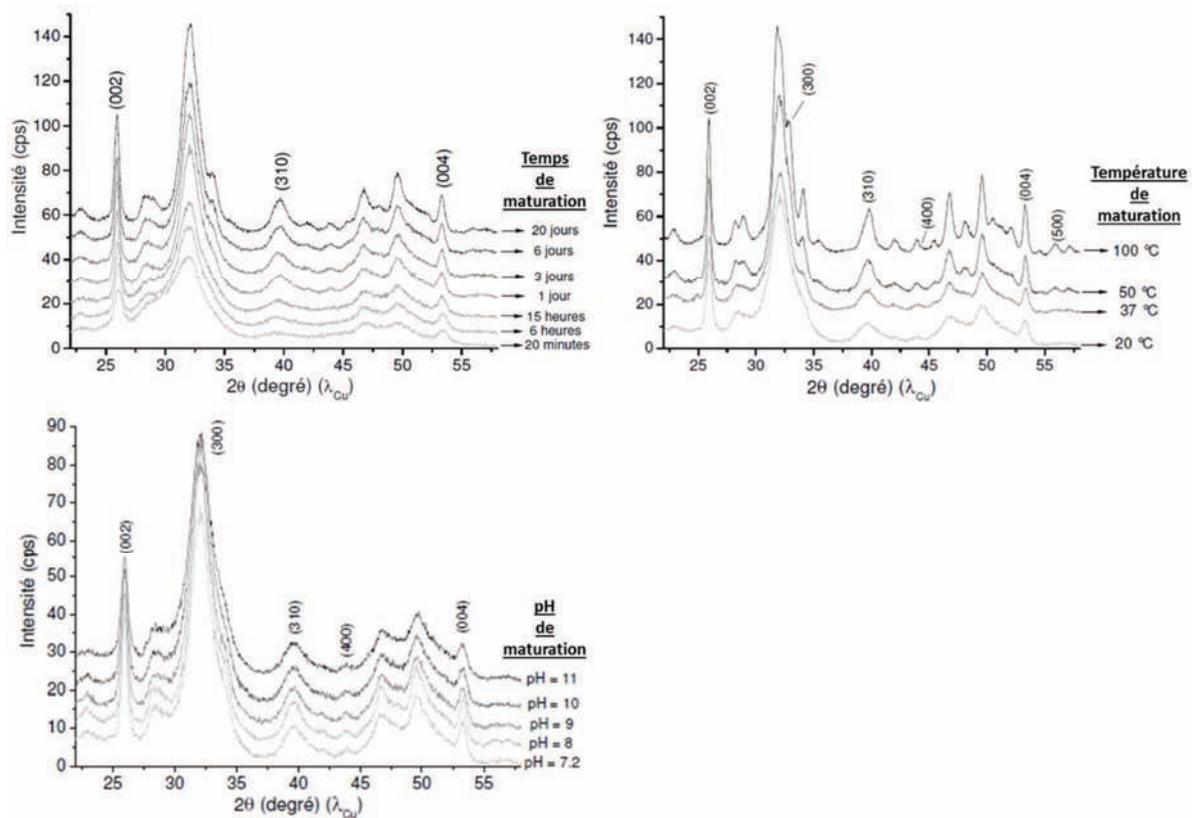


Figure 32 : Diagrammes de diffraction des rayons X représentant l'influence du temps (a) et de la température (b) et du pH (c) de maturation pour des apatites biomimétiques nanocristallines (tirés de la thèse de Nicolas Vandecandelaère [165])

Ces travaux ont montré que, pour un type de synthèse donné, quels que soient le temps, la température et le pH de maturation, tous les échantillons ont conservé une structure apatitique et aucune phase secondaire ne s'est formée. Dans ces travaux, plus la température et le temps de maturation augmentent, meilleure est l'organisation cristalline. Par ailleurs, bien que l'effet du pH soit beaucoup plus modéré par rapport aux deux autres paramètres, un pH basique pourra mener à une cristallinité paraissant moindre, en lien avec une plus forte carbonatation de l'apatite (les ions carbonate étant des inhibiteurs de croissance cristalline connus pour cette phase).

Ainsi le protocole de synthèse choisi et déjà établi au laboratoire, a consisté à coprecipiter en milieu aqueux, à température ambiante et à un pH proche du pH physiologique, du nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (52,2g dans 750 mL d'eau désionisée soit une concentration de 0,3 mol/L) et de l'hydrogénophosphate de di-ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (120 g dans 1500 mL d'eau désionisée soit une concentration de 0,6 mol/L). Le mélange a été laissé mûrir 15 jours à température ambiante. Il a ensuite été filtré sur Büchner et lavé à l'eau désionisée. Une étape de lyophilisation de 3 jours à une température comprise entre -50°C et -80°C sous une pression inférieure à 0,1 mbar, a été nécessaire afin d'enlever l'excès d'eau et

donc de sécher le matériau. La poudre a ensuite été séparée en 3 fractions granulométriques différentes par tamisage : $\varnothing < 100 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m} < \varnothing < 200 \mu\text{m}$ et $\varnothing > 200 \mu\text{m}$. La fraction retenue pour l'étude d'adsorption a été celle de diamètre inférieur à $100 \mu\text{m}$. L'apatite obtenue sera ainsi désignée par hap-15j pour le reste de l'étude.

b. Caractérisations physico-chimiques du substrat apatitique

Une analyse DRX, réalisée à l'aide du diffractomètre INEL Equinox 1000, muni d'une anticathode de cobalt ($\lambda_{\text{Co}} = 1,78892\text{\AA}$), a permis de confirmer la nature cristalline apatitique de l'hap-15j. Les raies caractéristiques d'une apatite phosphocalcique de faible cristallinité sont mises en évidence, pour cet échantillon, par le diagramme de DRX présenté en Figure 33. Les pics de diffractions (002) et (310) montrent la dimension nanométrique de l'échantillon, grâce à la formule de Scherrer avec une taille de cristallite d'environ $28 \pm 2 \text{ nm}$ de longueur et $6 \pm 2 \text{ nm}$ de largeur.

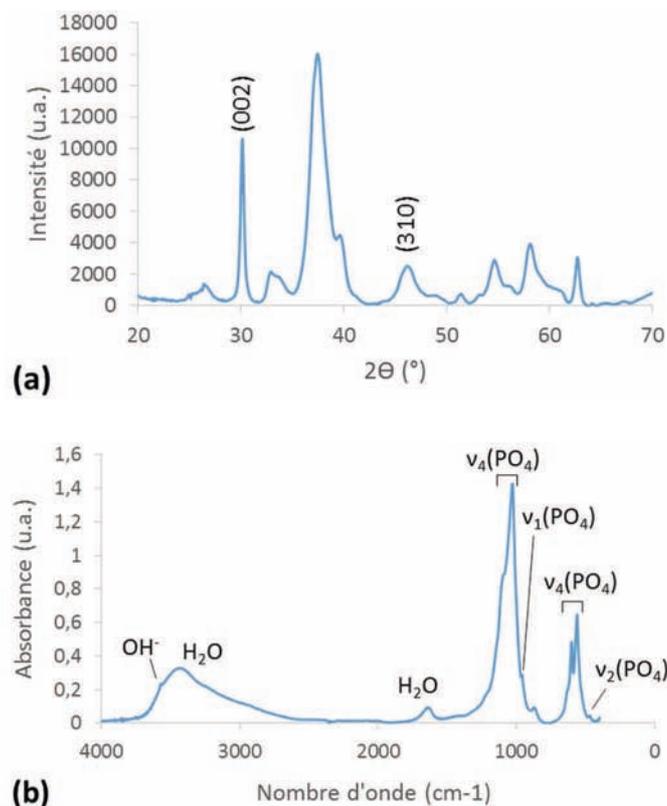


Figure 33 : (a) Diagramme de DRX et (b) spectre IRTF d'hap-15j

L'analyse IRTF, réalisée à l'aide du spectromètre infrarouge Thermo-Nicolet 5700 et présentée en Figure 33, confirme l'obtention d'une apatite biomimétique.

L'analyse de la surface spécifique a été réalisée sur un Microtrac BELSORP mini II (méthode BET basée sur l'adsorption d'azote). Elle indique une surface spécifique de $107 \pm 1 \text{ m}^2/\text{g}$. La teneur en ions calcium et phosphate a été évaluée par dosage complexométrique et spectrophotométrique respectivement. Le ratio molaire Ca/P de cette apatite (non carbonatée) est de 1,52, soit inférieur à celui l'apatite stœchiométrique (1,67) ce qui confirme la nature sous-stœchiométrique de l'apatite employée.

c. Dosage du ClindP

Deux principales techniques de dosage du ClindP et de ses dérivés sont décrites dans la littérature [184]–[187] : la spectroscopie UV et la chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) qui peut être couplée à un spectromètre de masse ou à un détecteur UV. La HPLC présente l'avantage de pouvoir séparer le ClindP de sa forme active, la clindamycine (Clind) et de la lincomycine (Linc, autre antibiotique pouvant être utilisé pour différentes infections (cutanées, respiratoires, digestives...), dont la différence avec la Clind est le remplacement du groupement chloré par une fonction alcool), dont les formules chimiques sont présentées en Figure 34.

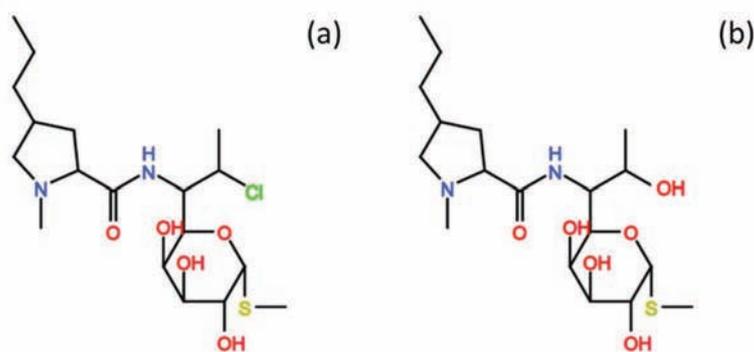


Figure 34 : Formules chimiques de la clindamycine (a) comparée à la lincomycine (b)

Pour cette étude, la HPLC couplée à l'UV a permis de vérifier la non dégradation du ClindP en Linc ou Clind suite à l'adsorption à la surface de l'apatite. Pour cela, 3 solutions de concentrations connues ont été passées à l'aide d'une HPLC ThermoScientific Spectra System équipée d'une colonne RP18 (5 μm , 25 cm x 4 mm). La méthode a été établie à partir de la littérature [185]. La phase mobile est constituée d'un mélange de 20 % d'acétonitrile et 80% d'un tampon phosphate (pH = 2,5, mélange d'une solution de NaH_2PO_4 (25 mM) et d'une solution de H_3PO_4 (25mM), 50 : 50 (v : v)) pour permettre la séparation du ClindP avec ses produits de dégradation. Chaque mesure s'est effectuée pendant dix minutes avec un suivi à la longueur d'onde de 210 nm. Le volume d'injection est de 20 μL et la température de la colonne

est maintenue à 40 °C. Les pics de séparation à différents temps du ClindP ainsi que de la Clind et la Linc sont présentés en Figure 35 .

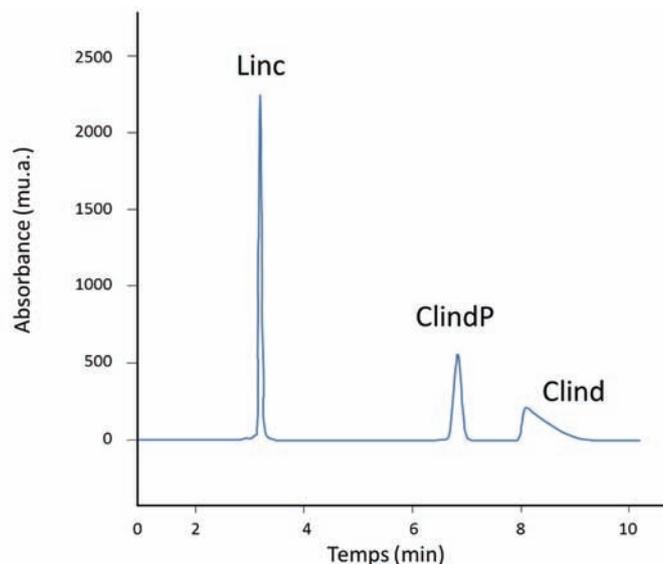


Figure 35 : Analyse HPLC/UV d'une injection (20 μ L) contenant un mélange de lincomycine (Linc), de phosphate de clindamycine (ClindP) et de clindamycine (Clind)

L'analyse HPLC permet ainsi de mesurer, par la méthode indiquée, la quantité de Linc (sortant à environ $3 \pm 0,5$ minutes), du ClindP (sortant à environ $7 \pm 0,5$ minutes) et de la Clind (sortant à environ $8 \pm 0,5$ minutes).

d. Etude de l'adsorption du ClindP sur substrat apatitique non colloïdale

Cette étude s'est basée sur notre étude préliminaire d'adsorption d'une molécule phosphatée modèle, la CMP, sur apatite biomimétique.

Cinétique d'adsorption

Afin d'évaluer le temps d'équilibre, la cinétique d'adsorption de la ClindP sur l'hap-15j a été réalisée par le suivi de la quantité de ClindP adsorbée en fonction du temps.

Une concentration initiale de 250 mg/L de ClindP dans une solution de KCl à 0,01M a permis d'obtenir la cinétique d'adsorption, à température ambiante et au pH physiologique. Les différents temps de contact testés étaient compris entre 5 minutes et 3 heures. De la même façon que pour la cinétique de la CMP, après dispersion de 20 mg d'hap-15j ($\varnothing < 100 \mu\text{m}$) dans un volume total de 5 ml d'une solution de ClindP, à différents temps de contact, les échantillons ont été centrifugés pendant 2 minutes à 5000 rpm. Le surnageant a ensuite été prélevé et analysé par HPLC. La Figure 36 montre que l'équilibre est atteint très rapidement, en moins de 10

minutes, à une quantité adsorbée d'environ 6 mg de ClindP / g d'apatite, pour une concentration initiale de 250 mg/L.

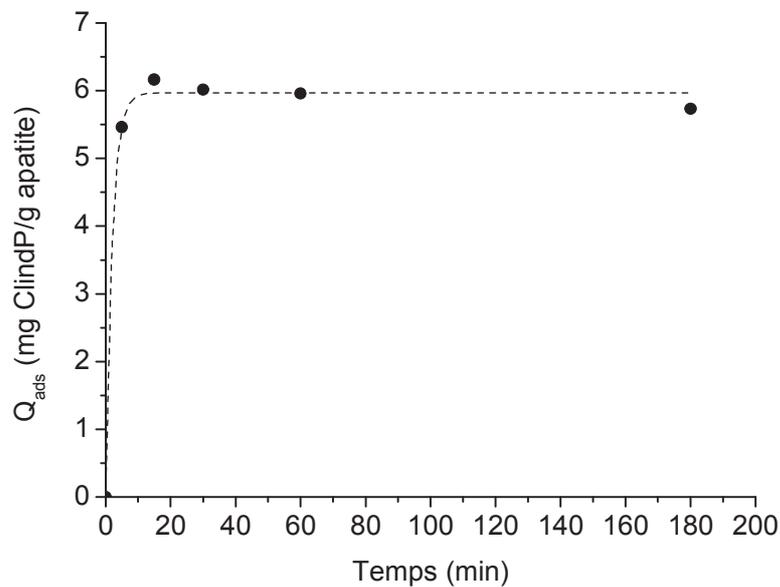


Figure 36 : Cinétique d'adsorption du ClindP sur de l'apatite biomimétique nanocristalline hap-15j à 25°C

Isotherme d'adsorption

Pour l'étude d'adsorption du ClindP sur l'apatite nanocristalline, 20 mg d'hap-15j, ayant une granulométrie inférieure à 100 µm, ont été dispersés dans 5 mL d'une solution de ClindP (KCl 0,01M) à température ambiante. La concentration de ClindP dans le surnageant a été mesurée par HPLC. De la même façon que pour la molécule modèle de CMP, la quantité de ClindP adsorbée a été calculée grâce à la formule suivante :

$$Q_{ads} = \frac{Q_i - Q_{sngt}}{m_{substrat}} \quad \text{Équation 10}$$

A partir de la cinétique précédemment obtenue, le temps choisi pour établir l'isotherme d'adsorption est d'une heure de contact entre l'apatite et la solution mère, afin de s'assurer que l'équilibre soit bien atteint. L'analyse des surnageants par HPLC/UV a permis d'établir l'isotherme d'adsorption (à 25°C) présenté en Figure 37.

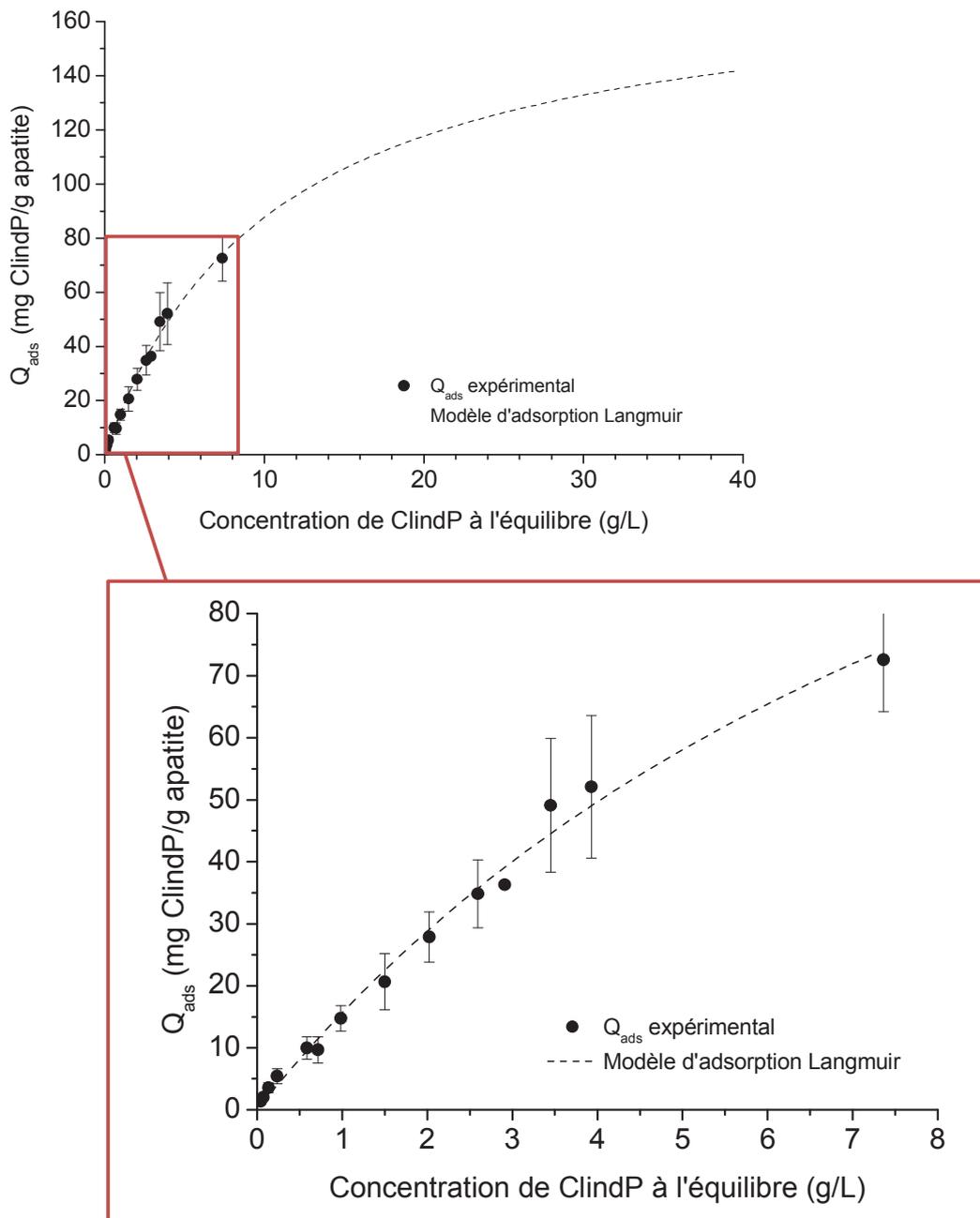


Figure 37 : Isotherme d'adsorption du ClindP sur de l'apatite biomimétique nanocristalline hap-15j à 25°C

Les différents modèles d'adsorption présentés précédemment (Langmuir, Freundlich, Sips (Langmuir-Freundlich)) ont été testés sur les résultats obtenus avec l'hap-15j, dans la gamme de concentration expérimentale 0-8 g/L. L'application de ces modèles aux données expérimentales a donné respectivement les coefficients de corrélation R^2 suivants : 0,99053, 0,98325 et 0,99046. Ces résultats indiquent que le modèle de Freundlich est moins en adéquation avec les valeurs de l'isotherme que les deux autres modèles, qui apparaissent plus

adaptés. Le modèle de Langmuir semble en particulier le mieux décrire le comportement à l'adsorption du ClindP sur hap-15j, tout au moins sur la gamme de concentration 0-8 g/L, suggérant la formation d'une monocouche de ClindP à la surface de l'apatite et des interactions négligeables entre molécules adsorbées. Les paramètres de Langmuir permettant de décrire l'isotherme sont $Q_m = 179 \pm 22$ mg/g d'apatite (soit $3,31 \pm 0,41$ $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) et $K_s = 0,096 \pm 0,016$ L/g. Il est à signaler cependant que cette valeur de Q_m n'a pas été atteinte dans notre étude, limitée à des concentrations inférieures à 10 g/L en ClindP. Ici, le point expérimental obtenu pour la concentration à l'équilibre maximale testée (d'environ 7,4 g/L) mène à une quantité adsorbée Q_{ads} de l'ordre de 72,5 mg/g, soit 1,34 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (ou encore 0,81 molécules/nm²). Moyennant une hypothèse sur l'orientation des molécules de ClindP à l'état adsorbé, il est possible de calculer, en première approximation, le taux de recouvrement (fraction de surface occupée par ClindP) atteint pour une concentration donnée. En supposant par exemple que les molécules de ClindP s'adsorbent via le groupement phosphate sur la surface apatitique, le reste de la molécule demeurant orientée vers la solution (Figure 38) une modélisation spatiale (logiciel ArgusLab 4.0.1) de la molécule mène alors à considérer la forme projetée de la molécule sur la surface comme une ellipse présentant une aire d'environ 32 Å². Pour une concentration à l'équilibre de 7,4 g/L, la surface totale occupée par les molécules de ClindP est alors estimée à 28 m², soit un taux de recouvrement de la surface de l'ordre de 26%. Bien que ce chiffre soit basé sur une hypothèse d'orientation des molécules, elle donne déjà une approximation (minimale) du taux de recouvrement effectif.

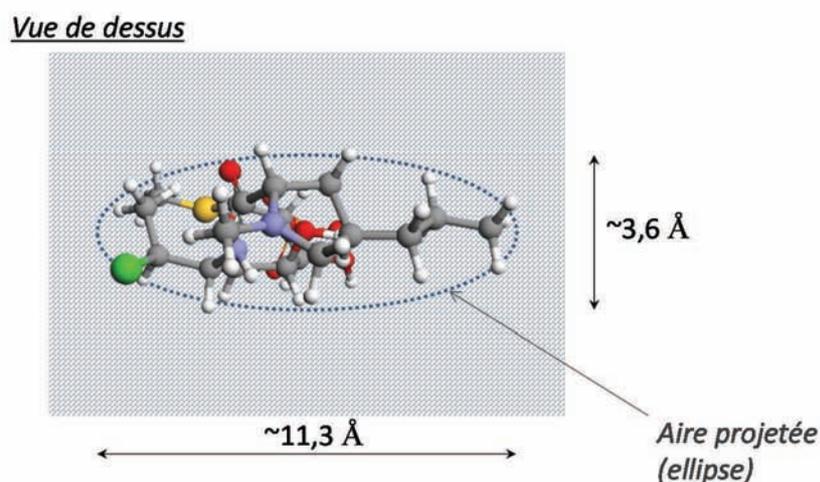
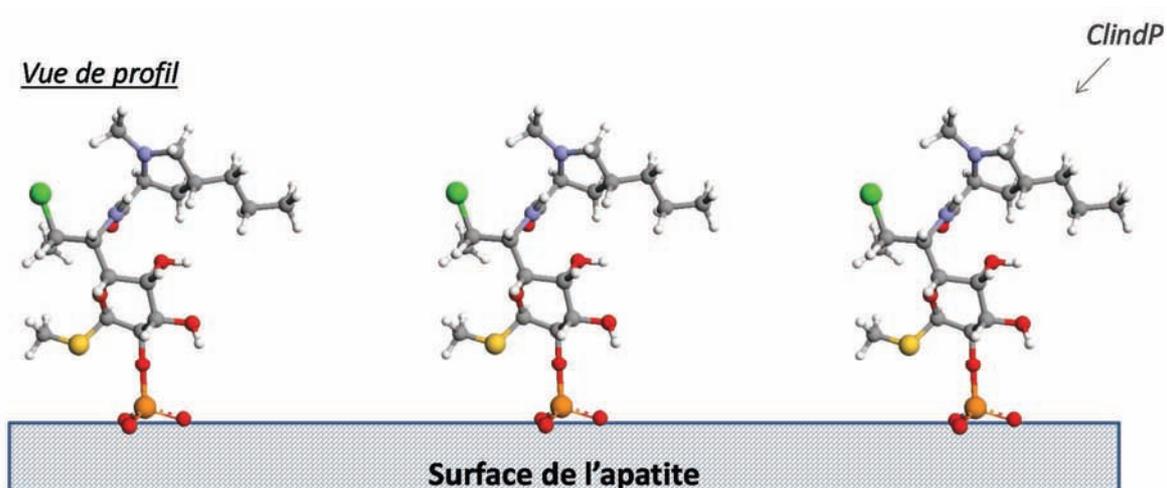


Figure 38 : Modélisation spatiale du ClindP (ArgusLab 4.0.1) et de son adsorption sur l'apatite nanocristalline

A ce stade, il peut également être intéressant de comparer les quantités de ClindP adsorbées dans cette étude à celles reportées pour d'autres molécules dans la littérature, telles que des bisphosphonates (ex : tiludronate de sodium, $Q_m \sim 2,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, [170]) connus pour présenter une forte interaction avec les apatites, ou encore la tétracycline ($Q_m \sim 0,68 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, [139]) qui au contraire ne présente pas de groupement chimique présentant une affinité notoire pour l'apatite. Cependant la valeur théorique de Q_m pour ClindP suggérée par la modélisation de Langmuir indique une valeur ($Q_m \sim 179 \text{ mg}/\text{g}$) non atteignable dans des conditions d'utilisation potentielle d'un tel principe actif, notamment pour des raisons de coûts. Il est possible de comparer néanmoins les quantités adsorbées pour différentes molécules à une concentration à l'équilibre donnée, et pour des surfaces apatitiques relativement équivalentes (ex : pour des apatites nanocristallines non carbonatées). Par exemple, la Figure 39 présente

une comparaison d'isothermes d'adsorption obtenus sur substrats apatitiques biomimétiques pour trois principes actifs différents (tiludronate de sodium, tétracycline, et ClindP).

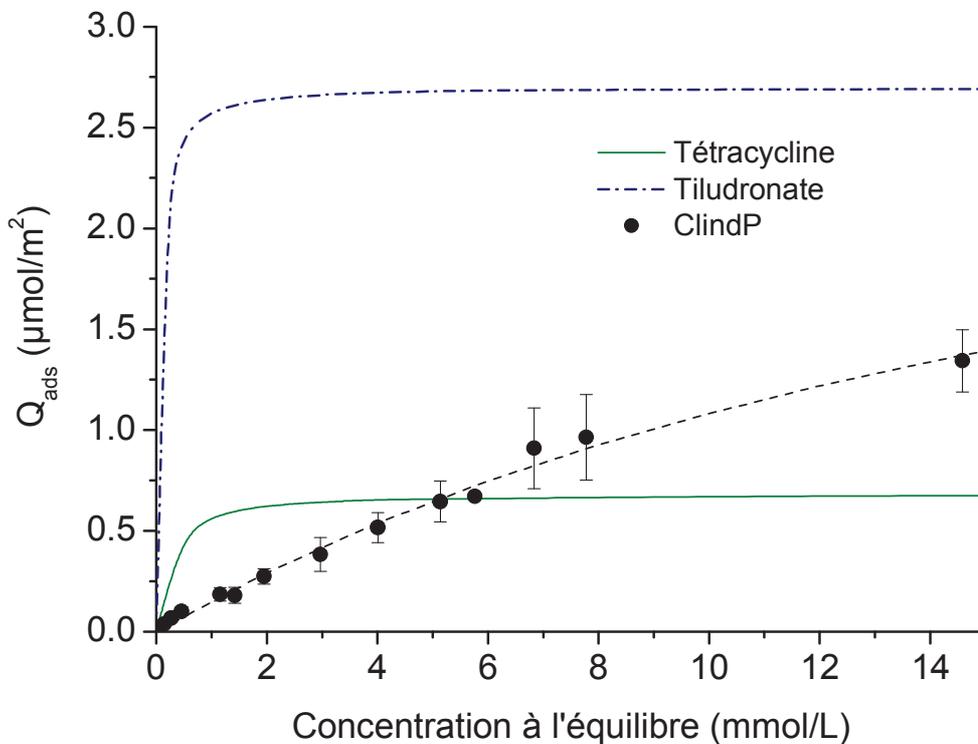


Figure 39 : Evolution comparative des capacités d'adsorption de trois molécules (tétracycline, tiludronate, ClindP) sur apatites nanocristallines

Sur ce graphique, on peut remarquer que, bien que l'affinité de ClindP pour la surface apatitique apparaisse moins élevée (pente à l'origine plus faible) que pour la tétracycline et le tiludronate, pour des concentrations molaires à l'équilibre supérieures à 5 mmol/L, la quantité adsorbée de ClindP par m^2 d'apatite devient plus importante que celle de la tétracycline.

Etude de la désorption

Le suivi de la désorption s'est fait par simple dilution pour l'ensemble des points de l'isotherme. Suite à l'adsorption, un volume connu de surnageant a été prélevé et remplacé par le même volume d'une solution de KCl (0,01 M). Après une heure d'immersion, le mélange a été centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm et le surnageant prélevé et mesuré par HPLC. L'étude de désorption est présentée en Figure 40.

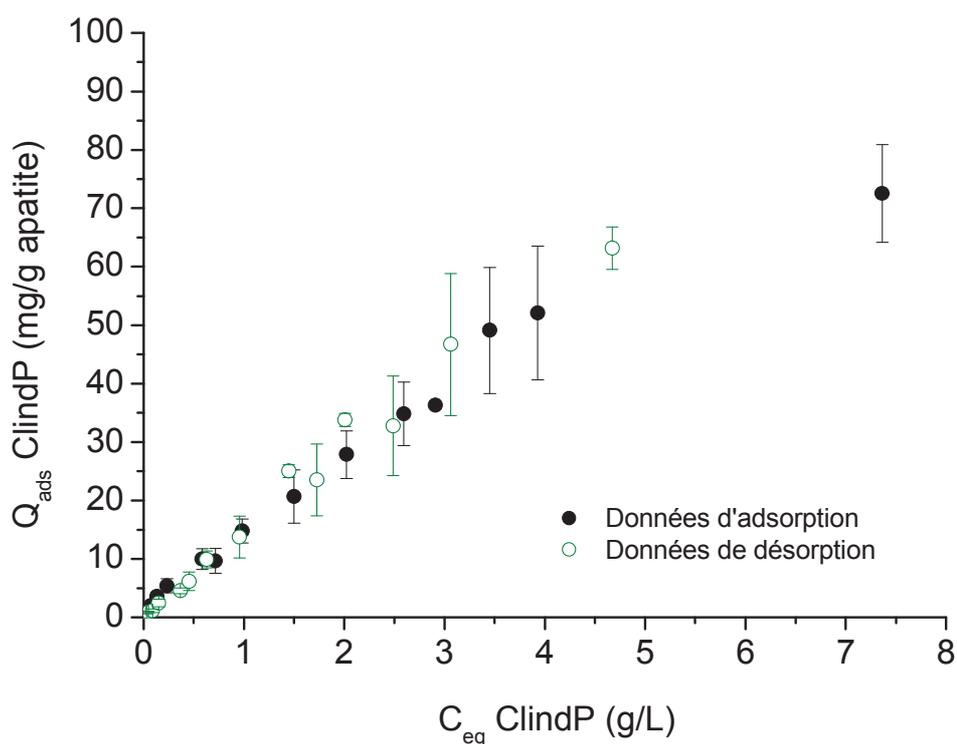


Figure 40 : Etude de la désorption du ClindP par dilution

Pour chaque point, la dilution provoque la désorption partielle du ClindP. Les points de désorption semblent suivre l'isotherme. Comme pour la CMP, ils approchent clairement l'isotherme sans être parfaitement superposés à celui-ci. De manière générale, l'adsorption du ClindP sur cette apatite biomimétique apparaît réversible par dilution. Ceci semble traduire, comme pour la CMP, d'une absence d'ancrage de la molécule à son substrat.

Conclusion

Ces travaux ont permis d'étudier le comportement du ClindP à la surface d'une apatite biomimétique, l'hap-15j, dont les modalités de synthèse et de caractérisation ont été présentées ci-avant. L'isotherme d'adsorption, établi pour un temps de contact permettant d'atteindre l'équilibre, semble suivre le modèle de Langmuir, suggérant l'adsorption du ClindP vers la formation d'une monocouche en surface de l'apatite et sans interaction intermoléculaire notable. L'étude de la désorption de ClindP par simple dilution a mis en évidence, comme dans le cas de l'adsorption de CMP sur apatite biomimétique, une adsorption réversible et ainsi, une libération du PA par dilution, sans mise en évidence d'un processus plus complexe impliquant un échange ionique.

C. Etude de l'adsorption du ClindP sur un colloïde apatitique

a. Synthèse du colloïde

La synthèse du colloïde apatitique au (PEG)P 5200 est décrite dans le chapitre II, le paragraphe 1 de la partie II, et ses caractérisations physico-chimiques dans la partie II paragraphe 4. En résumé, une solution de nitrate de calcium (4,87 mmol) et de (PEG)P 5200 (0,08 mmol) est mélangée à une solution d'hydrogénophosphate de di-ammonium (1,62 mmol) à pH 9,5. La solution est ensuite placée à 100°C pendant 16h, pour maturation.

b. Etude de l'adsorption du ClindP sur les particules colloïdales

Les points de l'isotherme d'adsorption ont été mesurés à l'aide d'une HPLC ThermoScientific Spectra System équipée d'une colonne RP18 (5 µm, 25 cm x 4 mm). La technique employée est la même que précédemment (phase mobile : 20 % d'acétonitrile, 80% d'un tampon phosphate (25 mM, pH = 2.5), volume d'injection : 20 µL, longueur d'onde : 210 nm, temps d'analyse : 10 minutes, température de la colonne : 40°C) pour permettre la séparation du ClindP avec ses produits éventuels de dégradation. Le temps de contact entre les solutions de ClindP (dans KCl 0,01 M et à pH 7) et les colloïdes au (PEG)P 5200 (ramenés à pH 7 par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique dilué) a été fixé comme précédemment à 1 heure (sous agitation). Pour chaque point de l'isotherme, un rapport colloïde : solution ClindP (v : v) de 5 : 1 a été fixé. Ainsi 1,6 mL de solution de ClindP, de concentrations définies pour l'isotherme d'adsorption, a été mélangé à 8 mL de colloïde. Les différentes concentrations des solutions mères de ClindP testées sont : 1,5 ; 6 ; 15 ; 30 ; 60 et 90 g / L soit des concentrations finales respectives (après mélange avec le colloïde) de 0,25 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 15 g / L. Suite à une heure de contact, chaque colloïde a été dialysé selon le même protocole de dialyse que précédemment, établi préalablement au laboratoire [163]. La concentration finale après dialyse de chaque colloïde a été mesurée par HPLC comme indiqué.

Suite à un premier essai d'adsorption, le colloïde a été lyophilisé après dialyse, afin de vérifier la conservation de la structure apatitique des particules. Les résultats sont présentés en Figure 41.

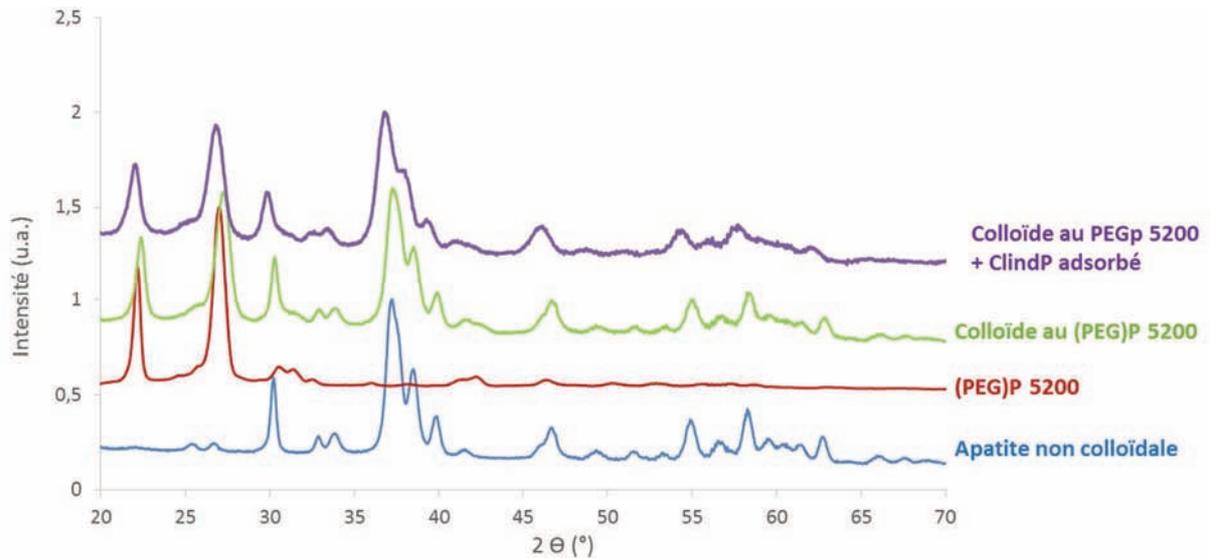


Figure 41 : Diffractogramme X : effet de l'adsorption du ClindP

Suite à l'adsorption du ClindP sur les particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 (pour une concentration initiale dans cet exemple de 1 g/L, menant à une concentration à l'équilibre de 0,84 g/L et à $Q_{ads} = 36,52$ mg/g), il peut être noté (Figure 41) que la nature apatitique des particules est préservée, bien qu'une légère diminution de la cristallinité des particules soit détectée (ce qui peut notamment être mis en évidence au niveau des raies (112) et (300) sur la Figure 41). Le taux de cristallinité peut être ici évalué à environ 77% (par application comme précédemment de la norme ISO 13779-3 : 2008), à comparer à 82% pour le colloïde initial. Ce phénomène peut cependant s'expliquer par l'ajout, dans ce cas, d'une étape supplémentaire de dialyse permettant une possible dissolution-reprécipitation très partielle, en surface de l'apatite (n'occasionnant pas de modification détectable des propriétés du colloïde). Les tailles moyennes de cristallites après adsorption dans l'exemple ci-dessus (longueur moyenne ~ 24 nm et largeur/épaisseur moyenne ~ 11 nm) restent très similaires à celles du colloïde avant adsorption (~ 24 et ~ 12 nm respectivement, voir la partie I.4.A de ce chapitre).

L'adsorption a ainsi été réalisée sur les particules colloïdales à différentes concentrations comprises entre 0,25 et 15 g/L. L'isotherme, présenté en Figure 42, met en évidence (de manière reproductible) une première courbure dans la gamme 0 - 10 g/L suivie d'une inflexion pour des concentrations supérieures.

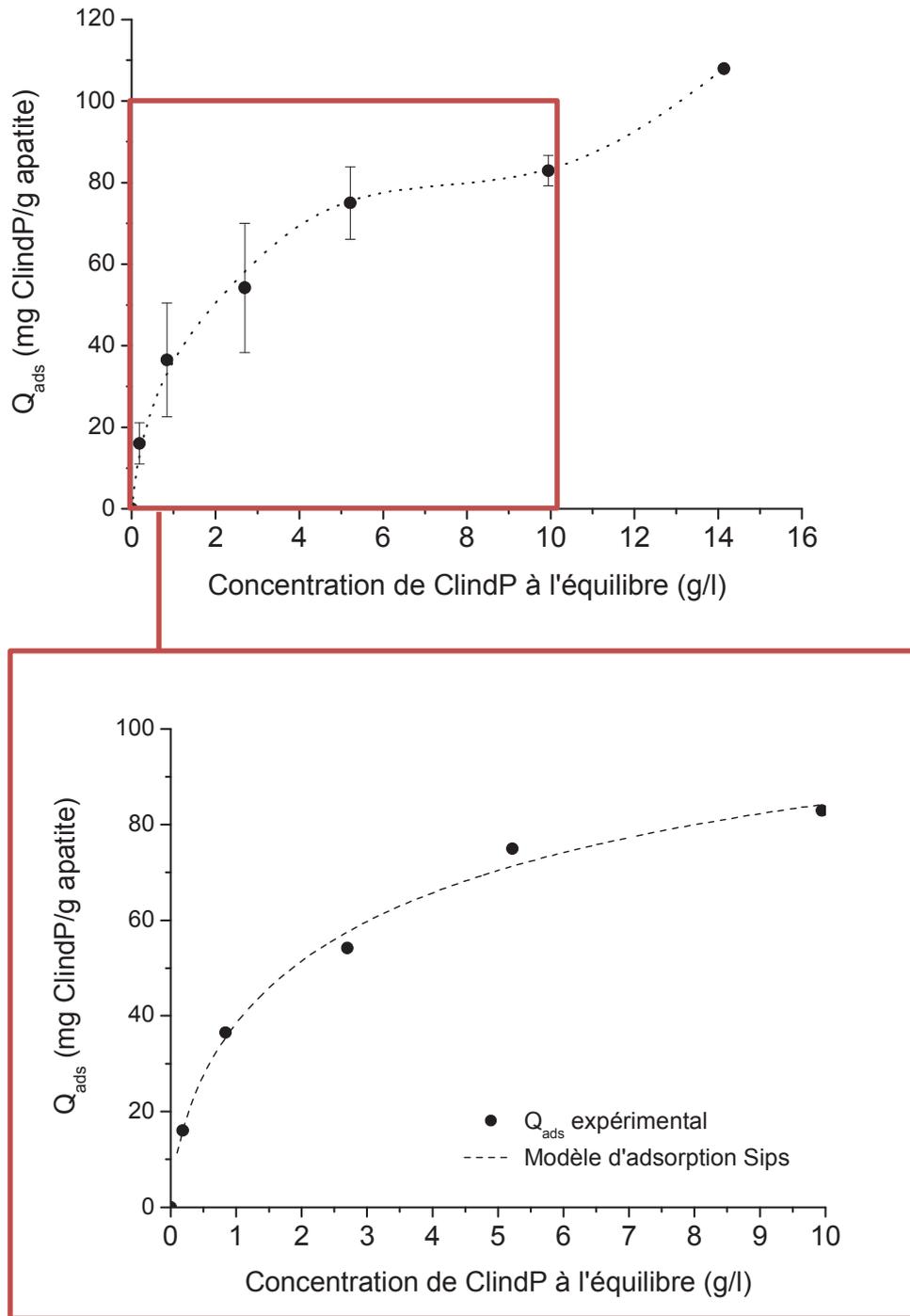


Figure 42 : Isotherme d'adsorption du ClindP sur l'apatite colloïdale stabilisée au (PEG)P 5200 à 25°C

Ce type d'évolution pourrait s'expliquer par la formation, pour des concentrations élevées, d'une seconde « couche » d'adsorbat en interaction avec les premières molécules fixées, et non plus directement avec la surface des particules. Une autre hypothèse pouvant possiblement expliquer ce phénomène impliquerait la formation d'un sel de calcium de ClindP, favorisée à haute concentration. Dans les deux, cette situation (mise en évidence à hautes

concentrations) n'est pas souhaitée : en effet, une interaction directe entre les molécules de ClindP et la surface des particules colloïdales est recherchée ici afin d'en contrôler la libération. Ainsi, la gamme de concentration sélectionnée pour la suite de ce travail sur colloïdes est comprise entre 0 et 10 g/L. Dans ce domaine de concentration, l'isotherme d'adsorption met en évidence une quantité adsorbée maximale de l'ordre de 83 mg/g d'apatite (obtenue pour une concentration à l'équilibre de ~ 10 g/L). La modélisation mathématique de l'isotherme dans cette zone de concentration indique que le modèle de Sips est celui qui permet le mieux de décrire l'évolution des données expérimentales (coefficient de corrélation $R^2 = 0,9914$, contre 0,9804 pour Langmuir et 0,9671 pour Freundlich), avec les paramètres $K_S = 0,42 \pm 0,17$ (L/g)^{0,64} et $m = 0,64 \pm 0,14$. Cette valeur de m , significativement inférieure à 1, suggère une situation où les interactions moléculaires peuvent devenir non négligeables et évoquant une « coopérativité négative » entre molécules adsorbées, voire une augmentation de l'hétérogénéité de surface, ce qui semble pouvoir être relié à la présence en surface des particules colloïdales de molécules de (PEG)P 5200. A l'inverse, le modèle de Langmuir était le modèle le plus adapté pour décrire l'adsorption de ClindP sur apatite non colloïdale, qui ne présentait pas de pré-adsorption de molécules organiques. Ainsi, il peut être suggéré que la pré-adsorption de (PEG)P 5200 modifie le comportement à l'adsorption des molécules de ClindP, et mène à une situation où les adsorbats entrent en interaction.

A ce stade, il peut être intéressant de comparer les isothermes obtenus pour les particules colloïdales et non colloïdales, en ramenant les quantités adsorbées par unité de surface. Cependant, la mesure d'adsorption d'azote par méthode BET sur l'échantillon colloïdal ne peut être fiable en raison de la nécessité de sécher/lyophiliser le colloïde, modifiant alors la valeur de surface spécifique à cause d'un phénomène d'agrégation. En échelle massique (Q_{ads} exprimée par gramme d'apatite), les quantités adsorbées pour une concentration de ClindP à l'équilibre de 7,4 g/L (concentration maximale testée pour l'apatite non colloïdale) sont respectivement de $Q_{ads} = 72,5$ mg/g en condition non colloïdale et de $Q_{ads} = 78,5$ mg/g en condition colloïdale. Ces valeurs massiques sont du même ordre de grandeur (elles font cependant référence à deux substrats présentant des surfaces spécifiques potentiellement différentes et donc à des taux de recouvrement par unité de surface distincts).

3. Dopage en différents ions biologiquement actifs

Le ClindP possède des propriétés anti-acnéiques principalement par son rôle antibactérien contre *P. acnes*, le principal agent pathogène de la maladie de l'acné. Sa forme active, la Clind, est reconnue comme ayant une meilleure activité que l'érythromycine ou la tétracycline, cependant le risque de résistance de *P. acnes* face à l'utilisation de ces antibiotiques est non négligeable [80], [179]. Ainsi, il est conseillé de ne pas utiliser ces antibiotiques seuls mais en combinaison avec d'autres agents anti-acnéiques, comme par exemple le peroxyde de benzoyle ou des rétinoïdes topiques. Une étude réalisée par Dreno et al.[81], démontre que la résistance bactérienne de *P. acnes* peut être modulée en fonction de la dose de gluconate de zinc par voie orale ajoutée à un traitement à l'érythromycine par voie topique, par l'activité bactériostatique du zinc. Cette étude a permis de mettre en évidence que l'activité anti-inflammatoire du zinc n'a pas été modifiée en présence de souche bactérienne résistante à l'érythromycine. Elle a également mis en évidence que l'ajout de sels de zinc dans le milieu de culture de *P. acnes*, *in vitro*, permet de réduire de la résistance de la bactérie à l'érythromycine.

De plus, il existe, actuellement disponible dans le commerce, une préparation à base de ClindP et de sel de zinc, le Zindacline ®, dont une étude a démontré l'efficacité du zinc, sur la diminution d'absorption systémique de la Clind suite à l'application de la préparation par voie topique [188]. Cette étude a également permis de montrer l'efficacité du zinc sur la complaisance des patients. En effet, une telle préparation permettrait de réduire la fréquence d'application par deux par rapport à une lotion de Clind seule, en raison d'une meilleure efficacité de traitement en couplant le zinc à la Clind.

Il a donc été intéressant de pouvoir tester le dopage en différents ions ayant des propriétés antibactériennes, comme par exemple le cuivre et le zinc, pour ensuite pouvoir évaluer leurs effets sur *P. acnes* (diminution de la résistance contre le ClindP, augmentation de l'efficacité contre *P. acnes*). Des études précédentes ont été réalisées au sein du laboratoire, et ont montré la faisabilité d'enrichir des apatites biomimétiques nanocristallines non colloïdales en ions cuivre et zinc [165].

A. Les propriétés du zinc en dermo-cosmétique

Le zinc et ses sels sont très utilisés dans de nombreuses préparations pour différentes propriétés. En fonction du type de sel, il peut être utilisé comme photo-protecteur dans des produits solaires (oxyde de zinc), comme agent apaisant (oxyde de zinc (calamine)) contre les

coups de soleil, l'eczéma ou les piqûres d'insectes, ou encore comme agent antipelliculaire (zinc pyrithione) dans les shampoings.

En dermatologie, il est très employé pour plusieurs types de pathologies : les infections comme par exemple les verrues, les dermatoses inflammatoires (acné vulgaire et rosacée), les maladies pigmentaires (mélasma) et contre la néoplasie [189].

Dans le cas de la pathologie de l'acné, il est utilisé par voie orale et topique. Au niveau oral, le sulfate de zinc est reconnu pour être efficace dans le traitement de l'acné sévère et inflammatoire, et aussi contre l'acné conglobata [190] et l'être moins pour l'acné légère à modérée [191]. Au niveau topique, l'acétate de zinc et le gluconate de zinc sont principalement utilisés, avec ou sans antibiotique. Le mécanisme d'action du zinc et de ses sels reste mal connu et à élucider. Seul ou en tant qu'adjuvant, ils possèderaient une action sur les cytokines inflammatoires [189]. Ils permettraient également de limiter le développement de *P. acnes*, et également de réduire la quantité d'acides gras libres produits [192].

B. Les propriétés du cuivre en dermo-cosmétique

Le cuivre est beaucoup moins utilisé en dermo-cosmétique. Cependant il reste connu pour ses propriétés cicatrisantes, régénérantes, apaisantes, antibactériennes et anti-inflammatoires. Il est actuellement présent dans certaines formulations présentes sur le marché de la dermo-cosmétique, comme par exemple dans la crème réparatrice Cicalfate® d'Avène et Dermalibour® d'A-DERMA, proposées par le laboratoire Pierre Fabre. Ces crèmes associent le sulfate de cuivre et le sulfate de zinc pour leur action assainissante.

C. Etude des enrichissements de particules d'apatite colloïdales en ions zinc et/ou cuivre

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire [165] montrent la possibilité d'enrichir des apatites nanocristallines (non colloïdales) en ions zinc et cuivre tout en conservant la structure de l'apatite (jusqu'à une limite de substitution du calcium). Leur bonne biocompatibilité ainsi que leur bonne efficacité antibactérienne sur différentes souches, en font de bons candidats pour des applications biomédicales. La substitution d'ions calcium par des ions zinc et/ou cuivre a été fixée ici à 5% chacun.

a. Synthèse

Le protocole de référence pour la synthèse des colloïdes au (PEG)P 5200, décrit dans la partie I.1.A de ce chapitre, a été employé pour l'enrichissement en ions zinc et/ou cuivre, mais en substitution d'une partie du nitrate de calcium par du nitrate de zinc et/ou cuivre.

En résumé, une solution A, contenant du nitrate de calcium (4,63 mmol, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), le ou les ions de substitution choisis sous forme de sels ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et / ou $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, dont les proportions sont indiquées dans le Tableau 13) et un agent dispersant (0,076 mmol, (PEG)P 5200) dans un volume total de 18,75 mL (pH = 9,5), est mélangée à température ambiante à une solution B, contenant du di-ammonium hydrogénophosphate (1,62 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans 6,25 mL d'eau déminéralisée (pH = 9,5). Après ajustement du pH du mélange à 9,5, le précipité est placé à 100°C pendant 16 heures pour la maturation.

Tableau 13 : Concentrations en cations employées dans la synthèse d'apatites nanocristallines colloïdales enrichies en diverses teneurs en ions zinc et/ou cuivre

<i>Référence de l'échantillon</i>	<i>[Ca²⁺] dans la solution A (mol/L)</i>	<i>[ions de substitution] dans la solution A (mol/L)</i>	<i>% molaire initiale</i>
(PEG)P 5200-Zn5%	0,25	[Zn ²⁺] = 0,01	5%
(PEG)P 5200-Cu5%	0,25	[Cu ²⁺] = 0,01	5%
(PEG)P 5200-Zn5% + Cu5%	0,23	[Zn ²⁺] + [Cu ²⁺] = 0,01 + 0,01	5 + 5 = 10 %

b. Caractérisations physico-chimiques

Des analyses DRX de chaque échantillon ont été réalisées à l'aide du diffractomètre INEL Equinox 1000, muni d'une anticathode de cobalt ($\lambda_{\text{Co}} = 1,78892\text{Å}$) dont les diffractogrammes sont présentés en Figure 43.

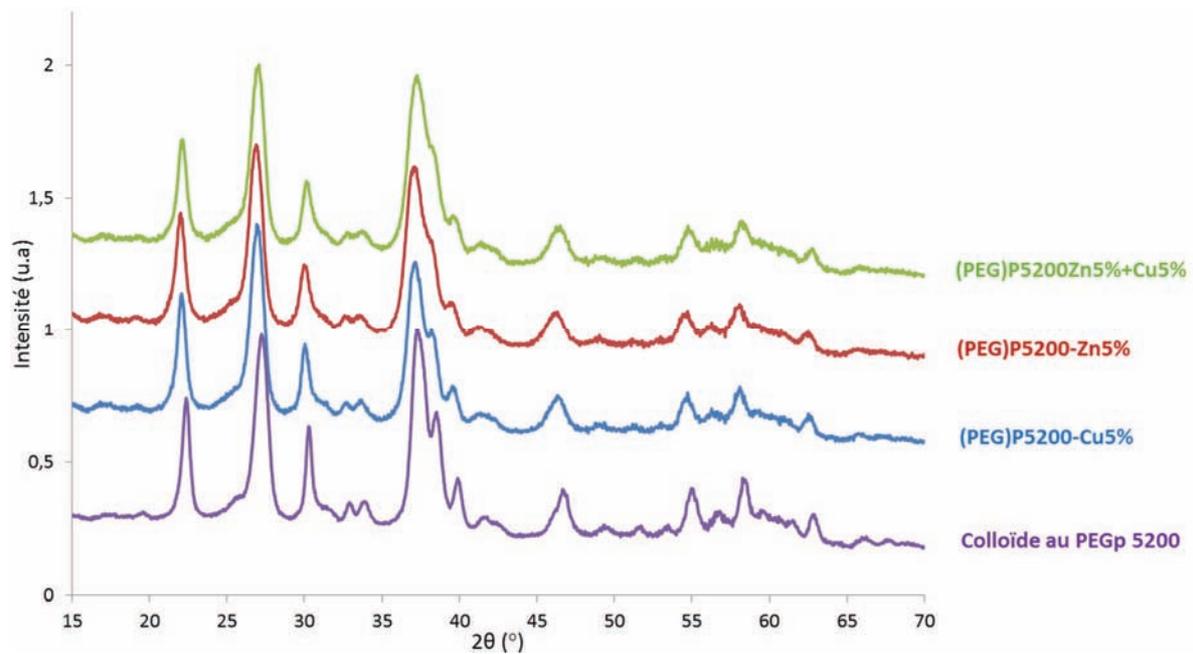


Figure 43 : Diffractogrammes des différentes apatites nanocristallines colloïdales enrichies en zinc et/ou cuivre

Quel que soit l'échantillon, les analyses DRX n'ont permis de détecter aucune trace d'une phase cristalline secondaire aux côtés de l'apatite, et en particulier d'hydroxyde, d'oxyde, ou de phosphate de zinc ou de cuivre. De plus, une diminution de l'état de cristallinité apparaît en présence des ions en question par rapport au colloïde non dopé. L'application, comme précédemment, de la norme ISO 13779-3 : 2008 indique en effet une diminution du taux de cristallinité liée à ces dopages, passant d'environ 82% pour le colloïde non dopé à environ 55% pour les colloïdes dopés. Une telle variation suggère ainsi l'incorporation effective d'ions Cu^{2+} et/ou Zn^{2+} dans le réseau apatitique, et non pas la précipitation d'une phase secondaire.

Par ailleurs, une possible modification des paramètres de maille de la phase apatitique pourrait informer également sur l'incorporation des ions cuivre et/ou zinc dans la structure. Ces paramètres peuvent être estimés sur la base d'un affinement de type Le Bail – *profile fitting*. Il est à noter cependant qu'une plus grande incertitude entache la valeur du paramètre a (aucune raie de diffraction de type $(h00)$ n'étant détectable sur le diagramme X) que celle du paramètre c , pour lequel les raies (002) et (004) sont accessibles. L'affinement de type Le Bail (réalisé à l'aide du logiciel JANA) suggère ici une diminution systématique de la valeur du paramètre c pour les échantillons dopés ($c \sim 6,8832 \text{ \AA}$ pour Zn^{2+} et $c \sim 6,8850 \text{ \AA}$ pour Cu^{2+}) en comparaison au composé non dopé ($c \sim 6,8957 \text{ \AA}$). Or, une telle diminution est effectivement attendue dans le cas d'une substitution ionique d'ions Ca^{2+} (rayon ionique $\sim 1,00 \text{ \AA}$) par des ions de taille inférieure ($\sim 0,75 \text{ \AA}$ pour Zn^{2+} et $0,73 \text{ \AA}$ pour Cu^{2+}) [193]. De plus, une diminution des

paramètres cristallins apatitiques a été notée dans une étude préalable au laboratoire [165] sur des apatites non colloïdales dopées en ions Zn^{2+} ou Cu^{2+} , corroborant ces observations.

Bien que des expérimentations supplémentaires pourront être menées, notamment impliquant des taux différents de dopants zinc et cuivre, ces résultats confirment que dans les conditions testées ici la nature apatitique des particules colloïdales est bien conservée en présence des ions zinc et/ou cuivre en substitution d'ions calcium.

Une analyse par spectroscopie infrarouge a également été réalisée sur chaque échantillon et est présentée en Figure 44. Les bandes caractéristiques du colloïde apatitique stabilisé au (PEG)P 5200 sont présentes pour chaque échantillon.

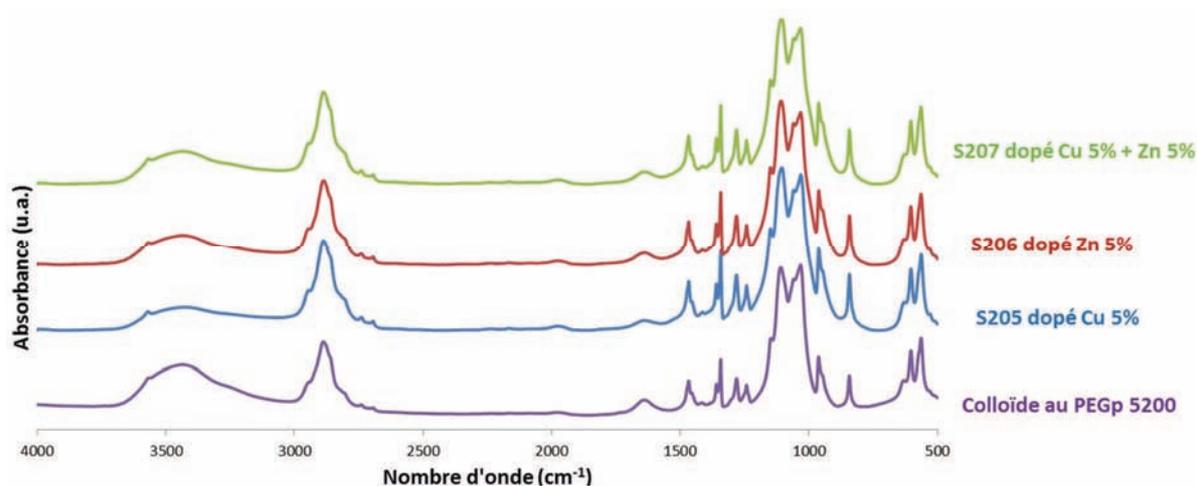


Figure 44 : Spectres IR des différentes apatites nanocristallines colloïdales enrichies en zinc et/ou cuivre

Afin de déterminer la teneur relative en ions zinc et cuivre effectivement incorporée dans les échantillons, une analyse par spectroscopie d'absorption atomique a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14 .

Tableau 14 : Teneurs relatives en ions Zn et / ou Cu des échantillons synthétisés en présence de 5 % molaire en Zn et / ou Cu

Référence de l'échantillon	Teneur relative des ions (X) à l'état final ($[X]_i / ([Ca^{2+}]_i + [X]_i)$)
(PEG)P 5200-Zn5%	7 %
(PEG)P 5200-Cu5%	3,8 %
(PEG)P 5200-Zn5% + Cu5%	6,3 % + 3,3 %

On peut noter que la teneur effective en ions Zn^{2+} (6 - 7 %) est légèrement supérieure à la proportion initialement présente en solution (5 %), et qu'une tendance inverse est observée

dans le cas d'ions Cu^{2+} ($\sim 4\%$). Ceci peut être relié à la différence d'affinité thermodynamique de ces deux types d'ions pour la structure de l'apatite. La synthèse en co-présence des deux ions permet par ailleurs d'obtenir des teneurs finales très proches de celles obtenues pour les synthèses réalisées séparément en présence de chaque ion. Ainsi, avec une teneur initiale de chaque ion de 5 % molaire lors de la synthèse des colloïdes au (PEG)P 5200, les composés obtenus possèdent en moyenne une teneur finale molaire (par rapport au calcium) de 6,5 % en Zn^{2+} et de 3,5 % en Cu^{2+} .

Ces résultats montrent ainsi la possibilité de préparer des apatites nanocristallines colloïdales enrichies en ions biologiquement actifs tels que Zn^{2+} et Cu^{2+} .

III. CONCLUSION

Ces premiers travaux de recherche ont permis d'élaborer des particules d'apatite de taille contrôlée, avec une échelle de taille allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de nanomètres. Pour une taille de particules colloïdales donnée (D_h moyen d'environ 180 nm grâce à l'ajout d'un agent dispersant, le (PEG)P 5200), il a été démontré ici qu'il est possible d'enrichir ces apatites en différents ions et molécule ayant un intérêt pour traiter la pathologie de l'acné. Ainsi, un antibiotique a été adsorbé à la surface de particules submicroniques d'apatite colloïdale. L'enrichissement du colloïde au (PEPG)P 5200 par des ions ayant des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires (zinc et/ou cuivre) a été démontré dans ce chapitre. Il serait donc intéressant par la suite de confirmer la possibilité d'adsorber cet antibiotique, le ClindP, à la surface de ces particules colloïdales dopées au zinc et/ou cuivre. Il serait ensuite intéressant de pouvoir tester l'efficacité de tels ions sur la résistance bactérienne de *P. acnes* au ClindP et également d'évaluer un éventuel effet synergique de la molécule d'antibiotique avec les différents ions.

CHAPITRE III
EVALUATION ET SUIVI
BIOLOGIQUE : VERS
L'ELABORATION D'UNE
FORMULATION

L'un des objectifs de ces travaux de thèse est de permettre une vectorisation du PA anti-acnéique directement au niveau des follicules pileux afin de minimiser le passage de celui-ci dans la circulation sanguine. L'utilisation de particules submicroniques pour des applications biologiques telles qu'en dermatologie, nécessite donc à la fois d'évaluer la biocompatibilité de ces composés et de suivre leur devenir suite à leur administration. Pour cela, des études préliminaires d'interaction avec plusieurs types cellulaires, mais également du devenir des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 après application cutanée ont été entreprises.

I. Etude de l'hémocompatibilité des colloïdes

Dans un premier temps, l'étude de l'interaction entre particules colloïdales apatitiques et certains éléments du sang (globules rouges et protéines plasmatiques) a été explorée, dans l'éventualité d'une application sur peau lésée, et de manière plus générale afin de disposer de données relatives à l'hémocompatibilité de ces systèmes minéral-organiques colloïdaux. Ces travaux ont permis d'initier une collaboration avec le laboratoire de Nano Bio Materials de l'université de Yonsei en Corée. Ils ont fait l'objet d'une publication spécifique : *M. Choimet et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 145 (2016) 87-94 (Annexe 3)*, reprise dans cette section.

A. Introduction

Cette étude a été réalisée sur les particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 et comparée avec des colloïdes de plus petite taille, stabilisés à l'AEP. Le risque de passage des particules colloïdales au (PEG)P 5200 dans la voie sanguine suite à leur application cutanée reste faible (en absence de lésion cutanée) en raison de différents paramètres comme par exemple leur taille. Vogt et al [8] ont montré que pour des microsphères de latex et polystyrène, une taille inférieure à 50 nm aura tendance à passer au niveau du derme (dans lequel on trouve des vaisseaux sanguins), tandis que pour des tailles plus grandes (750 et 1500 nm), les particules ont tendance à rester au niveau de la surface cutanée. Comme indiqué précédemment, le comportement des particules à la surface cutanée est dépendant de nombreux paramètres comme le type de particules, la nature de la peau (saine ou lésée) ou encore la technique d'application. Une peau lésée sera beaucoup plus favorable au passage de substances dans la circulation sanguine. Il est donc nécessaire de connaître le comportement des particules colloïdales d'apatite biomimétique en cas de passage dans la circulation sanguine. L'étude de

leur interaction avec des éléments essentiels du sang est une première étape dans l'étude de ce comportement.

Quelques études précédentes ont étudié la compatibilité sanguine d'apatites nanocristallines (recouvertes d'héparine, de polyaziridine ou non recouvertes) possédant différentes propriétés de surface, et pour différents types d'applications comme l'administration de médicaments (antibiotiques, anticancéreux, anticoagulant) [194]–[196] ou encore comme agent de contraste pour l'imagerie [197]. Dans toutes ces études, les nanoparticules n'ont pas engendré d'hémolyse (< 5 %) dans les conditions testées. D'autres études ont mis en évidence la haute compatibilité d'apatites nanocristallines par différents aspects comme l'évaluation de l'activation des plaquettes [197], de la cytotoxicité [145], [197], [198], de la toxicité *in vivo* [194], du potentiel non-inflammatoire [145] ou encore, dans le cas d'apatite fluorée, de l'interaction avec les protéines plasmatiques [199].

B. Matériels et méthodes

a. Synthèse des colloïdes

Les colloïdes stabilisés à l'AEP et au (PEG)P 5200 ont été préparés selon le protocole de référence, détaillé précédemment dans le chapitre II (partie II-1-A). Après purification des colloïdes par dialyse et ajustement au pH physiologique (7,4), chaque type de colloïde (AEP et (PEG)P 5200) a été testé au contact de globules rouges et protéines plasmatiques, sous forme liquide et également après lyophilisation et redispersion juste avant la mise en contact. Avant la lyophilisation, l'ajout d'un composé hydrosoluble (glucose) dans les colloïdes à l'AEP a été nécessaire pour pouvoir les redisperser dans l'eau en évitant l'agglomération des particules entre elles [200]. Afin d'avoir des résultats comparables, du glucose a également été ajouté aux colloïdes au (PEG)P 5200. Chaque colloïde a ensuite été préparé afin d'avoir une concentration finale en NaCl de 0,9 % (poids / volume). Ainsi, « AN » et « AG » désignent respectivement les colloïdes à l'AEP, en suspension avec du NaCl et lyophilisés puis redispersés (avec ajout de glucose et NaCl). Il en est de même pour les colloïdes au (PEG)P 5200 désignés respectivement par les annotations « PN » et « PG ». Une référence non colloïdale a également été préparée dans les mêmes conditions que le protocole de référence mais en l'absence d'agent stabilisant.

b. Evaluation de la charge de surface des particules colloïdales

Afin d'estimer la charge de surface des particules, les suspensions ont été diluées et les poudres dispersées dans de l'eau désionisée dans une gamme de concentration appropriée

(1 ~ 1,8 mg/mL). Les mesures de potentiel zêta se sont faites avec l'Otsuka ELS-Z 1000. Le potentiel zêta et la taille des particules de chaque échantillon ont également été évalués après mise en contact avec du plasma humain : celui-ci a été dilué 50 fois dans du tampon phosphate Dulbecco (DPBS) et mélangé avec 0,25 mg/mL (pour le potentiel zêta) et 1 mg/mL (pour le D_h) de chaque échantillon d'apatite (ratio volumique 1 : 1).

c. Test d'hémolyse

Les essais d'hémolyse permettent d'évaluer la toxicité des particules colloïdales vis-à-vis des globules rouges en suivant la libération possible d'hémoglobine suite à leur mise en contact avec les particules. Cette technique est couramment employée et a été inspirée de travaux issus de la littérature [201]–[203]. Pour ces tests, l'ensemble des échantillons de sang humain « frais » a été obtenu d'un individu volontaire sain et a été utilisé directement après prélèvement (approuvé par le collègue Wonju de médecine de l'Université de Yonsei, numéro d'approbation YWMR-12-6-030). De l'eau désionisée et une solution saline ont été ajoutées à la suspension de globules rouges, respectivement comme contrôles positif et négatif.

Dans un premier temps, les particules colloïdales ont été mises en suspension dans une solution saline à différentes concentrations, 1, 5 et 10 mg/mL. Les échantillons de sang ont été mélangés aux colloïdes dans un rapport volumique de 1 : 1, sous agitation puis incubés à 36,5 °C pendant 30 minutes et 24 heures [202], [204]. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant a été prélevé et laissé à température ambiante pendant 30 minutes pour permettre la formation d'oxyhémoglobine. L'absorbance a ensuite été mesurée l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 (540 nm). Le calcul du pourcentage d'hémolyse a été réalisé à partir de l'équation suivante (*Équation 11*) [205] :

$$\% \text{ Hémolyse} = \frac{(\text{Absorbance}_{\text{échantillon}} - \text{Absorbance}_{\text{contrôle négatif}})}{(\text{Absorbance}_{\text{contrôle positif}} - \text{Absorbance}_{\text{contrôle négatif}})} \times 100$$

Pour chaque type de colloïde (AN, AG, PN, PG), les essais ont été réalisés en triplicat.

d. Etude de l'interaction avec les protéines plasmatiques humaines

Les principales protéines présentes au niveau du plasma sanguin humain sont l'albumine (~58 %), l'immunoglobuline (~38 %), et le fibrinogène (~4 %). L'étude des interactions entre les apatites colloïdales et les protéines plasmatiques d'origine humaines a été réalisée en utilisant individuellement ces trois protéines, mais aussi avec la totalité du plasma sanguin complet.

Le plasma (ou les protéines isolées dans des mêmes conditions de concentration), dilué 50 fois dans du DPBS, a été mélangé aux colloïdes (à différentes concentrations initiales en particules colloïdales de (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/mL)) dans un rapport volumique de 1 : 1, puis les suspensions ont été placées dans un mélangeur – incubateur Thermo Finemixer (FINEPCR SH2000-DX) à 36,5°C pendant 30 minutes sous faible agitation.

Les résidus tryptophanes présents au sein des protéines permettent leur suivi par fluorescence. Une décroissance de fluorescence [206] met en évidence la présence d'une interaction entre les protéines et les particules submicroniques (par phénomène d'adsorption, d'agglomération et / ou de complexation) [207]. La mesure de fluorescence s'est faite à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer LS55 (longueur d'onde d'excitation : 280 nm, longueur d'onde d'émission : 340 nm). La décroissance de fluorescence des protéines a été quantifiée à partir de la formule suivante :

$$Q = \frac{(I_0 - I)}{I_0} \quad \text{Équation 12}$$

où I_0 et I représentent respectivement les intensités de fluorescence en absence et présence des colloïdes.

C. Résultats et discussion

Les caractérisations DRX et IRTF des particules non colloïdales et colloïdales ont déjà été décrites précédemment dans ce manuscrit (colloïdes stabilisés au (PEG)P 5200) et dans étude précédente réalisée au laboratoire et publiée dans la littérature (colloïdes stabilisés à l'AEP) [145]. Brièvement, ces analyses ont permis de mettre en évidence la nature apatitique nanocristalline pour les particules colloïdales, dans les deux cas.

Les mesures par DLS indiquent des D_h moyens des particules colloïdales stabilisées à l'AEP et au (PEG)P 5200 respectivement de 47 nm (PdI de 0,163) et de 190 nm (PdI de 0,151). Pour chaque colloïde, le potentiel zêta a également été mesuré et les valeurs sont présentées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Mesures du potentiel zêta des particules d'apatites dans de l'eau déminéralisée et en présence du plasma sanguin

<i>Référence de l'échantillon</i>	<i>Echantillons seuls</i>		<i>Echantillons mélangés au plasma</i>	
	<i>pH</i>	<i>Potentiel zêta moyen (mV)</i>	<i>pH</i>	<i>Potentiel zêta moyen (mV)</i>
AN	6,91	- 40 ± 5	7,41	- 22 ± 5
AG	7,02	- 56 ± 5	7,45	- 17 ± 5
PN	7,07	+ 6 ± 5	7,43	- 4,2 ± 5
PG	7,05	+ 3,5 ± 5	7,35	- 6,3 ± 5

Les apatites non colloïdales ont en moyenne un potentiel zêta proche de - 10 mV [9]. Le Tableau 15 indique une différence notable entre la charge des particules colloïdales stabilisées à l'AEP et celles stabilisées au (PEG)P 5200. Les plus petites particules sont chargées négativement, avec une charge de surface avoisinant les - 48 mV, pouvant être expliquée par l'ajout d'un groupement fluidifiant de charge globale négative, l'hexamétaphosphate de sodium (HMP). Ces particules colloïdales (AN et AG) présentent une charge de surface globale très négative comparée aux particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200, dont la charge de surface est proche de la neutralité (légèrement positive).

a. Interaction entre globules rouges et particules apatitiques submicroniques : Evaluation de l'hémolyse

L'interaction des particules avec les globules rouges a été suivie en évaluant le pourcentage d'hémolyse atteint après 30 minutes et 24 heures d'exposition de ces colloïdes au sang. L'effet hémolytique en fonction du type de colloïdes et de leur concentration est présenté en Figure 45.

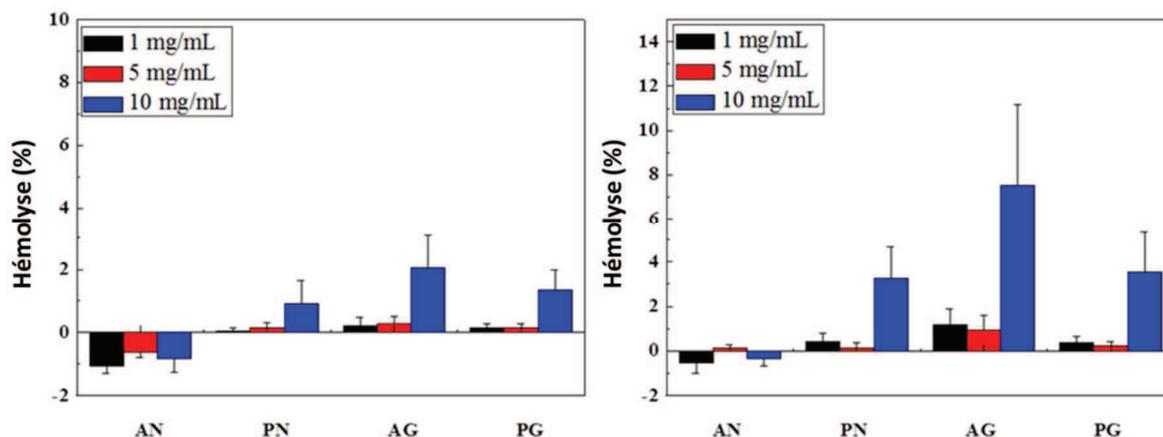


Figure 45 : Pourcentage hémolytique induit par les colloïdes à 3 différentes concentrations (concentration initiale : 1, 5 et 10 mg/mL, puis mélangés à un ratio volumique 1 : 1 avec le sang), après 30 minutes et 24 heures d'incubation

En moyenne un pourcentage de 5% d'hémolyse est considéré comme faible et acceptable pour les biomatériaux [208]–[210]. Les résultats, présentés en Figure 45, indiquent clairement que, pour aucun des colloïdes, un risque élevé d'hémolyse est observé. Dans cette étude, le pourcentage de 5% n'est jamais atteint, sauf pour un type de colloïde (AG, concentration initiale testée de 10 mg/ml), qui correspondrait à une concentration sanguine ne pouvant pas être atteinte suite à une application topique. Tous les autres taux d'hémolyse restent très faibles, tout en augmentant très légèrement avec la concentration et le temps. Les valeurs négatives observées pour les colloïdes AN indiquent une viabilité des globules rouges (de façon reproductible) meilleure que pour le contrôle négatif. Ceci peut être expliqué soit par le fait que pendant la période d'incubation du contrôle négatif, un nombre limité de cellules peut être dénaturés, et / ou par un possible effet protecteur de ce type de particules colloïdales.

Bien que les échantillons d'AEP liquide (AN) et pré-lyophilisés (AG) ont des propriétés physico-chimiques similaires (D_h et potentiel zêta), ils présentent des taux d'hémolyse légèrement différents : les colloïdes AG montrent une hémolyse légèrement plus importante et cette différence est accentuée après 24 heures. La seule différence entre ces 2 variantes de colloïdes stabilisés à l'AEP est la présence de glucose pour faciliter le séchage et la redispersion, et la charge de surface des particules (plus négative pour AG). Plusieurs études ont évalué l'impact du glucose sur les membranes des globules rouges chez l'homme : Quan et al. [211] ont mis en évidence l'effet bénéfique (cryopréservation) de certains sucres sur les globules rouges avant la lyophilisation, mais aussi certains effets néfastes. Ils ont montré que le glucose peut induire une élévation de l'osmolarité interne des globules rouges induisant une fragilité osmotique de ces derniers. Schiar et al. [212] ont également montré que le glucose peut

augmenter, bien que dans une mesure limitée, la toxicité de composés organiques et inorganiques et ainsi l'hémolyse en maintenant le taux de glutathion réduit au niveau des érythrocytes. Viskupicova et al. [213] ont étudié le rôle du glucose lors de l'incubation sur le taux d'hémolyse : l'hémolyse a tendance à augmenter avec le temps d'incubation en présence de glucose. Toutes ces études tendent à expliquer les résultats obtenus dans les présents travaux, indiquant une légère augmentation du taux d'hémolyse en présence de glucose. Il est à noter que, même en présence de glucose pour les colloïdes AG et PG, aucun taux d'hémolyse élevé n'a été atteint, sauf en présence de fortes concentrations qui seraient au-delà des conditions réelles.

Plusieurs études ont montré que les propriétés de surface des particules (et en particulier la charge de surface) pouvaient avoir un effet sur la dégradation des globules rouges par interaction directe avec leur membrane. Han et al. [196] ont étudié l'interaction entre des particules d'hydroxyapatite revêtues d'héparine et les globules rouges. Ils ont démontré que la présence des particules engendre une forte tendance des globules rouges à s'agréger, comparé à des particules de taille micronique. Ils ont aussi expliqué que la modification de la surface de ces particules (initialement chargées positivement) avec une charge négative (en raison de l'ajout d'héparine), peut aider à limiter ces phénomènes d'agrégation, et ainsi favoriser la diminution de l'hémolyse. Ils ont ainsi conclu que l'hémolyse est plutôt dépendante des propriétés des particules, et en particulier de la charge de surface plutôt que de la taille des particules. Ainsi, les résultats d'hémolyse obtenus avec les 2 tailles de particules des colloïdes non lyophilisés (AN et PN) sont en accords avec la littérature.

De manière générale, cette étude montre une excellente hémocompatibilité des apatites biomimétiques colloïdales stabilisées par de l'AEP ou du (PEG)P 5200, vis-à-vis des globules rouges. Il a ensuite été intéressant d'étudier l'interaction entre ces particules et des protéines plasmatiques contenues dans le plasma sanguin humain.

b. Interaction entre protéines plasmatiques et particules apatitiques submicroniques : Etude de la perte de fluorescence non spécifique des protéines

Le niveau d'interactions entre les protéines plasmatiques et les particules colloïdales est un autre point important à prendre en considération pour l'étude de l'hémocompatibilité [207]. L'élimination d'agents pathogènes par le corps résulte en partie par l'activation du système du complément (un groupe de protéines plasmatiques actives dans la réponse immunitaire innée). La biodisponibilité des particules peut ainsi être réduite en raison de leur phagocytose. Il est

donc important de vérifier si les particules pouvant être potentiellement en contact avec le sang peuvent engendrer des interactions importantes avec les protéines plasmatiques puisque l'adsorption protéique est un prérequis au processus de phagocytose.

L'interaction avec les protéines a été évaluée, comme réalisé dans la littérature [204], en mesurant (à 340 nm) la fluorescence des protéines plasmatiques présentes dans le surnageant après contact avec les colloïdes : une perte de fluorescence est attendue, tout au moins à cette longueur d'onde, si les protéines s'adsorbent sur les particules.

La Figure 46 représente la perte de fluorescence Q obtenue en fonction de la concentration en particules colloïdales, soit mélangées avec les protéines individuelles (Figure 46a), soit avec l'ensemble du plasma (Figure 46b). De manière globale, les tendances obtenues pour chaque triplicat ont été très reproductibles. Pour tous les colloïdes, la perte de fluorescence augmente avec la concentration en particules. Les résultats sont relativement similaires si les protéines individuelles ou l'ensemble du plasma sont considérés. Les colloïdes AN, PN et PG présentent des résultats proches (jusqu'à $Q = 0,5$ à $0,7$ de perte de fluorescence), tandis que les colloïdes de type AG montrent des pertes de fluorescence moins importantes ($Q \sim 0,3$ pour une concentration initiale en particules colloïdales de 10 mg/mL).

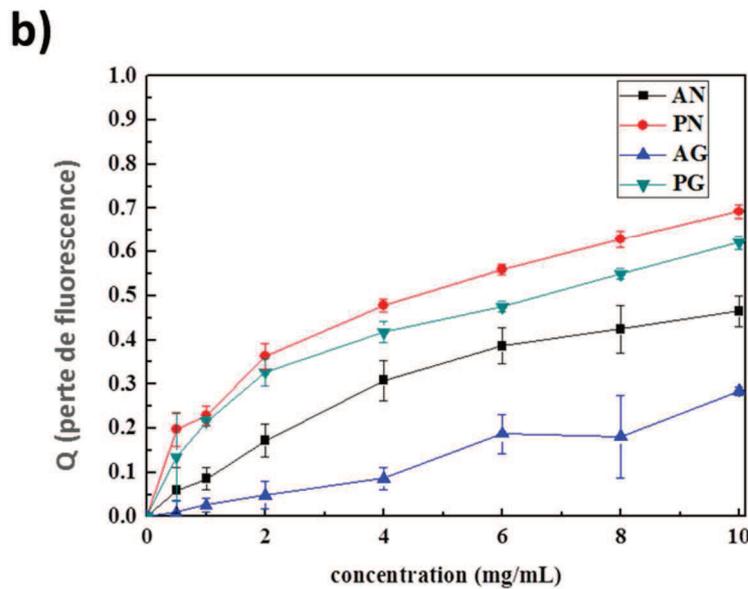
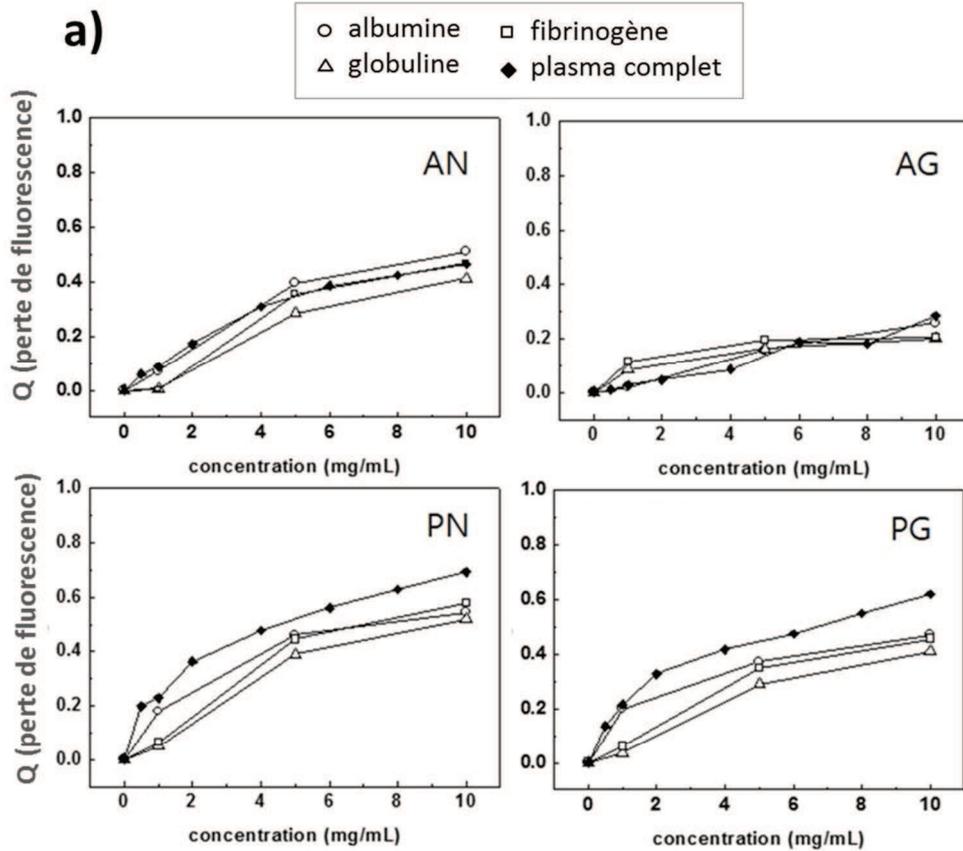


Figure 46 : Mesure de la perte de fluorescence de (a) protéines du plasma humain et du (b) plasma humain total après contact avec les colloïdes stabilisés au (PEG)P 5200 et à l'AEP

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre les particules et les protéines plasmatiques, les résultats de perte de fluorescence en fonction de la concentration en colloïdes (mettant en évidence les phénomènes d'adsorption des protéines sur les particules

colloïdales et étant ainsi équivalent à des isothermes d'adsorption) ont été appliqués à différents modèles mathématiques. Deux modèles ont été utilisés et comparés pour analyser la capacité des protéines à interagir avec les particules. Dans un premier temps, l'équation de Sips (Équation 7) a été appliquée pour évaluer la perte de fluorescence, comme précédemment dans la littérature [214]. Le second modèle employé utilisé pour analyser la perte de fluorescence correspond au modèle de Stern-Volmer, déjà utilisé pour des analyses similaires [214] et défini par l'équation suivante [215] :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_{sv} \cdot C_{eq} \quad \text{Équation 13}$$

où C_{eq} représente la concentration des particules à l'équilibre, I_0 , l'intensité de fluorescence des protéines avant contact avec les particules, I , l'intensité de fluorescence après contact avec les particules (prenant donc en compte les pertes de fluorescence) et k_{sv} , la constante d'équilibre protéine – particule. Ce modèle est en général plus adapté pour les faibles concentrations (un domaine où la perte est dominée par le transport diffusif [214]). Il a été considéré ici pour une concentration en particules C_{eq} allant jusqu'à 4 mg/mL.

Les valeurs des paramètres ont été obtenues en appliquant les deux modèles et sont reportées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Analyse de la perte de fluorescence des protéines à partir de deux modèles mathématiques : Sips et Stern - Volmer

Paramètres de l'équation de Sips				
	AN	AG	PN	PG
m	0,92	1,17	0,75	0,74
K_S	33,66	33,01	36,14	26,10
$K_B=K_S^{1/m}$	45,14	19,86	119,5	82,09
R^2	0,970	0,972	0,980	0,992
Paramètres de l'équation de Stern – Volmer				
	AN	AG	PN	PG
k_{sv}	21,01	46,52	99,74	71,15
R^2	0,981	0,991	0,993	0,984

Dans chaque cas, les coefficients de corrélation R^2 supérieurs à 0,97 (pour les paramètres de Sips $R^2 \geq 0,97$, pour ceux de Stern – Volmer $R^2 \geq 0,98$) ont été obtenus indépendamment du modèle (Sips ou Stern – Volmer), ce qui montre la pertinence des modèles choisis. Dans le cas

des colloïdes stabilisés à l'AEP, les paramètres m de Sips obtenus sont proches de 1 (supérieur à 1 en présence de glucose), suggérant une adsorption impliquant peu d'interactions intermoléculaire voire une interaction coopérative entre les protéines. A l'inverse, une valeur d'environ 0,75 a été obtenue pour les colloïdes stabilisés au (PEG)P 5200, indiquant une coopérativité plutôt négative entre molécules adsorbées. L'AEP et l'HMP sont de petites molécules organiques et occupent faiblement l'espace, ce qui empêche faiblement les protéines de s'adsorber, contrairement au (PEG)P 5200 beaucoup plus volumineux. La taille des agents stabilisants pourrait ainsi expliquer la différence de valeurs du paramètre m observée pour les deux types de colloïdes.

Au niveau des constantes d'interaction (K_B pour le modèle de Sips ou k_{sv} pour le modèle de Stern – Volmer), les deux modèles étudiés permettent d'obtenir des valeurs de l'ordre de $10^1 - 10^2$ (entre 19 et 120 pour la constante de Sips K_B , et entre 20 et 200 pour la constante Stern – Volmer k_{sv}). Des valeurs plus importantes ont été reportées dans la littérature pour différents types de particules (par exemple de l'ordre de $10^4 - 10^7$ pour des particules d'or (réputées biocompatibles) recouvertes de citrates [214], de l'ordre de 10^3 pour des particules d'oxyde de graphite [204]). Des valeurs de l'ordre de $10^4 - 10^5$ ont également été reportées pour des interactions entre les flavonoïdes, autres composés jugés biocompatibles (un groupement de polyphénols avec des applications biomédicales potentielles) et de l'albumine de sérum bovin [215]. Ces données suggèrent que les particules colloïdales d'apatites biomimétiques testées dans ces travaux sont relativement inertes face aux protéines plasmatiques. Ces résultats sont justifiés par le fait de la présence d'une couronne passive organique (AEP ou (PEG)P 5200) qui limite les interactions avec les protéines. Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils ne nécessitent pas de stabilisation additionnelle des particules par l'ajout de molécules thérapeutiques telles que l'héparine [196].

Après contact avec du plasma sanguin complet, il est important de noter que la mesure de la taille des particules par DLS donne des résultats similaires (avec moins de 3,5% de différence) avant et après contact. En revanche, il est à noter que les valeurs de potentiel zêta ont significativement changé : la charge fortement négative des colloïdes AN et AG sont passées dans des régions moins négatives. Les apatites chargées positivement (PN et PG) sont passées à des valeurs négatives après contact avec le plasma (Tableau 15). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que des protéines plasmatiques recouvrent tout de même partiellement les particules, les protéines possédant des résidus de charges négatives pour des valeurs de pH proches du pH physiologique.

Ces résultats suggèrent une relative inertie des particules colloïdales testées vis-à-vis des protéines plasmatiques, laissant présager d'une furtivité possible *in vivo*, ce qui est relativement intéressant dans le cas où les particules seraient amenées à passer dans la circulation sanguine (peau lésée), évitant ainsi des réactions non désirées. Parmi les 4 colloïdes testés, certaines différences apparaissent toutefois au niveau des capacités d'adsorption. Ainsi, indépendamment du modèle mathématique testé, les constantes d'interactions évoluent dans l'ordre $AN < AG < PG < PN$. Les interactions protéines – particules sont principalement gouvernées par les caractéristiques des particules comme les propriétés de surface (la charge de surface, l'accessibilité des sites de surface malgré l'encombrement stérique dû à la présence d'une couronne organique, la composition de la couronne organique, la surface spécifique...) et la taille des particules. Si la taille des particules était seulement considérée, celles stabilisées à l'AEP devraient avoir une interaction avec les protéines plus grande que celles au (PEG)P 5200. Cependant, cette hypothèse ne coïncide pas avec les résultats obtenus (Tableau 16), indiquant que d'autres facteurs doivent être considérés comme la charge de surface par exemple. En effet, les particules colloïdales à l'AEP sont chargées négativement (par l'intermédiaire des molécules d'HMP) ce qui peut expliquer la plus faible affinité des protéines, comparé à la charge initiale légèrement positive des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 (PN et PG).

D. Conclusion

Ces travaux ont permis de suivre l'interaction des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 avec les éléments du sang, les globules rouges (via des tests d'hémolyse) et les protéines plasmatiques (suivi de l'adsorption non spécifique des protéines via leur perte de fluorescence), et de comparer ces résultats avec des particules colloïdales stabilisées à l'AEP de D_h plus petit.

Des taux d'hémolyse inférieurs à 5% ont été obtenus, mettant en évidence l'excellente compatibilité des colloïdes testés vis-à-vis des globules rouges. Un seul type de colloïde (stabilisé avec les molécules AEP et lyophilisé en présence de glucose) a engendré un taux d'hémolyse légèrement plus élevé, mais pour de fortes concentrations (10 mg/mL), au-dessus des pratiques d'usage, et ces résultats sont vraisemblablement reliés à la présence de glucose dans l'échantillon. Pour ces colloïdes, il est nécessaire de trouver une matrice hydrosoluble plus adaptée pour leur redispersion sans formation incontrôlée d'agrégats.

L'interaction des particules colloïdales avec du plasma humain complet, ainsi qu'avec trois protéines plasmatiques majeures a été étudiée. Afin d'interpréter les résultats obtenus suite à la mesure de la perte de fluorescence des protéines en présence des colloïdes, deux modèles mathématiques ont été testés : Sips et Stern – Volmer. Pour l'ensemble des colloïdes étudiés et indépendamment du modèle mathématique choisi, des constantes d'interaction de l'ordre de $10^1 - 10^2$ ont été trouvées. Ces valeurs, significativement plus faibles que celles relevées dans la littérature, pour d'autres types de nanoparticules ou molécules réputées biocompatibles, mettent en évidence le caractère relativement inerte des particules colloïdales testées et ainsi confirment leur bonne hémocompatibilité.

II. Etude de la localisation des particules colloïdales au niveau cutané

L'objectif de cette partie est de suivre le devenir des particules d'apatites colloïdales fonctionnalisées ou non avec différents ions/molécules d'intérêt, au niveau cutané. Dans ces travaux, le suivi s'est porté sur les particules colloïdales au (PEG)P 5200 non dopées en ClindP. Le but de cette recherche est de pouvoir à terme définir si la taille des particules utilisées est adaptée au ciblage folliculaire, permettant ainsi une libération du principe actif directement au niveau des foyers infectieux.

Cette partie présente différentes techniques envisageables pour le suivi du devenir des particules au niveau cutané et a permis d'initier des collaborations avec plusieurs laboratoires. Certaines techniques nécessiteront d'être approfondies en optimisant le mode opératoire et pourront faire l'objet de travaux de recherche à la suite de cette thèse.

La première partie sera consacrée à une technique permettant de suivre les particules colloïdales par microscopie biphotonique, développée en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) de Toulouse. Ces premiers travaux ont été entrepris dans le but d'utiliser la microscopie multiphotonique pour le suivi des particules dans l'épiderme et le derme. Ces recherches correspondent à des résultats préliminaires pour pouvoir ensuite envisager d'utiliser cette technique pour la localisation cutanée des particules colloïdales.

La deuxième partie sera consacrée à un début d'étude de suivi des particules colloïdales par analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission) et RBS (Rutherford Backscattering

Spectrometry) permettant d'obtenir la composition qualitative et quantitative des éléments chimiques.

Une technique de suivi par cartographie a été débutée au laboratoire et fait l'objet de la troisième partie. Elle consiste dans un premier temps par une localisation des follicules pileux grâce à une coloration histologique des peaux d'oreilles de porc (mimant la peau humaine), en collaboration avec le Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan (CPTP). Le suivi des particules se fait ensuite par microscopie confocale Raman (MCR, photoluminescence) grâce au dopage des particules colloïdales en ions europium.

1. Premiers essais de suivi des particules colloïdales par microscopie biphotonique

Des premiers essais ont été entrepris afin d'évaluer la possibilité de suivre le devenir des particules par microscopie multiphotonique. Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration avec l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS).

A. Présentation de la technique

La microscopie multiphotonique, couramment appelée biphoton, est une technique combinant la microscopie confocale avec une excitation multiphotonique pour imager en 3 dimensions un échantillon possédant des groupements fluorophores. Cette méthode présente l'avantage par rapport à la microscopie confocale d'avoir une faible phototoxicité sur les organismes vivants [216]. Cette technique utilise la lumière infrarouge, plus pénétrante que le visible permettant ainsi d'explorer des couches plus profondes d'échantillons (plusieurs centaines de μm pour les tissus animaux). Enfin, cette méthode utilise une excitation localisée au point focal qui limite ainsi le photo-blanchiment des fluorochromes et diminue la dégradation de l'échantillon, permettant ainsi une augmentation possible de la durée de l'expérience.

B. Matériels et méthodes

a. Préparation des échantillons

Afin de suivre les particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 par microscopie multiphotonique, des essais d'adsorption d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, longueur d'onde d'excitation : 495 nm, longueur d'onde d'émission : 525 nm, Figure 47) sur les particules colloïdales ont été entrepris.

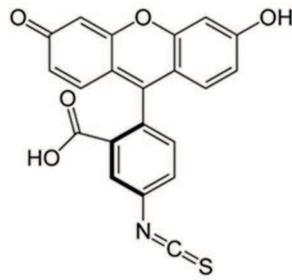


Figure 47 : Formule chimique de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

Les colloïdes au (PEG)P 5200 ont été obtenus à partir du protocole de référence indiqué dans le chapitre II la partie I.1.A. Ils ont ensuite été dialysés avec une membrane de dialyse dont le seuil de coupure est compris entre 12000 à 14000 g/mol. La solubilité du FITC dans l'eau étant relativement faible pour des valeurs de pH > 6, deux techniques de préparation de solution au FITC ont été utilisées et sont présentées en Figure 48.

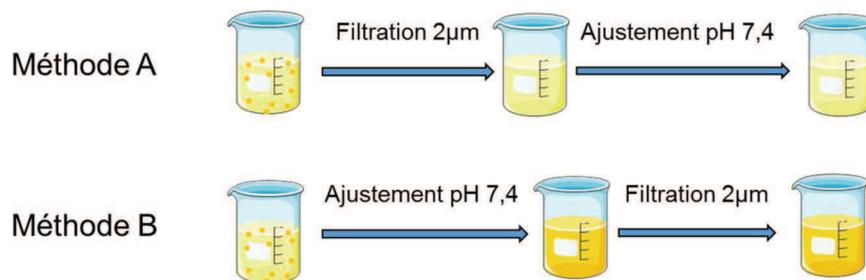


Figure 48 : Techniques de préparation de la solution de FITC

La première méthode (A) consiste à disperser le FITC à une concentration comprise entre 0,5 et 1 mg/mL dans de l'eau déminéralisée. Suite à cette dispersion une étape de filtration à l'aide d'un filtre d'une porosité de 2 µm est réalisée suivie d'un ajustement du pH de la solution (initialement proche de 5,5) au pH de 7,4 à l'aide d'une solution d'ammoniaque. La seconde technique (méthode B) est quasiment identique à la différence de l'ordre d'ajustement du pH et de la filtration. Après avoir dispersé le FITC, le pH de la solution est ajusté à 7,4, puis la solution est filtrée ($\varnothing = 2 \mu\text{m}$).

Différents mélanges des colloïdes avec les 2 types de solutions ont été réalisés et sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Rapports des mélanges FITC / Colloïdes

	<i>FITC : Colloïde (v : v)</i>				
<i>Méthode A</i>	1 : 2				
<i>Méthode B</i>	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 8	1 : 24

Chaque mélange a été laissé sous agitation pendant une heure puis dialysé selon le protocole décrit précédemment avec une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure compris entre 12000 à 14000 g/mol.

b. Observation microscopique des échantillons

Les colloïdes, mis au contact du FITC selon les méthodes A et B, ont été observés en microscopie confocale à fluorescence pour évaluer dans un premier temps la faisabilité d'observation des particules colloïdales pour ensuite pouvoir les observer au microscope multiphotonique.

C. Résultats et discussion

Les premiers essais d'observation par microscopie confocale ont permis de détecter des points de fluorescence correspondant aux groupements de FITC adsorbés sur les particules colloïdales. Ces premières observations ne permettent cependant pas de définir si les « tâches » détectées correspondent à des particules isolées ou à des agglomérats de particules. Ces premiers essais ont été réalisés dans un premier temps afin d'évaluer la possibilité de détecter les particules colloïdales fonctionnalisées à l'AF et de les différencier du fond continu pouvant être présent en raison d'éventuelles molécules de FITC libres en solution. Les résultats sont présentés en Figure 49.

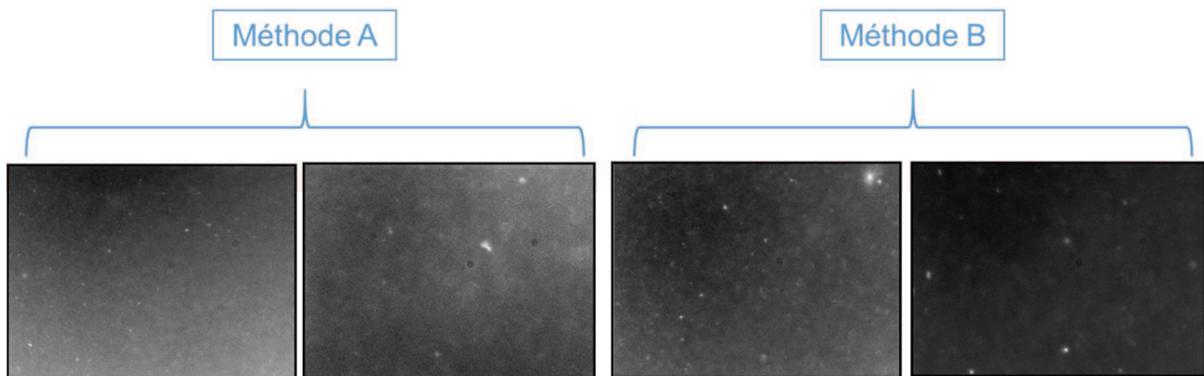


Figure 49 : Observations microscopiques des colloïdes marqués au FITC

Les 2 méthodes de préparation des solutions de FITC permettent d'obtenir des particules ou agglomérats de particules pouvant être détectés par microscopie confocale à fluorescence. Les tailles des « tâches » obtenues ne sont pas représentatives d'une taille de particule ou agglomérat n'étant pas au plan focal lors de l'observation, c'est pourquoi aucune échelle n'est indiquée sur les différentes images microscopiques présentées. Ces résultats représentent une première étape permettant de laisser supposer une possibilité d'observation des particules colloïdales par microscopie multiphotonique. Cependant des étapes d'amélioration de la préparation des colloïdes restent nécessaires comme l'optimisation de l'étape d'adsorption et la quantification des molécules de FITC adsorbées sur les particules colloïdales. L'étape de dialyse devra éventuellement être aussi optimisée afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de FITC libre (non adsorbé sur les particules).

D. Conclusion

Ces premières étapes de recherche, pour pouvoir observer par microscopie multiphotonique les particules colloïdales, donnent des résultats prometteurs nécessitant cependant plusieurs étapes d'optimisation. Les recherches sont en cours afin d'évaluer la possibilité d'observer ces particules colloïdales sur des explants de peaux d'oreilles de porc. L'IPBS possède déjà une expertise en observation de peaux animales pour le suivi de substances suite à une application cutanée. Des travaux ont déjà été reportés dans la littérature sur l'observation, par cette technique, de peaux d'oreilles de porc pour un suivi cutané de nanoparticules. Zhu et al. [217] ont notamment utilisé la microscopie biphotonique à fluorescence afin de suivre la pénétration de nanoparticules d'argent dopées en poly(vinylpyrrolidone). Ils ont couplé ces résultats à une analyse Raman afin de déterminer la profondeur de pénétration de ces particules. La microscopie multiphotonique serait ainsi une technique potentielle d'analyse permettant le suivi cutané des particules colloïdales d'apatite stabilisées au (PEG)P 5200 et marquées au FITC.

2. Interaction avec les cellules par analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission) et RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)

Des travaux réalisés précédemment dans la littérature ont montré la possibilité d'évaluer la pénétration transcutanée potentielle de l'aluminium. Celle-ci s'est faite par quantification des concentrations en aluminium dans les différents compartiments de l'épiderme provenant d'explants de peau d'oreille de porc, par microfaisceau d'ions [218]. Dans le cadre de ces travaux de thèse, une étude, permettant d'évaluer la possibilité de suivre les particules

colloïdales d'apatite biomimétique en interaction avec des cellules par ces techniques d'analyse, a été entreprise.

A. Présentation des deux techniques

L'analyse PIXE est une technique basée sur la détection des rayons X issus des interactions ions – matière, et plus particulièrement, dans le cadre de ces travaux, de protons (H^+) avec deux types cellulaires. Cette méthode a été découverte en 1970 par Johansson [219], [220], et permet une analyse élémentaire à partir du rayonnement X (caractéristique de l'atome ionisé), induit par le bombardement d'une matière par des protons de quelques MeV. Il est ainsi possible d'obtenir la composition chimique élémentaire et de réaliser une cartographie d'un échantillon à étudier. Une analyse par diffusion Rutherford (Rutherford Backscattering Spectrometry, RBS) a été couplée à l'analyse PIXE afin d'avoir des données quantitatives sur les éléments majoritaires du matériau analysé (C, N, O). Les résultats PIXE associés aux résultats RBS permettent d'avoir des données exprimées en terme de concentrations absolues sur l'ensemble des éléments présents dans l'échantillon [218].

B. Matériels et méthodes

Les analyses ont été réalisées à l'aide de la microsonde nucléaire du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG) sur la plateforme Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine (AIFIRA). Ces travaux ont permis d'entreprendre un début de collaboration avec le CENBG.

Afin d'évaluer dans un premier temps l'adaptabilité de ces techniques d'analyse aux colloïdes d'apatite biomimétique, des premiers tests ont été réalisés. Le choix du modèle pour cette étude de faisabilité a été simplifié. Ainsi, les premiers essais n'ont pas été réalisés sur des modèles de peaux, mais par la mise en contact des colloïdes avec deux types de lignées cellulaires : des cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des kératinocytes d'épiderme cutané, HEKn (Normal Human Epidermal Keratinocytes). Les cellules HUVEC favorisent le transfert des nutriments entre le sang et les organes. Leur capacité d'endocytose les rend intéressantes pour étudier l'internalisation des particules colloïdales. Le choix des cellules kératinocytaires se justifie par l'exposition des colloïdes à ces cellules dans le cas d'une application cutanée.

Les particules colloïdales au (PEG)P 5200 ayant une taille pouvant être trop importante pour l'internalisation cellulaire, les essais ont été réalisés avec une taille de particules colloïdales plus petite, obtenue précédemment : les apatites stabilisées à l'AEP, ayant un D_h moyen d'environ 25 nm. Le suivi du calcium seul ou du phosphate seul dans les cellules peut s'avérer difficile, en raison de leur présence naturelle au niveau cellulaire. Pour cela, les particules colloïdales ont été dopées en éléments pouvant potentiellement être détectés plus aisément : le strontium et l'euporium.

a. Synthèse des colloïdes

Le protocole de référence pour la synthèse des colloïdes à l'AEP décrit dans le chapitre II partie I.1.A, a été employé pour l'enrichissement en strontium ou en europorium.

En résumé, une solution A, contenant du nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), le ou les ions de substitution choisis sous forme de sels ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) dont le nombre total de mole est égale à 4,87 mmol ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 = 4,87$ mmol) et le 2-amino ethyl phosphate (AEP, 4,87 mmol) dans un volume de 18,75 mL (pH = 9,5), est mélangée à température ambiante à une solution B, contenant du di-ammonium hydrogénophosphate (1,62 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans 6,25 mL d'eau déminéralisée (pH = 9,5). Les proportions pour chaque échantillon sont indiquées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Quantités relatives et absolues en cation employées dans la synthèse d'apatites nanocristallines enrichies en ions europorium ou strontium

<i>Référence de l'échantillon</i>	<i>$[\text{Ca}^{2+}]$ dans la solution A (mol/L)</i>	<i>[ions de substitution] dans la solution A (mol/L)</i>	<i>% molaire des ions Eu^{3+} ou Sr^{2+}</i>
AEP-Eu1,5%	0,26	$[\text{Eu}^{3+}] = 0,004$	1,5%
AEP-Sr24%	0,19	$[\text{Sr}^{2+}] = 0,06$	24%
AEP-Sr50%	0,13	$[\text{Sr}^{2+}] = 0,13$	50 %

Après ajustement du pH du mélange à 9,5, le précipité est placé à 100°C pendant 16 heures pour une étape de maturation. Tous les colloïdes ont été dialysés à l'aide d'une membrane dont le seuil de coupure est de 6000 à 8000 g/mol. Une augmentation de la viscosité peut avoir lieu au cours de la dialyse pour ces colloïdes stabilisés à l'AEP. L'ajout d'hexamétaphosphate de sodium (HMP), un agent fluidifiant utilisé notamment dans la formulation de dentifrice, permet à la fois d'obtenir des particules bien dispersées, de parer ainsi à ce phénomène de gélification, et d'ajuster le pH de chaque colloïde au pH physiologique après synthèse.

b. Culture cellulaire

Les expériences d'analyse par microfaisceau d'ions ont été réalisées sur 2 types cellulaires : les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et les HEKn (Human Epidermal Keratinocytes neonatal) provenant de chez Invitrogen (ThermoFischer Scientific). Elles sont cultivées dans du M200-PRF® (ThermoFischer Scientific, M200PRF500) ou de l'EpiLife® (ThermoFischer Scientific, MEPICFPRF500) respectivement avec 100 mg/mL de pénicilline/streptomycine (Invitrogen, ThermoFischer Scientific). Le M200-PRF® est un milieu de culture stérile, pour la culture de cellules endothéliales, complété avec du Low Serum Growth Supplement (LSGS, S-003-10). Le milieu EpiLife® est un milieu sans sérum et à concentration contrôlée en calcium (0,06 mM final) afin de maintenir les kératinocytes dans un état prolifératif. Il est complété avec un facteur de croissance le Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS, S-001-5). La formulation détaillée de ces milieux peut être trouvée sur le site web du fournisseur.

Les cellules sont cultivées dans leur milieu de culture respectif, à 37°C, 5% CO₂ (v/v) dans une atmosphère humide et les analyses sont réalisés lorsque les cellules atteignent 80% de confluence.

c. Préparation des cellules pour l'analyse par microfaisceau d'ions

Les cellules sontensemencées sur des puits PEEK adaptés à l'analyse par faisceau d'ions [221]. Les puits sont recouverts d'une fine feuille de polycarbonate de 2µm d'épaisseur maintenue à l'aide d'une résine Formvar et stérilisés. Les cellules sont alorsensemencées à raison de 20 000 cellules par puits dans une goutte de 40 µL déposée au centre du puits sur le film de polycarbonate. Après 24h de culture, les cellules sont exposées à 0,1 et 0,5 mg/L des différents colloïdes dans 2 mL de milieu de culture frais. Les différents types de colloïdes utilisés sont AEP-Eu1,5%, AEP-Sr24% et AEP-Sr50%. Des cellules exposées à de l'eau avec de l'HMP seul sont préparées comme contrôle.

Après 24 heures d'exposition les cellules sont cryofixées dans de l'isopentane refroidi à -150°C par de l'azote liquide puis lyophilisées afin de permettre leur étude sous vide. La lyophilisation consiste en deux étapes : une dessiccation primaire de 24 h à basse pression et basse température (-99 °C, 10⁻³ mbar) suivie d'une étape de dessiccation secondaire de 24 h minimum durant laquelle la température du plateau augmente jusqu'à 40°C en maintenant une basse pression. (+40 °C, 10⁻³ mbar). Les échantillons sont alors conservés à température ambiante en présence de dessiccant avant analyse.

d. Analyse PIXE et RBS

La répartition des différents éléments a été analysée sous vide (afin de préserver la structure et la composition chimique élémentaire des échantillons) par un faisceau incident de protons de 2,5 MeV, d'un micromètre de diamètre, avec une intensité de 150 pA.

C. *Résultats et Discussion*

a. Détection directe des particules par l'analyse des dopants

Un exemple du suivi des concentrations moyennes est présenté en Figure 50 sur les cellules HEK_n. Pour cela, deux types d'analyses ont été effectués : une analyse de référence, où les cellules ont été mises en contact avec de l'eau et de l'HMP (à même concentration que celle des colloïdes), et une analyse où le colloïde AEP-Eu1,5% a été mis au contact des cellules HEK_n.

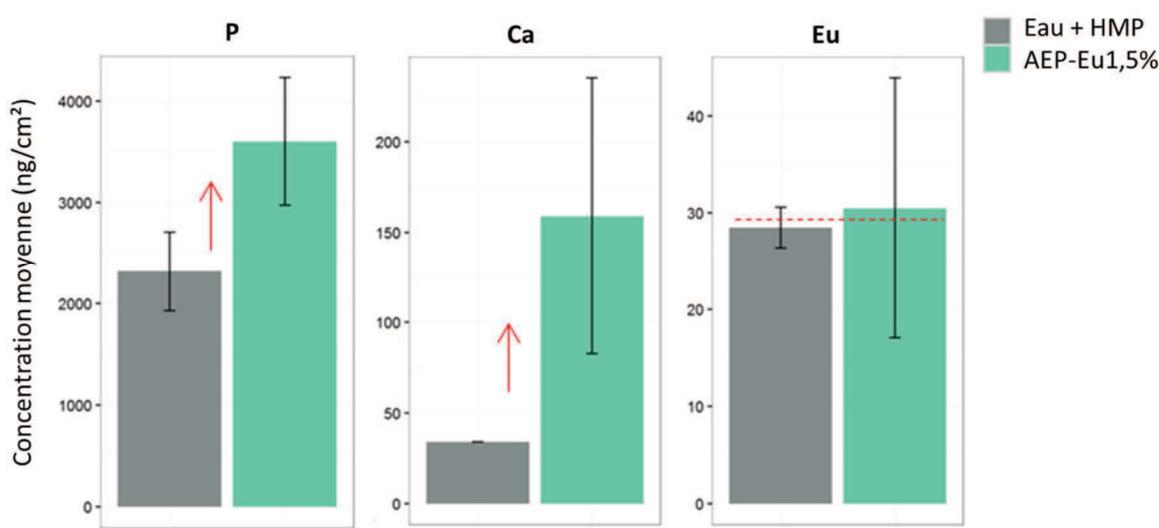


Figure 50 : Analyse des éléments constitutifs des particules d'apatite dopées en Eu en contact avec les cellules HEK_n

L'analyse de la quantité d'euporium révèle que les concentrations en euporium se situent en dessous de la limite de détection pour cette technique (pointillés). Cependant, les quantités de P et de Ca augmentent de manière significative pour cet échantillon, ce qui permettrait un éventuel suivi des particules par détection indirecte, présenté dans la partie suivante.

Le strontium a été détecté faiblement dans les échantillons dopés à 50%, au contact des cellules HUVEC. Les résultats sont présentés en Figure 51.

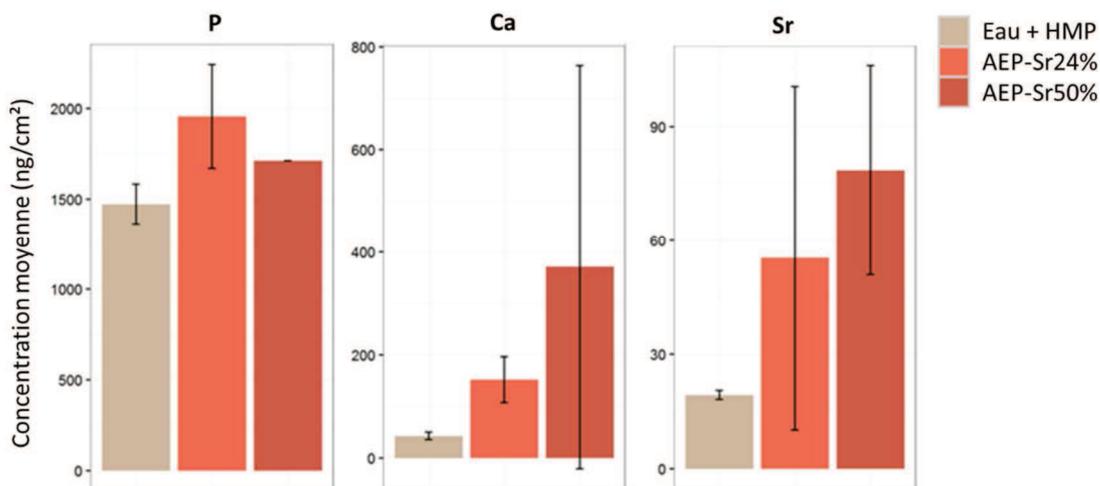


Figure 51 : Analyse des éléments constitutifs des particules d'apatite dopées en Sr en contact avec les cellules HUVEC

Le strontium est faiblement détecté dans ces conditions d'analyse. Les concentrations en calcium et strontium augmentent de manière progressive en fonction de la quantité de strontium présente dans les échantillons. Des essais d'optimisation de ces conditions pourraient permettre de suivre les particules colloïdales stabilisées à l'AEP dopées à 50% en strontium.

b. Détection indirecte des particules par l'analyse des ions calcium et phosphate

Les particules peuvent néanmoins être identifiées indirectement par la mesure des rapports d'éléments, en particulier les rapports molaires Ca/P, mesurés directement en isolant les spectres issus des structures denses identifiées comme potentiellement des agrégats de particules. Ces rapports sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Rapport molaire Ca / P des échantillons seuls et en contact avec les cellules HEK_n et HUVEC

<i>Référence de l'échantillon</i>	<i>Ca / P molaire</i>
<u>Cellules seules</u>	0,001
<u>Colloïde seul :</u>	
- AEP-Eu1,5%	0,61
- AEP-Sr24%	0,59
- AEP-Sr50%	0,86
<u>Colloïde + cellules HEK_n :</u>	
- AEP-Eu1,5%	0,58
- AEP-Sr24%	0,36
- AEP-Sr50%	0,53
<u>Colloïde + cellules HUVEC :</u>	
- AEP-Eu1,5%	0,46
- AEP-Sr24%	0,53
- AEP-Sr50%	0,40

De manière générale, le rapport Ca / P est relativement proche pour chaque analyse menée sur un échantillon donné, et est compris en moyenne entre 0,6 et 0,9 pour les colloïdes seuls et est légèrement plus faible lorsque les colloïdes sont au contact des cellules (0,4 à 0,6). Ces valeurs légèrement plus faibles pourraient être interprétées comme un début de métabolisation des particules, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces interprétations. Ces rapports sont très supérieurs à 0,001 correspondant à la moyenne du rapport Ca / P dans les cellules seules. Ainsi, ces résultats tendent à mettre en évidence la présence et la détection des particules colloïdales dans les échantillons mesurés.

D. Conclusion

Les résultats obtenus tendent à montrer que les paramètres de détection directe et indirecte doivent être optimisés compte tenu de la sensibilité de la méthode. Pour réaliser une détection directe, il faudrait augmenter si possible la concentration intracellulaire des éléments dopants Sr et Eu en modifiant, par exemple, les conditions d'exposition des cellules (en augmentant par exemple la concentration en éléments dopant dans le colloïde).

Le comptage de particules reste possible en convertissant les quantités d'éléments chimiques mesurés en nombre de particules moyennant la connaissance du nombre d'atomes

de Ca et P par particule. Il existe cependant une limite à cette quantification indirecte car Ca et P sont des éléments constitutifs des cellules. Dans le cas particulier de phénomène d'agrégation, il est possible de discriminer les particules des structures cellulaires et de les compter. Pour des particules distribuées de manière homogène dans les cellules et/ou présentes en quantité inférieure à la limite de détection, cette discrimination n'est dans ce cas pas possible et la méthode reste inadaptée sans optimisation de certains paramètres.

L'optimisation de ces méthodes est à développer et n'a pas pu être plus investiguée dans ces travaux de recherche. L'un des paramètres à augmenter serait la concentration en particules dopées à 50 % en strontium lors de la mise en contact avec les cellules. Il serait également intéressant d'utiliser ces méthodes d'analyse dans le cadre d'un suivi de métabolisation des particules.

3. Suivi de la pénétration cutanée par coupes histologiques et analyse par microscopie confocale Raman

A. Présentation de la technique

La Microscopie Confocale Raman (MCR) consiste à mettre en interaction une lumière monochromatique (laser) avec l'échantillon à analyser et de mesurer la diffusion engendrée par cette interaction. Cette radiation est composée de deux types de signaux : la diffusion Rayleigh élastique (fréquence de désexcitation = fréquence d'excitation) et la diffusion Raman inélastique (Stokes (fréquence de désexcitation < fréquence d'excitation) et anti-Stokes (fréquence de désexcitation > fréquence d'excitation), Figure 52).

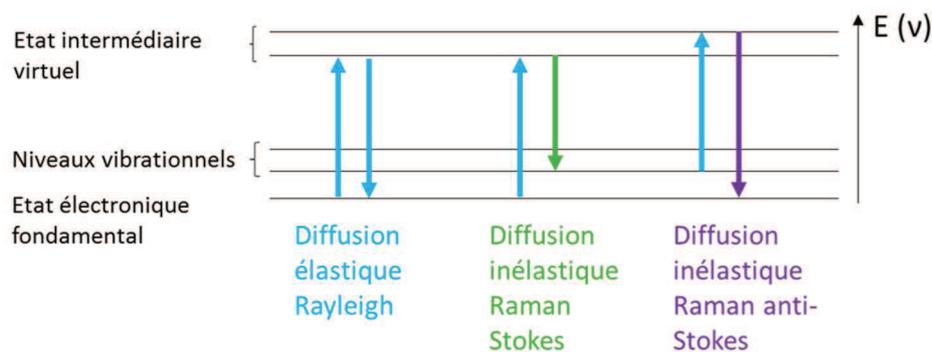


Figure 52 : Différents types de diffusion de la lumière monochromatique par MCR

La photoluminescence peut également être mesurée et est une technique permettant d'apporter des informations complémentaires à l'analyse Raman. Elle consiste en l'émission d'un photon suite à l'interaction entre la lumière monochromatique et l'échantillon à analyser.

Elle est souvent employée en biologie pour évaluer la présence et distribution d'espèce moléculaire dans des échantillons biologiques. Cette méthode peut être plus invasive que le Raman. La diffusion inélastique de la lumière est relativement faible et peut être masquée par la luminescence. Celle-ci est illustrée en Figure 53.

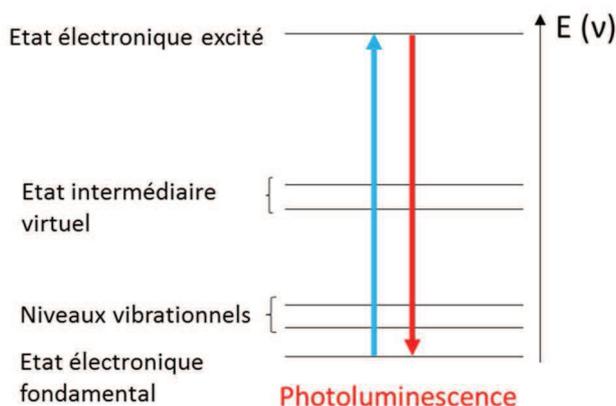


Figure 53 : Représentation du phénomène de photoluminescence

Par MCR, il est possible de réaliser des cartographies permettant ainsi d'identifier et localiser chaque espèce au sein d'un échantillon (résolution submicronique de l'ordre de 0,8 μm). Elle est ainsi de plus en plus utilisée pour l'observation de modèle cutané en dermatologie, pour différentes applications, comme le suivi de la pénétration d'actifs [222]–[224]. Landeman et al. [222] ont par exemple étudié la pénétration de particules de TiO_2 présentes dans des crèmes solaires, au sein de la couche cornée et des follicules pileux, par l'intermédiaire de tape-stripping couplé à plusieurs techniques d'analyse dont la spectroscopie Raman. Ils ont ainsi pu suivre la distribution des particules de TiO_2 et mettre en évidence leur présence au niveau folliculaire. Förster et al. [224] ont couplé la MCR avec les cellules de Franz afin de suivre et quantifier la pénétration d'un PA lipophile, le rétinol, au niveau d'explant de peau de porc. Ils ont ainsi montré que la présence de tensio-actifs dans la formulation permet de favoriser la pénétration du rétinol en modifiant la barrière lipidique au niveau de la couche cornée. Mogilevych et al. [223] ont évalué la pénétration de différentes vitamines en fonction de leur administration (libres en solution ou présentes au sein d'une émulsion eau/huile) *in vivo* chez des sujets sains. Ils ont ainsi mis en évidence l'efficacité d'encapsuler le palmitate de rétinyl (dérivé de la vitamine A) dans une phase grasse pour améliorer la pénétration cutanée. La spectroscopie Raman peut également être utilisée pour évaluer l'efficacité des améliorateurs de pénétration [225], [226], mais aussi pour évaluer les propriétés cutanées, comme par exemple

l'hydratation de la peau [227]. Cette technique permet également de pouvoir détecter des maladies cutanées telles que les carcinomes [228], [229].

Dans ces travaux de thèse, la MCR a été utilisée afin de réaliser des cartographies pour suivre la localisation des particules colloïdales suite à leur application cutanée. Le Raman a été couplé ici à la photoluminescence en suivant les particules colloïdales dopées en europium (substitution d'une partie des ions calcium de l'apatite [155]). La photoluminescence a permis d'apporter une information complémentaire au Raman par le suivi de la localisation de l'europium dans les échantillons cutanés. Une étude précédemment réalisée au laboratoire [155] sur des apatites (non colloïdales) dopées en europium pour une application en oncologie, a montré que l'intensité absolue des bandes de photoluminescence ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$, ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de l'ion Eu^{3+} europium (dont les domaines respectifs sont compris entre 575 - 580, 583 - 603 et 605 - 627 nm) augmente avec le taux de substitution des ions calcium en europium.

Le but de cette étude est de localiser les particules suite à leur application sur des explants de peau d'oreille de porc.

B. Matériels et méthodes

a. Synthèse et caractérisation des colloïdes

La synthèse des colloïdes stabilisés au (PEG)P 5200 et dopés à l'europium a été réalisée de la même façon que pour les colloïdes à l'AEP (décrit dans le chapitre III partie II 2.B.a.).

En résumé, une solution A, contenant du nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et d'europium ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) avec un nombre total de moles égal à 4,87 mmol ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 4,87 \text{ mmol}$) et le polyéthylène glycol phosphonaté ((PEG)P 5200, 0,08 mmol) dans un volume de 18,75 mL (pH = 9,5), est mélangée à température ambiante à une solution B, contenant du di-ammonium hydrogénophosphate (1,62 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans 6,25 mL d'eau déminéralisée (pH = 9,5). Après ajustement du pH du mélange à 9,5, le précipité est placé à 100°C pendant 16 heures pour une étape de maturation. Tous les colloïdes ont été dialysés à l'aide d'une membrane dont le seuil de coupure est de 12 000 à 14 000 g/mol.

Une mesure du D_h moyen des particules a été réalisée à l'aide d'un NanosizerZS (Malvern Instruments, $\lambda = 633 \text{ nm}$).

b. Préparation des oreilles de porc

Les oreilles de porc proviennent de l'abattoir de Puylaurens. Les oreilles ont été prélevées avant que celles-ci ne subissent des traitements thermiques de nettoyage ou que le cartilage ne soit retiré. A leur réception, les oreilles ont été lavées à l'eau froide et nettoyées à l'aide d'une solution antiseptique des laboratoires Pierre Fabre, Cytéal®. Les oreilles ont été tondues afin de ne pas gêner l'étude de pénétration, comme réalisé dans la littérature [32], [33]. Des biopsies ont été ensuite réalisées à l'aide d'un scalpel, sur la face externe des oreilles de porc (Figure 54).



Figure 54 : Biopsies réalisées sur la face externe des oreilles de porc

Les explants ont été séchés et une partie a été placée à -20°C jusqu'à leur utilisation (< 1 mois) ; l'autre partie a été utilisée directement après préparation pour l'étude de mise en contact avec les particules colloïdales (que l'on nommera pour le reste de l'étude « peaux fraîches »). Chaque biopsie a été vérifiée au microscope afin de valider l'absence de trous ou autres lésions (égratignures, rougeurs, cicatrices). La solution d'euporium et les colloïdes au (PEG)P 5200 contenant de l'euporium ont ensuite été mis au contact des biopsies. Un massage manuel d'une minute a été exercé suite à l'application suivi d'une étape de séchage à l'air libre et température ambiante, pour simuler les conditions d'utilisation potentielle.

Pour le traitement des explants, les biopsies ont été découpées et placées dans des moules contenant de la résine (Tissue-Tek® O.C.T.TM (Optimum Cutting Temperature)) puis congelées par congélation rapide dans de l'isopentane refroidi à -80°C à l'aide d'un système de congélation ultra rapide, Snapfrost®. Des coupes sériées de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM 1950), dont une coupe sur deux a été colorée en

hématoxyline-éosine (HE) pour observation histologique afin de pouvoir localiser les follicules pileux et l'autre laissée non colorée pour observation par MCR.

c. Coloration histologique

Les colorations histologiques des échantillons ont été réalisées par le laboratoire CPTP. Une coupe sur deux a été colorée avec de l'HE afin de pouvoir localiser les follicules pileux. La coloration HE permet de colorer les noyaux en bleu-violet (hémateïne (hématoxyline oxydée)) et les cytoplasmes en rose (éosine). Il est ainsi possible de différencier les couches cutanées et les cellules qui les composent et donc de repérer les invaginations épidermiques provoquées par la présence de follicule pileux. La coloration a été réalisée à l'aide d'un automate de coloration (Leica ST 5020) sur les cryo-coupes ramenées à température ambiante (4 minutes dans un bain d'hématoxyline pour permettre sa fixation au niveau des noyaux cellulaires et 2 minutes dans une solution d'éosine à 2% (v/v)). Après la coloration les tissus sont déshydratés dans deux bains successifs d'éthanol 100°, suivi de 2 bains de xylène. Les lamelles sont montées sur les lames avec de la résine Eukitt.

d. Analyse des échantillons par microscopie optique et MCR

L'analyse optique des coupes colorées s'est faite à l'aide d'un microscope Olympus BX50F. Cette analyse a lieu afin de repérer les coupes avec présence de follicule pileux pour ensuite analyser les coupes non colorées par MCR.

Le suivi des particules par Raman et photoluminescence s'est fait grâce au dopage en ions europium des particules apatitiques. Les mesures de spectres Raman ont été réalisées à l'aide d'un microspectromètre confocal Labram HR800 Horiba Jobin Yvon sur les échantillons exposés en rétrodiffusion à un laser vert d'une longueur d'onde de 532 nm à une puissance de 13 mW et un réseau de 600 traits/mm. Un objectif (x100) avec une ouverture numérique de 0,9 a permis d'obtenir une résolution latérale de 0,7 μm et une résolution axiale de 2,6 μm . Les cartographies ont été réalisées avec un laser 532nm 13 mW, un pas de 3 μm et un temps d'acquisition de 3s et 1 accumulation. Tous les spectres ont été traités avec le logiciel LabSpec6.

C. Résultats et Discussion

a. Caractérisation des colloïdes

Deux lots de colloïdes au (PEG)P 5200 ont été préparés dont la mesure du D_h moyen des particules est présentée dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Mesure du D_h des particules colloïdales au (PEG)P 5200 dopées en europium

<i>Désignation échantillon</i>	<i>Diamètre hydrodynamique (nm)</i>	<i>Indice de polydispersité</i>
Colloïde (PEG)P 5200 – Eu (Lot 1)	170	0,18
Colloïde (PEG)P 5200 – Eu (Lot 2)	184	0,24

Les particules colloïdales obtenues ont des tailles relativement comparables, ce qui est nécessaire pour la comparaison des résultats, au niveau du suivi des particules par cartographie Raman suite à leur application sur peau d'oreille de porc.

b. Observations histologiques des explants d'oreilles de porc

L'observation microscopique des biopsies de peaux d'oreilles de porc suite à leur coloration par l'hématoxyline-éosine a permis de mettre en évidence les différentes couches cutanées (épiderme, derme, hypoderme) et les follicules pileux (Figure 55).

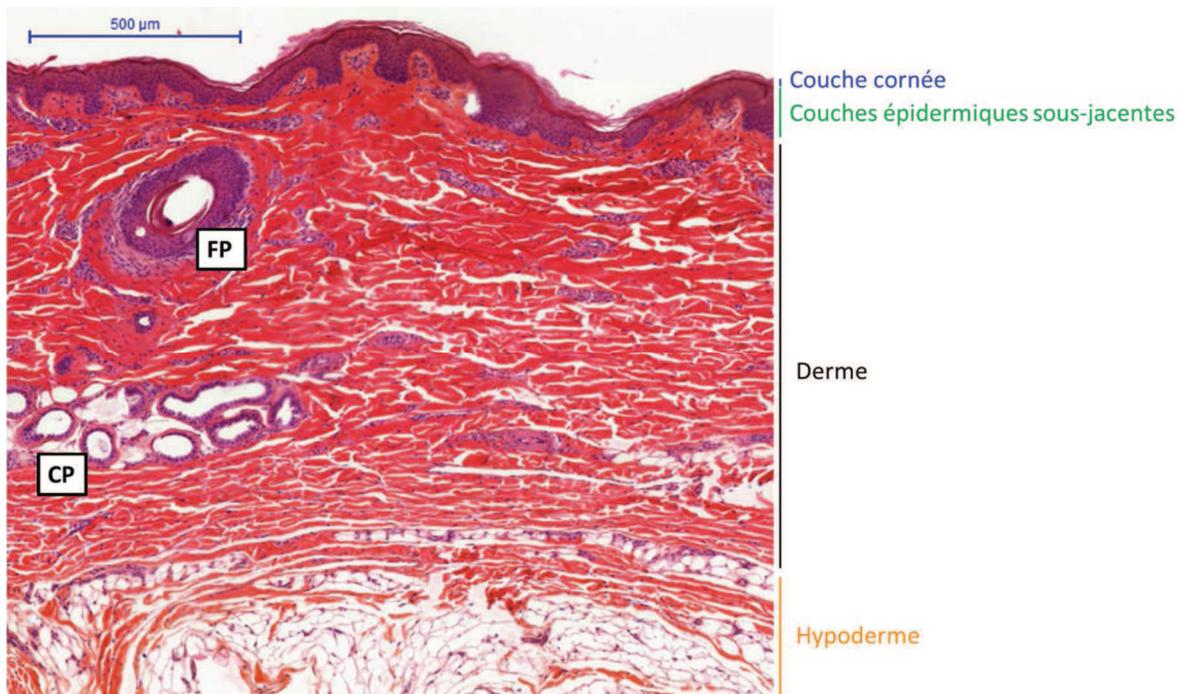


Figure 55 : Observation microscopique d'une biopsie de peau d'oreille de porc (épiderme, derme, hypoderme, follicule pileux (FP), capillaire (CP))

Cette observation est nécessaire pour localiser les follicules pileux des différentes coupes sériées, afin de sélectionner celles qui seront analysées en MCR. Certains follicules peuvent apparaître parallèles au plan de coupe, mettant ainsi en évidence tout le follicule pileux, du pore cutané au bulbe pileux (avec toute la tige pileuse représentée). Sur certaines coupes, le

bulbe pileux est uniquement présent, la coupe n'étant pas réalisée exactement dans le plan de la tige pileuse (Figure 56).

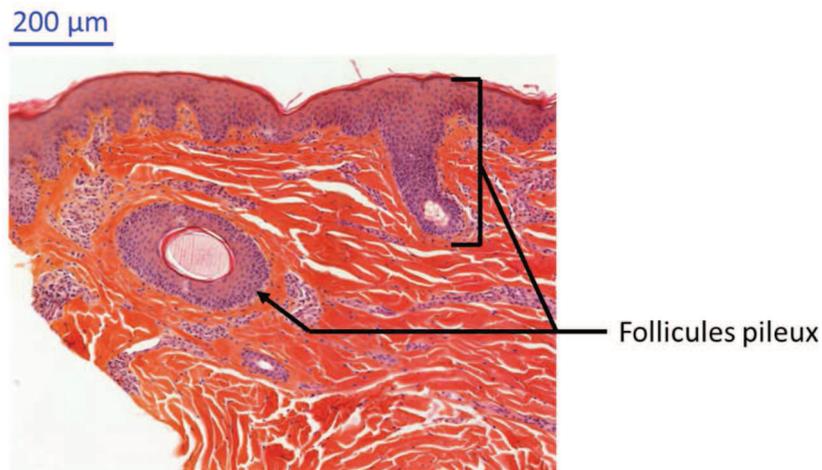


Figure 56 : Observation microscopique des follicules pileux des peaux d'oreilles de porc

Pour le suivi des particules, il est préférable d'avoir l'ensemble du follicule pileux représenté pour l'observation par spectroscopie de luminescence, afin d'évaluer la profondeur de pénétration des particules au sein de celui-ci. Une fois le follicule pileux sélectionné, la coupe sériée qui est juste avant ou après celle de la coloration histologique (non colorée) est ainsi analysée en spectroscopie de luminescence.

c. Etude de la localisation des particules par cartographie Raman suite à l'application cutanée

Le suivi de la bande de photoluminescence la plus intense ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ des ions europium (Eu^{3+}) au sein de la structure apatitique a permis de localiser par cartographie les particules colloïdales au sein des échantillons cutanés de peau d'oreille de porc. La Figure 57 présente les bandes de photoluminescence de l'euporium en solution (en bleu) et au sein du colloïde au (PEG)P 5200 (en orange).

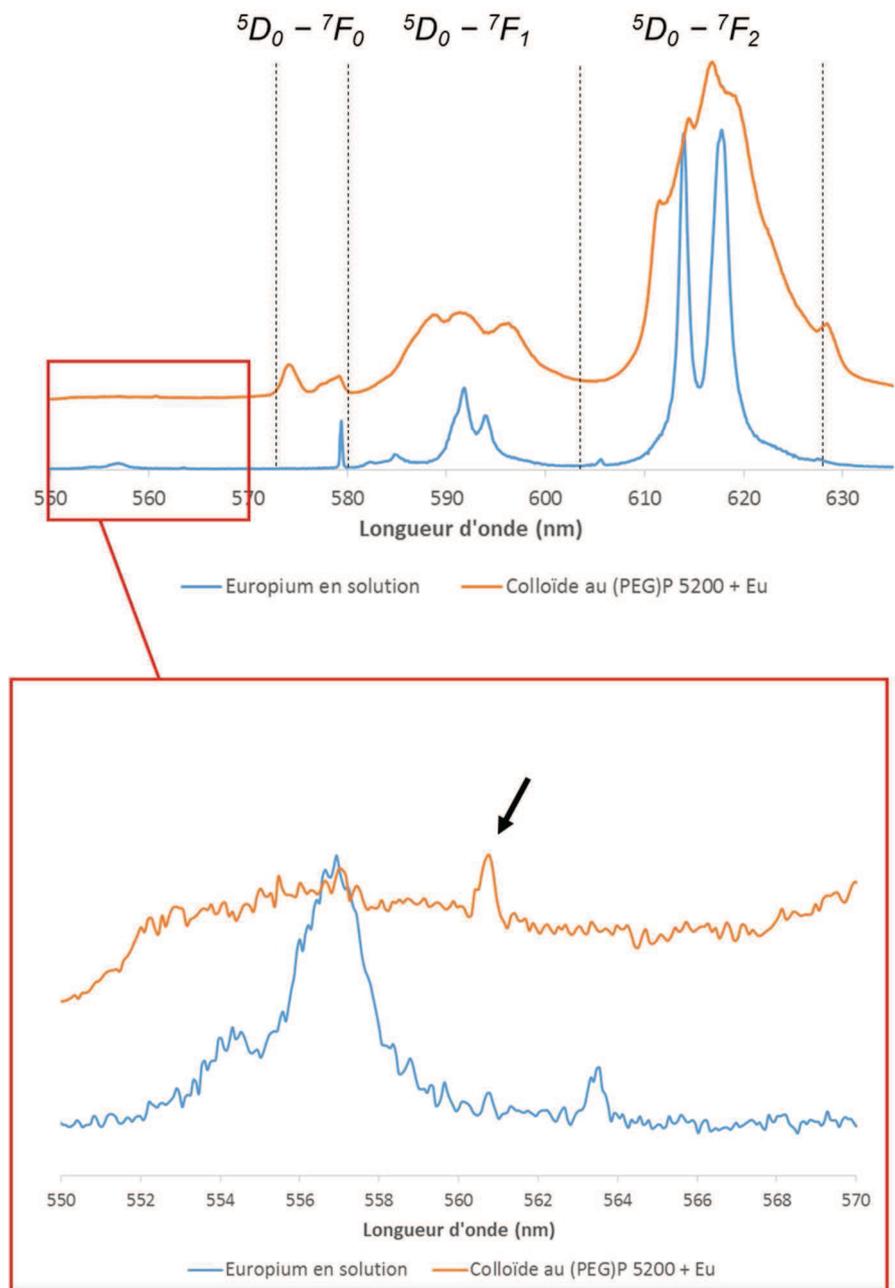


Figure 57 : Spectres des bandes de photoluminescence de l'euporium en solution et au sein du colloïde d'apatite stabilisé au (PEG)P 5200

Un grossissement des spectres a permis de mettre en évidence la bande caractéristique de l'apatite à 561 nm ($\sim 960 \text{ cm}^{-1}$), représentée par la flèche noire (Figure 57), pour le colloïde au (PEG)P 5200. Cette bande est également représentée sur la Figure 58, comparant le spectre Raman du colloïde au (PEG)P 5200 avec celui du (PEG)P 5200 seul.

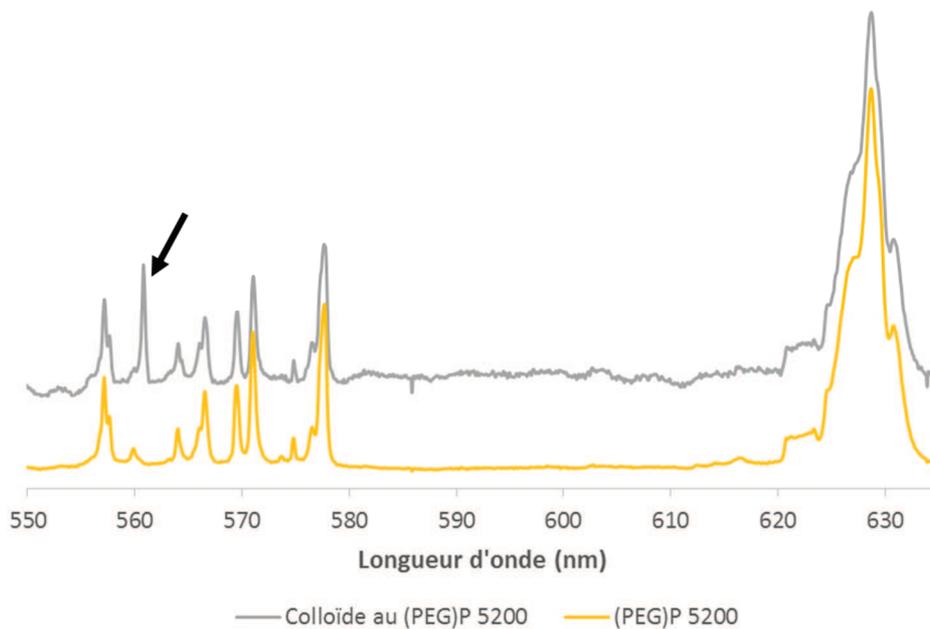


Figure 58 : Spectre Raman du (PEG)P 5200 seul et du colloïde au (PEG)P 5200

Afin de vérifier que le spectre de la peau d'oreille de porc n'interfère pas avec la bande de photoluminescence ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$) de l'euporium (apparaissant dans la gamme 605 - 627 nm), un explant de peau d'oreille de porc isolé a été analysé au Raman. Le spectre correspondant est présenté en Figure 59.

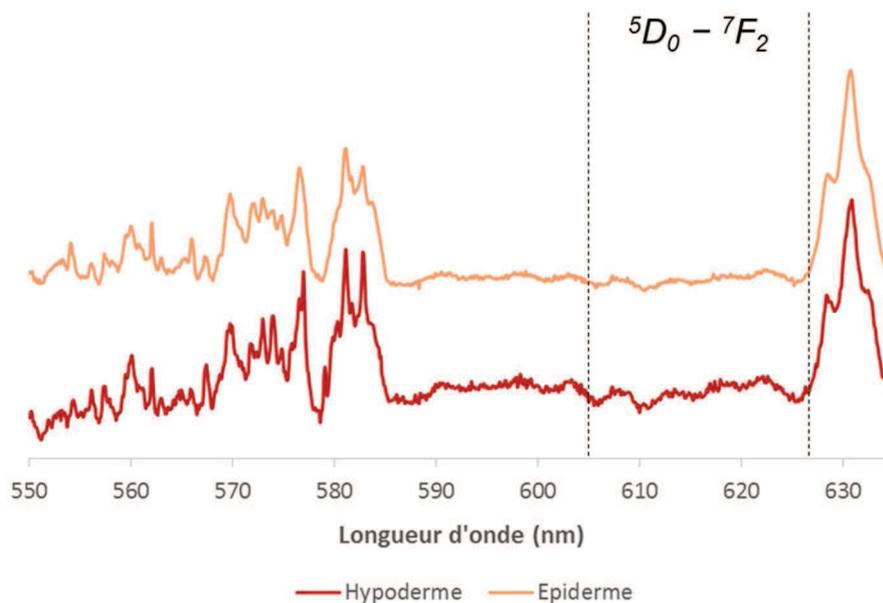


Figure 59 : Spectre Raman de l'épiderme et de l'hypoderme de peau d'oreille de porc

Pour l'analyse de la peau d'oreille de porc, le temps d'acquisition employé est supérieur à celui pour l'euporium (10 s > 3 s). Les spectres semblent relativement similaires pour

l'observation de l'épiderme et de l'hypoderme d'oreille de porc. Aucune bande Raman et/ou de photoluminescence caractéristique de la peau d'oreille de porc n'est active aux fréquences où apparaissent celles de l'euporium, et en particulier entre 605 et 627 nm, permettant ainsi de suivre l'euporium sur des biopsies de peau d'oreilles de porc.

Essais réalisés sur peaux préalablement congelées

Les premiers essais de cartographies ont été réalisés sur des explants ayant été congelés pour valider la méthodologie employée. Une fois celle-ci obtenue, les essais ont été réalisés sur peaux fraîches.

Dans un premier temps, une solution de nitrate d'euporium (de même concentration que celle des colloïdes) a été appliquée sur une biopsie d'oreille de porc (préalablement congelée puis décongelée). Les résultats d'histologie et de spectroscopie de luminescence sont présentés en Figure 60.

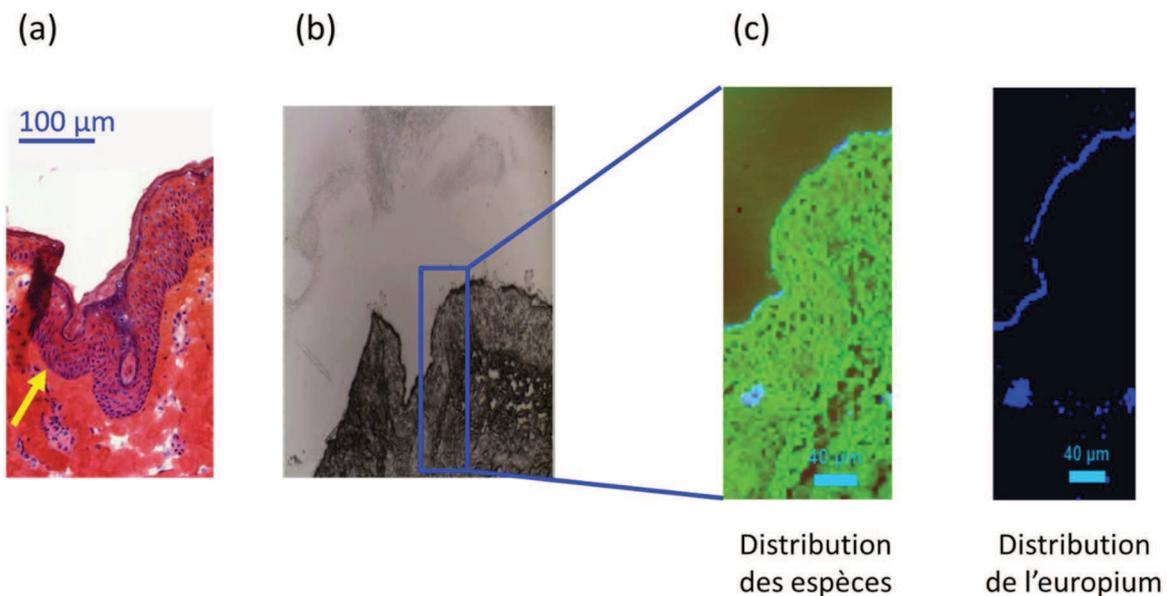


Figure 60 : Observation microscopique d'une coupe histologique de peau d'oreille de porc (a), image du microscope confocal (b) et cartographie (c) de la peau d'oreille de porc (pré-congelée) contenant une solution de nitrate d'euporium

Le follicule pileux étudié pour cette cartographie est relativement court, ayant une profondeur d'environ 200 μm et un diamètre d'environ 100 μm. Sur la coupe histologique, un deuxième orifice folliculaire est présent à gauche de celui étudié (flèche jaune). La cartographie met en évidence la présence d'euporium (en bleu sur la cartographie) à la surface cutanée, notamment au niveau de la couche cornée. Une quantité non négligeable d'euporium est également retrouvée au niveau de l'infundibulum, dans l'invagination épidermique et

également au niveau du derme. Cependant sa répartition n'est pas diffuse au sein des différentes couches et apparaît sous forme de zones relativement localisées. Cela pourrait être justifié par la congélation préalable de la peau pouvant éventuellement altérer celle-ci et ainsi favoriser le passage non uniforme au niveau épidermique et dermique. Des duplicats devront être réalisés, afin de clarifier le résultat obtenu, et comparés à des essais sur peau fraîche.

Le colloïde au (PEG)P 5200 dopé à l'euporium a ensuite été appliqué sur une nouvelle biopsie d'oreille de porc (préalablement congelée puis décongelée). Les résultats d'histologie et de spectroscopie de luminescence sont présentés en Figure 61.

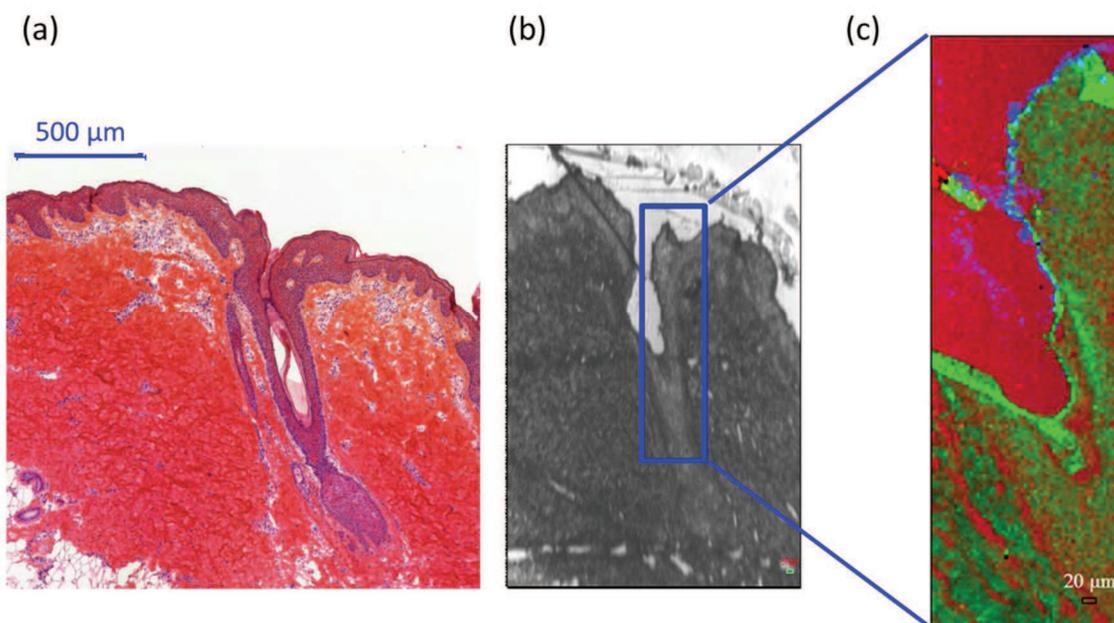


Figure 61 : Observation microscopique d'une coupe histologique de peau d'oreille de porc (a), image du microscope confocal (b) et cartographie Raman (c) de la peau d'oreille de porc (pré-congelée) contenant les particules colloïdales d'apatite stabilisées au (PEG)P 5200 et dopées en Eu (lot 1)

Le follicule en présence ici possède une taille plus importante que celui étudié lors du passage de la solution d'euporium seul (Figure 60). Il possède une profondeur d'environ 1,2 cm et un diamètre d'environ 170 μm. L'euporium apparaît en bleu sur la cartographie, avec la matière organique en vert et le verre (lame) en rouge. L'euporium reste en surface de la peau au niveau de la couche cornée, avec un début de localisation au niveau folliculaire. L'absence de signal de l'euporium au niveau épidermique et dermiques semblerait indiquer une limitation de passage de l'euporium lorsqu'il est présent au sein des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 (en comparaison avec les résultats de pénétration de la solution d'euporium (Figure 60)).

Cette première étude a été réalisée sur explants d'oreille de porc préalablement congelés afin de mettre en place au sein du laboratoire un protocole de suivi de l'euporium et des particules colloïdales contenant de l'euporium par MCR. Elle a ainsi permis de mettre évidence la possibilité de suivre l'euporium (et les particules colloïdales contenant de l'euporium) dans un échantillon biologique par la méthodologie employée.

Essais réalisés sur peau fraîche

Suite à la validation de la méthode de détection et de suivi des particules colloïdales par MCR, des essais ont ensuite été entrepris sur peau fraîche. Dans un premier temps, une solution de nitrate d'euporium a été appliquée sur peau fraîche dans les mêmes conditions que l'essai précédemment sur peau décongelée. Les résultats sont présentés en Figure 62.

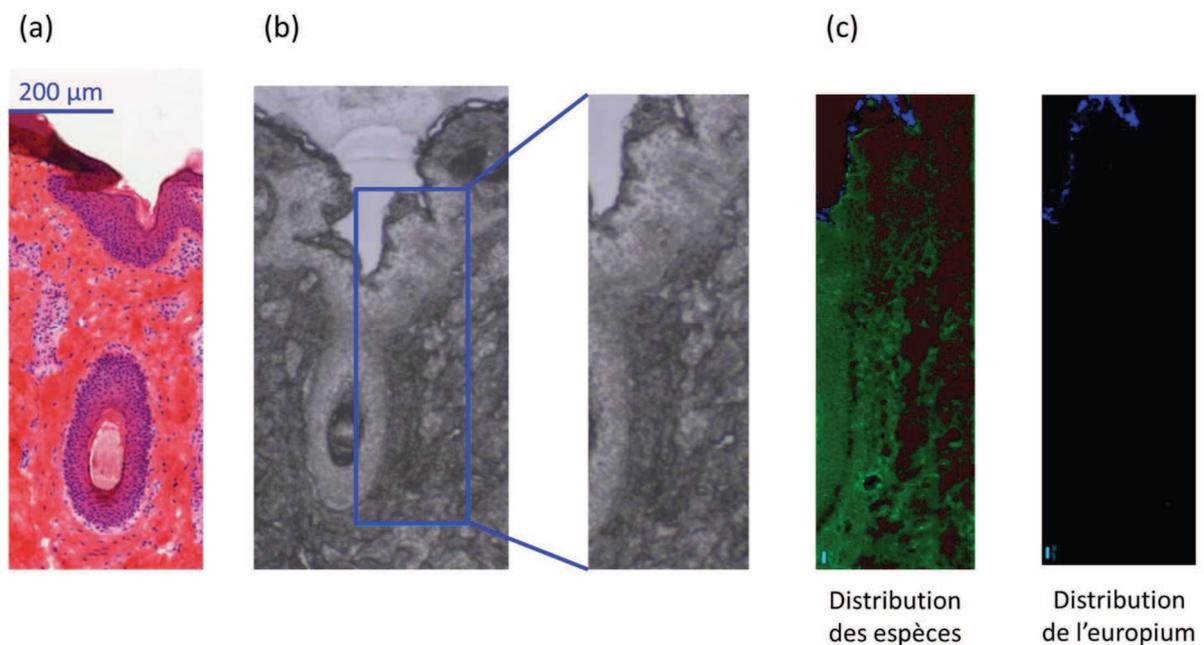


Figure 62 : Observation microscopique d'une coupe histologique de peau d'oreille de porc (a), image du microscope confocal (b) et cartographie Raman (c) de la peau d'oreille de porc (fraîche) contenant une solution de nitrate d'euporium

Les résultats d'étude de la pénétration d'une solution de nitrate d'euporium sur peau d'oreille de porc fraîche semblent différer de ceux obtenus sur peau préalablement congelée (Figure 60), qui avait indiqué un passage éventuel (non uniforme) de la solution d'euporium au niveau épidermique et dermique. La Figure 62 montre en effet que la solution d'euporium ne semble pas franchir la barrière cutanée lorsque qu'elle est appliquée sur peau fraîche, et reste localisée au niveau de la couche cornée. Cette différence au niveau des résultats semble mettre en évidence que la peau pré-congelée ne serait éventuellement pas adaptée pour l'étude de

pénétration au sein d'un explant d'oreille de porc et peut ainsi favoriser le passage de PA à travers la peau par rapport à une application sur peau fraîche. Cependant les essais devront être renouvelés afin d'évaluer la reproductibilité des résultats obtenus.

L'étude de pénétration des particules colloïdales a également été entreprise sur peau fraîche. Les résultats sont présentés en Figure 63.

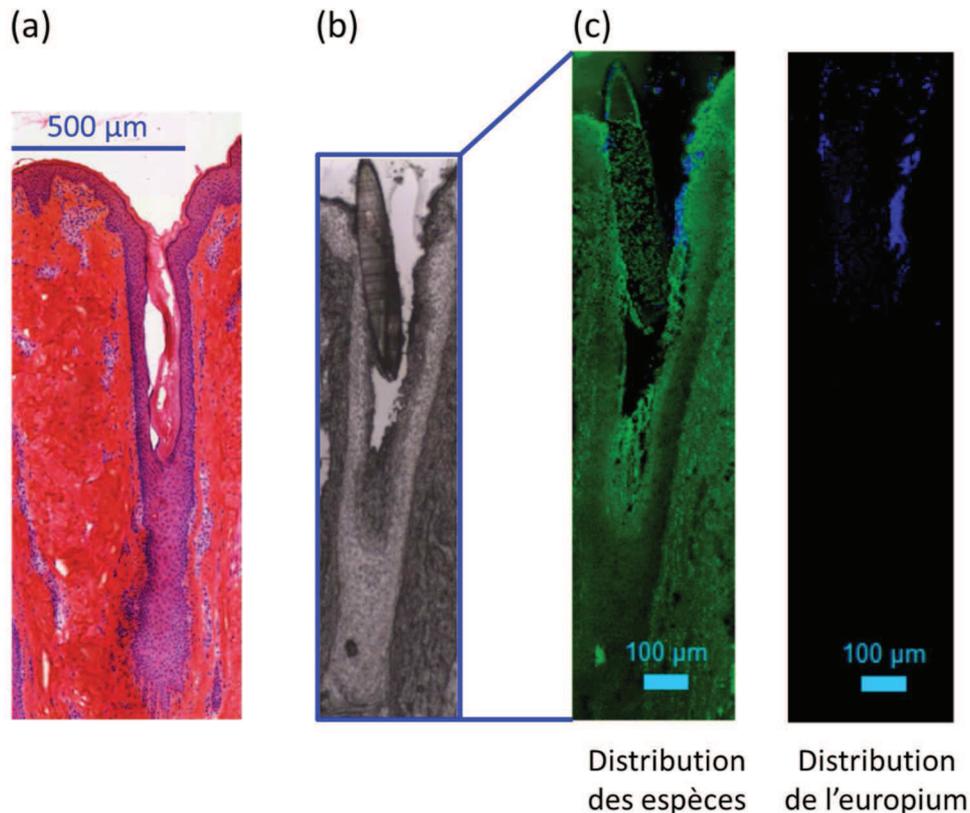


Figure 63 : Observation microscopique d'une coupe histologique de peau d'oreille de porc (a), image du microscope confocal (b) et cartographie Raman (c) de la peau d'oreille de porc (fraîche) contenant les particules colloïdales d'apatite stabilisées au (PEG)P 5200 et dopées en Eu (lot 2)

Le suivi du passage des particules colloïdales sur peau fraîche indique des résultats similaires à ceux obtenus sur la peau pré-congelée. Les résultats indiquent la présence des particules colloïdales uniquement au niveau de la surface cutanée, avec aucune détection d'euporium au niveau du derme. Les particules restent en surface de l'épiderme, au niveau de la couche cornée, et également au niveau de la partie supérieure des follicules pileux, au niveau de l'infundibulum.

Cette première étude sur peau fraîche présente des résultats de pénétration relativement similaires pour la solution d'euporium et les particules colloïdales contenant de l'euporium. Ces

résultats ne permettent cependant pas en l'état de conclure sur l'effet de la présence des particules sur le passage d'un PA à travers la peau. Dans cet essai, la solution aqueuse de nitrate d'euporium ne peut vraisemblablement pas franchir la couche cornée hydrophobe en raison de son caractère hydrophile. Comme expliqué précédemment, la couche cornée constitue la principale barrière lipophile de la peau pouvant empêcher la pénétration de substance dans les couches sous-jacentes. Le passage d'une molécule et/ou d'ions à travers la barrière cutanée est un phénomène relativement complexe impliquant plusieurs paramètres (comme par exemple sa masse molaire, sa solubilité...) et est donc dépendant du PA à étudier. De plus, lors de cette étude, une évaporation partielle de l'eau suite à l'application de la solution d'euporium a pu provoquer la cristallisation du nitrate d'euporium, ne favorisant pas ainsi son passage au sein de la peau. Ici, l'évaluation du passage de l'euporium s'est faite à partir d'une solution aqueuse de nitrate d'euporium non incorporée au sein d'une formulation galénique. Il faut cependant rappeler qu'une formulation est constituée de plusieurs excipients pouvant favoriser le passage de PA [230] (type alcool, TA, propylène glycol...). Afin de pouvoir discriminer les résultats et ainsi évaluer l'effet de la présence des particules sur le passage d'un PA, les prochaines étapes consisteront à intégrer les particules colloïdales et le nitrate d'euporium au sein d'une formulation galénique.

D. Conclusion

Cette étude a permis de mettre au point, au laboratoire, une méthodologie de suivi cutané des particules colloïdales dopées en euporium sur peau d'oreille de porc. Cette méthodologie a d'abord été développée sur des explants préalablement congelés afin de pouvoir multiplier les essais et de valider le mode opératoire établi. Les premiers résultats sur peau préalablement congelée suggèrent un passage transdermique de la solution d'euporium seule (de façon non uniforme) pouvant être du à une altération des échantillons préalablement congelé ne reflétant pas les conditions d'utilisation réelles. Les essais sur peau préalablement congelée ont ensuite été réalisés avec les particules colloïdales contenant de l'euporium en substitution d'ions calcium dans la structure apatitique. Ils indiquent un non passage des particules au niveau épidermique et dermique, celles-ci restant localisées au niveau de la couche cornée et des follicules pileux. Suite à la mise en place de ce protocole, les études ont été menées sur peaux fraîches. Les résultats semblent différer de ceux sur peau préalablement congelée pour la solution d'euporium qui semble rester, comme pour les particules colloïdales, au niveau de la couche cornée. L'évaluation de la localisation de l'euporium sur peau fraîche ne permettant pas de discriminer l'effet de la présence des particules colloïdales, il sera nécessaire pour les

prochaines étapes d'améliorer la formulation de la solution d'euporium seule, afin de favoriser son passage transcutané et ainsi de pouvoir discriminer le rôle des particules sur le passage. Les études devront être réalisées plusieurs fois afin d'obtenir des résultats statistiques fiables (la reproductibilité des résultats étant multi-facteurs dépendante).

4. Bilan du suivi de la pénétration cutanée et perspectives

Le suivi des particules colloïdales par différentes techniques a été entrepris : par microscopie biphotonique suite à l'adsorption du FITC sur les particules, par analyse PIXE et RBS suite à l'incorporation d'euporium ou de strontium au sein du cœur apatitique des particules et par MCR grâce à la photoluminescence de l'euporium. Les deux premières techniques ont montré une éventuelle possibilité de détecter les particules colloïdales grâce aux agents de marquage respectifs qui leur ont été incorporés. Cependant, pour ces deux techniques, des étapes d'amélioration de détection des particules sont nécessaires. Le suivi de la pénétration cutané par MCR a permis d'obtenir des premiers résultats prometteurs permettant de valider et de retenir cette technique. Les prochaines étapes consisteront à évaluer l'influence de la formulation.

III. Etude des cinétiques de diffusion à travers des membranes synthétiques et des modèles cutanés

Cette étude a été menée en collaboration avec la faculté de pharmacie de l'université de Sassari (Sardaigne) dans le cadre d'une mobilité de deux mois (obtention de la bourse de soutien à la mobilité de l'INP), dans le but d'évaluer la diffusion des particules colloïdales à travers des membranes synthétiques et biologiques. L'acide folique (AF), adsorbé à la surface des particules, a été utilisé comme principe actif modèle et a permis leur suivi par spectroscopie UV. L'adsorption de l'AF sur des particules d'apatite biomimétique nanocristalline a déjà été entreprise lors d'une étude précédente au laboratoire [145], sur des apatites stabilisées à l'AEP. L'étude des cinétiques de diffusion ont été réalisées à travers des membranes synthétiques de compositions et tailles de pores variables, afin d'évaluer l'influence de leurs caractéristiques sur la diffusion des particules colloïdales. Les études ont ensuite été entreprises sur explants d'oreilles de porcs. Des cellules de Franz ont été utilisées, en mode statique et dynamique, pour évaluer l'intérêt de la présence des particules colloïdales et d'une formulation galénique pour un ciblage topique.

1. Présentation de la technique

Les cellules de Franz sont des dispositifs développés en 1975 par Franz et Bronaugh [231], [232], et restent l'une des méthodes couramment utilisées pour le suivi du passage cutané de substances [233]. Il s'agit de cellules de diffusion, constituées d'un compartiment donneur et d'un receveur séparés par une membrane pouvant être d'origine synthétique, animale ou humaine. Le modèle de cellules utilisé pour ces travaux de recherche est le même que celui présenté dans le chapitre I (Figure 5). La substance à analyser est déposée dans le compartiment donneur. Sa diffusion à travers la membrane est ensuite dosée périodiquement dans le milieu receveur par prélèvement de celui-ci ou en analyse continue.

Il existe deux modalités d'utilisation des cellules de Franz : le mode statique, où le milieu receveur est fixe ; et le mode dynamique, où le milieu receveur est en flux continu. Le mode dynamique peut être en circuit ouvert, cela signifie que le milieu est constamment renouvelé. Il peut aussi être en circuit fermé où le milieu receveur n'est pas renouvelé. Le mode statique et le mode dynamique en circuit fermé peuvent parfois conduire à des phénomènes de saturation du milieu receveur. Il est donc important de vérifier que les conditions « sink » sont respectées : il faut s'assurer que la solubilité du PA ne sera pas un facteur limitant à sa libération. Dans ces conditions, au cours et à la fin de la cinétique, sa concentration doit être inférieure de 3 à 10 fois à la concentration de saturation du PA.

2. Matériels et méthodes

A. Préparation des échantillons

a. Préparation des colloïdes

L'AF a été adsorbé à la surface des particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200 afin de suivre leur diffusion par spectroscopie UV (à $\lambda = 280$ nm). Ces travaux se sont inspirés de précédentes études réalisées au laboratoire [9], [145], [156]. Les colloïdes ont été obtenus à partir du protocole de référence indiqué dans le chapitre II (partie II.1.A), avec la seule différence d'ajout d'AF dans la solution A. Brièvement, les colloïdes d'apatite nanocristalline ont été obtenus, à température ambiante, par co-précipitation à partir d'une solution A, contenant du nitrate de calcium (4,87 mmol, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), du (PEG)P 5200 jouant le rôle d'agent dispersant (0,076 mmol) et de l'AF (0,011 mmol) dans un volume total de 18,75 mL (pH = 9,5), et d'une solution B, contenant du di-ammonium hydrogénophosphate (1,62 mmol, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) solubilisé dans 6,25 mL d'eau déminéralisée (pH = 9,5). Le mélange est ensuite

placé à 100°C pendant 16h pour l'étape de maturation (une étude séparée ayant préalablement montré que l'AF n'était pas altéré par ces conditions expérimentales). Les colloïdes (nommé dans la suite de l'étude (PEG)P 5200-AF) ont ensuite été dialysés avec une membrane de dialyse dont le seuil de coupure était compris entre 12000 à 14000 g/mol et le pH a été ramené à 7,4.

Les résultats de diffusion des particules (PEG)P 5200-AF ont été comparés à ceux de l'AF en solution. Pour cela, une solution d'AF d'une concentration de 200 mg/L a été préparée dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 / NaOH, pH \sim 7,4). Les conditions « sink » ont été vérifiées et validées pour les suivis cinétiques en mode statique et dynamique.

b. Préparation des formulations

Afin d'évaluer si la diffusion des particules colloïdales était influencée par la formulation, des premiers tests ont été réalisés en incorporant les colloïdes au sein d'une formulation galénique (gel d'alginate). Deux types de gels ont été formulés : des gels contenant uniquement une solution d'AF et des gels contenant l'AF adsorbé sur les particules colloïdales. Pour pouvoir comparer le comportement des deux types de gels, il est important de rajouter des ions calcium dans le gel à l'AF, afin d'obtenir une viscosité comparable au gel contenant les colloïdes à l'AF. En effet, les ions calcium sont connus pour interagir avec l'alginate en augmentant la viscosité des gels [234]. Les gels contenant les colloïdes ont été obtenus en préparant les colloïdes selon le protocole cité ci-dessus et en ajoutant à cette préparation 3% (masse / volume) d'alginate de sodium en poudre à l'aide d'un Ultra-turrax® à une vitesse d'agitation d'environ 6000 rpm. Pour les gels contenant uniquement de l'AF, une solution d'AF (200 mg/L, pH \sim 7,4) a été préparée. Des ions calcium y ont été ajoutés à différentes concentrations afin de déterminer laquelle se rapproche le plus de la viscosité des gels de colloïdes (CaCl_2 5, 7,5 et 10 mmol/L), et de l'alginate de sodium à 3 % (masse / volume) (Ultra-turrax®, 6000 rpm).

B. Caractérisation des échantillons

Pour les colloïdes (PEG)P 5200-AF, des mesures de la taille des particules ont été réalisées par DLS à l'aide d'un granulomètre laser, le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, $\lambda = 633$ nm), sans dilution préalable des échantillons.

Une mesure de la viscosité des gels a été effectuée à 25°C à l'aide d'un rhéomètre (Haake RS75 Rheostress) couplé à un régulateur de température (Haake UTM Controller) et un

thermostateur (Haake F6) (programme : augmentation du taux de cisaillement de 0 à 500s^{-1} pendant 200s, maintien de ce taux (500s^{-1}) pendant 60s, diminution du taux de 500 à 0s^{-1} (200s), cône 60 mm d'angle 1° , à 25°C).

C. Etude de diffusion *in vitro* et *ex vivo*

Deux modes opératoires ont été testés : le mode statique, réalisé à l'aide du système de diffusion cellulaire Microette (Hanson), et le mode dynamique en collaboration avec la faculté de pharmacie de Sassari (Sardaigne) à l'aide de cellules de diffusion propre au laboratoire, appelées cellules de Franz modifiées.

a. Mode statique

Les cellules de Franz Microette de Hanson correspondent à un système de banc de 6 cellules de diffusion verticales ayant un volume standard au niveau de la chambre réceptrice de 7 mL. Le schéma du système est présenté en Figure 64.

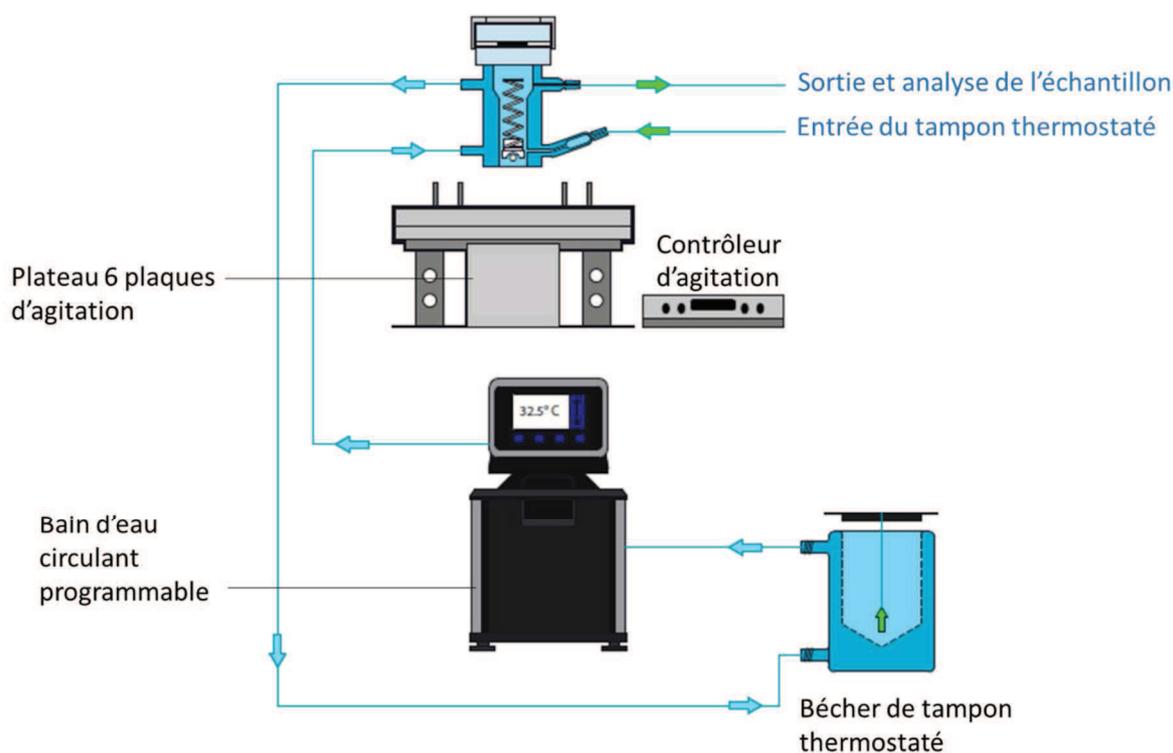


Figure 64 : Schéma des cellules de diffusion Microette (Hanson)

L'ensemble du montage a été thermostaté à $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (température de la surface cutanée). L'aire de diffusion pour les cellules de Franz est de $3,14\text{ cm}^2$. Ces cellules possèdent un système de piégeage des bulles d'air au niveau de l'entrée du tampon thermostaté, afin

d'éviter la formation de bulles d'air sous la membrane de diffusion. Les compartiments donneurs sont fermés à l'aide d'un bouchon hermétique afin de limiter l'évaporation des échantillons. Chaque compartiment receveur a été rempli d'une solution tampon ayant un pH proche du pH physiologique. Le tampon a été préparé de la façon suivante : 250 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4 , 0,2M) ont été mélangés à 195,5 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0,2M) et complétés avec de l'eau déminéralisée pour un volume total d'un litre. Chaque compartiment receveur possède un système d'agitation par barreau aimanté accompagné d'un système hélicoïdal. A chaque prélèvement, celui-ci est remplacé par le même volume de tampon thermostaté. Le suivi du passage s'est effectué sur 24 et 48h.

b. Mode dynamique (cellules de Franz modifiées)

Les cellules à flux dynamique ont été élaborées par le laboratoire de la faculté de pharmacie de Sassari (Sardaigne). Il s'agit de 3 cellules de diffusion montées en parallèles et reliées à un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-160A). L'ensemble du montage a été thermostaté à $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. L'aire de diffusion pour les cellules de Franz est de $3,14 \text{ cm}^2$. Chaque cellule a été placée de façon légèrement surélevée sur un côté afin d'éviter la formation de bulles d'air directement sous la membrane. Les compartiments donneurs ont été partiellement recouverts d'un support en plastique, afin d'éviter l'évaporation des échantillons à analyser. Chaque compartiment receveur a été rempli d'une solution tampon ayant un pH proche du pH physiologique (même préparation que pour le mode statique). Un barreau aimanté a été placé dans le compartiment receveur afin de favoriser l'agitation, en plus du système de pompe péristaltique auquel sont reliées les cellules. Les cellules ont été utilisées en circuit fermé, avec un volume circulant total de 50 mL et un flux fixé à 6 mL/min.

La cinétique de diffusion d'une solution d'AF seul (200 mg/L) et de l'AF adsorbé sur les particules colloïdales a été étudiée sur 2h (temps nécessaire pour l'atteinte d'un état d'équilibre), avec un volume initial d'un millilitre dans le compartiment donneur, tandis que pour les gels (d'AF seul et adsorbé), le suivi s'est déroulé sur 6h, avec une quantité initiale d'environ 1g. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

c. Suivi du passage in vitro

L'étude du passage des particules colloïdales à travers différents types de membranes a été réalisée afin d'évaluer l'impact des caractéristiques des membranes sur le passage des

particules. Plusieurs types de membranes synthétiques ont été utilisés pour le suivi *in vitro* et sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Membranes synthétiques testées pour le suivi du passage *in vitro*

<i>Taille des pores des membranes (μm)</i>	<i>Type de membrane</i>
0,05	Polycarbonate
0,2	Polyamide (nylon)
	Acétate de cellulose
Non définie	Polyéthersulfone et polyoléfine (Strat-M™)

Le type de membrane pouvant avoir une influence sur le passage de la substance à analyser en fonction de l'affinité pour la membrane, deux membranes de natures différentes mais de même porosité ont été comparées (polyamide / acétate de cellulose).

d. Suivi du passage ex vivo

Les études *ex vivo* ont été réalisées uniquement en mode dynamique sur des peaux d'oreilles de porc provenant d'un abattoir local proche de Sassari. Les premiers essais ont été réalisés sur l'épiderme seul. Le pré-traitement des peaux d'oreilles de porc a consisté à les laver à l'eau froide, afin de les rincer et éliminer toute impureté. Les oreilles ont été tondues et rasées afin de ne pas gêner l'étude de pénétration, les poils présents sur les oreilles de porc étant relativement longs. Les oreilles ont ensuite été trempées dans un bain d'eau à 60°C pendant 2 minutes, dans le but de faciliter la séparation ultérieure de l'épiderme et du derme. Elles ont été séchées, et l'épiderme a été séparé du derme par arrachage doux manuel. Les explants ont été placés à -20°C jusqu'à leur utilisation (< 1 mois). La validation de la technique, permettant de prélever uniquement l'épiderme, a été vérifiée grâce à une observation des prélèvements par microscopie optique (coloration histologique (hématoxyline-éosine) en collaboration avec le CPTP, dont le protocole a été détaillé précédemment dans ce manuscrit.

Avant utilisation, les modèles de peaux ont été décongelés à température ambiante puis réhydratés dans le milieu utilisé dans la chambre réceptrice des cellules de Franz. Ils ont ensuite été examinés au microscope optique, afin de vérifier l'absence de trous, qui pourraient fausser les études de diffusion. Les explants ont ensuite été placés sur les cellules de Franz.

3. Résultats et Discussion

A. Caractérisation des particules colloïdales

Les caractérisations par DRX et IRTF des colloïdes au (PEG)P 5200 ont été décrites précédemment. La mesure du D_h moyen des particules colloïdales s'est faite par analyse DLS. Pour l'étude en mode statique, le D_h moyen des particules colloïdales est de 195 nm avec un indice de polydispersité de 0,19 (Figure 65). Le D_h moyen des particules colloïdales (PEG)P 5200-AF pour l'étude en mode dynamique est d'environ 190 nm, avec un indice de polydispersité de 0,16.

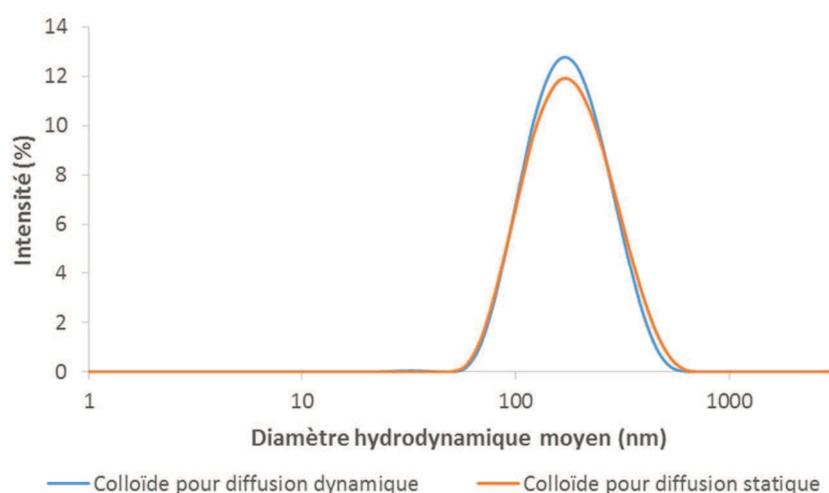


Figure 65 : Analyse DLS du D_h moyen des particules colloïdales au (PEG)P 5200 pour la diffusion en mode statique et dynamique

B. Suivi cinétique en mode statique

Dans un premier temps, les études de cinétique ont été réalisées en mode statique, à l'aide des cellules de Franz disponibles au CIRIMAT. Pour tous les essais, la stabilité de l'AF dans le tampon utilisé a tout d'abord été vérifiée. Pour cela, un suivi de l'absorbance de l'AF dans le tampon a été réalisé pendant 48h. L'absence de diminution d'absorbance semble indiquer qu'aucune dégradation de l'AF n'est observée après 48h de contact avec le tampon.

a. Influence des caractéristiques physico-chimiques de la membrane

Deux paramètres au niveau des membranes synthétiques peuvent influencer une étude de cinétique : le caractère hydrophile ou lipophile de la membrane, et sa porosité. Ainsi, trois membranes synthétiques ont été testées : 2 membranes hydrophiles de porosités différentes (0,05 (polycarbonate) et 0,2 μm (acétate de cellulose)) et une membrane hydrophobe (Strat-

MTM (Merck Millipore)). Cette dernière est constituée de 2 couches de polyéthersulfone (PES, résistante à la diffusion) à la surface d'une couche de polyoléfine (plus ouverte et diffusante). Ces couches polymériques créent une structure poreuse avec un gradient de porosité et ainsi un gradient de diffusion. Cette structure est pré-imprégnée par le fournisseur, d'un mélange de lipides de synthèse afin de mimer les propriétés lipophiles cutanées.

L'étude de la cinétique de diffusion d'une solution d'AF (Figure 66) permet de mettre en évidence l'influence du caractère hydrophile/lipophile de la membrane utilisée.

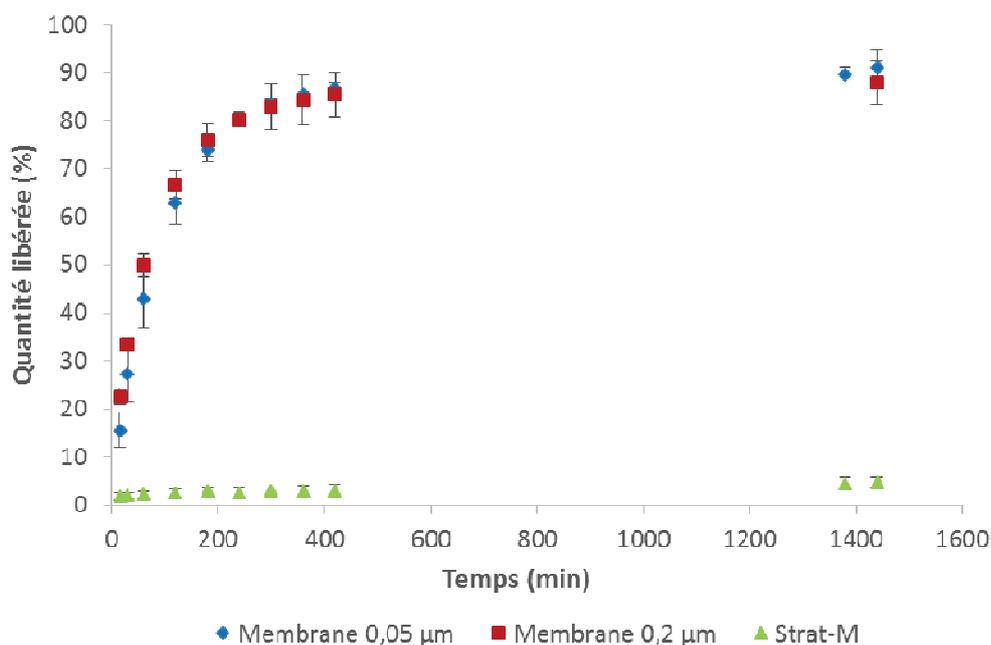


Figure 66 : Suivi de la diffusion d'une solution d'AF à travers différentes membranes synthétiques en mode statique

En effet, les résultats de suivi du passage de la solution d'AF à travers les deux membranes hydrophiles de 0,05 et 0,2 µm indiquent des cinétiques similaires (Figure 66), ce qui s'explique en raison de l'absence d'une gêne stérique (solution aqueuse d'AF). A environ 240 min (4h) d'étude apparaît un début de palier pour atteindre environ 90% de diffusion au bout de 24h. En revanche, le modèle de membrane Strat-MTM, hydrophobe, ne laisse passer que très peu d'AF en solution aqueuse dans ces conditions (< 5% à 24h). Il serait intéressant par la suite de comparer ce résultat avec une étude à travers des modèles cutanés comme la peau d'oreille de porc ou sur des explants humains pour valider la correspondance des membranes Strat-MTM avec la peau humaine. En effet, bien que ces membranes aient démontré une certaine capacité à mimer le passage cutané [235], les résultats peuvent cependant différer de ceux obtenus avec des peaux humaines dermatomées, en raison de plusieurs paramètres au niveau de

la manipulation [236]. Il sera donc important de vérifier la corrélation obtenue avec les Strat-M™ et des explants cutanés.

Compte-tenu de la diffusion très faible d'AF au travers de la membrane hydrophobe Strat-M™, il apparaît judicieux de sélectionner une membrane synthétique hydrophile pour la suite de notre étude, visant à étudier l'influence de la présence des particules colloïdales sur la diffusion du PA.

b. Rôle de la porosité et influence de la présence des colloïdes

Le passage des particules colloïdales (PEG)P-AF a été suivi à travers les membranes synthétiques hydrophiles (polycarbonate et acétate de cellulose) de porosité 0,05 et 0,2 µm. Le suivi a été entrepris sur 48h et est présenté en Figure 67.

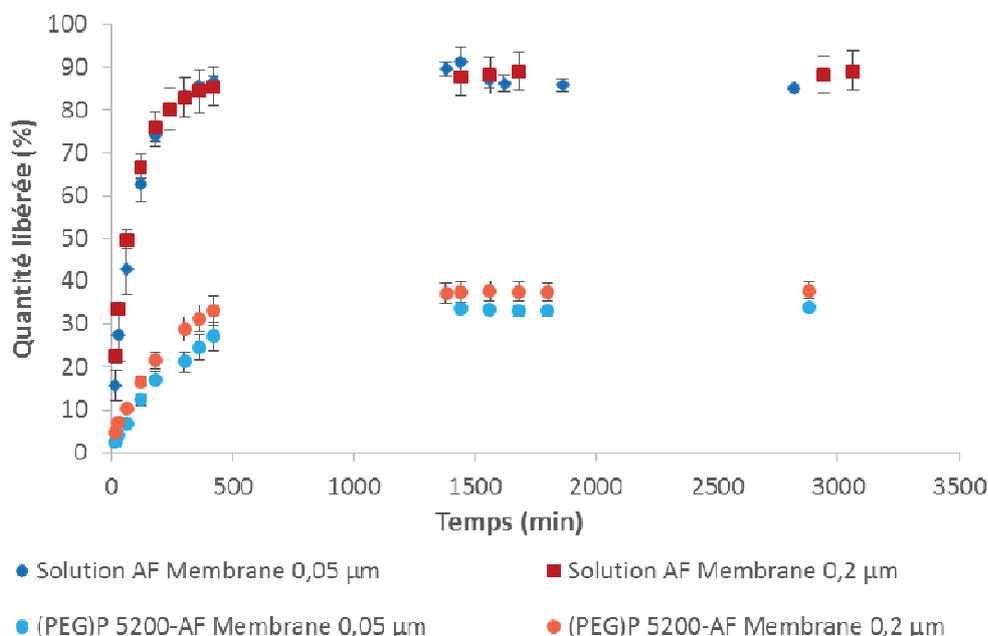


Figure 67 : Suivi de la diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200 – AF à travers différentes membranes synthétiques en mode statique

Lorsque l'AF est adsorbé sur les particules colloïdales, les cinétiques de diffusion sont significativement plus lentes (~1500 min) que lorsqu'il est libre en solution (~400 min). La quantité totale libérée d'AF est fortement diminuée en présence des colloïdes (~90% pour la solution d'AF, ~34% d'AF adsorbée sur les particules colloïdales à travers la membrane à 0,05 µm et ~38% à travers la membrane à 0,2 µm). De plus, la diffusion des particules colloïdales paraît relativement similaire pour les membranes de 0,05 et 0,2 µm.

Afin de quantifier cette observation, le calcul du coefficient de perméation a été calculé. Il permet de comparer les différents résultats obtenus à partir des systèmes d'étude identiques. Le coefficient effectif de perméation (P_{eff}) est défini par la formule suivante [237] :

$$P_{eff} = \Delta \times \frac{V}{A \cdot CD} \quad \text{Équation 14}$$

Avec :

- P_{eff} , le coefficient effectif de perméation (mg/cm².min)
- $\Delta = \left(\frac{dc}{dt}\right)_{ss}$: Variation de la concentration en fonction du temps (état stationnaire) (μmol/mL.min)
- V : Volume du compartiment receveur (mL)
- A : Aire de diffusion (cm²)
- CD : Concentration initiale dans le compartiment donneur (μmol/mg)

P_{eff} a ainsi été calculé pour les 2 études de diffusion à travers les membranes synthétiques de 0,05 et 0,2 μm. Les deux valeurs respectives de $0,52 \cdot 10^{-3} \pm 0,09 \cdot 10^{-3}$ et $0,63 \cdot 10^{-3} \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$ mg/cm².min sont très proches et traduisent bien un flux de diffusion similaire pour les 2 types de membranes.

La diffusion à travers la membrane de 0,05 μm devrait être inférieure à celle à travers la membrane à 0,2 μm. Pour la membrane de 0,2 μm, les résultats observés semblent correspondre avec les mesures de tailles. En effet, les résultats de DLS indiquent qu'environ la moitié des particules possèdent un D_h moyen inférieur à 200 nm, ce qui peut correspondre à environ 40% de passage à travers une membrane 0,2 μm. Pour la membrane de 0,05 μm, la diffusion devrait être quasiment nulle, or une quantité des particules franchissent la membrane. Ces résultats peuvent, au moins en partie, s'expliquer par le fait que la DLS fait l'hypothèse que les particules sont sphériques, or elles peuvent posséder une forme différente (démontrée dans une étude précédemment réalisée au laboratoire pour les particules colloïdales stabilisées à l'AEP ayant une forme ellipsoïdale [119]). Pour confirmer ces observations, une mesure de la forme des particules par cryomicroscopie devra être réalisée. En effet, comme présenté dans le chapitre II, des premiers essais d'observation des échantillons ont été entrepris en microscopie électronique en transmission, mais la préparation de l'échantillon a provoqué la désagglomération des particules colloïdales empêchant ainsi d'observer la forme des

agglomérats de particules initiales. Suite à ces observations, il a été important d’essayer d’évaluer si les résultats de diffusion identiques pour les 2 membranes ne pouvaient pas être dus également à une désorption partielle de l’AF lors de l’étude de la cinétique de diffusion.

c. Etude de la désorption éventuelle de l’AF à partir des colloïdes

Une étude de diffusion a été réalisée avec la synthèse d’un nouveau lot de colloïde (PEG)P 5200 – AF, en utilisant une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure de 3500 g/mol et une porosité de 0,001 μm [238]. Il est à noter que la mesure de taille a donné un D_h moyen légèrement plus élevé que précédemment de 215 nm avec un indice de polydispersité de 0,2. Les résultats de diffusion sont présentés en Figure 68.

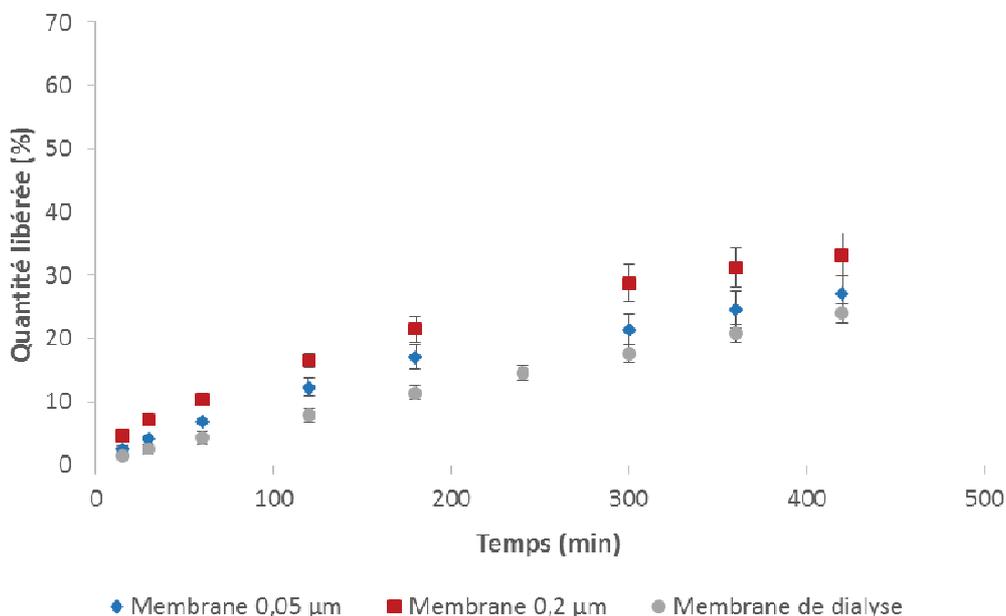


Figure 68 : Evaluation de la désorption de l’AF à la surface des particules colloïdales en mode statique

La membrane de dialyse ne peut permettre que la diffusion de molécules d’AF (sans possibilité de passage des particules d’apatite trop volumineuses). La Figure 68 montre qu’une quantité croissante d’AF est mesurée au cours du temps. Ces résultats mettent donc en évidence une désorption partielle de l’AF au cours de l’étude.

Afin d’étudier l’influence de la présence des particules colloïdales sur le passage de l’AF, un suivi de la cinétique sur des temps plus courts permettrait de minimiser l’influence de la désorption sur les résultats obtenus. Pour ce faire, une collaboration a été initiée avec la

faculté de pharmacie de l'Université de Sassari en Italie, possédant une expertise et un système réalisé par leurs soins correspondant à des cellules de diffusion en mode dynamique.

C. Suivi cinétique en mode dynamique

a. Etude préliminaire

Le suivi d'une solution d'AF seul a été entrepris à travers deux types de membranes de porosité différentes mais de nature identique (hydrophile, membranes identiques à celles utilisées en mode statique en polycarbonate (0,05 μm) et en acétate de cellulose (0,2 μm)), afin de vérifier que la porosité n'a pas d'influence sur la diffusion du PA seul étudié en mode dynamique (Figure 69).

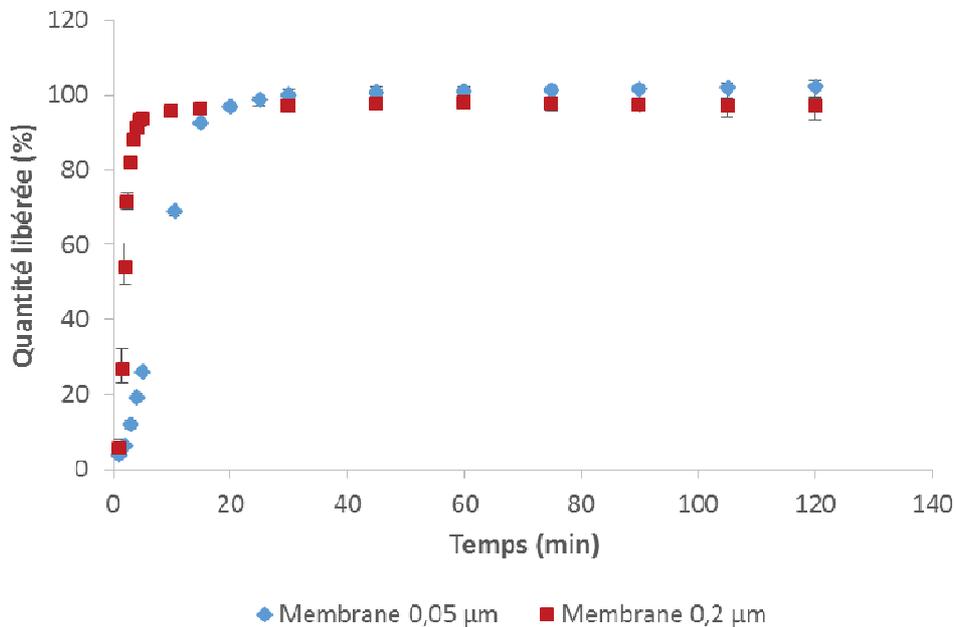


Figure 69 : Suivi de la diffusion d'une solution d'AF à travers 2 types de membranes synthétique en mode dynamique

La Figure 69 montre, en comparaison avec la Figure 66, que la cinétique de diffusion d'une solution d'AF en mode dynamique est significativement plus rapide qu'en mode statique. La totalité de la solution d'AF a diffusé à travers la membrane après moins de 10 minutes pour la membrane de porosité 0,2 μm , et moins de 30 minutes pour la membrane de porosité 0,05 μm , tandis qu'en mode statique 90% du PA n'est libéré qu'au bout de 400 min (Figure 66). L'étude de la désorption de l'AF des particules colloïdales (Figure 68) a par ailleurs montré qu'au bout de 30 minutes moins de 10% de la molécule est désorbée. Il est donc intéressant d'utiliser le mode dynamique, afin de minimiser le phénomène de désorption, et ainsi pouvoir

évaluer l'importance de la vectorisation d'un PA par les particules colloïdales pour favoriser une action locale.

Enfin, afin de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats obtenus pour le suivi des particules colloïdales à travers les membranes synthétiques, plusieurs synthèses colloïdales ont été utilisées : un lot 1 ayant un D_h moyen de 185 nm (PdI de 0,163) et un lot 2 ayant un D_h moyen de 195 nm (PdI de 0,165). Pour cela, les membranes d'une porosité de 0,05 μm (polycarbonate) ont été employées. Les résultats sont présentés en Figure 70.

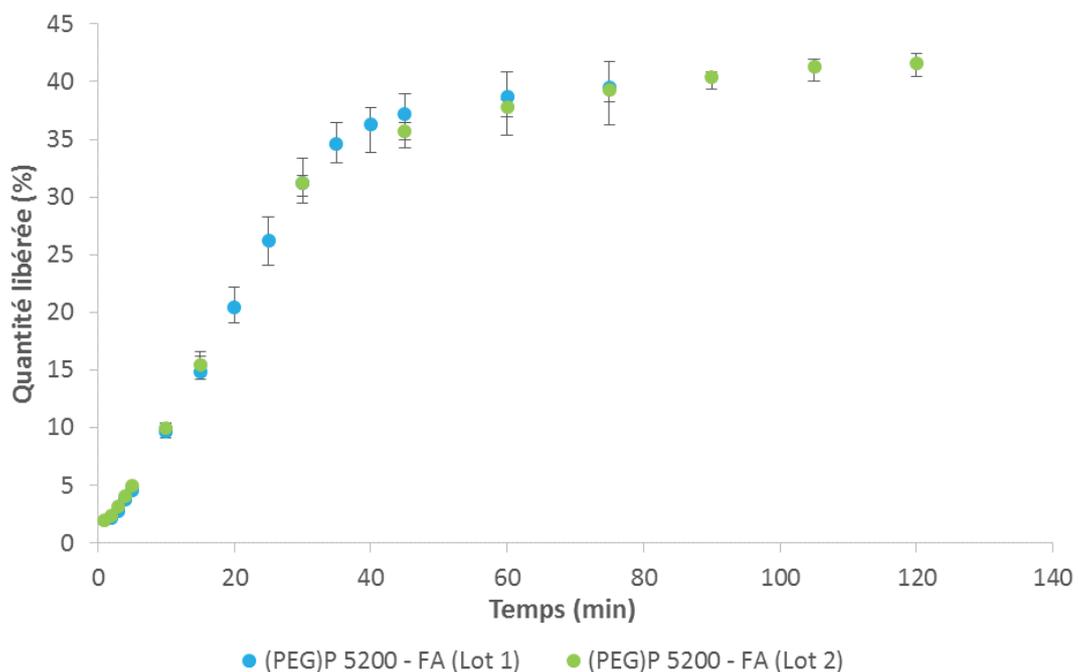


Figure 70 : Suivi de la diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200 - AF à travers une membrane de polycarbonate (0,05 μm) en mode dynamique – Evaluation de l'effet de lot

Pour chaque lot, le suivi du passage a été réalisé en triplicat. L'excellente reproductibilité des résultats montre que le lot n'a pas d'influence sur le suivi des colloïdes (PEG)P 5200 – AF.

b. Influence de la nature de la membrane sur le passage des particules colloïdales

Comme pour le mode statique, l'influence de la nature de la membrane a été évaluée. L'effet de la composition des membranes a été évalué pour une porosité de membrane de 0,2 μm de diamètre. Deux compositions ont été testées : le polyamide (nylon, hydrophobe) et l'acétate de cellulose (hydrophile). La Figure 71 montre une rétention plus importante pour la

membrane en polyamide (~ 60% libéré) que pour la membrane en acétate de cellulose (~ 90% libéré).

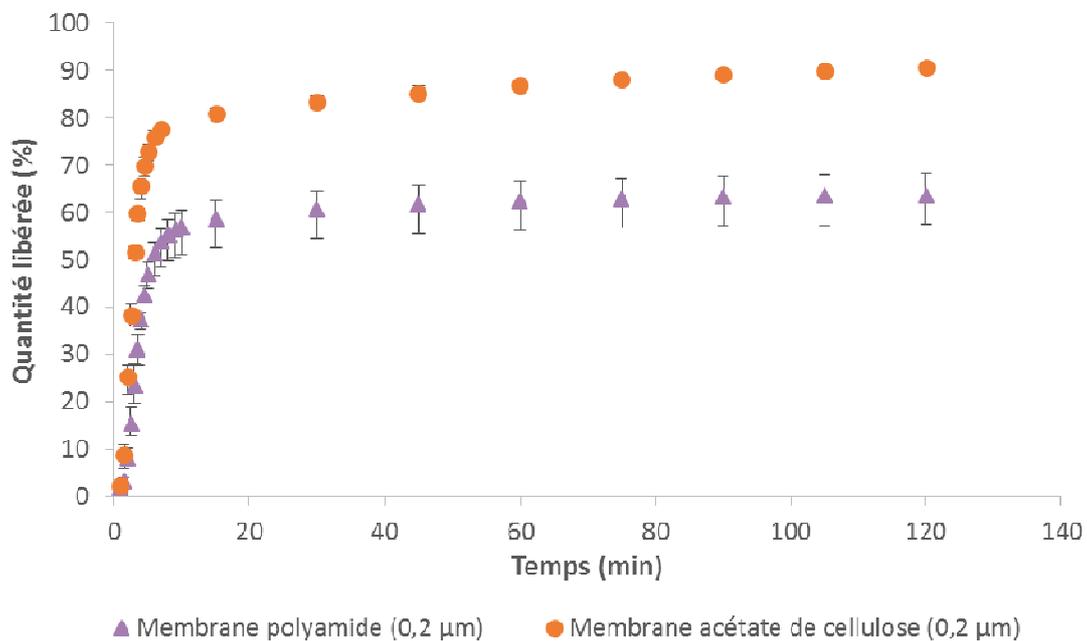


Figure 71 : Suivi de la diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200 - AF à travers deux types de membranes de même porosité (0,2 µm, polyamide et acétate de cellulose) en mode dynamique

Ces résultats coïncident avec la nature hydrophile du colloïde dont l'affinité est plus grande pour la membrane hydrophile (acétate de cellulose) que pour la membrane de polyamide (plus hydrophobe), permettant ainsi un passage facilité.

Les résultats montrent ainsi le rôle de la nature hydrophile ou lipophile de la membrane (indépendamment de la porosité) sur le passage des particules colloïdales.

c. Influence de la taille des pores sur le passage des particules colloïdales

Pour évaluer l'influence de la taille des pores, les cinétiques ont été suivies sur les mêmes membranes qu'en mode statique (0,05 µm (polycarbonate) et 0,2 µm (acétate de cellulose)). Les colloïdes (PEG)P 5200 – AF utilisés pour cette étude ont un D_h moyen d'environ 190 nm avec un indice de polydispersité de 0,165.

Les résultats de diffusion des particules colloïdales avec des membranes de tailles de pores différentes sont présentés en Figure 72.

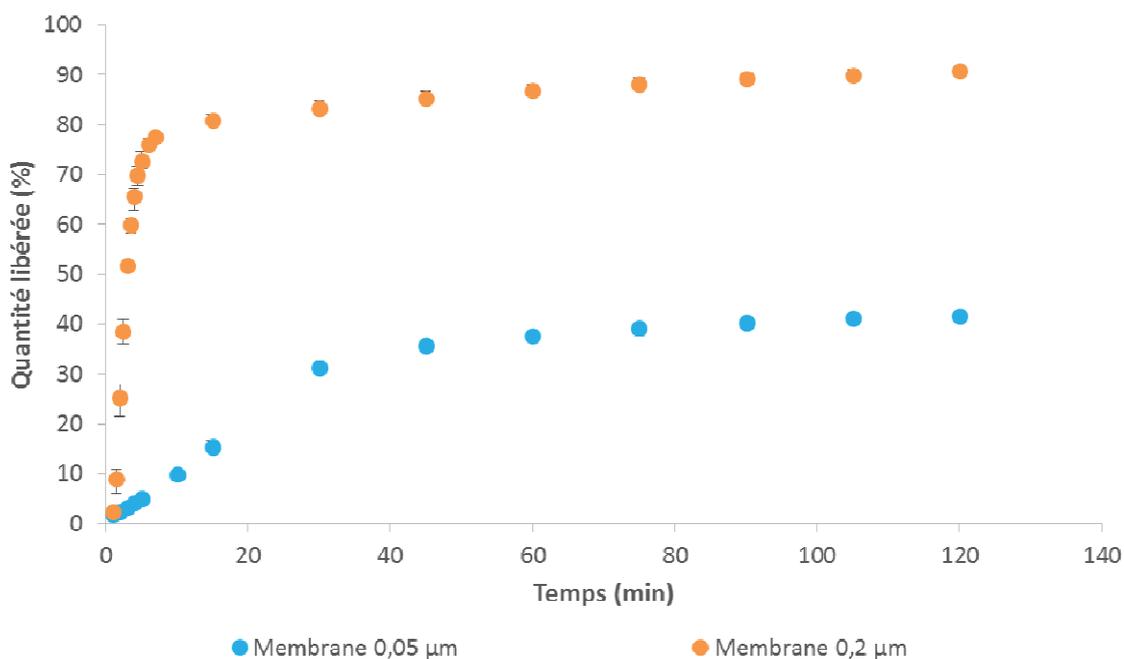


Figure 72 : Suivi de la diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200 - AF à travers différentes membranes synthétiques de porosités différentes en mode dynamique

Une différence des cinétiques est à noter, entre celles réalisées avec la membrane ayant une taille de pores supérieure au D_h moyen (c'est-à-dire supérieure à 190 nm, pour la membrane de 0,2 µm) et celle ayant une porosité inférieure au D_h (de 0,05 µm). En effet, lorsque la porosité est supérieure à 190 nm, environ 90% des particules colloïdales passent (sous réserve d'une non désorption de l'AF), avec un palier atteint à l'issue de deux heures de cinétique, comparé à une quantité libérée d'environ 40% avec la membrane de 0,05 µm. Lorsque la porosité de la membrane est inférieure à 190 nm, la cinétique est beaucoup plus lente : le plateau est atteint après environ une heure d'étude et seulement 40 % des particules franchissent la membrane. Cependant, en comparant les résultats de cinétique obtenus avec l'analyse du D_h moyen des particules colloïdales (Figure 65), les résultats diffèrent de ceux attendus. Cette différence peut être expliquée par les 2 hypothèses présentées pour le mode statique (facteur de forme et désorption partielle de l'AF).

Pour chaque étude, le coefficient effectif de perméation a été calculé. Plus la cinétique de diffusion est lente, plus le coefficient de perméation est faible, de 3,21 mg/cm².min pour la membrane à 0,05 µm et de 87,27 mg/cm².min pour la membrane à 0,2 µm.

d. Comparaison des deux méthodes d'étude cinétique (statique/dynamique)

Les cellules de Franz ont été utilisées selon deux modes, permettant leur comparaison pour un suivi cinétique de la diffusion d'une solution d'AF seul ou adsorbé sur les particules

d'apatite colloïdales. Les valeurs des coefficients de perméation et de pourcentage total d'AF libéré obtenus en fonction de la méthode sont présentées dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Comparaison des coefficients effectifs de perméation et des quantités libérées des particules colloïdales (PEG)P 5200 – AF à travers les membranes synthétiques

<i>Membrane</i>	<i>Mode statique</i>		<i>Mode dynamique</i>	
	<i>Pe_{eff} (mg/cm².min)</i>	<i>Quantité totale libérée (%)</i>	<i>Pe_{eff} (mg/cm².min)</i>	<i>Quantité totale libérée (%)</i>
0,05 µm polycarbonate	0,52.10 ⁻³ ± 0,09.10 ⁻³	37,9 ± 1,8	3,27 ± 0,12	41,6 ± 1,2
0,2 µm acétate de cellulose	0,63.10 ⁻³ ± 0,07.10 ⁻³	34,0 ± 0,8	89,00 ± 3,67	90,7 ± 0,9

La comparaison des deux modes d'utilisation des cellules de Franz (statique et dynamique) et en particulier des coefficients de perméation *Pe_{eff}*, met clairement en évidence une cinétique de diffusion beaucoup plus rapide en mode dynamique (de 3,27 mg/cm².min pour la membrane ayant une porosité de 0,05 µm et 89,00 mg/cm².min pour la membrane de 0,2 µm) qu'en mode statique (d'environ 0,6.10⁻³ mg/cm².min pour les 2 membranes). En mode dynamique le palier est atteint en moins d'une heure (Figure 70) comparé à plusieurs heures en mode statique (Figure 67). De plus, pour une membrane (0,05 µm) de porosité inférieure au *D_n* moyen des particules, le pourcentage total libéré d'AF n'est pas significativement influencé par le mode de cellule de Franz utilisé (environ 40% dans les deux cas). En revanche, dans le cas de la membrane de porosité 0,2 µm, le pourcentage libéré est dépendant du mode utilisé, avec un passage favorisé en mode dynamique. Ceci pourrait s'expliquer par les différentes conditions expérimentales entre les deux modes : le volume du compartiment receveur (6 ml en mode statique et 50 ml en mode dynamique), et la présence d'un flux de recirculation en mode dynamique.

Ainsi le choix du mode dynamique pour l'étude de diffusion en cellules de Franz sera préféré pour les étapes suivantes. Cette première étude a permis de mettre en évidence l'importance du choix à la fois de la membrane synthétique mais aussi du mode utilisé pour l'utilisation des cellules de Franz en fonction du système à étudier. L'utilisation de membrane hydrophile a permis une étude plus fondamentale de l'influence de la présence et de la taille des particules colloïdales sur la diffusion d'un PA modèle. Cependant ces membranes étant moins représentatives de la couche cornée, la suite de l'étude s'est portée sur le passage de ces particules à travers des membranes animales simulant la peau humaine : des explants

(épidermes) de peaux d'oreilles de porc, en utilisant le mode dynamique (pour des cinétiques plus rapides).

e. Suivi cinétique ex vivo

L'étude de la diffusion *ex vivo* s'est faite avec les particules colloïdales (PEG)P 5200 - AF ayant un D_h moyen relativement similaire aux études *in vitro*, d'environ 195 nm.

Une vérification de la technique de prélèvement de l'épiderme (uniquement) a été réalisée par observation microscopique (coloration histologique, collaboration avec le CPTP) des explants cutanés de porc, dont les résultats sont présentés en Figure 73.

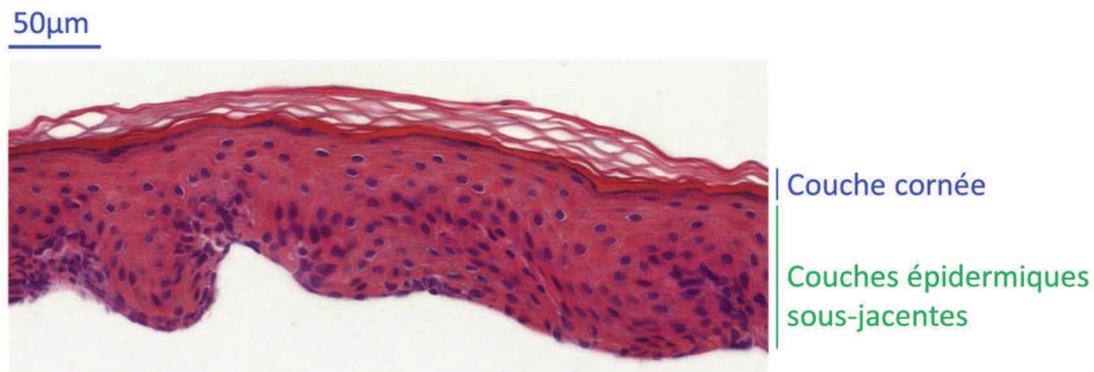


Figure 73 : Observation microscopique d'un prélèvement épidermique de peau d'oreille de porc

L'observation microscopique met bien en évidence l'absence de couche dermique (non observation de fibres de collagène et d'élastine). La présence uniquement de la couche cornée et des couches épidermiques sous-jacentes est observable sur la Figure 73. Il est cependant difficile de différencier les sous-couches épidermiques les unes des autres sur les prélèvements effectués, du fait d'une légère désorganisation des couches lors de l'arrachage doux. Il est ainsi difficile de déterminer si la couche basale est présente ou si celle-ci s'est arrachée au moment du prélèvement.

Après observation microscopique des oreilles de porc (afin de vérifier l'absence de lésions), celles-ci ont été placées sur les cellules de Franz (mode dynamique) en vue de l'étude du passage des colloïdes *ex vivo*. Les études *ex vivo* sont plus délicates pour l'obtention de résultats reproductibles, les membranes épidermiques étant beaucoup plus fines et ainsi plus fragiles que des membranes synthétiques. De plus, chaque étude est dépendante du prélèvement de peau dont l'épaisseur peut varier d'un échantillon à l'autre, mais aussi la pilosité, le nombre

de pores ouverts et fermés... Afin de limiter les variabilités de pénétration, les peaux ont été préparées de la même façon et les prélèvements ont été réalisés uniquement sur la partie externe des oreilles, la partie interne étant très fine et fragile. Il a ainsi été difficile d'obtenir des résultats hautement reproductibles pour la diffusion d'une solution d'AF seule à travers l'épiderme des peaux d'oreilles de porc. Cependant une tendance, traduisant un passage relativement rapide (~20 minutes) de la totalité de l'AF pour la solution d'AF seul, a été mise en évidence (Figure 73). La diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200 – AF est beaucoup plus lente et montre un passage très faible à travers la barrière épidermique. Les résultats sont présentés en Figure 74.

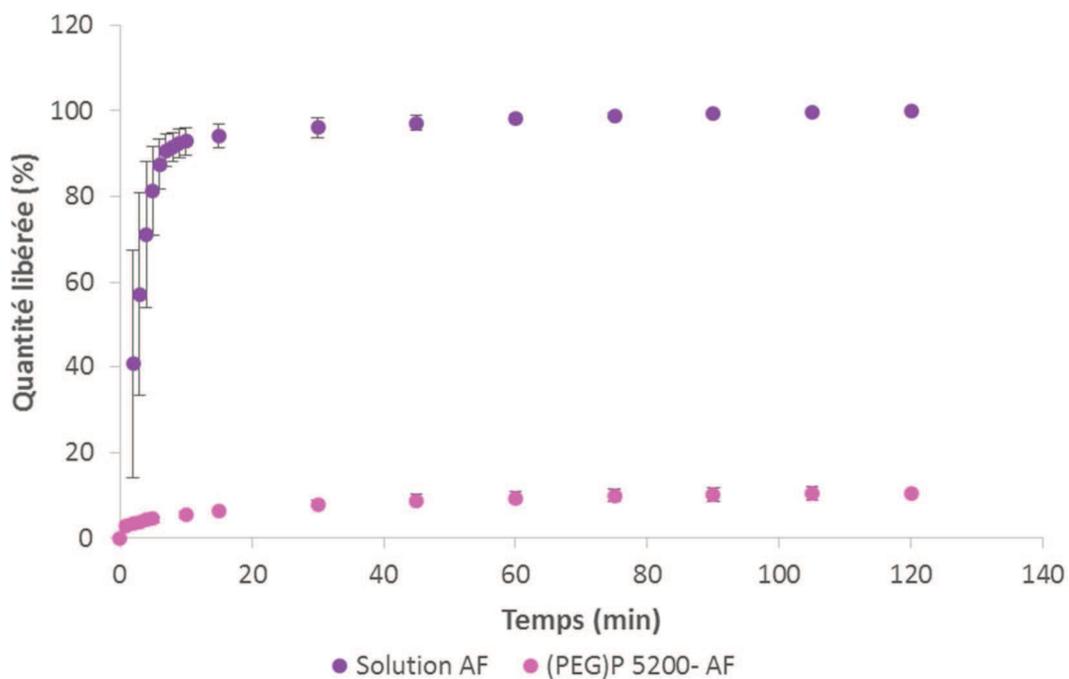


Figure 74 : Suivi du passage *ex vivo* (à travers de la peau d'oreille de porcs) d'un colloïde au (PEG)P 5200 dopé en AF en mode dynamique

La reproductibilité des résultats a été plus facilement obtenue pour les colloïdes que pour la solution d'AF seule, surtout sur les temps courts. Le passage du colloïde à travers l'explant d'oreille de porc est beaucoup plus restreint. Seul environ 10 % des particules colloïdales franchissent la couche cornée ainsi que la barrière épidermique après 2h d'étude. Les colloïdes au (PEG)P 5200 permettraient donc de maintenir majoritairement la molécule modèle dans la couche cornée, et de limiter ainsi son passage transcutané. La prochaine étape consistera à mener ces études de suivi cinétique *ex vivo* sur peaux fraîches.

Ce résultat est encourageant pour atteindre l'objectif de ce travail qui porte sur la mise au point d'une formulation cutanée favorisant une action locale.

D. Etude de l'influence de la formulation sur la cinétique de diffusion des particules colloïdales

Le suivi cinétique *ex vivo* sur explants d'oreilles de porc s'avère relativement délicat pour l'obtention de résultats reproductibles. Ainsi, pour l'étude de l'influence de la formulation sur la cinétique de diffusion des particules colloïdales (PEG)P 5200-AF, des membranes synthétiques ont été utilisées, typiquement les membranes employées précédemment de 0,05 μm en polycarbonate et 0,2 μm en acétate de cellulose. L'incorporation des particules colloïdales au sein d'une formulation a pour objectif d'une part d'étudier l'influence de la formulation sur la diffusion des particules et d'autre part de limiter la désorption de l'AF des particules. Ces dernières ont ainsi été incorporées ici à des formulations simples de type hydrogel à base d'alginate, pour se rapprocher de la forme galénique (gel) utilisée dans la formulation déjà commercialisée du ClindP (spécialité Zindacline®).

a. Etude rhéologique de la mise en forme des particules colloïdales au sein d'un hydrogel

Deux types de gels à base d'alginate ont été formulés : le premier contenant uniquement l'AF en solution et le second contenant l'AF adsorbé sur les particules colloïdales (stabilisées au (PEG)P 5200). Après formulation, une viscosité plus importante a été observée visuellement pour le gel contenant les particules colloïdales que pour celui à l'AF. Cette différence peut s'expliquer par la présence d'ions calcium (libres en solution) dans le colloïde, responsables de la réticulation de l'alginate. Afin d'obtenir des gels ayant une viscosité relativement identique, la formulation du gel à l'AF seul a été adaptée, en ajoutant une quantité d'ions calcium. En effet la diffusion d'un PA à partir d'un gel dépend à la fois de la nature hydrophile ou hydrophobe du gel mais aussi de sa viscosité. Les résultats d'étude de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les différentes concentrations en sels de calcium testées sont présentés dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Comparaison de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des différents gels formulés

<i>Référence de l'échantillon</i>	<i>Vitesse de cisaillement (s⁻¹)</i>	<i>Viscosité (Pa.s)</i>
Gel d'alginate + colloïdes (PEG)P 5200 - AF	101	1,85
	249	1,06
	400	0,76
Gel d'alginate + AF + CaCl ₂ (5 mmol/L)	101	1,62
	249	0,94
	401	0,68
Gel d'alginate + AF + CaCl ₂ (7,5 mmol/L)	101	1,87
	249	1,02
	398	0,73
Gel d'alginate + AF + CaCl ₂ (10 mmol/L)	101	2,38
	200	1,45
	399	0,86

En comparant les viscosités des différents gels testés en fonction de la vitesse de cisaillement, le gel contenant les colloïdes possède une viscosité comparable au gel d'alginate contenant l'AF et le sel de calcium CaCl₂, à une concentration molaire de 7,5 mmol/L, avec en moyenne une viscosité de 1,85 Pa.s pour une vitesse de cisaillement de 101 s⁻¹. Cette formule sera ainsi retenue pour le reste de l'étude.

b. Etude des cinétiques de diffusion

Des études de diffusion à partir de formulations à base de gel d'alginate ont également été réalisées. Il est important de préciser que pour ces études de diffusion, aucun massage n'a été appliqué pour aider à la pénétration des gels (pouvant influencer les résultats obtenus) et qu'il s'agit ainsi d'une étude de diffusion passive.

La Figure 75 présente les essais de diffusion des gels d'AF avec ou sans particules colloïdales, à travers les 2 types de membranes (en mode dynamique).

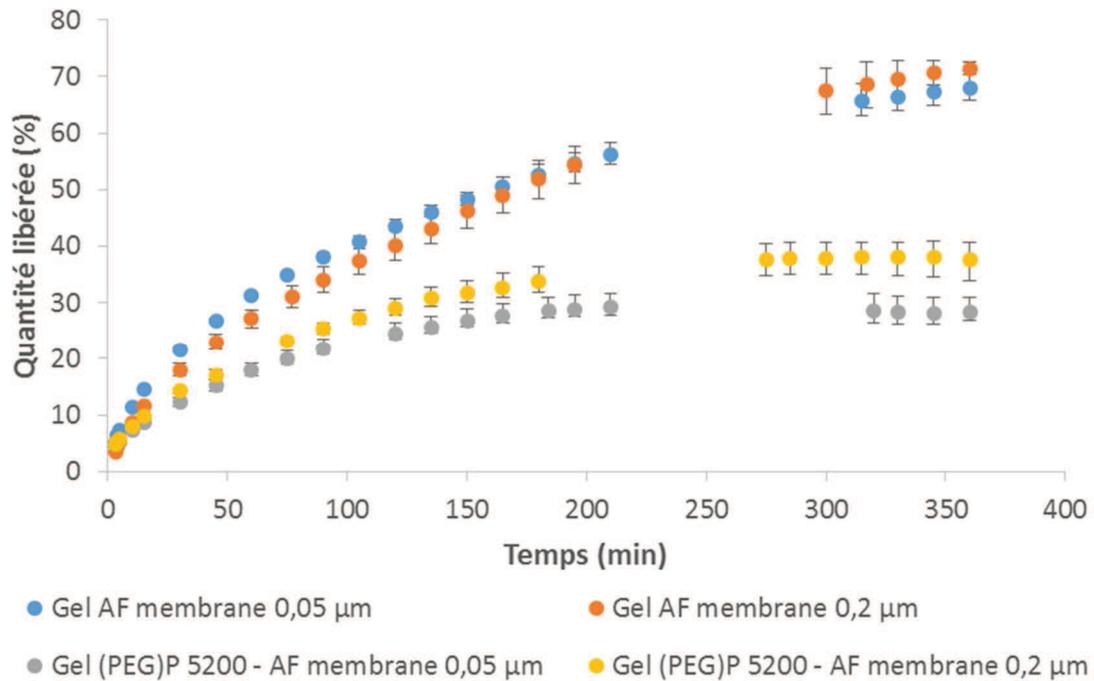


Figure 75 : Etude de la diffusion d'un gel d'AF et d'un gel de colloïde au (PEG)P 5200 - AF à travers différentes membranes synthétiques de porosités différentes en mode dynamique

Les résultats précédents (Figure 69) ont montré que le passage d'une solution d'AF seul était très rapide (100% du PA libéré en moins de 30 minutes). En comparant les résultats d'une solution d'AF seule et d'un gel à l'AF, il est possible de conclure sur l'effet de la viscosité lors du passage à travers des membranes synthétiques. Lorsque l'AF est dissout dans le gel d'alginate, seulement 68 % de l'AF passe à travers la membrane de 0,05 µm et 77 % à travers la membrane de 0,2 µm, au bout de 360 minutes (6h). Le passage est fortement ralenti quand la molécule seule se retrouve dans une formulation gélifiée. Ainsi, la forme visqueuse ralentit la diffusion de l'AF à travers les membranes synthétiques. De plus, en comparant les 2 types de gels entre eux (avec et sans colloïde), la présence des particules ralentit également le passage : après 6 heures, seulement 28 % des particules passent à travers la membrane de 0,05 µm et 38 % à travers la membrane 0,2 µm. Enfin la porosité semble jouer un léger effet sur le passage du gel d'AF, avec et sans particules colloïdales, à travers les 2 types de membrane : celui-ci est légèrement plus lent à travers la membrane de porosité inférieure (0,05 µm).

4. Conclusion

Ces résultats montrent d'une part que l'adsorption de l'AF sur les particules colloïdales permet de limiter sa diffusion au travers de membranes synthétiques, et ce en fonction de la taille des pores de la membrane étudiée. D'autre part la formulation des particules colloïdales

dans une phase externe gélifiée permet d'exacerber ce phénomène. Il est donc intéressant à ce stade de chercher à optimiser la formulation pharmaceutique afin d'atteindre l'objectif de ce travail qu'est le ciblage folliculaire pour le traitement de l'acné.

IV. Formulation

1. Introduction

Comme démontré précédemment lors de l'étude du passage des particules colloïdales incorporées dans des gels à travers des membranes synthétiques à l'aide de cellules de Franz, la formulation peut avoir une influence significative sur le passage cutané de substances. Suite à l'application d'une solution de ClindP, « un passage systémique de la clindamycine ne peut être exclu » et « il convient de ne pas négliger l'apparition d'une diarrhée [...] pouvant être symptomatique de la colite pseudomembraneuse » (Vidal, Dalacine T[®] Topic). Ainsi, une éventualité pour que le ClindP en solution seul puisse franchir la barrière épidermique pour atteindre le derme et par la suite la circulation sanguine est à considérer. L'étude précédente de diffusion des particules colloïdales (à l'aide de cellules de Franz) a permis de montrer que l'adsorption d'un PA modèle (AF) sur les particules d'apatites stabilisées au (PEG)P 5200 permet de ralentir sa diffusion à travers des membranes synthétiques.

Le but de la formulation est ici de favoriser le ciblage folliculaire des particules associées au ClindP. Les particules d'apatite se trouvent dans une phase aqueuse formant le colloïde. Pour favoriser la pénétration folliculaire riche en sébum, il semble important que la formulation se mélange facilement à celui-ci pour pouvoir pénétrer au sein du follicule pileux. Pour cela, une phase grasse externe peut être souhaitable pour permettre un bon mélange de phases lipophiles, avec la présence éventuelle de tensio-actifs en faible quantité pour favoriser le mélange phase grasse/phase aqueuse. De plus, ces travaux de thèse ont mis en évidence (en milieu purement aqueux) une possible désorption du ClindP des apatites non colloïdales par effet de dilution. Ce phénomène n'a pas été étudié dans le cas de ClindP pré-adsorbée sur les particules colloïdales, cependant s'il a également lieu, il peut être important d'essayer de les protéger dans une phase grasse.

Ainsi, différents essais de formulation contenant une phase grasse et une phase aqueuse, de type émulsion et bigel, ont été réalisés afin, par la suite, de pouvoir évaluer l'influence de la formulation sur la pénétration cutanée et le ciblage folliculaire des particules et du ClindP. Ces essais de formulation font l'objet d'une première partie. Dans une seconde partie, l'étude de la

libération du PA à partir de différentes formulations a ensuite été entreprise et comparée à la spécialité Zindacline®.

Mais tout d'abord, l'interaction du benzoate de sodium, excipient usuel ayant un rôle de conservateur, avec la surface des particules colloïdales apatitiques, a fait l'objet d'une étude spécifique afin de déterminer la pertinence de son utilisation dans la formulation pharmaceutique.

2. Etude de l'interaction d'un conservateur avec la surface apatitique

A. Matériel et méthodes

a. Choix du conservateur

Le benzoate de sodium, de formule chimique brute $C_7H_5O_2Na$, est un conservateur couramment utilisé dans de nombreux produits cosmétiques afin d'inhiber la croissance de micro-organismes mais également dans le domaine alimentaire, pour les mêmes propriétés mais aussi en tant qu'agent masquant (odeur, arôme). Sa teneur est en général comprise entre 0,1 et 0,5 % (m/m).

b. Choix du substrat apatitique

L'étude de l'interaction du conservateur avec une surface apatitique s'est faite ici sur une apatite non colloïdale, afin d'explorer l'interaction entre la surface apatitique et le benzoate de sodium. L'apatite utilisée a été la même que l'apatite biomimétique non colloïdale utilisée pour l'étude de l'adsorption du ClindP, hap-15j.

c. Etude de l'interaction entre le substrat apatitique et le benzoate de sodium

La méthodologie employée pour l'étude de l'isotherme d'adsorption du benzoate de sodium sur le substrat apatitique est identique aux études précédentes réalisées dans ces travaux de recherche : 20 mg de poudre d'apatite ont été dispersés dans 5 mL de solution de benzoate de sodium (dans KCl 0,01 M) à température ambiante et sous agitation, avec un temps de contact d'une heure. La concentration mesurée dans le surnageant par spectrophotométrie (Shimadzu UV 1800, $\lambda = 224$ nm) a permis de déterminer la quantité adsorbée Q_{ads} .

B. Résultats et Discussion

L'évolution de la quantité de benzoate de sodium adsorbée, Q_{ads} (g/g d'apatite), sur hap-15j, en fonction de la concentration à l'équilibre est présentée en Figure 76. Le choix d'une gamme de concentration relativement élevée a été fait en se basant sur la concentration éventuelle dans le produit fini (correspondant à un pourcentage massique final typiquement entre 0,1 et 0,5 %).

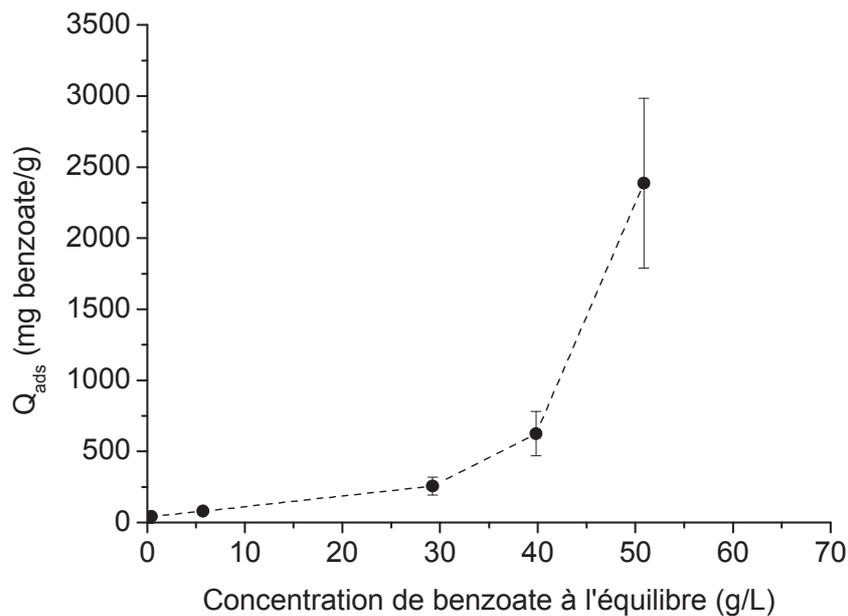


Figure 76 : Isotherme d'adsorption du benzoate de sodium sur hap-15j

Plus la concentration en benzoate de sodium augmente, plus la quantité adsorbée augmente, sans cependant observer de palier. Cet isotherme ne peut être décrit par les modèles de Langmuir, Freundlich, Temkin ou Sips en raison de la non obtention d'un palier mais plutôt d'une augmentation continue de la quantité adsorbée. Il laisse au contraire suggérer l'adsorption de multicouches à la surface de l'apatite. La molécule de benzoate de sodium (Figure 77) présente en effet un cycle aromatique.

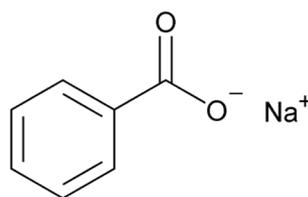


Figure 77 : Benzoate de sodium

La formation de multicouches peut alors être due à la formation d'interactions $\pi - \pi$ (phénomène connu sous le nom de π *stacking*), déjà démontrée dans le cas de l'adsorption de doxorubicine, autre composé aromatique, sur apatite [142]. Cet empilement $\pi - \pi$ correspond à des interactions non covalentes entre groupements aromatiques provenant de molécules adjacentes.

Dans le cas d'une telle apatite non colloïdale, pour une concentration finale par exemple de l'ordre de 10 g/L, une quantité adsorbée de $\sim 9,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ de benzoate est notée. Cette quantité, comparée à la quantité maximale de ClindP pouvant être adsorbée à la surface de la même apatite non colloïdale (hap-15j, $3.31 \mu\text{mol}/\text{m}^2$), est relativement importante. Or il est préférable que les excipients de la formule finale choisie n'interagissent pas avec les particules d'apatites.

C. Conclusion

L'étude de l'interaction entre le benzoate de sodium et une apatite nanocristalline non colloïdale, hap-15j, a permis de mettre en évidence un phénomène d'adsorption important, avec des quantités adsorbées relativement élevées suggérant la formation de multicouches à la surface de l'apatite et pouvant impliquer des empilements $\pi - \pi$. Ce conservateur ne pourra donc pas être retenu pour la formule galénique choisie. Il sera important de vérifier la non interaction pour chaque excipient de la formulation avec la surface apatitique.

3. Formulation et premiers essais de suivi de libération du ClindP

Des essais de formulation d'émulsion de type eau / huile (E/H) et de bigel, ont été entrepris et une étude de la libération du PA de la formule choisie a été comparée à la spécialité Zindacline®.

A. Matériels et méthodes

a. Préparation des formulations

Formulation d'émulsion eau / huile (E/H)

Plusieurs formules d'émulsions (E/H) ont été testées dont la formule de base (en masse) est présentée dans le Tableau 24 .

Tableau 24 : Formule de base des émulsions (E/H) testées

Phase	Excipient	Quantité (%)
Aqueuse	Eau	30
Huileuse	Huile d'amande douce	60
	Huile de paraffine	5
	TA lipophile	5

Le procédé de formulation consiste à faire chauffer séparément la phase grasse et la phase aqueuse à 60°C puis à les mélanger sous agitation (Ultra-turrax® ~ 6000 rpm), pour ensuite les laisser refroidir à température ambiante. Différents TA ont été testés, dont la composition varie légèrement et ainsi leurs valeurs de Balance Hydrophile – Lipophile (HLB, un TA ayant un HLB < 7 sera lipophile tandis qu'un TA ayant un HLB > 7 sera hydrophile) indiquées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Tensio-actifs utilisés pour la préparation des émulsions E/H

Nom commercial	Nom INCI	Valeur de HLB	Fonction
Span® 60	Stéarate de sorbitan	4,7	TA non ionique lipophile
Span® 65	Tristéarate de sorbitan	2,1	
Span® 80	Trioléate de sorbitan	4,3	
Span® 85	Oléate de sorbitan	1,8	

Formulation de bigel

Un bigel est formé d'une association entre un hydrogel et un organogel. Les hydrogels formés sont composés d'eau et d'alginate à 3% en masse. Ils ont été obtenus en ajoutant par saupoudrage l'alginate à l'eau à l'aide d'un Ultra-turrax® à en moyenne 6000 rpm. Pour la formulation des organogels, plusieurs huiles ont été testées séparément dont le type et les concentrations sont précisées dans le Tableau 26, en présence d'un organogélifiant, le Span® 65.

Tableau 26 : Différentes formules d'organogels testées pour la préparation du bigel

<i>Excipient</i>	<i>Quantité (%)</i>
Huile d'amande douce	80 – 85
Huile de tournesol	
Huile de coton	
Huile d'olive	
Span [®] 65 (Tristéarate de sorbitan)	15 – 20

L'organogel a été obtenu en mélangeant l'huile et le TA à 60°C sous agitation à l'aide d'une hélice à environ 200 rpm, jusqu'à homogénéisation du mélange (~ 5 minutes). Le refroidissement a permis ensuite de réduire la solubilité de l'agent gélifiant dans le liquide apolaire. Lors du refroidissement, les interactions gélifiant – solvant ont ainsi été minimisées et les interactions gélifiant – gélifiant favorisées, formant la structure de l'organogel (étape de maturation d'en moyenne 16 h à 4°C).

Une fois l'organogel obtenu, l'hydrogel et l'organogel ont été mélangés (50 : 50, m : m) sous agitation à l'aide d'un Ultra-turrax[®] à en moyenne 6000 rpm, jusqu'à homogénéisation du mélange (~ 5 minutes).

b. Analyse sensorielle de la formulation choisie

L'étude sensorielle a été réalisée sur un panel de 20 personnes (étudiants(es) dont la moyenne d'âge est d'environ 20 ans). Elle fait référence aux propriétés qualitatives de la formulation, perçues par l'utilisateur et qui doivent être adaptées à l'application visée. Ainsi, les paramètres évalués ont été les suivants : aspect homogène, brillant, facilité d'étalement, non gras, non collant, temps de pénétration court, absence de film résiduel et fraîcheur.

c. Etude de libération du PA

Les cinétiques de libération ont été réalisées à partir des différentes formulations contenant 1,188% (m/m) de ClindP (correspondant à 1% (m/m) en Clind, formulation retenue comparée à la spécialité Zindacline[®] en utilisant un Dissolutest AT 7 SMART (SOTAX)). Les cellules d'extraction ont été remplies avec 2 g de formulation et recouvertes avec une membrane de dialyse en cellulose (Spectro/Por[®], seuil de coupure compris entre 6000 et 8000 g/mol) puis placées dans les bols de dissolution préalablement remplis avec 700 mL de tampon phosphate (KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH ~ 7,4) et maintenus à 32 ± 0,5°C. La vitesse de rotation des pâles a été fixée à 100 rpm. A intervalles de temps déterminés, 5 mL de milieu de dissolution ont été

prélevés et analysés en UV (199 nm) puis remplacés par 5 mL de tampon thermostaté à $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les conditions « sink » ont été vérifiées et validées pour cette étude.

B. Résultats et Discussion

a. Formulation d'une émulsion (E/H)

Aucun des TA non ioniques lipophile testés, avec la formule indiquée dans le Tableau 24, n'a formé d'émulsion, sauf le Span[®] 65, qui a permis d'obtenir une émulsion blanche, homogène et relativement fluide. Ces essais consistent en de premières étapes de recherche afin de pouvoir affiner par la suite les paramètres à faire varier pour obtenir une émulsion stable et ayant les caractéristiques souhaitées pour l'application visée, dont les principales sont : légère, non collante et non grasse. Parmi les formulations réalisées, la plus prometteuse (nécessitant cependant encore des étapes d'amélioration) est celle obtenue avec le Span[®] 65.

Le sens de l'émulsion a été déterminé par l'utilisation d'un colorant hydrosoluble. Les résultats sont présentés en Figure 78.

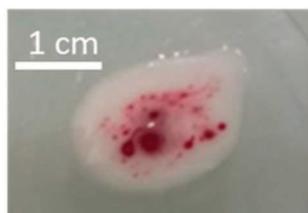


Figure 78 : Détermination du sens de l'émulsion formée par ajout d'un colorant aqueux

La Figure 78 indique la présence de gouttelettes, renfermant un colorant aqueux, entourées par une phase externe non colorée, la phase huileuse. Ainsi le sens de l'émulsion correspond à des gouttelettes de phase aqueuse renfermées dans une phase huileuse, une émulsion E/H.

b. Formulation d'un bigel

La phase hydrophile choisie pour l'élaboration du bigel est le gel d'alginate, dont les qualités organoleptiques avaient été validées précédemment pour l'étude de l'influence de la formulation sur les cinétiques de passage avec les cellules de Franz. Ce gel est relativement brillant, non collant et possède un léger effet frais à l'application.

L'ensemble des essais réalisés avec une quantité d'organogélateur (Span[®] 65) de 15 % massique n'a pas formé d'organogel. Après un temps de maturation de 16h, les gels obtenus

n'ont pas formé de réseau tridimensionnel conséquent pour éviter au gel de s'écouler. La quantité de Span[®] 65 a alors été augmentée à 20 % et a permis l'obtention d'organogel pour chaque type d'huile. En fonction des propriétés organoleptiques des différents organogels et aussi du coût des matières premières, l'organogel à l'huile d'amande douce a été retenu (Figure 79).

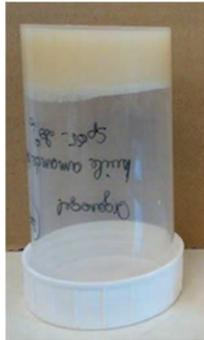


Figure 79 : Organogel à base d'huile d'amande douce et de Span 65 pour la formulation du bigel

Suite à l'obtention de l'hydrogel et de l'organogel, les 2 ont été mélangés pour former le bigel présenté en Figure 80.

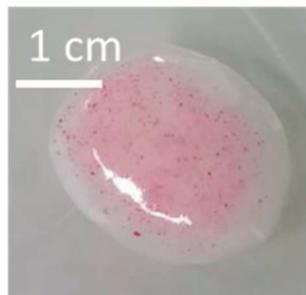


Figure 80 : Caractérisation de la phase aqueuse du bigel par l'utilisation d'un colorant aqueux

La coloration de la phase aqueuse par un colorant aqueux semble montrer une phase interne entourée d'une phase externe huileuse. De plus, cette phase aqueuse semble former des gouttelettes relativement fines comparées à l'émulsion E/H obtenue, laissant supposer une meilleure dispersion.

c. Choix de la formulation

D'un point de vue visuel, la formulation du bigel semble montrer une phase aqueuse répartie de façon plus homogène au sein de la phase huileuse. En se basant sur ces premières observations, la formule du bigel a été choisie, mais également en raison des avantages que peut

apporter ce type de formulation. Il peut présenter l'avantage de combiner les propriétés des organogels et des hydrogels [239] : facilité de préparation, absence d'utilisation d'une grande quantité de TA qui peut favoriser le passage transcutané en altérant la barrière cutanée et être irritant pour la peau [240], [241], présence de PA à la fois hydrophile et lipophile et libération pouvant être contrôlée, effet froid des hydrogels combiné aux propriétés émoullientes et hydratantes des organogels [242], structure entièrement gélifiée permettant une éventuelle libération prolongée comparée aux émulsions. Les caractérisations pour déterminer la structure du bigel formé nécessitent cependant d'être affinées pour la suite de ces travaux de recherche. La structure du bigel reste encore peu étudiée à ce jour et fait l'objet de quelques travaux dans la littérature. Lupi et al. [243] ont essayé d'étudier la structure d'un bigel afin de déterminer le sens du bigel formé : E/H, H/E ou combinaison de 2 structures. Ils semblent montrer la formation d'une structure complexe (matrice-matrice). Cependant les recherches sont toujours en cours pour éclaircir ce système relativement complexe au niveau de sa structure, mais intéressant pour sa simplicité de préparation et ses avantages pour des applications topiques.

d. Analyse sensorielle

Les résultats de l'analyse sensorielle, réalisée sur un panel de 20 personnes, sont présentés en Figure 81 (une note de 10 indiquant une propriété jugée très satisfaisante).

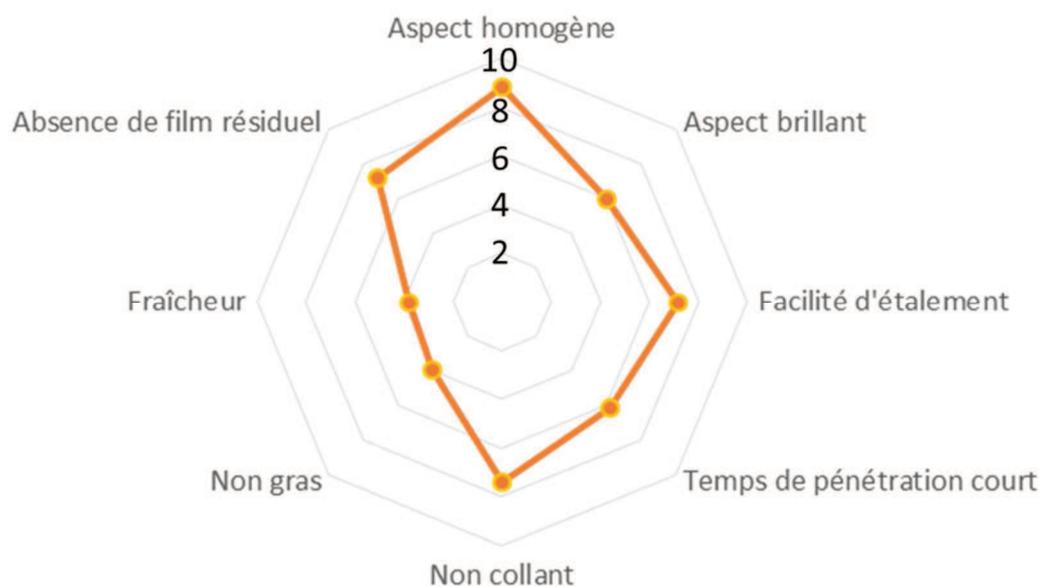


Figure 81 : Résultats d'analyse sensorielle du bigel réalisé sur un panel de 20 personnes

Plusieurs propriétés organoleptiques ont été évaluées sur la formulation : avant (aspect homogène et brillant), pendant (facilité d'étalement, temps de pénétration) et après application

(collant, aspect gras, fraîcheur, absence de film résiduel). Les résultats de l'analyse sensorielle sont relativement satisfaisants pour l'aspect général de la formulation. L'homogénéité de celle-ci est bien perçue (8,8/10) par le panel avec un aspect brillant visuel satisfaisant. Pendant l'application, l'étalement est perçu comme facile (7,2/10) avec un temps de pénétration satisfaisant mais qui peut être amélioré. Après application, le bigel est relativement non collant (7,4/10) avec un film résiduel perçu comme relativement absent (7,2/10). Les propriétés à améliorer seraient le côté frais et le toucher non gras suite à l'application du bigel. Pour ces premiers essais de formulation, le bigel a été obtenu en mélangeant l'organogel et l'hydrogel à 50/50 % en masse. Ces proportions peuvent être modulées afin d'obtenir des meilleurs propriétés organoleptiques. En effet en réduisant la phase grasse, le toucher (non gras) pourrait être amélioré ainsi qu'éventuellement le temps de pénétration mais aussi le côté frais pendant et après application.

e. Profil de libération du ClindP

Le profil de libération du ClindP a été évalué pour le bigel contenant uniquement le ClindP dans la phase aqueuse (hydrogel), et comparé à celui du gel d'alginate (contenant également du ClindP) et de la spécialité Zindacline®. Les résultats du pourcentage de ClindP libéré en fonction du temps pour chaque formulation sont présentés en Figure 82.

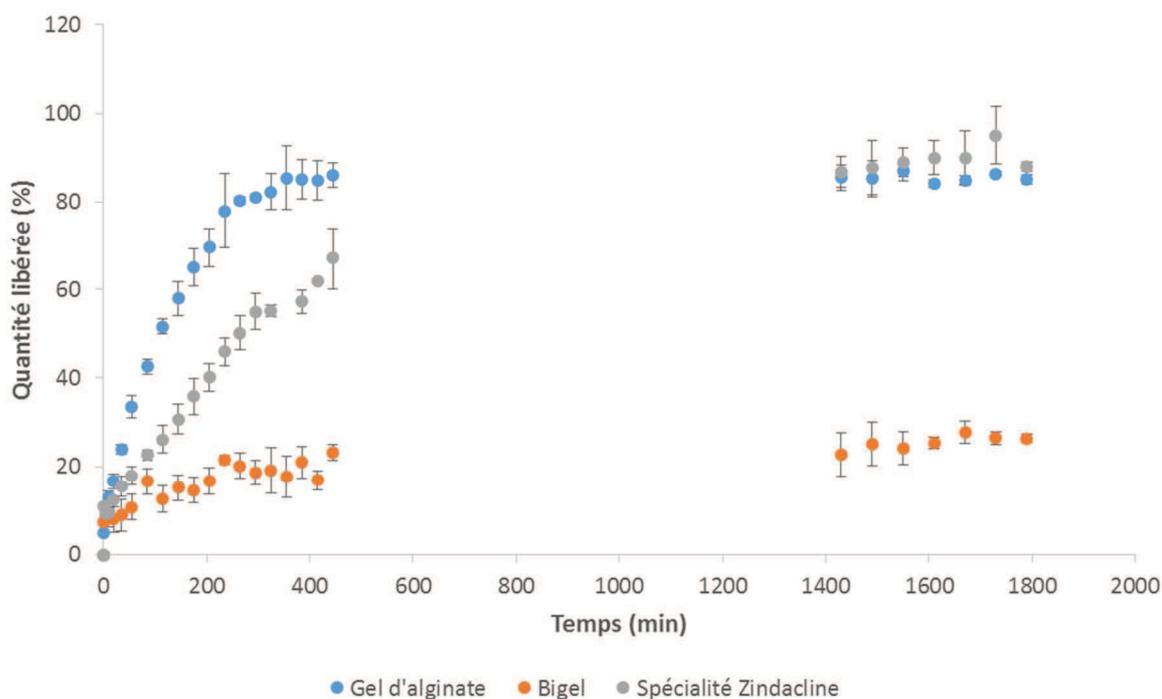


Figure 82 : Profil de libération du ClindP à partir de différentes formulations

L'étude de la libération s'est faite à partir de 2 formes galéniques différentes : 2 hydrogels possédant des agents gélifiants hydrophiles différents (alginate de sodium et hydroxyéthylcellulose pour la spécialité Zindacline® (avec l'ajout de quelques excipients supplémentaires pour la spécialité)) et un bigel. Les deux hydrogels possèdent une libération plus rapide que le bigel. Les taux de libération du ClindP des 2 hydrogels sont assez similaires au bout de 24h d'étude (~85% de ClindP libéré). Cependant, une cinétique plus rapide pour le gel d'alginate que pour la spécialité est observée, qui peut s'expliquer en raison d'un aspect plus visqueux de la spécialité. Le bigel possède une quantité libérée considérablement plus faible au bout de 24h de libération, d'environ 25%. La formulation du bigel devra donc être optimisée afin de permettre un meilleur taux de libération du ClindP après 24h.

La comparaison de la libération du ClindP à partir du bigel avec celle à partir du gel d'alginate seul permet de mettre en évidence le rôle de l'organogel au sein du bigel. La présence de l'organogel ralentit fortement la libération en raison de la non affinité de la molécule avec la phase grasse.

Dans le but d'explorer plus avant la libération du ClindP à partir des différentes formes pharmaceutiques étudiées, les résultats ont été comparés avec différents modèles

mathématiques couramment utilisés dans la littérature : ordre zéro, ordre un, Higuchi et Korsmeyer-Peppas. Ils sont décrits par les formules suivantes :

Ordre zéro $Q_t = Q_0 + K_0 \cdot t$ *Équation 15*

Ordre un $\text{Log } Q_r = \text{Log } Q_0 - \frac{K_1 \cdot t}{2,303}$ *Équation 16*

Higuchi $Q_t = K_H \cdot \sqrt{t}$ *Équation 17*

Korsmeyer-Peppas $Q_t = K_{KP} \cdot t^n$ *Équation 18*

Hixson-Crowell $Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} \cdot t$

avec :

- Q_t , la quantité de PA libérée à un temps t
- Q_0 , la quantité initiale de PA dans la forme galénique
- Q_r , la quantité restante de PA dans la forme galénique
- K_0, K_1, K_H et K_{KP}, K_{HC} les constantes de libération respectives
- t , le temps
- n , l'exposant de Korsmeyer-Peppas

Les résultats des coefficients de corrélation obtenus avec les différents modèles pour chaque formulation sont présentés dans le Tableau 27 .

Tableau 27 : Modélisations mathématiques des cinétiques de libération du ClindP à partir des différentes formes pharmaceutiques étudiées (comparaison des coefficients de corrélation R²)

	<i>Gel d'alginate</i>	<i>Spécialité Zindacline®</i>	<i>Bigel</i>
<i>Ordre zéro</i>	0,9266	0,7932	0,5447
<i>Ordre un</i>	0,9910	0,9672	0,5737
<i>Higuchi</i>	0,9928	0,9524	0,7755
<i>Korsmeyer-Peppas</i>	0,9852	0,8480	0,8934
<i>Hixson-Crowell</i>	0,6793	0,4968	0,2614

Pour le gel d'alginate, parmi les quatre modèles testés, les modèles d'Higuchi et d'ordre un permettent de décrire au mieux le profil de libération du ClindP. Le calcul du paramètre n

de l'équation de Korsmeyer-Peppas donne par ailleurs une valeur (0,497) très proche de 0,5, ce qui revient au modèle d'Higuchi qui demeure, dans ce cas, le plus adapté. Ce modèle suggère une cinétique de libération suivant une loi de diffusion Fickienne du ClindP à partir du gel d'alginate. La comparaison des coefficients de corrélation donne la même tendance pour la spécialité Zindacline® : l'ordre un et le modèle d'Higuchi présentent les coefficients les plus élevés, suggérant de nouveau une cinétique de diffusion à travers les gels hydrophiles. Le bigel présente de manière générale des coefficients de corrélation moins élevés, reflétant un mécanisme de libération plus complexe. Le modèle de Korsmeyer-Peppas semble alors, parmi les modèles testés, le plus adapté pour décrire la libération du ClindP à partir du bigel. Le paramètre n correspondant est égal à 0,2 ($< 0,5$) suggérant encore un mécanisme de diffusion de type Fickien (mais différent du modèle d'Higuchi où $n = 0,5$), relativement lent comparé aux deux autres formes galéniques, ce qui peut être relié à la structure plus complexe du bigel. En effet le mécanisme de libération à partir de celui-ci fait intervenir la diffusion du ClindP au sein d'une matrice hydrogel-organogel. Il est à noter que, comme cela pouvait être attendu, les modèles d'ordre zéro (impliquant une cinétique indépendante de la concentration du PA dissous) et d'Hixson-Crowell (impliquant la dissolution de la forme galénique) sont systématiquement inadaptés pour décrire les courbes expérimentales obtenues dans ce travail. Ainsi, seuls des modèles diffusifs, dépendants de la concentration en PA, semblent permettre de modéliser les cinétiques de libération observées ici.

En comparant les résultats d'analyse sensorielle avec ceux de l'étude de libération du ClindP à partir du bigel, il serait intéressant de diminuer la proportion d'organogel au sein de la formulation. En effet, une diminution de la phase grasse pourrait permettre, comme expliqué précédemment, d'améliorer les qualités organoleptiques du bigel (toucher moins gras, amélioration de la sensation de « fraîcheur » pendant et après application et diminution du temps de pénétration) mais également de moduler la cinétique de libération du ClindP en augmentant éventuellement les quantités libérées à l'issue de 24h d'étude, afin de se rapprocher des cinétiques de libération à partir de la spécialité. Enfin, diminuer la proportion de phase grasse du bigel permettrait d'augmenter la concentration en particules dans le produit fini et ainsi en PA.

C. Conclusion

Ces premiers essais ont permis de ressortir une formulation potentiellement intéressante pour une application dermatologique visant la pathologie de l'acné. Comme indiqué

précédemment, une phase grasse externe pourrait améliorer la pénétration folliculaire (riche en sébum). La formulation d'un bigel a été retenue et la libération d'un PA, le ClindP, à partir de cette forme galénique a été étudiée et comparée à la spécialité Zindacline®. La phase externe huileuse permet de ralentir le profil de libération du PA de la forme galénique, cependant cette libération pourrait être améliorée voire modulée en fonction de la proportion en phase grasse (organogel) du bigel. Ces résultats constituent une première étude du profil de libération du ClindP de la forme galénique choisie (le bigel). La prochaine étape consistera à étudier le profil de libération des particules colloïdales suite à leur incorporation au sein de la phase aqueuse du bigel (dont la composition chimique devra être modifiée par une diminution de la quantité d'organogel) et de comparer les résultats obtenus aux profils de libération du ClindP à partir des spécialités, telles que le Zindacline®, utilisées à ce jour pour le traitement de l'acné.

CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche ont porté sur l'élaboration et l'utilisation de particules colloïdales submicroniques à base d'apatites nanocristallines pour le traitement de la pathologie de l'acné. L'emploi de ces particules (bio-inspirées) avait pour objectifs de permettre un meilleur ciblage des principes actifs anti-acnéiques couramment employés, ici le phosphate de clindamycine (ClindP), de permettre une libération accrue au niveau des foyers infectieux, les follicules pileux, et de limiter leur passage transcutané, tout ceci pouvant diminuer la survenue d'effets indésirables au niveau topique et éventuellement systémique. C'est dans cette optique qu'ont porté ces travaux de thèse qui se sont déroulés en plusieurs étapes, tout d'abord au niveau de la synthèse et de la caractérisation des particules et de leur fonctionnalisation en différents agents de stabilisation, molécule thérapeutique et ions biologiquement actifs, puis au niveau de leur suivi cutané, et enfin par la mise au point d'une première formulation avec étude préliminaire de libération (Schéma 3).

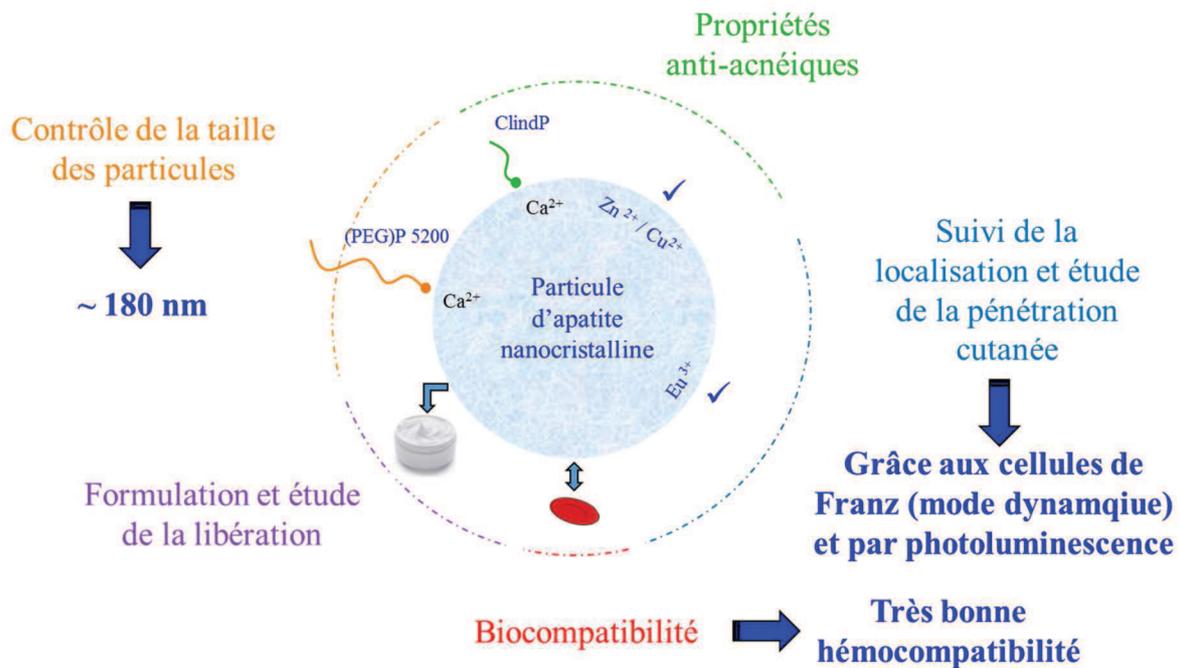


Schéma 3 : Principaux résultats obtenus sur la synthèse de particules d'apatite nanocristalline multifonctionnalisables

Un protocole de synthèse de particules d'apatites biomimétiques colloïdales stabilisées par un agent dispersant, un polyéthylène glycol phosphonaté, le (PEG)P 5200, a été mis au point. Ce protocole relativement simple a permis l'obtention des particules colloïdales possédant un diamètre hydrodynamique moyen de l'ordre de 180 nm. Différentes conditions de synthèses ont été explorées et ont permis de faire ressortir les paramètres optimums pour l'obtention de ces particules colloïdales stables (possiblement redispersables après

séchage) dont les principaux sont : un pH basique initial de 9,5 et une température de maturation de 100°C pendant 16h. Les particules colloïdales obtenues ont été caractérisées par DRX et IRTF confirmant l'obtention d'une phase apatitique nanocristalline biomimétique. Une analyse RMN du solide a de plus confirmé l'interaction entre le groupement phosphate du (PEG)P et la surface apatitique.

L'adsorption d'une molécule modèle, puis d'un antibiotique d'intérêt pour le traitement de l'acné (ClindP) sur ces particules colloïdales a alors fait l'objet d'une autre partie de ces travaux de recherche. Afin d'explorer plus avant les mécanismes d'adsorption, les isothermes obtenus ont été modélisés avec différents modèles mathématiques. L'application des modèles de Langmuir, Freundlich, Temkin et Sips à l'isotherme d'adsorption du ClindP sur apatite colloïdale a permis de mettre en évidence que l'adsorption, pour une certaine gamme de concentration (≤ 8 mg/L), suit le modèle de Sips. Cette modélisation suggère l'existence d'interactions entre les molécules adsorbées.

Un enrichissement des particules en ions aux propriétés antibactériennes et/ou anti-inflammatoires (6,5 % en Zn^{2+} et 3,5 % en Cu^{2+}) a également été réalisé. La caractérisation DRX et IR a confirmé la conservation de la phase apatitique suite à l'incorporation de ces ions.

La biocompatibilité de ces composés a ensuite été explorée. Dans le cas d'une application éventuelle sur peau lésée, le passage des particules dans la circulation sanguine est à considérer. Il a donc été important de vérifier leur bonne hémocompatibilité. L'étude de l'interaction des particules avec des éléments du sang (globules rouges et protéines plasmatiques) a mis en évidence l'excellente hémocompatibilité de ces composés, avec notamment des taux d'hémolyse inférieurs à 5 % pour les particules colloïdales stabilisées au (PEG)P 5200. De plus, la modélisation des interactions entre les particules colloïdales et les protéines plasmatiques a permis de calculer des constantes d'interactions relativement faibles suggérant une certaine inertie des particules colloïdales testées vis-à-vis des protéines plasmatiques et ainsi une furtivité possible *in vivo*.

Plusieurs techniques de suivi des particules colloïdales ont été testées afin d'évaluer la localisation des particules au niveau de membranes synthétiques ou biologiques. Parmi les techniques de suivi initiées (microscopie optique, analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission) et RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry), microscopie confocale Raman (MCR)), la MCR a été retenue pour l'étude de la localisation cutanée de ces particules

colloïdales sur des explants de peau d'oreilles de porc, et montrent une accumulation de celles-ci au niveau de l'épiderme et plus précisément de la couche cornée, et des follicules pileux.

Une étude des cinétiques de pénétration d'une solution d'un PA modèle (l'acide folique, AF) seul, comparé à l'AF adsorbé sur les particules colloïdales, a permis de montrer que la diffusion du PA est ralentie suite à son adsorption. Cette comparaison a été réalisée sur peaux d'oreilles de porc (prélèvement de l'épiderme), et a montré une diffusion minimisée de l'AF qui passe de 100% de libération au bout de 2 heures à 10% libéré une fois celui-ci adsorbé sur les particules colloïdales. De plus, l'incorporation de ces particules au sein d'une forme gélifiée (gel d'alginate) a montré l'influence de la formulation sur les cinétiques de passage des particules colloïdales.

Le développement d'une formulation a ensuite été entrepris afin de favoriser le ciblage des particules colloïdales hydrophiles vers les foyers infectieux riches en sébum, donc plus hydrophobes. Une première formule de bigel, associant un hydrogel à base d'alginate de sodium et un organogel à base d'huile d'amande douce, a été retenue. L'incorporation de l'antibiotique (ClindP) au bigel a permis d'étudier le profil de libération dans un premier temps de l'antibiotique seul, afin d'évaluer l'influence de la formulation sur la libération du PA aqueux. La présence de l'organogel ralentit la libération du PA, comparé à la libération de ce même PA à partir de l'hydrogel (alginate) seul.

Ces travaux de recherches ont permis l'élaboration et la fonctionnalisation (antibiotique, ions antimicrobiens et anti-inflammatoires) de nouvelles particules colloïdales d'apatite bio-inspirée hautement biocompatibles et l'étude de leur potentielle application en dermatologie. Ces travaux représentent une preuve de concept de l'utilisation des apatites phosphocalciques nanocristallines par exemple pour le traitement de la pathologie de l'acné. Les premiers résultats obtenus sont encourageants bien que plusieurs axes de recherches soient encore à approfondir (Schéma 4) comme par exemple au niveau de l'étude de libération du ClindP des particules colloïdales.

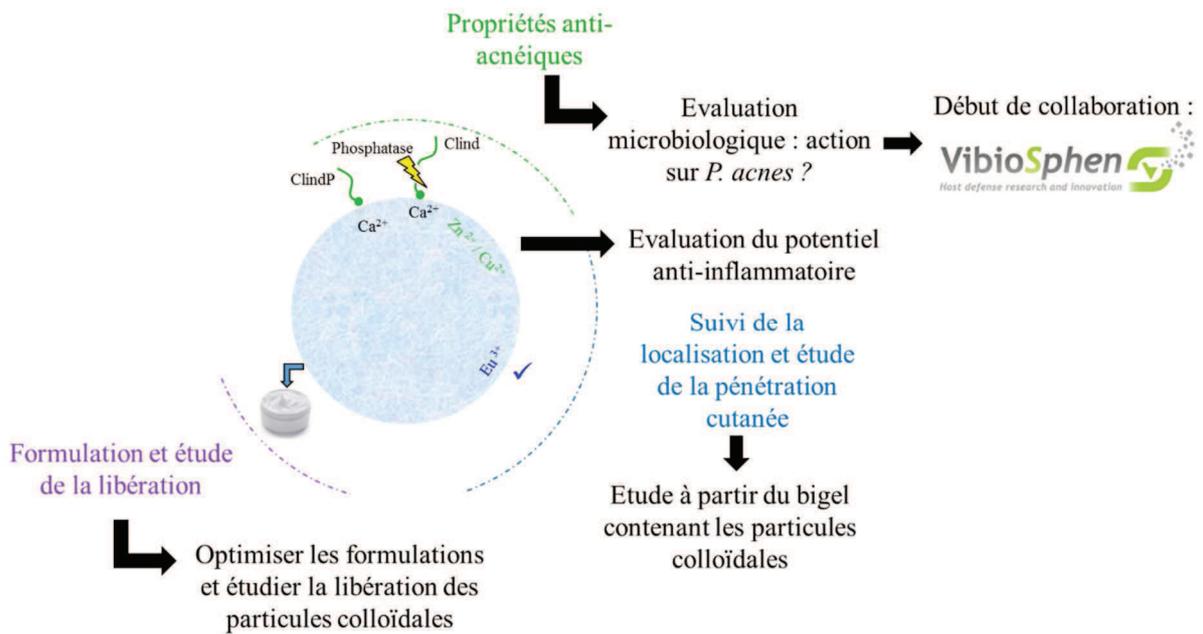


Schéma 4 : Perspectives de ces travaux

La présence de phosphatases au niveau des follicules pileux (inflammation), pourrait par ailleurs permettre une libération ciblée « intelligente » de l'antibiotique. La dose de ClindP (sa forme active la clindamycine) libérée pourrait en effet être dépendante du degré d'inflammation. Une partie des perspectives de ce travail (Schéma 4) consisterait donc à étudier le profil de libération du ClindP des particules colloïdales puis de la forme galénique choisie (ici le bigel, dont l'optimisation de formulation est en cours) et notamment en présence de phosphatases. Une autre perspective serait d'évaluer le potentiel antibactérien (dont les essais ont déjà été initiés en collaboration avec la société Vibiosphen de Toulouse Labège) et anti-inflammatoire du ClindP associé aux particules colloïdales, en particulier sur *P. acnes*. Des essais de localisations des particules colloïdales incorporées à une formulation suite à l'application sur peau d'oreilles de porc pourront également par la suite être étudiés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Pierre Fabre DERMATOLOGIE, “www.acne-severe.com/les-chiffres-cles.” .
- [2] D. R. Bickers, H. W. Lim, D. Margolis, M. A. Weinstock, C. Goodman, E. Faulkner, C. Gould, E. Gemmen, and T. Dall, “The burden of skin diseases: 2004: A joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 55, no. 3, pp. 490–500, 2006.
- [3] A. Akhavan and S. Bershad, “Topical acne drugs: review of clinical properties, systemic exposure, and safety,” *Am. J. Clin. Dermatol.*, vol. 4, no. 7, pp. 473–492, 2003.
- [4] M. Ulmer, a Patzelt, T. Vergou, J. Lademann, H. Richter, a Kramer, G. Müller, W. Sterry, and B. Lange-Asschenfeldt, “In vitro investigation of the follicular penetration of porcine ear skin using a nanoparticle-emulsion containing the antiseptic polihexanide,” *Laser Phys. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 381–386, 2012.
- [5] C.-L. Fang, I. A. Aljuffali, and J.-Y. Fang, “Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles,” *Ther. Deliv.*, vol. 5, no. 9, pp. 991–1006, 2014.
- [6] C. Mathes, A. Melero, P. Conrad, T. Vogt, L. Rigo, D. Selzer, W. A. Prado, C. De Rossi, T. M. Garrigues, S. Hansen, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann, R. C. R. Beck, C. M. Lehr, and U. F. Schaefer, “Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects,” *J. Control. Release*, vol. 223, pp. 207–214, 2016.
- [7] J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, S. Jung, M. C. Meinke, E. Rühl, U. Alexiev, M. Calderon, and A. Patzelt, “Hair follicles as a target structure for nanoparticles,” *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 08, no. 04, p. 1530004, 2015.
- [8] A. Vogt, B. Combadiere, S. Hadam, K. M. Stieler, J. Lademann, H. Schaefer, B. Autran, W. Sterry, and U. Blume-Peytavi, “40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, no. 6, pp. 1316–1322, 2006.
- [9] A. Al-Kattan, V. Santran, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, and C. Drouet, “Novel contributions on luminescent apatite-based colloids intended for medical imaging,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 28, no. 5, pp. 697–707, 2014.
- [10] R. Lüllmann-Rauch, *Histologie*, 1ère éd. De Boeck Supérieur, 2008.
- [11] D. Ricquier, “Le tissu adipeux brun humain,” *Cah. Nutr. Diet.*, vol. 47, no. 1, pp. 15–24, 2012.
- [12] B. Cannon and J. Nedergaard, “Brown adipose tissue: function and physiological significance,” *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 1, pp. 277–359, 2004.
- [13] M.-C. Martini, *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*, 3ème éd. Lavoisier, 2011.
- [14] A. Bouloc, “Les cellules dendritiques cutanées humaines,” *Médecine/Sciences*, no. 17, pp. 465–474, 2001.
- [15] A. L. Kierszenbaum, *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l’anatomie pathologique*, 1ère éd. De Boeck Supérieur, 2006.
- [16] A. Stevens and J. Lowe, *Histologie humaine*, 1ère éd. De Boeck Supérieur, 1997.
- [17] E. A. Grice and J. A. Segre, “The skin microbiome,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 4, pp. 244–253, 2011.

- [18] J. Krutmann, “Pre- and probiotics for human skin,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 54, no. 1, pp. 1–5, 2009.
- [19] H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, and P. Finkel, “Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 28, no. 5, pp. 359–370, 2006.
- [20] A. D. Venereol, “Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes Vascularisation, innervation cutanée et récepteurs à la sensibilité de la peau et de ses annexes - Vascularisation du derme et de l’ hypoderme,” no. 1, pp. 47–48, 2005.
- [21] J. A. Sanford and R. L. Gallo, “Functions of the skin microbiota in health and disease,” *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 5, pp. 370–377, 2013.
- [22] R. Coujard and J. Poirier, *Précis d’histologie humaine*, 1ère éd. Masson, 1980.
- [23] V. M. Meidan, M. C. Bonner, and B. B. Michniak, “Transfollicular drug delivery - Is it a reality?,” *Int. J. Pharm.*, vol. 306, no. 1–2, pp. 1–14, 2005.
- [24] N. Otberg, H. Richter, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, and J. Lademann, “Variations of hair follicle size and distribution in different body sites,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, no. 1, pp. 14–19, 2004.
- [25] C. Prost-Squarcioni, “Histologie de la peau et des follicules pileux,” *Médecine/Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 131–137, 2006.
- [26] H. Wosicka and K. Cal, “Targeting to the hair follicles: Current status and potential,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 57, no. 2, pp. 83–89, 2010.
- [27] F. Knorr, J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, and A. Vogt, “Follicular transport route - Research progress and future perspectives,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 2, pp. 173–180, 2009.
- [28] *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*, 1st ed. Wiley Blackwell, 2011.
- [29] M. Seiller and M.-C. Martini, *Formes pharmaceutiques pour application locale*, 1ère éd. Lavoisier, 1996.
- [30] *Biological barriers to protein delivery*, 1st ed. Springer Science+Business Media, 1993.
- [31] J. Lademann, H. Richter, S. Schanzer, F. Knorr, M. Meinke, W. Sterry, and A. Patzelt, “Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 77, no. 3, pp. 465–468, 2011.
- [32] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weib, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf, and W. Sterry, “Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, no. 2, pp. 159–164, 2007.
- [33] A. Patzelt, H. Richter, F. Knorr, U. Schäfer, C.-M. Lehr, L. Dähne, W. Sterry, and J. Lademann, “Selective follicular targeting by modification of the particle sizes,” *J. Control. Release*, vol. 150, no. 1, pp. 45–48, 2011.
- [34] OCDE, “Essai n° 427: Absorption cutanée : méthode in vivo Lignes directrices de l’OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4,” 2004.
- [35] J. J. Escobar-Chavez, V. Merino-Sanjuán, M. López-Cervantes, Z. Urban-Morlan, E. Piñón-Segundo, D. Quintanar-Guerrero, and A. Ganem-Quintanar, “The tape-stripping

- technique as a method for drug quantification in skin,” *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 11, no. 1, pp. 104–130, 2008.
- [36] J. Lademann, U. Jacobi, C. Surber, H.-J. Weigmann, and J. W. Fluhr, “The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no. 2, pp. 317–323, 2009.
- [37] E. Schnetz and M. Fartasch, “Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier — a promising tool for future research?,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 165–174, 2001.
- [38] S. Grives, “Etude de la toxicité in vitro et de l’efficacité ex vivo et in vivo de formes galéniques de calixarène développées pour le traitement des contaminations cutanées dues à des composés d’uranium,” 2015.
- [39] A. Avalos, A. I. Haza, D. Mateo, and P. Morales, “Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts,” *Int. Wound J.*, vol. 13, no. 1, pp. 101–109, 2014.
- [40] M. Crosera, A. Prodi, M. Mauro, M. Pelin, C. Florio, F. Bellomo, G. Adami, P. Apostoli, G. De Palma, M. Bovenzi, M. Campanini, and F. L. Filon, “Titanium dioxide nanoparticle penetration into the skin and effects on HaCaT cells,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 12, no. 8, pp. 9282–9297, 2015.
- [41] E. Desmet, S. Bracke, K. Forier, L. Taevernier, M. C. A. Stuart, B. De Spiegeleer, K. Raemdonck, M. Van Gele, and J. Lambert, “An elastic liposomal formulation for RNAi-based topical treatment of skin disorders: Proof-of-concept in the treatment of psoriasis,” *Int. J. Pharm.*, vol. 500, no. 1–2, pp. 268–274, 2016.
- [42] M. E. Samberg, P. Mente, T. He, M. W. King, and N. A. Monteiro-Riviere, “In vitro biocompatibility and antibacterial efficacy of a degradable poly(l-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymer incorporated with silver nanoparticles,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 42, no. 7, pp. 1482–1493, 2014.
- [43] F. Netzlaff, C.-M. Lehr, P. W. Wertz, and U. F. Schaefer, “The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, no. 2, pp. 167–178, 2005.
- [44] V. Cenizo, V. André, C. Reymermier, P. Sommer, O. Damour, and E. Perrier, “LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression,” *Exp. Dermatol.*, vol. 15, no. 8, pp. 574–581, 2006.
- [45] A. F. Black, C. Bouez, E. Perrier, K. Schlotmann, F. Chapuis, and O. Damour, “Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 5–6, pp. 723–733, 2005.
- [46] R. Pouliot, “<http://www.bioengineering.pha.ulaval.ca/>.”
- [47] B. Godin and E. Touitou, “Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 11, pp. 1152–1161, 2007.
- [48] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, and J. Lademann, “Porcine ear skin: An in vitro model for human skin,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 13, no. 1, pp. 19–24, 2007.

- [49] R. Nguyen and J. Su, "Treatment of acne vulgaris," *Paediatr. Child Health (Oxford)*, vol. 21, no. 3, pp. 119–125, 2011.
- [50] D. T. Downing, M. E. Stewart, P. W. Wertz, and J. S. Strauss, "Essential fatty acids and acne," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 14, no. 2, pp. 221–225, 1986.
- [51] D. M. Thiboutot, H. Knaggs, K. Gilliland, and S. Hagari, "Activity of type 1 5 alpha-reductase is greater in the follicular infundibulum compared with the epidermis," *Br. J. Dermatol.*, vol. 136, no. 2, pp. 166–171, 1997.
- [52] R. Guy, M. R. Green, and T. Kealey, "Modeling Acne in Vitro," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 106, no. 1, pp. 176–182, 1996.
- [53] M. M. T. Downie, D. A. Sanders, and T. Kealey, "Modelling the remission of individual acne lesions in vitro," *Br. J. Dermatol.*, vol. 147, no. 5, pp. 869–878, 2002.
- [54] I. M. Freedberg, M. Tomic-Canic, M. Komine, and M. Blumenberg, "Keratins and the keratinocyte activation cycle," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 116, no. 5, pp. 633–640, 2001.
- [55] E. Ingham, E. A. Eady, C. E. Goodwin, J. H. Cove, and W. J. Cunliffe, "Pro-inflammatory levels of interleukine-1 α like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 98, no. 6, pp. 895–901, 1992.
- [56] J. L. Selway, T. Kurczab, T. Kealey, and K. Langlands, "Toll-Like receptor 2 activation and comedogenesis: implications for the pathogenesis of acne," *BMC Dermatol.*, vol. 13, no. 1, pp. 10–17, 2013.
- [57] W. J. Cunliffe, D. B. Holland, and A. Jeremy, "Comedone formation: Etiology, clinical presentation, and treatment," *Clin. Dermatol.*, vol. 22, no. 5, pp. 367–374, 2004.
- [58] C. Renaud, "L'acné: une pathologie multifactorielle - Facteurs de risques et traitements," 2014.
- [59] AFSSAPS, "Recommandations de Bonne Pratique - Traitement de l'acné par voie locale et générale," 2007.
- [60] B. Shaheen and M. Gonzalez, "A microbial aetiology of acne: what is the evidence?," *Br. J. Dermatol.*, vol. 165, no. 3, pp. 474–85, 2011.
- [61] J. P. Leeming, K. T. Holland, and W. J. Cunliffe, "The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 130, no. 4, pp. 803–807, 1984.
- [62] A. E. Till, V. Goulden, W. J. Cunliffe, and K. T. Holland, "The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ," *Br. J. Dermatol.*, vol. 142, no. 5, pp. 885–892, 2000.
- [63] K. T. Holland, E. Ingham, and W. J. Cunliffe, "A review The microbiology of acne," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 51, no. 2, pp. 195–215, 1981.
- [64] R. M. Lavker, J. J. Leyden, and K. J. McGinley, "The relationship between bacteria and the abnormal follicular keratinization in acne vulgaris," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 77, no. 3, pp. 325–330, 1981.
- [65] J. P. Leeming, K. T. Holland, and W. J. Cunliffe, "The pathological and ecological significance of microorganisms colonising," vol. 20, pp. 11–16, 1985.
- [66] S. M. Puhvel and D. Amirian, "Bacterial flora of comedones," *Br. J. Dermatol.*, vol. 101,

- no. 5, pp. 543–548, 1979.
- [67] J. P. Leeming, K. T. Holland, and W. J. Cunliffe, “The microbial colonization of inflamed lesions,” *Br J Dermatol.*, vol. 118, pp. 203–208, 1988.
- [68] S. Fitz-Gibbon, S. Tomida, B.-H. Chiu, L. Nguyen, C. Du, M. Liu, D. Elashoff, M. C. Erfe, A. Loncaric, J. Kim, R. L. Modlin, J. F. Miller, E. Sodergren, N. Craft, G. M. Weinstock, and H. Li, “Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 9, pp. 2152–2160, 2013.
- [69] C. Dessinioti and A. D. Katsambas, “The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies,” *Clin. Dermatol.*, vol. 28, no. 1, pp. 2–7, 2010.
- [70] C. Beylot, N. Auffret, F. Poli, J.-P. Claudel, M.-T. Leccia, P. Del Giudice, and B. Dreno, “Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne,” *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 28, no. 3, pp. 271–8, 2014.
- [71] P. G. Unna, “The histological pathology of diseases of the skin,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 7, no. 3, pp. 83–85, 1895.
- [72] G. E. Webster, “Acne,” in *Current problems in dermatology*, vol. 8, no. 6, 1996.
- [73] A. McDowell, S. Valanne, G. Ramage, M. M. Tunney, J. V Glenn, C. Gregory, A. Bhatia, J. Maisonneuve, M. Lodes, D. H. Persing, S. Patrick, and G. C. McIorinan, “Propionibacterium acnes types I and II represent phylogenetically distinct groups,” vol. 43, no. 1, pp. 326–334, 2005.
- [74] A. Pappas, S. Johnsen, J.-C. Liu, and M. Eisinger, “Sebum analysis of individuals with and without acne,” *Dermatoendocrinol.*, vol. 1, no. 3, pp. 157–161, 2009.
- [75] M. Picardo, M. Ottaviani, E. Camera, and A. Mastrofrancesco, “Sebaceous gland lipids,” *Dermatoendocrinol.*, vol. 1, no. 2, pp. 68–71, 2014.
- [76] M. Ottaviani, E. Camera, and M. Picardo, “Lipid mediators in acne,” *Mediators Inflamm.*, 2010.
- [77] G. M. White, “Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, no. 39, pp. S34–37, 1998.
- [78] H. C. Williams, “Acne vulgaris,” *Lancet*, no. 379, pp. 361–372, 2012.
- [79] L. Martin, “L’observance des traitements antiacnéiques,” 2006.
- [80] B. Dreno, “Bacteriological resistance in acne: A call to action,” *Eur. J. Dermatology*, vol. 26, no. 2, pp. 127–132, 2016.
- [81] B. Dreno, P. Foulc, A. Reynaud, D. Moyse, and H. Habert, “Effect of zinc gluconate on propionibacterium acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study,” *Eur J Dermatol*, vol. 15, no. 3, pp. 152–155, 2005.
- [82] E. A. Eady, R. A. Bojar, C. E. Jones, J. H. Cove, K. T. Holland, and W. J. Cunliffe, “The effects of acne treatment with a combination of benzoyl peroxide and erythromycin on skin carriage of erythromycin-resistant propionibacteria,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 134, no. 1, pp. 107–113, 1996.
- [83] U. Jappe, “Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy,” *Acta Derm. Venereol.*, vol. 83, no. 4, pp.

- 241–248, 2003.
- [84] M. S. Nestor, N. Swenson, and A. Macri, “Physical modalities (devices) in the management of acne,” vol. 34, no. 2, pp. 215–223, 2016.
- [85] K. Nouri and C. J. Ballard, “Laser therapy for acne,” *Clin. Dermatol.*, vol. 24, no. 1, pp. 26–32, 2006.
- [86] D. Paithankar, B. H. Hwang, G. Munavalli, A. Kauvar, J. Lloyd, R. Blomgren, L. Faupel, T. Meyer, and S. Mitragotri, “Ultrasonic delivery of silica-gold nanoshells for photothermolysis of sebaceous glands in humans: Nanotechnology from the bench to clinic,” *J. Control. release*, vol. 206, pp. 30–36, 2015.
- [87] H. Azimi, M. Fallah-Tafti, A. A. Khakshur, and M. Abdollahi, “A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments,” *Fitoterapia*, no. 83, pp. 1306–1317, 2012.
- [88] M. R. Roudsari, R. Karimi, and a M. Mortazavian, “Health effects of probiotics on the skin,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 55, no. 9, pp. 1219–1240, 2015.
- [89] H.-J. Cao, G.-Y. Yang, Y.-Y. Wang, and J.-P. Liu, “Acupoint stimulation for acne: A systematic review of randomized controlled trials,” *Med. Acupunct.*, vol. 25, no. 3, pp. 173–194, 2013.
- [90] S. Jung, N. Otberg, G. Thiede, H. Richter, W. Sterry, S. Panzner, and J. Lademann, “Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 126, no. 8, pp. 1728–1732, 2006.
- [91] G. a Castro and L. A. Ferreira, “Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 5, no. 6, pp. 665–679, 2008.
- [92] K. P. Redbord, M. Busso, and C. W. Hanke, “Soft-tissue augmentation with hyaluronic acid and calcium hydroxyl apatite fillers,” *Dermatol. Ther.*, vol. 24, no. 1, pp. 71–81, 2011.
- [93] G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, “Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no. 4, pp. 415–429, 2006.
- [94] D. Yang, D. Pornpattananangkul, T. Nakatsuji, M. Chan, D. Carson, C.-M. Huang, and L. Zhang, “The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 6035–6040, 2009.
- [95] T. Nakatsuji, M. C. Kao, J.-Y. Fang, C. C. Zouboulis, L. Zhang, R. L. Gallo, and C.-M. Huang, “Antimicrobial Property of Lauric Acid Against *Propionibacterium Acnes*: Its Therapeutic Potential for Inflammatory Acne Vulgaris,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, no. 10, pp. 2480–2488, 2009.
- [96] G. a Castro, R. L. Oréfice, J. M. C. Vilela, M. S. Andrade, and L. a M. Ferreira, “Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne,” *J. Microencapsul.*, vol. 24, no. 5, pp. 395–407, 2007.
- [97] G. A. Castro, A. L. L. R. Coelho, C. A. Oliveira, G. A. B. Mahecha, R. L. Oréfice, and L. A. M. Ferreira, “Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles,” *Int. J. Pharm.*, vol. 381, no. 1, pp. 77–83, 2009.
- [98] G. A. Castro, C. A. Oliveira, G. A. B. Mahecha, and L. A. M. Ferreira, “Comedolytic

- effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 303, no. 7, pp. 513–520, 2011.
- [99] D. M. Ridolfi, P. D. Marcato, G. Z. Justo, L. Cordi, D. Machado, and N. Durán, “Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 93, pp. 36–40, 2012.
- [100] W. Gao, D. Vecchio, J. Li, J. Zhu, Q. Zhang, V. Fu, and J. Li, “Hydrogel Containing Nanoparticle- Stabilized Liposomes for Topical Antimicrobial Delivery,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 2900–2907, 2014.
- [101] L. Perioli, C. Pagano, M. Nocchetti, and L. Latterini, “Development of smart semisolid formulations to enhance retinoic acid topical application,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 11, pp. 3904–3912, 2015.
- [102] V. Ambrogi, G. Fardella, G. Grandolini, and L. Perioli, “Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents — I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen,” *Int. J. Pharm.*, vol. 220, no. 1–2, pp. 23–32, 2001.
- [103] D. Pornpattananangkul, S. Olson, S. Aryal, M. Sartor, M. Huang, K. Vecchio, and L. Zhang, “Stimuli - responsive liposome fusion mediated by gold nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 1935–1942, 2011.
- [104] J. Chorachoo, T. Amnuaikit, and S. P. Voravuthikunchai, “Liposomal encapsulated rhodomertone: A novel antiacne drug,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, pp. 1–7, 2013.
- [105] S. Shanmugam, C.-K. Song, S. Nagayya-Sriraman, R. Baskaran, C.-S. Yong, H.-G. Choi, D.-D. Kim, J. S. Woo, and B.-K. Yoo, “Physicochemical characterization and skin permeation of liposome formulations containing clindamycin phosphate,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 32, no. 7, pp. 1067–1075, 2009.
- [106] H. Harde, A. K. Agrawal, M. Katariya, D. Kale, and S. Jain, “Development of a topical adapalene-solid lipid nanoparticle loaded gel with enhanced efficacy and improved skin tolerability,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 55, pp. 43917–43929, 2015.
- [107] E. Silva, G. Carneiro, L. Araujo, M. Trindade, M. Yoshida, R. Orefice, L. ; Farias, M. ; Carvalho, S. ; Santos, G. ; Goulart, R. ; Alves, and L. Ferreira, “Solid Lipid Nanoparticles loaded with retinoic acid and lauric acid as an alternative for topical treatment of acne vulgaris,” vol. 15, no. 1, pp. 792–799, 2015.
- [108] V. B. Pokharkar, C. Mendiratta, A. Y. Kyadarkunte, S. H. Bhosale, and G. A. Barhate, “Skin delivery aspects of benzoyl peroxide loaded solid lipid nanoparticles for acne treatment,” vol. 5, no. 6, pp. 635–652, 2014.
- [109] K. Raza, B. Singh, P. Singal, S. Wadhwa, and O. P. Katare, “Systematically optimized biocompatible isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical treatment of acne,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 105, pp. 67–74, 2013.
- [110] A. Gupta, S. Singh, N. G. Kotla, and T. J. Webster, “Formulation and evaluation of a topical niosomal gel containing a combination of benzoyl peroxide and tretinoin for antiacne activity,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 171–182, 2014.
- [111] M. Manconi, C. Sinico, D. Valenti, F. Lai, and A. M. Fadda, “Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated

- tretinoin,” *Int. J. Pharm.*, vol. 311, no. 1–2, pp. 11–19, 2006.
- [112] C. P. Reis, N. Martinho, C. Rosado, A. S. Fernandes, and A. Roberto, “Design of polymeric nanoparticles and its applications as drug delivery systems for acne treatment,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 3, pp. 409–417, 2014.
- [113] A. J. Friedman, J. Phan, D. O. Schairer, J. Champer, M. Qin, A. Pirouz, K. Blecher-Paz, A. Oren, P. T. Liu, R. L. Modlin, and J. Kim, “Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 5, pp. 1231–1239, 2013.
- [114] M. Jelvehgari, M. R. Siahi-Shadbad, S. Azarmi, G. P. Martin, and A. Nokhodchi, “The microsp sponge delivery system of benzoyl peroxide: Preparation, characterization and release studies,” *Int. J. Pharm.*, vol. 308, no. 1–2, pp. 124–132, 2006.
- [115] S. Inui, H. Aoshima, A. Nishiyama, and S. Itami, “Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: Unique impact on skin care,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 238–241, 2011.
- [116] U. Blume-Peytavi and A. Vogt, “Human hair follicle: Reservoir function and selective targeting,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 165, no. S2, pp. 13–17, 2011.
- [117] A. Vogt, S. Hadam, M. Heiderhoff, H. Audring, J. Lademann, W. Sterry, and U. Blume-Peytavi, “Morphometry of human terminal and vellus hair follicles,” *Exp. Dermatol.*, vol. 16, no. 11, pp. 946–950, 2007.
- [118] J. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, 1st ed. Elsevier, 1994.
- [119] A. Al-Kattan, “Développement de nano-systèmes hybrides à base d’apatites biomimétiques en vue d’applications biomédicales en oncologie,” 2010.
- [120] J. Gómez-morales, M. Iafisco, J. M. Delgado-lópez, S. Sarda, and C. Drouet, “Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization : Overview of fundamental and applied aspects,” *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, vol. 59, pp. 1–46, 2013.
- [121] D. Eichert, C. Drouet, H. Sfihi, C. Rey, and C. Combes, *Nanocrystalline apatite-based biomaterials : Synthesis , processing and characterization*. 2007.
- [122] N. Vandecandelaere, C. Rey, and C. Drouet, “Biomimetic apatite-based biomaterials: On the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 11, pp. 2593–2606, 2012.
- [123] S. Cazalbou, D. Eichert, X. Ranz, C. Drouet, C. Combes, M. F. Harmand, and C. Rey, “Ion exchanges in apatites for biomedical application,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 405–409, 2005.
- [124] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, and M. J. Glimcher, “Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo,” *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 22, no. 4, pp. 310–317, 2004.
- [125] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, and A. Barroug, “Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 2, pp. 198–205, 2007.
- [126] S. V. Dorozhkin, “Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates,” *Acta*

- Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 715–734, 2010.
- [127] Y. Sakhno, L. Bertinetti, M. Iafisco, A. Tampieri, N. Roveri, and G. Martra, “Surface hydration and cationic sites of nanohydroxyapatites with amorphous or crystalline surfaces: A comparative study,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 39, pp. 16640–16648, 2010.
- [128] F. Dabbarh, A. Lebugle, A. Taitai, and M. Bennami, “Influence du séchage sur la composition de phosphates de calcium carbonatés, analogues osseux,” *Ann. Chim. Sci. des Matériaux*, vol. 25, no. 5, pp. 339–348, 2000.
- [129] C. Drouet, “Apatite formation: Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–12, 2013.
- [130] P. Scherrer, “Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen,” *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Math. Klasse*, pp. 98–100, 1918.
- [131] W. Vogel and R. Hosemann, “Evaluation of paracrystalline distortions from line broadening,” *Acta Crystallogr. Sect. A Cryst. Physics, Diffraction, Theor. Gen. Crystallogr.*, vol. 26, no. 2, pp. 272–277, 1970.
- [132] G. . Williamson and W. . Hall, “X-ray line broadening from filed aluminium and wolfram,” *Acta Metall.*, vol. 1, no. 1, pp. 22–31, 1953.
- [133] N. C. Halder and C. N. J. Wagner, “Separation of particle size and lattice strain in integral breadth measurements,” *Acta Crystallogr.*, vol. 20, no. 2, pp. 312–313, 1966.
- [134] A. R. Stokes and A. J. C. Wilson, “A method of calculating the integral breadths of Debye-Scherrer lines: generalization to non-cubic crystals,” *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.*, vol. 40, no. 02, pp. 197–198, 1944.
- [135] C. Rey, O. Marsan, C. Combes, C. Drouet, D. Grossin, and S. Sarda, “Characterization of calcium phosphates using vibrational spectroscopies,” in *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*, Springer, 2014, pp. 229–266.
- [136] C. Rey, J. Lian, M. Grynopas, F. Shapiro, L. Zylberberg, and M. J. Glimcher, “Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 21, no. 1–4, pp. 267–73, 1989.
- [137] C. Rey, M. Shimizu, B. Collins, and M. J. Glimcher, “Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the v4 PO4 domain,” *Calcif Tissue Int*, no. 46, pp. 384–394, 1990.
- [138] G. Charlot, *Chimie analytique quantitative*. 1974.
- [139] S. Cazalbou, G. Bertrand, and C. Drouet, “Tetracycline-loaded biomimetic apatite: An adsorption study,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, no. 7, pp. 3014–3024, 2015.
- [140] C. H. Giles, T. H. Macewan, and D. Smith, “Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids,” in *Journal of Chemical Society*, 1960, pp. 3973 – 3993.

- [141] K. Y. Foo and B. H. Hameed, "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems," *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 1, pp. 2–10, 2010.
- [142] M. Iafisco, C. Drouet, A. Adamiano, P. Pascaud, M. Montesi, S. Panseri, S. Sarda, and A. Tampieri, "Superparamagnetic iron-doped nanocrystalline apatite as a delivery system for doxorubicin," *J. Mater. Chem. B*, no. 4, pp. 57–70, 2016.
- [143] S. Sarda, F. Errassifi, O. Marsan, A. Geffre, C. Trumel, and C. Drouet, "Adsorption of tranexamic acid on hydroxyapatite: Toward the development of biomaterials with local hemostatic activity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 1–7, 2016.
- [144] C. Combes and C. Rey, "Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity," *Biomaterials*, vol. 23, no. 13, pp. 2817–2823, 2002.
- [145] A. Al-Kattan, S. Girod-Fullana, C. Charvillat, H. Ternet-Fontebasso, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, V. Santran, J. Bordère, B. Pipy, J. Bernad, and C. Drouet, "Biomimetic nanocrystalline apatites: Emerging perspectives in cancer diagnosis and treatment," *Int. J. Pharm.*, vol. 423, no. 1, pp. 26–36, 2012.
- [146] M. Iafisco, J. M. Delgado-López, and C. Drouet, "Nanocrystalline apatites: synthesis, physical-chemical and thermodynamic characterization," in *Apatites: synthesis, structural characterization and biomedical applications*, M. Iafisco and J. M. Delgado-López, Eds. New York: Nova Science Publishers, 2014.
- [147] C. Drouet, A. Al-Kattan, M. Choimet, A. Tourrette, V. Santran, J. Dexpert-Ghys, B. Pipy, F. Brouillet, and M. Tourbin, "Biomimetic apatite-based functional nanoparticles as promising newcomers in nanomedicine: Overview of 10 years of initiatory research," *J. Gen. Pract. Med. Diagnosis*, vol. 1, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [148] M. Kester, Y. Heakal, T. Fox, A. Sharma, G. P. Robertson, T. T. Morgan, E. İ. Altinoğlu, A. Tabaković, M. R. Parette, S. M. Rouse, V. Ruiz-Velasco, and J. H. Adair, "Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 12, pp. 4116–4121, 2008.
- [149] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate cements for biomedical application," *J. Mater. Sci.*, no. 43, pp. 3028–3057, 2008.
- [150] S. V. Dorozhkin and M. Epple, "Biological and medical significance of calcium phosphates," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 41, no. 17, pp. 3130–3146, 2002.
- [151] H. Noukrati, S. Cazalbou, I. Demnati, C. Rey, A. Barroug, and C. Combes, "Injectability, microstructure and release properties of sodium fusidate-loaded apatitic cement as a local drug-delivery system," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 177–184, 2016.
- [152] S. M. Hosseini, C. Drouet, A. Al-Kattan, and A. Navrotsky, "Energetics of lanthanide-doped calcium phosphate apatite," *Am. Mineral.*, vol. 99, no. 11–12, pp. 2320–2327, 2014.
- [153] A. Lebugle, A. Rodrigues, P. Bonneville, J. Voigt, P. Canal, and F. Rodriguez, "Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate," *Biomaterials*, vol. 23, no. 16, pp. 3517–3122, 2002.
- [154] K. Hochdörffert, K. A. Ajaj, C. Schäfer-Obodziet, and F. Kratz, "Development of novel bisphosphonate prodrugs of doxorubicin for targeting bone metastases that are cleaved pH dependently or by cathepsin B: Synthesis, cleavage properties, and binding properties

- to hydroxyapatite as well as bone matrix,” *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 17, pp. 7502–7515, 2012.
- [155] A. Al-Kattan, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, and C. Drouet, “Preparation and physicochemical characteristics of luminescent apatite-based colloids,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 7, pp. 2918–2924, 2010.
- [156] A. Bouladjine, A. Al-Kattan, P. Dufour, and C. Drouet, “New advances in nanocrystalline apatite colloids intended for cellular drug delivery,” *Langmuir*, vol. 25, no. 20, pp. 12256–12265, 2009.
- [157] J. D. Sallis, “Structure/performance relationships of phosphorous and carboxyl containing additives as calcium phosphate crystal growth inhibitors,” in *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Springer, 1998, pp. 174–191.
- [158] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013.
- [159] W. P. S. L. Wijesinghe, M. M. M. G. P. G. Mantilaka, E. V. A. Premalal, H. M. T. U. Herath, S. Mahalingam, M. Edirisinghe, R. P. V. J. Rajapakse, and R. M. G. Rajapakse, “Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity,” *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 42, pp. 83–90, 2014.
- [160] A. Paz, D. Guadarrama, M. López, J. E. González, N. Brizuela, and J. Aragón, “A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes,” *Quim. Nova*, vol. 35, no. 9, pp. 1724–1727, 2012.
- [161] R. Barabás, M. Czikó, I. Dékány, L. Bizo, and E. Bogya, “Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials,” *Chem. Pap.*, vol. 67, no. 11, pp. 1414–1423, 2013.
- [162] V. Uskoković, S. S. Batarni, J. Schweicher, A. King, and T. A. Desai, “Effect of calcium phosphate particle shape and size on their antibacterial and osteogenic activity in the delivery of antibiotics in vitro,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 7, pp. 2422–2431, 2013.
- [163] A. Al-kattan, P. Dufour, and C. Drouet, “Purification of biomimetic apatite-based hybrid colloids intended for biomedical applications: A dialysis study,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 378–384, 2011.
- [164] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I. R. Dickson, and M. J. Glimcher, “The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 45, no. 3, pp. 157–164, 1989.
- [165] N. Vandecandelaere, “Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d’apatites phospho-calciques dopées,” 2012.
- [166] M. Choimet, A. Tourrette, and C. Drouet, “Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite: The case of cytidine 5’ monophosphate (CMP),” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 456, pp. 132–137, 2015.
- [167] I. Rodríguez-Ruiz, J. M. Delgado-López, M. A. Durán-Olivencia, M. Iafisco, A. Tampieri, D. Colangelo, M. Prat, and J. Gómez-Morales, “pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content,”

Langmuir, vol. 29, no. 26, pp. 8213–8221, 2013.

- [168] L. Benaziz, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, and A. Lebugle, “Adsorption of O-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 238, no. 1, pp. 48–53, 2001.
- [169] A. Grunenwald, C. Keyser, A. M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, and C. Drouet, “Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology,” *J. Archaeol. Sci.*, vol. 49, pp. 134–141, 2014.
- [170] P. Pascaud, P. Gras, Y. Coppel, C. Rey, and S. Sarda, “Interaction between a bisphosphonate, tiludronate, and biomimetic nanocrystalline apatites,” *Langmuir*, vol. 29, no. 7, pp. 2224–2232, 2013.
- [171] L. K. Koopal, W. H. van Riemsdijk, J. C. M. de Wit, and M. F. Benedetti, “Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 166, no. 1, pp. 51–60, 1994.
- [172] K. Hammami, H. El Feki, O. Marsan, and C. Drouet, “Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite: The case of adenosine 5′ monophosphate (AMP),” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 353, pp. 165–172, 2015.
- [173] A. Al-Kattan, F. Errassifi, A.-M. Sautereau, S. Sarda, P. Dufour, A. Barroug, I. Dos Santos, C. Combes, D. Grossin, C. Rey, and C. Drouet, “Medical potentialities of biomimetic apatites through adsorption, ionic substitution, and mineral/organic associations: Three illustrative examples,” *Adv. Eng. Mater.*, vol. 12, no. 7, pp. B224–B233, 2010.
- [174] A. Grunenwald, C. Keyser, A. M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, and C. Drouet, “Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 292, pp. 867–875, 2014.
- [175] K. Hammami, H. El-Feki, O. Marsan, and C. Drouet, “Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite: The case of adenosine 5′ triphosphate (ATP),” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 360, pp. 979–988, 2016.
- [176] S. Amr, M. B. Brown, G. P. Martin, and B. Forbes, “Activation of clindamycin phosphate by human skin,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 90, no. 4, pp. 550–554, 2001.
- [177] E. A. Eady, M. Gloor, and J. J. Leyden, “Propionibacterium acnes resistance: A worldwide problem,” *Dermatology*, vol. 206, no. 1, pp. 54–56, 2003.
- [178] J. I. Ross, E. A. Eady, J. H. Cove, C. E. Jones, A. H. Ratyal, Y. W. Miller, S. Vyakrnam, and W. J. Cunliffe, “Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, no. 5, pp. 1162–1165, 1997.
- [179] D. R. P. Guay, “Topical clindamycin in the management of acne vulgaris,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 8, pp. 2625–2664, 2007.
- [180] M. Jevtic, A. Radulovic, N. Ignjatovic, M. Mitric, and D. Uskokovic, “Controlled assembly of poly(d,l-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres under ultrasonic irradiation,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 208–218, 2009.
- [181] M. Vukomanovic, S. D. Skapin, I. Poljansek, E. Zagar, B. Kralj, N. Ignjatovic, and D. Uskokovic, “Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanosphere. Part

- 2: Simultaneous release of a drug and a prodrug (clindamycin and clindamycin phosphate),” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 414–421, 2011.
- [182] C. Drouet, F. Bosc, M. Banu, C. Largeot, C. Combes, G. Dechambre, C. Estournès, G. Raimbeaux, and C. Rey, “Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials,” *Powder Technol.*, vol. 190, no. 1–2, pp. 118–122, 2009.
- [183] D. Eichert, C. Combes, C. Drouet, and C. Rey, “Formation and evolution of hydrated surface layers of apatites,” *Key Eng. Mater.*, vol. 284–286, pp. 3–6, 2005.
- [184] P. Jackson and M. I. Attalla, “N-Nitrosopiperazines form at high pH in post-combustion capture solutions containing piperazine: a low-energy collisional behaviour study,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 24, pp. 3567–3577, 2010.
- [185] Y. R. Ye, E. Bektic, R. Buchta, R. Houlden, and B. Hunt, “Simultaneous determination of tretinoin and clindamycin phosphate and their degradation products in topical formulations by reverse phase HPLC,” *J. Sep. Sci.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 71–77, 2004.
- [186] M. Barazandeh Tehrani, M. Namadchian, S. Fadayee Vatan, and E. Souri, “Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and tretinoin in pharmaceutical dosage forms,” *Daru*, vol. 21, no. 1, pp. 29–36, 2013.
- [187] G. C. Batzias, G. A. Delis, and M. Koutsoviti-Papadopoulou, “A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 35, no. 3, pp. 545–554, 2004.
- [188] W. J. Cunliffe, C. Fernandez, R. Bojar, R. Kanis, and F. West, “An observer-blind parallel-group, randomized, multicentre clinical and microbiological study of a topical clindamycin/zinc gel and a topical clindamycin lotion in patients with mild/moderate acne,” *J. Dermatolog. Treat.*, vol. 16, no. 4, pp. 213–218, 2005.
- [189] M. Gupta, V. K. Mahajan, K. S. Mehta, and P. S. Chauhan, “Zinc therapy in dermatology: A review,” *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2014, 2014.
- [190] H. Kobayashi, S. Aiba, and H. Tagami, “Successful treatment of dissecting cellulitis and acne conglobata with oral zinc,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 141, no. 6, pp. 1137–1138, 1999.
- [191] Y. S. Bae, N. D. Hill, Y. Bibi, J. Dreiherr, and A. D. Cohen, “Innovative uses for zinc in dermatology,” *Dermatol. Clin.*, vol. 28, no. 3, pp. 587–597, 2010.
- [192] J. S. Strauss and A. M. Stranieri, “Acne treatment with topical erythromycin and zinc: effect of *Propionibacterium acnes* and free fatty acid composition,” *J Am Acad Dermatol*, vol. 11, no. 1, pp. 86–89, 1984.
- [193] R.D.Shannon and C.T.Prewitt, “Effective ionic radii in oxides and fluorides,” *Acta Cryst*, vol. B25, no. 1454, p. 925946, 1969.
- [194] E. M. Múzquiz-Ramos, D. A. Cortés-Hernández, J. C. Escobedo-Bocardo, A. Zugasti-Cruz, X. S. Ramírez-Gómez, and J. G. Osuna-Alarcón, “In vitro and in vivo biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 4, pp. 1035–1041, 2013.
- [195] V. Sarath Chandra, G. Baskar, R. V. Suganthi, K. Elayaraja, M. I. Ahymah Joshy, W. Sofi Beaula, R. Mythili, G. Venkatraman, and S. Narayana Kalkura, “Blood compatibility of iron-doped nanosize hydroxyapatite and its drug release,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 3, pp. 1200–1210, 2012.

- [196] Y. Han, X. Wang, H. Dai, and S. Li, "Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, pp. 4616–4622, 2012.
- [197] A. Ashokan, G. S. Gowd, V. H. Somasundaram, A. Bhupathi, R. Peethambaran, A. K. K. Unni, S. Palaniswamy, S. V. Nair, and M. Koyakutty, "Multifunctional calcium phosphate nano-contrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging," *Biomaterials*, vol. 34, no. 29, pp. 7143–7157, 2013.
- [198] W. S. Vedakumari, V. M. Priya, and T. P. Sastry, "Deposition of superparamagnetic nanohydroxyapatite on iron–fibrin substrates: Preparation, characterization, cytocompatibility and bioactivity studies," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 120, pp. 208–214, 2014.
- [199] L. Montazeri, J. Javadpour, M. A. Shokrgozar, S. Bonakdar, M. Khayyat Moghaddam, and V. Asgary, "The interaction of plasma proteins with nano-size fluoride-substituted apatite powders," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 6, pp. 6145–6152, 2013.
- [200] M. Tourbin, A. Al-Kattan, and C. Drouet, "Study on the stability of suspensions based on biomimetic apatites aimed at biomedical applications," *Powder Technol.*, vol. 255, pp. 17–22, 2014.
- [201] T. Yu, A. Malugin, and H. Ghandehari, "Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity," *ACS Nano*, vol. 5, no. 7, pp. 5717–5728, 2011.
- [202] Y.-S. Lin and C. L. Haynes, "Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 13, pp. 4834–4842, Apr. 2010.
- [203] J. Choi, V. Reipa, V. M. Hitchins, P. L. Goering, and R. A. Malinauskas, "Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles," *Toxicol. Sci.*, vol. 123, no. 1, pp. 133–143, 2011.
- [204] H.-M. Kim, K.-M. Kim, K. Lee, Y. S. Kim, and J.-M. Oh, "Nano-bio interaction between graphite oxide nanoparticles and human blood components," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2012, no. 32, pp. 5343–5349, 2012.
- [205] J. Autian, "Biological model systems for the testing of the toxicity of biomaterials," in *Polymer in Medicine and Surgery*, Vol. 8., P. Press, Ed. New York: Springer Science & Business Media, 1996, p. 181.
- [206] L. Lai, C. Lin, Z.-Q. Xu, X.-L. Han, F.-F. Tian, P. Mei, D.-W. Li, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, Y.-Z. Zhang, and Y. Liu, "Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 97, pp. 366–376, 2012.
- [207] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, and S. E. McNeil, "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 6, pp. 428–437, 2009.
- [208] C. Hou, Q. Yuan, D. Huo, S. Zheng, and D. Zhan, "Investigation on clotting and hemolysis characteristics of heparin-immobilized polyether sulfones biomembrane," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 85, no. 3, pp. 847–852, 2008.
- [209] H. Hu, X. B. Wang, S. L. Xu, W. T. Yang, F. J. Xu, J. Shen, and C. Mao, "Preparation

- and evaluation of well-defined hemocompatible layered double hydroxide-poly(sulfobetaine) nanohybrids,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 30, pp. 15362–15369, 2012.
- [210] Q. Z. Wang, X. G. Chen, Z. X. Li, S. Wang, C. S. Liu, X. H. Meng, C. G. Liu, Y. H. Lv, and L. J. Yu, “Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 1371–1377, 2008.
- [211] G. B. Quan, Y. Han, M. X. Liu, L. Fang, W. Du, S. P. Ren, J. X. Wang, and Y. Wang, “Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose,” *Cryobiology*, vol. 62, no. 2, pp. 135–144, 2011.
- [212] V. P. P. Schiar, D. B. dos Santos, M. W. Paixão, C. W. Nogueira, J. B. T. Rocha, and G. Zeni, “Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: A possible involvement of reactive oxygen species,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 177, no. 1, pp. 28–33, 2009.
- [213] J. Viskupicova, D. Blaskovic, S. Galiniak, M. Soszyński, G. Bartosz, L. Horakova, and I. Sadowska-Bartosz, “Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro,” *Redox Biol.*, vol. 5, pp. 381–387, 2015.
- [214] S. H. D. P. Lacerda, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, and J. F. Douglas, “Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 1, pp. 365–379, 2010.
- [215] A. Papadopoulou, R. J. Green, and R. A. Frazier, “Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 1, pp. 158–163, 2005.
- [216] J. Squirrell, D. Wokosin, J. White, and B. Bavister, “Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability,” *Nat. Biotechnol.*, no. 17, pp. 763–767, 1999.
- [217] Y. Zhu, C.-S. Choe, S. Ahlberg, M. C. Meinke, U. Alexiev, J. Lademann, and M. E. Darwin, “Penetration of silver nanoparticles into porcine skin ex vivo using fluorescence lifetime imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 5, pp. 051006–1–8, 2015.
- [218] M. Simon, “Analyse par microfaisceau d’ions. Application à l’étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in vitro,” 2009.
- [219] S. A. E. Johansson, “PIXE: a novel technique for elemental analysis,” *Endeavour*, vol. 13, no. 2, pp. 48–53, 1989.
- [220] T. B. Johansson, R. Akselsson, and S. A. E. Johansson, “X-ray analysis: Elemental trace analysis at the 10–12 g level,” *Nucl. Instruments Methods*, vol. 84, no. 1, pp. 141–143, 1970.
- [221] Q. Le Trequesser, “Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées: localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l’organisme pluricellulaire,” 2014.
- [222] J. Lademann, H. J. Weigmann, C. Rickmeyer, H. Barthelmes, H. Schaefer, G. Mueller, and W. Sterry, “Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice,” *Skin Pharmacol. Appl. Skin*

- Physiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 247–256, 1999.
- [223] B. Mogilevych, D. Isensee, J. L. Rangel, C. Dal Pizzol, V. C. a. Martinello, G. C. Dieamant, and A. a. Martin, “Study of the vitamins A, E and C esters penetration into the skin by confocal Raman spectroscopy in vivo,” *Prog. Biomed. Opt. Imaging - Proc. SPIE*, vol. 9531, pp. 95312A1–8, 2015.
- [224] M. Förster, M. A. Bolzinger, D. Ach, G. Montagnac, and S. Briançon, “Ingredients tracking of cosmetic formulations in the skin: A confocal raman microscopy investigation,” *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 4, pp. 858–872, 2011.
- [225] D. Lunter and R. Daniels, “Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 12, pp. 126015–1–12, 2014.
- [226] M. Mélot, P. D. A. Pudney, A. M. Williamson, P. J. Caspers, A. Van Der Pol, and G. J. Puppels, “Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy,” *J. Control. Release*, vol. 138, no. 1, pp. 32–39, 2009.
- [227] R. Darlenski, S. Sassning, N. Tsankov, and J. W. Fluhr, “Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no. 2, pp. 295–303, 2009.
- [228] J. Zhao, H. Lui, S. Kalia, and H. Zeng, “Real-time Raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection: an independent validation,” *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 8373–8379, 2015.
- [229] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, and R. Salzer, “Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 2, no. 1–2, pp. 13–28, 2009.
- [230] M. Lane, “Skin penetration enhancers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 447, no. 1–2, pp. 12–21, 2013.
- [231] R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and E. R. Congdon, “Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 62, no. 3, pp. 481–488, Mar. 1982.
- [232] T. J. Franz, R. J. Scheuplein, I. H. Blank, G. J. Brauner, A. B. MacFarlane, J. Ostrenga, C. Steinmetz, B. Poulsen, J. Ostrenga, C. Steinmetz, B. Poulsen, S. Yett, P. C. H. Newbold, R. B. Stoughton, W. L. Pines, R. J. Scheuplein, I. H. Blank, R. J. Feldmann, H. I. Maibach, I. H. Blank, J. W. H. Mali, W. J. Van Kooten, F. C. J. Van Neer, R. J. Scheuplein, J. E. Treherne, R. J. Scheuplein, L. W. Ross, R. J. Feldmann, H. I. Maibach, E. Cronin, R. B. Stoughton, S. Rothberg, R. C. Crouse, J. L. Lee, H. Baker, A. M. Kligman, J. V. Bradley, E. Cronin, R. B. Stoughton, W. C. Fritsch, R. B. Stoughton, R. J. Feldmann, H. I. Maibach, H. I. Maibach, R. J. Feldmann, R. B. Stoughton, W. C. Fritsch, R. B. Stoughton, W. E. Clendenning, D. Kruse, R. J. Feldmann, and H. I. Maibach, “Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 64, no. 3, pp. 190–195, 1975.
- [233] T. J. Franz, P. A. Lehman, and S. G. Raney, “Use of excised human skin to assess the bioequivalence of topical products,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 22, no. 5, pp. 276–286, 2009.
- [234] Y. Yang, O. H. Campanella, B. R. Hamaker, G. Zhang, and Z. Gu, “Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations,”

Food Hydrocoll., vol. 30, no. 1, pp. 26–32, 2013.

- [235] T. Uchida, W. R. Kadhum, S. Kanai, H. Todo, T. Oshizaka, and K. Sugibayashi, “Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 67, pp. 113–118, 2015.
- [236] S. Wood, A. McEwen, G. Ford, K. Wilson, and H. Leech, “Comparative in-vitro dermal penetration studies with [14C]-aniline using Strat-M™ membrane and dermatomed human skin,” in *Poster*, 2013.
- [237] G. Rassu, E. Soddu, M. Cossu, A. Brundu, G. Cerri, N. Marchetti, L. Ferraro, R. F. Regan, P. Giunchedi, E. Gavini, and A. Dalpiaz, “Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: A first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate,” *J. Control. Release*, vol. 201, pp. 68–77, 2015.
- [238] M. Miró, W. Frenzel, W. J. Lee, S.-H. Kim, M. Chalukova, K. Lekova, F. J. Sikora, F. J. Stevenson, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, A. F. Danet, M. Cheregi, J. Martínez-Calatayud, J. V. García-Mateo, H. Y. A. Enein, J. F. van Staden, S. I. Tlowana, A. T. Haj-Hussein, J. Cirello-Egamino, I. D. Brindle, D. Kraemer, E. Rosenberg, A. Krug, R. Kellner, W. Hutter, W. Hampel, R. B. R. Mesquita, S. M. V. Fernandes, A. O. S. S. Rangel, M. Zenki, Y. Iwadou, J. F. van Staden, A. van Rensburg, M. B. Etxebarria, J. L. F. C. Lima, M. C. B. S. M. Montenegro, R. Pérez-Olmos, W. Frenzel, E. Sucman, J. Bednar, I. M. P. L. V. O. Ferreira, J. L. F. C. Lima, L. S. M. Rocha, A. M. R. Ferreira, A. O. S. S. Rangel, J. L. F. C. Lima, Z.-L. Zhi, A. Rios, M. Valcárcel, A. Caballo-López, M. D. L. de Castro, J. F. van Staden, F. V. Silva, G. B. Souza, L. F. M. Feraz, A. R. A. Nogueira, J. F. Van Staden, R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, E. Barrado, H. Vela, S. Morais, M. I. Alcaina-Miranda, F. Lázaro, M. Plantá, A. Maquieira, R. Puchades, P. Kuban, B. Karlberg, N. Torto, B. Lobelo, L. Gorton, J. F. van Staden, A. N. Araújo, M. B. Etxebarria, J. L. F. C. Lima, M. C. B. S. M. Montenegro, R. Pérez-Olmos, W. Frenzel, T. Altunbulduk, H. M. zu Köcker, W. Frenzel, W. Frenzel, D. Schepers, G. Schulze, I. M. P. L. O. Ferreira, J. L. F. C. Lima, I. González-Canal, J. L. F. C. Lima, M. C. B. S. M. Montenegro, R. Pérez-Olmos, W. Frenzel, C.-Y. Liu, J. L. F. C. Lima, C. Delerue-Matos, and M. Carmo-Vaz, “A novel flow-through microdialysis separation unit with integrated differential potentiometric detection for the determination of chloride in soil samples,” *Analyst*, vol. 128, no. 10, pp. 1291–1297, 2003.
- [239] K. Rehman and M. H. Zulfakar, “Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 4, pp. 433–440, 2014.
- [240] E. Lemery, S. Briançon, Y. Chevalier, C. Bordes, T. Oddos, A. Gohier, and M. Bolzinger, “Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Skin toxicity of surfactants: Structure / toxicity relationships,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 469, pp. 166–179, 2015.
- [241] E. Lemery, S. Briançon, Y. Chevalier, T. Oddos, A. Gohier, O. Boyron, and M. Bolzinger, “Surfactants have multi-fold effects on skin barrier function,” *Eur J Dermatol*, vol. 25, no. 5, pp. 424–435, 2015.
- [242] I. F. Almeida, A. R. Fernandes, L. Fernandes, M. R. Pena Ferreira, P. C. Costa, and M. F. Bahia, “Moisturizing Effect of Oleogel/Hydrogel Mixtures,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 13, no. 6, pp. 487–494, 2008.
- [243] F. R. Lupi, L. Gentile, D. Gabriele, S. Mazzulla, N. Baldino, and B. de Cindio, “Olive oil and hyperthermal water bigels for cosmetic uses,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 459,

pp. 70–78, 2015.

ANNEXES

Mini Review

Biomimetic Apatite-Based Functional Nanoparticles as Promising Newcomers in Nanomedicine: Overview of 10 Years of Initiatory Research

Christophe Drouet^{1*}, Ahmed Al-Kattan^{1,2}, Choimet M^{1,3}, Tourrette A³, Santran V⁴, Jeannette Dexpert-Ghys⁵, Bernard Pipy⁶, Brouillet F³ and Tourbin M⁷

¹CIRIMAT Carnot Institute, UMR 5085 CNRS/INPT/UPS, University of Toulouse, Ensiacet, Toulouse, France

²LP3 Laboratory, UMR 6182 CNRS/Aix-Marseille University, Marseille, France

³CIRIMAT Carnot Institute, UMR 5085 CNRS/INPT/UPS, Faculty of Pharmacy, University of Toulouse, Ensiacet, Toulouse, France

⁴ICELLTIS Eurl, Immeuble Biostep, 436 rue Pierre et Marie Curie, 31670 Labège, France

⁵CEMES Laboratory, Toulouse, France

⁶UMR-MD3 EA2405, University of Toulouse, France

⁷LGC (Chemical Engineering Laboratory), UMR 5503 CNRS/INPT/UPS, Ensiacet, University of Toulouse, France

Abstract

Biomimetic calcium phosphate apatites, analogous to bone mineral, may now be produced synthetically. Their intrinsic biocompatibility and the nanometer dimensions of their constitutive crystals not only allow one to envision applications in bone tissue regeneration, but also in other medical fields such as nanomedicine, and in particular in view of cell diagnosis.

In this mini-review, we look back at 10 years of our dedicated research, and summarize the main advances made in terms of preparation, physical-chemical characterizations and biological evaluations of colloidal formulations of biomimetic apatite-based nanoparticles, which we illustrate here with the angle of cancer diagnosis. The confirmed exceptional biocompatibility of these engineered nanoparticles, associated to the possibility to confer them luminescence properties by way of controlled lanthanide doping, and their capacity to be internalized by cells, including with

cancer cell addressing abilities (shown here as a proof of concept), underline that biomimetic apatite-based colloidal nanoparticles are particularly promising for nanomedicine applications, for example related to diseased cells diagnosis. Multidisciplinary research on these functional nanoparticles, initiated as described here, has now generated emulation in the scientific community where the concept of apatite nanoparticles for nanomedicine is being, gratifyingly, appropriated.

Keywords: Biomimetic apatites; Calcium phosphate; Cell diagnosis; Colloid; Luminescence; Medical imaging; Theranostic

Introductory Statements

Early and precise diagnosis plays a key role in successful patient's recovery. Thanks not only to exponential advances in the field of medical instrumentation but also that of nano-biotechnologies and the constant development and testing of new nano-systems, the limit of what is possible in terms of medical diagnosis is being continuously expanded [1]. The last decades have in particular witnessed the birth or development of various types of nano-systems for use in cell-based or tissue-based diagnosis. One can cite many examples, which includes but is not limited to gold nanoparticles, quantum dots, liposomes, silica, iron or gadolinium oxide nanoparticles [2-5]. In this regard, the domain of oncology has been rather pioneering; early and precise cancer diagnosis may indeed allow clinicians to propose adequate and anticipated therapy and to significantly reduce the odds of metastatic events [6]. An area attracting much attention in the oncology field relates to the search for nano-systems often denoted "nanoprobes" in the context of diagnosis capable of interacting with diseased cells or tissues, in a rather specific way, and thus is capable of identifying and locating tumoral regions *in vivo* and checking the efficacy of a therapeutic plan versus time.

In addition to cell or tissue specificity, via appropriate biomarkers, such nanoprobes should be intrinsically detectable by some way so as to track them within biological matter. In this regard, various characteristics of the nano-systems or nanoparticles can be exploited, typically such as luminescence, magnetism through Magnetic Resonance Imaging (MRI), or else radioactivity. A vast literature on nanoparticles developed for biomedical imaging is available; and listing all the existing systems under study is far beyond the scope of this paper. An overview of some of the most detailed systems is for example accessible in reference [7].

Other features are also expected from nanoprobes intended to be used in nanomedicine. In particular, the systems ought to exhibit a high biocompatibility¹. Also, a growing attention is paid to the setup of versatile functional nanoparticles allowing multi-functionalization, e.g., associating simultaneously a cell targeting agent, a stabilizing agent for colloidal stabilization, a drug to be delivered intracellularly, etc.,. In the latter case, the nanoprobes initially intended for cell diagnosis then also become a drug-carrier, paving the way for theranostic approaches, coupling therapy and diagnosis [8-10].

***Corresponding author:** Christophe Drouet, CIRIMAT Carnot Institute, UMR 5085 CNRS/INPT/UPS, University of Toulouse, Ensiacet, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse cedex 4, France, Tel: +33 534323411; E-mail: christophe.drouet@ensiacet.fr

Citation: Drouet C, Al-Kattan A, Choimet M, Tourrette A, Santran V, et al., (2015) Biomimetic Apatite-Based Functional Nanoparticles as Promising Newcomers in Nanomedicine: Overview of 10 Years of Initiatory Research. J Gen Pract Med Diagn 1: 001.

Received: October 28, 2014; **Accepted:** February 06, 2015; **Published:** February 20, 2015

¹ - In this view, it may be remarked that the use of systems containing heavy metal ions such as cadmium could perhaps be further discussed.

Taking into account all these aspects, the development of new types of nano-systems for nanomedicine, and in particular for cellular diagnosis, can only be encouraged. And in this view, the use of bio-inspired or even biomimetic compounds, mimicking compounds fabricated by nature itself, could serve as primary smart materials due to “advanced” biocompatibility properties. Among naturally occurring compounds observed *in vivo* in vertebrates such as humans, are calcium phosphate compounds exhibiting a crystalline structure called “apatite” [11]: bone and dentin tissues contain apatitic materials in the form of nanometer-sized crystals of a few tens of nanometers in length and up to about a tenth of nanometers in width. Apatite nanoparticles are thus already present in vertebrates - although in an agglomerated form and associated to collagen fibers - and the high surface reactivity of these nanocrystals is known to play a central role in the homeostasis of ionic and molecular species from body fluids. Apatite surface reactions like ionic exchanges and molecular adsorption/desorption processes help to maintain constant adequate concentrations for normal body functions [12,13].

The physico-chemistry and reactivity of biomimetic nanocrystalline apatites has been investigated in previous works [14-23], including in review studies (eg: [11]). Briefly, it may be reminded that the apatite structure is quite accommodating and can accept many types of ionic substituents that confer additional properties to the apatitic nanocrystals. Also, the adsorptive potential of the surface of apatitic nanocrystals is quite large, which leads to a wider range of possibilities for association with many organic (bio) molecules. For example, surface grafting of enzymes [24], growth factors [25], anti-osteoporotic drugs [26,27], DNA [28], and so on have been studied previously. These wide adsorptive abilities and versatile ion accommodation capacity then make of bio-inspired nanocrystalline apatites an obvious platform for developing the armamentarium of biologists and clinicians, either in the field of bone reconstruction or - taking into account the intrinsically high biocompatibility of these bio-inspired systems - in other application fields such as nanomedicine, for diagnosis and/or therapy. Attempts to produce drug or antibody loaded nanoparticles of hydroxyapatite were reported [29,30], but the absence of stabilizing agent in the preparation of hydroxyapatite nanosized crystals leaves a doubt concerning the stability of these particles in cell culture media or *in vivo*; as the use of an adsorbed dispersing agent on the surface of apatite nanoparticles appears as a prerequisite for preventing aggregation phenomena. The use of molecules like DNA strands has been tempted, especially in view of transfection assays [31,32], but the presence of various negatively charged phosphate group along the whole backbone of DNA also allows one to wonder about long-term stability due to the potential creation of lateral molecular interactions or interaction with other (bio)molecules present in the medium.

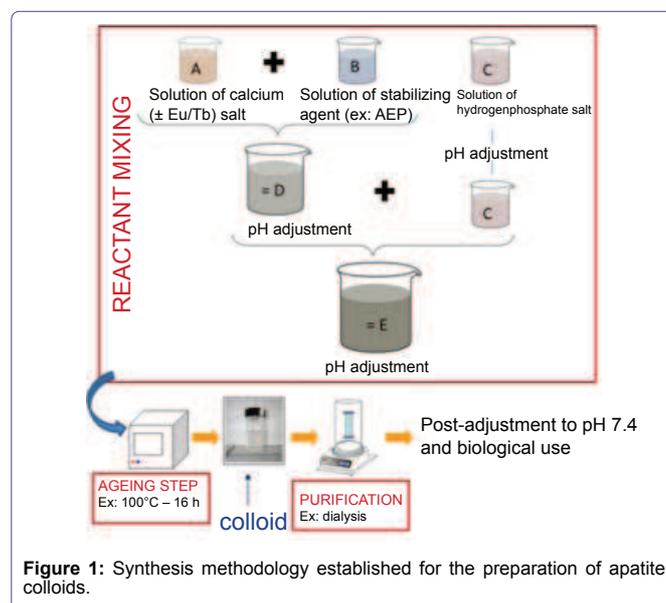
In this article, we review 10 years of initiatory research on this field that we carried out in view of the setup and study of biomimetic apatite-based colloidal functional nanoparticles for nanomedicine, with a special focus here on cancer cell diagnosis. We recapitulate progresses made on i) the formulation of apatite colloids with individualized nanoparticles, ii) the study of some of their properties for a possible use as nanoprobes (including drying and re-suspending ability as well as the adjunction of luminescence properties), iii) the confirmation of their high biocompatibility, and iv) their use for cancer cell interaction by coupling the nanoparticles with a cell targeting agent. Promising application perspectives are underlined along the text, for functionalized nanoparticles based on biomimetic nanocrystalline apatites, especially in the context of nanomedicine.

Materials and Methods

Preparation of apatite colloidal suspensions

The protocol used for synthesizing apatite-based colloids was described previously [33]. All starting salts were at least of reagent-grade purity. Briefly three starting aqueous solutions were prepared: solution (A) containing a mixture of calcium and europium (or terbium) nitrates (Merck). The Ln/(Ca+Ln) mole ratio, where Ln stands for the lanthanide ions used (Eu^{3+} or Tb^{3+}), was generally set to 2 mol%. The total Ca + Ln amount in solution (A) was 4.87 mmol dissolved in 6.25 ml of deionized water. For purely calcic systems, neither europium nor terbium was added. The second solution, called (B), contained the stabilizing agent, namely 4.87 mmol of 2-Aminoethylphosphate (noted AEP), or 0.61 mmol of phosphocholine chloride (calcium salt tetrahydrated, noted PhCol), or 0.08 mmol of Phosphonated Polyethylene Glycol ((PEG)P) at 5200 or at 5800 g/mol, dissolved in 12.5 ml of deionized water. The AEP and PhCol were purchased at Sigma Aldrich and TCI Europe respectively. The (PEG)P polymers were prepared on-demand and purchased from the company SPECIFIC POLYMERS (Montpellier, France), Lot # PEO Phosphonic acid SP-1P-1-001 [CAS. No. 911391-95-2]. Finally solution (C) was composed of 1.62 mmol of ammonium hydrogenphosphate (Prolabo VWR) dissolved in 6.25 ml of deionized water. Solution (A) was added under stirring to solution (B), leading to the mixture (D) for which the pH was adjusted to 9.5. Then (D) was added into solution (C) for which the pH value was previously adjusted to 9.5. The suspension was then introduced in an oven preset at 100°C, for 16 h, for an ageing step. The colloidal suspensions obtained were then purified by dialysis process as detailed in ref. [34]. For biological testing, the final pH of the suspension was then reduced to the physiological value (pH ~ 7.4). For AEP-stabilized colloids, this was performed by addition of a solution of sodium Hexametaphosphate (HMP) at a concentration of 0.08 M, added until reaching a pH of 7.4. The methodology followed for the preparation of such colloids is summarized in figure 1.

When mentioned in the text, Folic Acid (FA) was added in the reacting medium at the same time as the preparation of solution (A). The FA concentration used was typically 0.45 mM.



Freeze-drying was performed on a Christ Alpha 2-4 LD freeze dryer operating at -80°C and less than 0.120 m bars of residual pressure. Spray drying experiments were run on a Buchimini Spray Dryer B 290 (Buchi, Germany). Briefly, the suspension was fed into the instrument by a peristaltic pump and sprayed with a 0.7 mm nozzle tip, by means of a flow of compressed air, in the drying chamber of the apparatus. A parallel flow of heated air aspirated induced the quick evaporation of water from the drops, leading to the formation and recovery of solid particles. The instrumental settings were the following: inlet temperature $\sim 105^{\circ}\text{C}$, outlet temperature $\sim 60^{\circ}\text{C}$, atomizing gas flow rate: 670 L/h, liquid flow rate: 1.8 ml/min, aspirator power: 80%, volume of suspension tested per experiment: 20 ml. When mentioned in the text, glucose was added to the medium prior to drying experiments. Typically, 150 mg of glucose were added to 13.5 ml of suspension. Re-dispersion in water of the dry composite apatite/glucose agglomerates formed upon drying was studied under moderate magnetic stirring (300 rpm).

Physico-chemical characterizations

The crystallographic structure of the nanoparticles was checked by X-Ray Diffraction (XRD) using a CPS 120 INEL diffractometer with the $\text{K}\alpha 1$ cobalt radiation ($\lambda = 1.78892 \text{ \AA}$). Fourier Transform Infrared (FTIR) analyses were performed, for additional characterization, using a Nicolet 5700 spectrometer operating in the $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ (resolution of 4 cm^{-1}).

Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses were performed on a LEO VP135 microscope operated at 15 kV. Transmission Electron Microscopy (TEM) was run on a JEOL JEM-1011 microscope set at 100 keV.

The particle size of the colloids was determined without dilution by Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS apparatus from Malvern Instruments ($\lambda = 630 \text{ nm}$). The dispersion of the data points was estimated to 0.5%. The same apparatus was used for zeta potential measurements, using a capillary cell, by a combination of electrophoresis and Laser doppler velocimetry. Rheological measurements were carried out at 25°C , using an AR rheometer (TA Instruments). The suspensions were analyzed by simple shear measurements using a parallel geometry (gap 1 mm) with serrated plates (diameter 60 mm). Experiments were realized in quadruplicate.

Luminescence properties were investigated using a Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3-11 spectrofluorometer equipped with a 450 W xenon lamp. Excitation and emission were measured at room temperature directly on the colloidal suspensions, purified by dialysis. Concerning Eu^{3+} , excitation spectra were recorded between 350 nm and 600 nm by monitoring the $[\text{Eu}^{3+}] \text{ } ^5\text{D}_0 \rightarrow \text{}^7\text{F}_2$ emission at $\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$ (spectral bandwidth = 2 nm). Emission spectra were recorded in the 500-700 nm range, with spectral bandwidth of 1 nm, under selected excitation in the $[\text{Eu}^{3+}] \text{ } ^7\text{F}_0 \rightarrow \text{}^5\text{L}_6$ of Eu^{3+} at $\lambda^{\text{ex}} = 392.8 \text{ nm}$. For Tb^{3+} , excitation spectra were recorded between 200 nm and 500 nm by monitoring the $[\text{Tb}^{3+}] \text{ } ^5\text{D}_4 \rightarrow \text{}^7\text{F}_5$ emission at $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ (spectral bandwidth = 2 nm). Emission of Tb^{3+} in the 410-700 nm range, with spectral bandwidth of 2 nm, under selected excitation in the $[\text{Tb}^{3+}] \text{ } ^7\text{F}_6 \rightarrow \text{}^5\text{G}_6$ transition at $\lambda_{\text{ex}} = 379 \text{ nm}$. The transient characteristics of the emitting level $\text{}^5\text{D}_4$ and $\text{}^5\text{D}_0$ respectively of Tb^{3+} and Eu^{3+} were investigated with the phosphorimeter FL-1040, equipped with a UV xenon flash tube.

Emission decays were analyzed at chosen λ_{ex} and λ_{em} on a time interval up to 8 ms. The analysis was made in quadruplicate. The time resolution imposed by the apparatus in the experimental conditions employed was $30 \mu\text{s}$.

Cytotoxicity and pro-inflammatory potential study

The cytotoxicity of the colloids was assessed on the basis of MTT tests performed by the ICELLTIS Company (Labege, France) [35]. Two types of cells were used: human Adipose tissue Mesenchymal Stem Cells (AMSC) and breast cancer cells ZR-75-1, cultivated in humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). The cells were placed in 96-well culture plates (30,000 cells per well) and each test was run in triplicate. After 24 h of preliminary incubation, the culture medium was replaced by fresh DMEM and the MTT tests were performed. Cell viability was assessed for various contact times over a period of 7 days, and 5 different concentrations of nanoparticles in the culture medium were tested: 0, 0.1, 1, 2, 5 and 10 mg/ml.

The pro-inflammatory potential of the colloidal nanoparticles was investigated by following their interaction with human monocyte cells² intended to mediate the inflammatory response to foreign substances. These cells are activated by inflammatory signals, conducting to an increased capacity to release pro-inflammatory and cytotoxic mediators such as Reactive Oxygen Intermediates (ROI) [36]. As indicated previously [35,37], the measure of the amount of possibly produced ROI was undergone by chemiluminescence: the generation of chemiluminescence was monitored continuously for 1 h after incubation of the cells with luminol (66 mM) and after contact with the colloidal nanoparticles at various concentrations (1.2, 12, 60 and 120 $\mu\text{g/ml}$). The experiments were run in triplicate. The negative control was based on experiments carried out without nanoparticles.

Cell uptake evaluation

Cell uptake of colloidal apatite-based nanoparticles was followed, for FA-functionalized or FA-free nanoparticles, on both ZR-75-1 (not over expressing folate receptors, FR⁻) and on T-47-D (ATCC, cells over expressing folate receptors, FR⁺) breast cancer cells, for a concentration of nanoparticles in the culture medium of 1.5 mg/ml. The negative control was carried out without nanoparticles. The tests, realized in triplicate, were carried out by the ICELLTIS Company (Labege, France). 24 h after seeding, the colloid was added to the cells during 24 h. After washing in PBS buffer, the cells were then counted and centrifuged. The residual cell pellets were dissolved in HCl 37% and incubated for 30 min to allow quantification of the intracellular Eu and Ca contents by ICP-AES. The analyses were performed by the MARION TECHNOLOGIES Company, Verniolle, France, with a relative uncertainty of 3%.

Results and Discussion

As stated in the introductory section, this work was based on the exploration, as a proof on concept, of the potential use of biomimetic apatite-based colloidal nanoparticles in the field of nanomedicine, and especially for cancer cell diagnosis. Below, the main findings related to this investigation have been listed, ranging from physico-chemical aspects up to biological aspects.

² - human peripheral blood mono nuclear cells, precursors of macrophages

Preparation of individualized nanoparticles by way of colloidal formulation

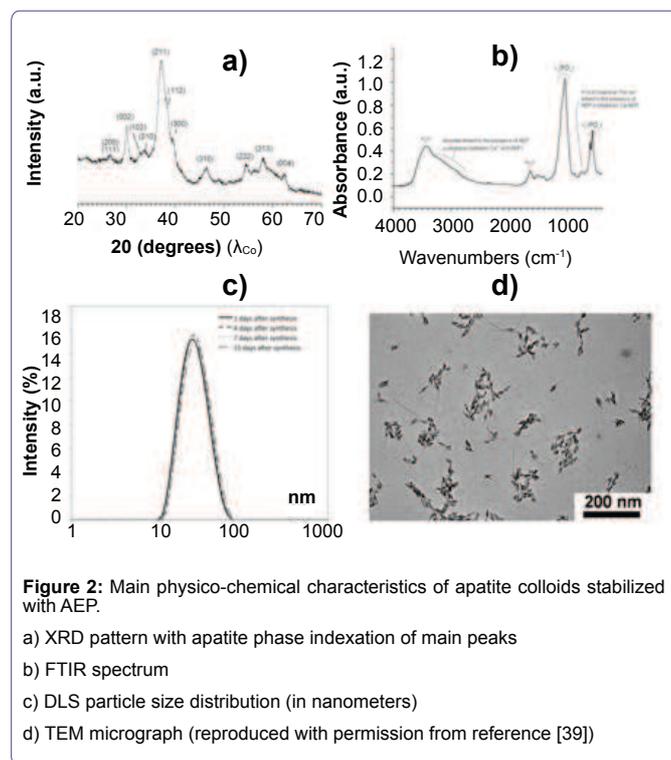
Biomimetic apatitic compounds correspond roughly to the general chemical formula $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-3x}$, eventually substituted by either cations and/or anions. In bone [38] or in synthetic analogs prepared in conditions close to physiological ones [20], these compounds are comprised of nanocrystals. But their high specific surface area, their plate-like morphology and probably high surface energies give rise to a strong agglomeration effect between adjacent nanocrystals, leading to microcrystalline (or larger) aggregates. Moreover, this agglomeration process appears rather irreversible in practice. The large size of such aggregates, often larger than cells, constitutes a hurdle for use in nanomedicine applications. Ways to circumvent this drawback can be proposed, starting from the observation that the agglomeration process takes place as soon as precipitation is initiated in solution. Therefore, the control of the aggregation state of apatitic particles may be found by modifying the precipitation medium; and more precisely by adding in the solution a dispersing agent capable of i) adsorbing on the surface of apatite nanocrystals in formation and ii) of preventing/limiting the approach of adjacent nanocrystals by way of steric and/or electrostatic repulsion.

This hypothesis was tested by adding, in the precipitating medium, organic molecules exposing an anionic end-group such as phosphate or phosphonate groups likely to interact strongly with the Ca^{2+} ions located on the surface of the apatite nanocrystals. In this paper, we report on our experiments performed by adding either AEP, PhCol, or (PEG)P in the medium (see details in the experimental section). Interestingly, in the presence of one of these molecules, a fluid suspension could be obtained in contrast to the experiment carried

out without additive. These three molecules may thus be considered as dispersing agents making it possible to prepare colloidal suspensions. The apatitic nature of the colloidal nanoparticles obtained in all these experiments was systematically confirmed: the obtained XRD pattern (Figure 2a) was characteristic of an apatite phase (indexation with the JCPDS file 09-432 relative to hydroxyapatite), and FTIR spectra corresponded to bone-like apatite with the presence of phosphate groups and associated water molecules, as well as typical absorption bands due to AEP (Figure 2b).

The colloidal-like aspect may be related to a distribution of the dispersing agent molecules around the particles, therefore hindering/limiting agglomeration between adjacent particles. In the case of AEP-stabilized colloids, for example, this matter of fact was indeed supported by zeta potential measurements pointing out a global positive surface charge (typically +12mV) due to the exposure of the $-\text{NH}_3^+$ terminal groups of AEP molecules, themselves interacting with exposed surface Ca^{2+} ions via their phosphate group. DLS analyses pointed out the nanometric dimensions of the colloidal particles, which followed monomodal particle size distributions dependent on experimental conditions (e.g., nature of dispersing agent used). Figure 2c, reports the typical case of an AEP-stabilized apatite colloid prepared aged 16 hours at 100°C and for an AEP/Ca initial molar ratio of 1. Table 1, reports in a tabulated format the size characteristics³ of some of the colloidal nanoparticles obtained [40]. It may be noted that dimensions lower or around 100 nm were obtained for some of these suspensions, therefore opening perspectives in terms of nanoparticle/cells interaction in the field of nanomedicine where dimensions up to around 100 nm are often considered as optimal. In other cases, sizes larger than 100 nm were also obtained. Such variations show clearly the impact of the nature of stabilizing agent on the mean nanoparticle size obtained. For instance, in the case of (PEG) P-stabilized colloids, a significant decrease in particle size can be reached by increasing the PEG molecular weight (Table 1).

In particular, AEP-stabilized apatite colloids retained our attention due to nanoparticle sizes of the order of 30 nm, also confirmed by direct analysis of the particles by TEM (Figure 2d). In this paper, the following sections will thus mostly focus on such AEP-stabilized apatite colloids; the highly biocompatible⁴ character of AEP being also particularly advantageous. The methodology followed for the preparation of such colloids was summarized in figure 1 [41]. Insights on the stability of such colloids were sought, by following the



Stabilizing agent used in colloidal formulation	Typical particle size*(nm)	PdI**	Chemical formula
PhCol	70	0.112	$\text{N}(\text{CH}_3)_3^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$
(PEG)P 5200 g/mol	200	0.225	$\text{CH}_3-\text{O}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$
(PEG)P 5800 g/mol	120	0.156	$\text{CH}_3-\text{O}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$
AEP	30	0.1	$\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$

Table 1 : Main size characteristics of some colloidal formulations prepared with various stabilizing agents.

*Size corresponding to the maximum of the monodisperse domain (mode of the size distribution)

**Polydispersity index (giving a measure of dispersion in size)

3 - Mode of the size distribution and polydispersity index [40].

possible evolution of their physical characteristics over colloid ageing time. Rheological characterization [39] pointed out the rheofluidifying behavior of such AEP/apatite colloids, witnessed by a nearly exponential decrease of the suspension viscosity upon increase of the shear rate, in the range 0.1 to 0.001 Pa·s for shear rates varying from 0 and 300 s⁻¹. Upon ageing over a 2-week period, a progressive increase of the suspension viscosity was detected, with an increased yield stress, evolving towards a threshold value close to 0.1 Pa. However, interestingly, DLS measurements carried out 1,4,7 and 15 days after synthesis indicated that the mean particle size (hydrodynamic diameter) remained rather unchanged and close to 30-35 nm over the whole period of colloid ageing. These results suggest that, despite some progressive structuration of the suspension over time at room temperature, no real agglomeration or sedimentation occurred and the nanoparticles size remained in the desired window for nanomedicine applications.

Drying and re-dispersion of colloidal apatite nanoparticles

From practical viewpoints, the manipulation of powder samples may be preferred to that of liquid suspensions, as in the case of some vaccine formulations for instance. In particular, the storage of powdered compounds over long periods of time is expected to be easier than that of fluid colloids. Also, other aspects such as sterilization processes may be found facilitated. For that reason, we also investigated the possibility to dry apatite-based colloids as presented above, while retaining the ability to re-suspend the nanoparticles in a subsequent step without loss of physico-chemical characteristics such as particle size.

It may be noted here that direct drying of apatite colloids without extra care leads to significant agglomeration, hardly reversible after re-immersion. This was linked to the high surface energy of apatite nanocrystals which are prone to interact strongly with each other upon elimination of water, to minimize the total surface energy of the system [39].

We then developed a strategy aiming at preserving the dispersibility of the nanoparticles, and based on the addition of a water-soluble matrix prior to the drying process. Experiments were here run by selecting glucose. Typically, 150 mg of glucose were dissolved in the colloidal medium (13.5 ml), and the system was then subjected to freeze-drying. In this case, re-suspension proved to be fully effective with an absence of sedimentation, and DLS experiments showed that no major change in particle size was detected as compared to the initial suspension purified by dialysis as exposed previously [34]. The advantageous role of glucose in this experiment can be explained, during the drying process, by the formation of a solid matrix preventing particle aggregation by a physical hindrance process. After re-immersion in aqueous medium, the solubilization of glucose then allows the release of the nanoparticles in the fluid.

The analysis by SEM (Figure 3a) of the freeze-dried glucose/apatite suspension suggested that the apatite nanoparticles were embedded within large glucose sheets of various dimensions and shapes. Although re-dispersion in aqueous medium was found to be efficient, the search for a better controlled morphology and size for the composite glucose/apatite was attempted with the objective of better controlling the re-dispersion kinetics. Noticeable progress was made by replacing the freeze-drying process by the spray drying technology. By using an inlet temperature of ~105°C and outlet

temperature of 60°C, for example (see experimental section), the spray drying of AEP-stabilized colloidal suspensions led (with a yield estimated to 74%) to the retrieval of purely spherical composite apatite/glucose particles (Figure 3b), with a monomodal size distribution centered around 1.2 ± 0.9 μm. The re-dispersion was also found to be more effective and better controlled than with solely freeze-dried particles (Figure 3c).

Conferring luminescence properties

The possibility to confer luminescence to such apatite-based nanoparticles was studied for a possible use in the field of medical diagnosis through fluorescence imaging. Among the advantages of the apatite structure is its high capacity to accommodate foreign ions. In this work, the substitution, during apatite colloid synthesis, of part of the calcium Ca²⁺ ions by lanthanide ions such as europium (Eu³⁺) and terbium (Tb³⁺) ions was investigated, so as to render the nanoparticles luminescent respectively in the red and green domains of the visible light spectrum. Such ionic substitutions, at least up to 2 at % of Eu or Tb relative to the calcium content per apatite unit

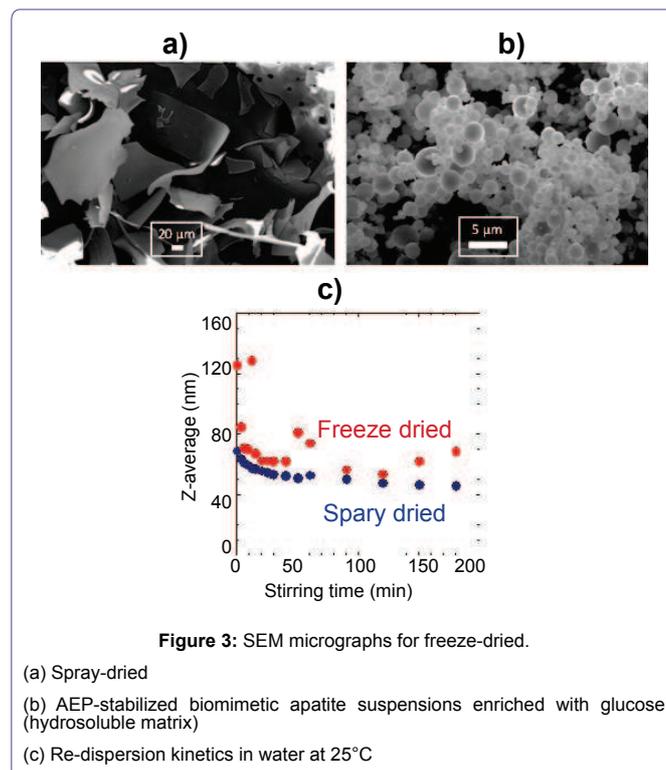


Figure 3: SEM micrographs for freeze-dried.

- (a) Spray-dried
- (b) AEP-stabilized biomimetic apatite suspensions enriched with glucose (hydrosoluble matrix)
- (c) Re-dispersion kinetics in water at 25°C

formula, were shown to be effective by the observation by XRD of a single apatite phase in each case. The substitution of divalent calcium by trivalent europium or terbium in the apatitic crystallographic array was discussed elsewhere in detail [33]; for non-stoichiometric apatites, several substitution scenarios can contribute to facilitate this process.

As could be expected, excitation and emission line characteristics of the luminescence behavior of Eu³⁺ or Tb³⁺ ions, respectively, were observed (Figure 4a and 4b). These have been described in previous occurrences [33,42]. Briefly, in the case of europium, main luminescence maxima (recorded under excitation at 393 nm) were localized in

4 - AEP represents indeed the hydrophilic head of phosphatidylethanolamine, one type of phospholipids constitutive of cell membranes [41].

the ranges 583-603, 605-627 and 685-715 nm, assignable to the $[Eu^{3+}]$ $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ and $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ transitions. In the case of terbium, the emission spectrum (recorded under excitation at 379 nm) showed peaks resulting from the 4f-4f transition of the Tb^{3+} ions: $[Tb^{3+}]$ $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ (at 488 nm), $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (at 545 nm), $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ (at 586 nm) and $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ (at 623 nm).

Beyond the low toxicity of Eu or Tb ions, another advantage of using these elements to convey luminescence lies in their long luminescence lifetime. This was investigated by following luminescence decay curves, over time [42]; the example of a colloid enriched with 2 at %Eu (relative to Ca) is given in figure 4c, in logarithmic scale. For curves approximated to mono-exponential decay functions, the so-called "lifetime value" was found to reach 1.34 ± 0.14 ms for Eu ($[Eu^{3+}]$ 5D_0) and 2.15 ± 0.21 ms for Tb ($[Tb^{3+}]$ 5D_4). These values, of the order of the millisecond, are noticeably larger than the luminescence lifetime of biological tissue auto-fluorescence, of the order of the nanosecond, thus enabling one to envision with such functional nanoparticles the analysis of biological materials over extended periods of time and/or the use of time-resolved luminescence equipment, e.g., for cell sorting. Intracellular diagnosis applications using colloidal apatite-based self-luminescent nanoparticles could therefore be seen as a promising approach.

Another study [43], on non-colloidal apatite, showed the possibility to visualize by laser scanning confocal microscopy some Eu-doped apatite particles internalized by human pancreatic cells Capan-1, exploiting their luminescence feature. The development of colloidal formulations, allowing a control of particle size and size distribution, is now expected to widen considerably the significance of the discovery/use of biomimetic apatite-based colloidal nanoparticles in the field of nanomedicine, and in particular for diseased cells diagnosis thanks to improved cell uptake capabilities. It may be noted

that, contrarily to organic luminescent probes which degrade rapidly due to the photo bleaching effect, the luminescence of these Eu- or Tb-doped apatite nanoprobles is photo stable; also this luminescence feature can be obtained within or very close to the visible light domain, thus making them suitable for prolonged examination of live cells.

Biocompatibility aspects

Taking into account the nanomedicine applications envisioned for such apatite-based colloidal nanoparticles, and despite their intrinsic bio-inspired nature, it was important to point out on a quantitative manner their high cytocompatibility. This was carried out by introducing the colloidal nanoparticles to various types of cells [35]. In particular, MTT tests were run on adipose tissue mesenchymal stem cells, denoted AMSC, and human breast cancer cells ZR-75-1. Results indicated that cell viability remained close to 100%, over 7 days of contact time, for concentrations of nanoparticles in the culture medium as high as 1 mg/ml for AMSC, and in the range 1-2 mg/ml for ZR-75-1 (Figure 5a). Such levels of nanoparticle concentration are considered as particularly high, which thus points to the very low cytotoxicity of these colloidal nanoparticles.

Besides such direct cytotoxicity evaluations, it was also interesting to investigate the "pro-inflammatory potential" of these colloidal nanoparticles by checking the interaction with human monocytes [35]. To this aim, the amount of Reactive Oxygenated radical Intermediates (ROI) possibly produced by monocytes under inflammatory stress was followed by way of luminol-enhanced Chemiluminescence (CL). CL measurements performed after 1 hr of contact between the colloidal nanoparticles⁵ purified by dialysis and stabilized at physiological pH, and monocyte cells showed no significant effect (Figure 5b), whether activator or inhibitor, on the production of ROI, which remained at the level of the control⁶. These results thus suggested the absence of significant inflammatory response for such colloidal apatite nanoparticles.

Cell uptake and targeting aspects

The previous sections thus indicated the possibility to formulate fluid colloids containing individualized biomimetic apatite nanoparticles, with dimensions adapted to nanomedicine and interaction with cells; they also pointed out the high biocompatibility of these nanoparticles, as well as the possibility to make them luminescent, either red or green.

At this stage, it was thus appealing to go one step forward and follow cell uptake, from a quantitative point of view. Also, in the field of nanomedicine, the search for systems capable of addressing more specifically some types of diseased cells (e.g., cancer cells) are an important aspect. As a proof of concept of using such colloids for targeted/differential cell interaction, we functionalized the surface of our Eu-doped AEP-stabilized nanoparticles with folic acid, FA, via chemical adsorption. FA, or vitamin B9, is indeed known to be recognized more specifically by cells that over express folate receptors, FR, as in the case of some ovary or breast cancers for instance [44,45]. The capacity for such FA-functionalized nanoparticles to be internalized by cells, most probably via endocytosis, was then followed on both T-47-D (over expressing folate receptors [46], or "FR⁺") and ZR-75-1 (without over expression [47], or "FR⁻") breast cancer cells. The extent of cell uptake was determined by measure by

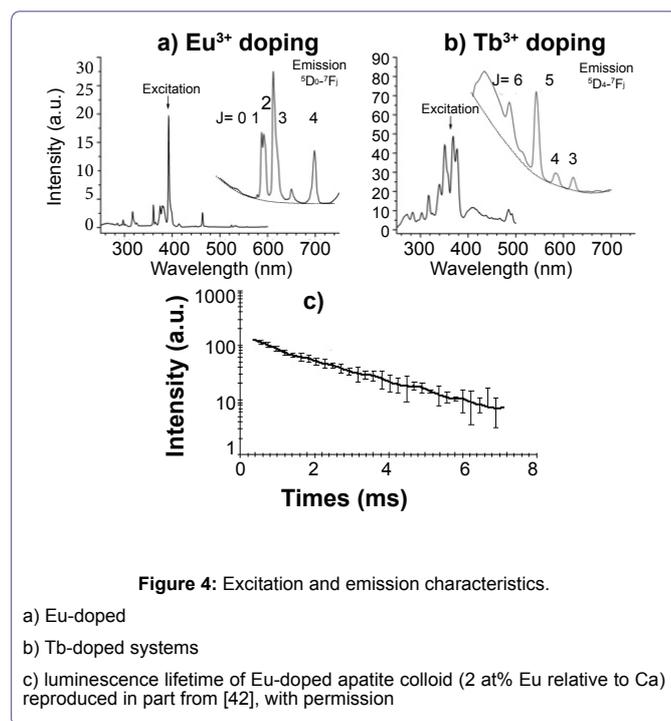
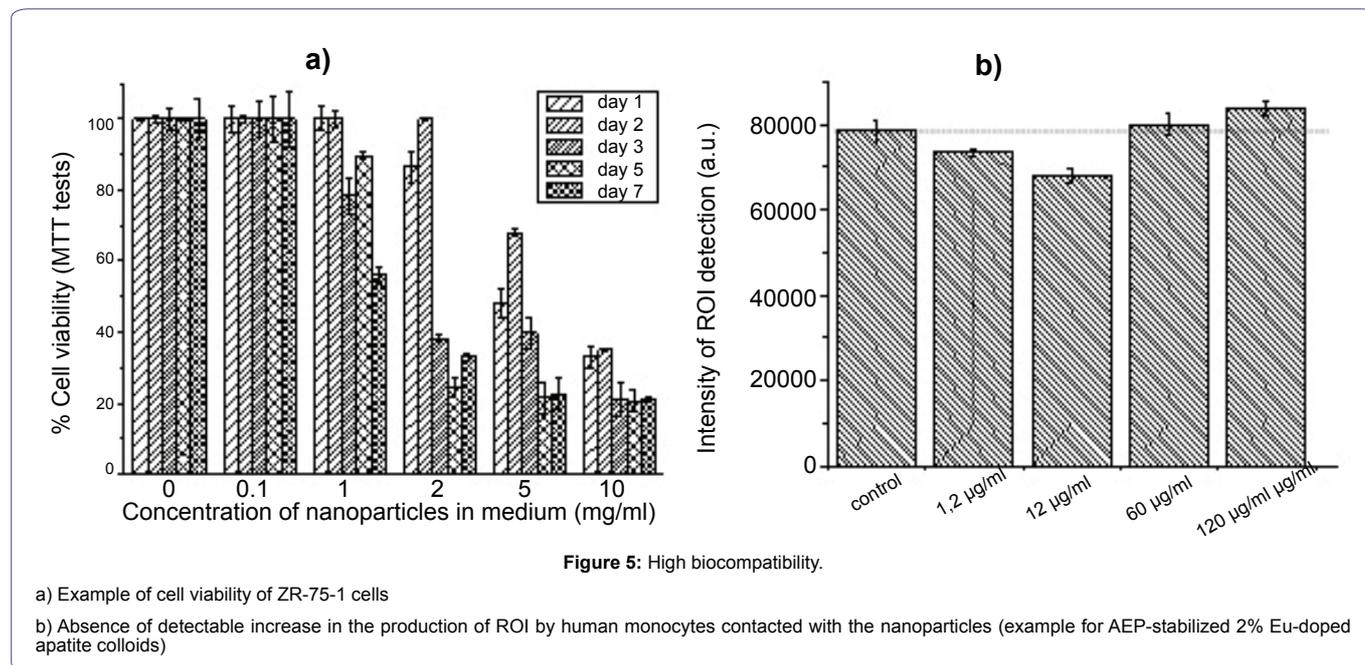


Figure 4: Excitation and emission characteristics.

- a) Eu-doped
- b) Tb-doped systems
- c) luminescence lifetime of Eu-doped apatite colloid (2 at% Eu relative to Ca) reproduced in part from [42], with permission

5 - Nanoparticles concentration range studied: 0 - 120 μ g/ml

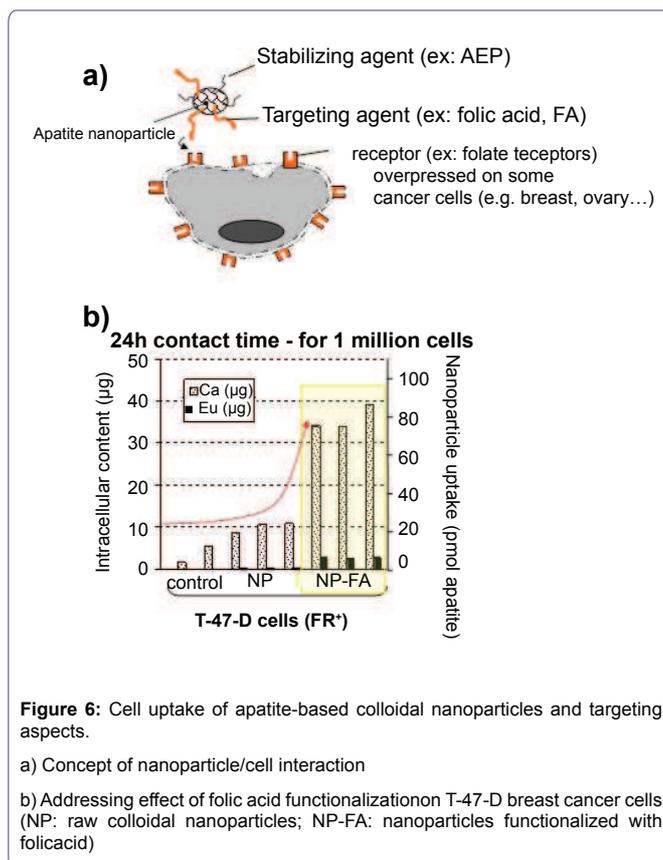
6 - Control experiment carried out in the absence of nanoparticles



(ICP-AES) of the amount of calcium and europium ions in the cytoplasm after a contact time of 24 hours with the nanoparticles, functionalized or not with FA. No significant cell death was detected during this period. Control experiments carried out in the absence of nanoparticles in the medium recurrently showed a low intracellular calcium content (< 5 µg per million cells) for both cell types as well as the absence of intracellular europium ions, as expected.

For cells contacted with nanoparticles without functionalization by folic acid (denoted “NP”), the analysis of intracellular Ca and Eu values indicated that both ZR-75-1 and T-47-D cells were able to internalize some “background” amount of nanoparticles but limited to Ca. 20 pmol of colloidal nanoparticles per million cells. On the contrary, the uptake of FA-grafted nanoparticles, denoted NP-FA, was significantly enhanced and especially for the FR⁺ T-47-D cells. It was found to be 3- to 4- fold greater than in the absence of FA functionalization, and cell uptake remained 1.5 to 2 times greater for T-47-D cells, reaching up to 86.2 pmol of colloidal nanoparticles per million cells as compared to ZR-75-1 cells. These results unveil the more selective uptake of FA-modified apatite-based nanoparticles by the FR⁺-cell type, here represented by T-47-D cells, therefore evidencing some targeting abilities for such colloidal engineered nanoparticles. These findings also allow us to envision even wider perspectives by substituting FA by other cell-targeting agents, so as to increase further the targeting selectivity and to adjust cell recognition capabilities of these colloidal nanoparticles to various cell types.

It may be mentioned here that Methotrexate (MTX), a chemotherapeutic drug, is an anti-folate compound with a chemical formula extremely close to that of folic acid. Adsorption experiments have shown the possibility to replace FA by MTX and to obtain MTX-functionalized apatites. This then opens not only perspectives in terms of cell diagnosis but also of therapeutics, using MTX for intracellular drug delivery. The era of theranostic thus also becomes within reach.



Concluding Remarks and Perspectives

This mini-review came back on the main progresses that we made during last decade in terms of preparation and characterization of colloidal formulations of biomimetic apatites, the possibility to dry/re-suspend the nanoparticles while retaining their characteristics,

7 - In similar amounts independently of the presence of FR receptors on the cells

and to confer them luminescence properties in variable colors, their high biocompatibility, and their cell uptake abilities with the eventuality of addressing more specifically some types of (cancer) cells, as is illustrated here by folic acid mediation as a proof of concept.

All these features may now allow one to envision promising perspectives in the use of such colloidal bio-inspired nanoparticles in the field of nanomedicine, and especially with the final aim of setting up point-of-care medical diagnosis solutions.

Some potential challenges or questions however still remain. For example, hematocompatibility and Foreign Body Response (FBR) will have to be investigated in more detail to get a wider evaluation of such systems, for example in view of intravenous administration. Also, stability studies on various colloidal formulations will have to be further explored, especially after contact with plasma proteins, as post-aggregation has to be prevented. Sterilization aspects will also have to be inspected more specifically. From a cell-targeting viewpoint, the necessity to increase the sensitivity of apatite-based nanoparticles to bio-markers of interest also represents an important challenge.

Multidisciplinary research on these inspiring functional nanoparticles, initiated as described in this mini-review, has undoubtedly started to create a great movement of interest from the “biomaterials” and “calcium phosphate” scientific communities, where the concept of apatite nanoparticles for nanomedicine is being contemplated and appropriated. Research on these systems is thus bound to continue more than ever, and extended worldwide, with the final objective of clinical diagnosis/therapeutic or else theranostic uses.

References

1. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2005) Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 19: 311-330.
2. Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281: 2013-2016.
3. Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, Zanchet D, Micheel C, et al. (2003) Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* 14: 15-27.
4. Ow H, Larson DR, Srivastava M, Baird BA, Webb WW, et al. (2005) Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Lett* 5: 113-117.
5. Fizez J, Rivière C, Bridot JL, Charvet N, Louis C, et al. (2009) Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labeling. *J Nanosci Nanotechnol* 9: 5717-5725.
6. Hamilton W, Neal RD, Stapley S (2014) Building the evidence base for the early symptomatic diagnosis of cancer (the ABC-DEEP Consortium - Workstream 3). *Eur J Cancer Care* 23: 7-7.
7. Bulte JWM, Modo MJ (2008) Introduction: The Emergence of Nanoparticles as Imaging Platform in Biomedicine. In: Bulte JM, Modo MJ (eds.). *Nanoparticles in Biomedical Imaging, Fundamental Biomedical Technologies (Vol 102)*, Springer, New York, USA.
8. Prabhu P, Patravale V (2012) The upcoming field of theranostic nanomedicine: an overview. *J Biomed Nanotechnol* 8: 859-882.
9. Ahmed N, Fessi H, Elaissari A (2012) Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discov Today* 17: 928-934.
10. Choi KY, Liu G, Lee S, Chen X (2012) Theranostic nanoplatforams for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* 4: 330-342.
11. Gomez-Morales J, Iafisco M, Manuel Delgado-Lopez J, Sarda S, Drouet C (2013) Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 59: 1-46.
12. Driessens FCM, Vandijk JWE, Verbeeck RMH (1986) The role of bone-mineral in calcium and phosphate homeostasis. *Bulletin Des Societes Chimiques Belges* 95: 337-342.
13. Bonjour JP (2011) Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr* 30: 438-448.
14. Drouet C, Gómez-Morales J, Iafisco M, Sarda S (2012) Calcium Phosphate Surface Tailoring Technologies for Drug Delivering and Tissue Engineering and applied aspects. In: Rimondini L, Bianchi CL, Vernè E (eds.). *Surface Tailoring of Inorganic Materials for Biomedical Applications*, Bentham Science Publishers, UAE.
15. Drouet C (2013) Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *Biomed Res Int* 2013: 490946.
16. Eichert D, Combes C, Drouet C, Rey C (2005) Formation and evolution of hydrated surface layers of apatites. *Bioceramics* 17: 3-6.
17. Eichert D, Drouet C, Sfihi H, Rey C, Combes C (2007) Nanocrystalline apatite-based biomaterials: Synthesis, Processing and Characterization. In: Kendall JB (ed.). *Biomaterials Research Advances*, Nova Science Publishers, USA. Pg: 93-143.
18. Rey C, Combes C, Drouet C, Lebugle V, Sfihi H, et al. (2007) Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 38: 996-1002.
19. Rey C, Combes C, Drouet C, Sfihi H, Barroug A (2007) Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and engineering : C* 27: 198-205.
20. Vandecandelaere N, Rey C, Drouet C (2012) Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *J Mater Sci Mater Med* 23: 2593-2606.
21. Delgado-López JM, Iafisco M, Rodríguez I, Tampieri A, Prat M, et al. (2012) Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta Biomater* 8: 3491-3499.
22. Iafisco M, Delgado-López JM, Gómez-Morales J, Hernández-Hernández MA, Rodríguez-Ruiz I, et al. (2011) Formation of calcium phosphates by vapour diffusion in highly concentrated ionic micro-droplets. *Crystal Research and Technology* 46: 841-846.
23. Sakhno Y, Bertinetti L, Iafisco M, Tampieri A, Roveri N, et al. (2010) Surface Hydration and Cationic Sites of Nanohydroxyapatites with Amorphous or Crystalline Surfaces: A Comparative Study. *J Phys Chem C* 114: 16640-16648.
24. Weber CG, Mueller M, Vandecandelaere N, Trick I, Burger-Kentischer A, et al. (2014) Enzyme-functionalized biomimetic apatites: concept and perspectives in view of innovative medical approaches. *J Mater Sci Mater Med* 25: 595-606.
25. Autefage H, Briand-Mésange F, Cazalbou S, Drouet C, Fourmy D, et al. (2009) Adsorption and Release of BMP-2 on Nanocrystalline Apatite-Coated and Uncoated Hydroxyapatite/beta-Tricalcium Phosphate Porous Ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 706-715.
26. Al-Kattan A, Errassifi F, Sautereau AM, Sarda S, Dufour P, et al. (2010) Medical Potentialities of Biomimetic Apatites through Adsorption, Ionic Substitution, and Mineral/Organic Associations: Three Illustrative Examples. *Adv Eng Mater* 12: 224-233.
27. Errassifi F, Sarda S, Barroug A, Legrouri A, Sfihi H, et al. (2014) Infrared, Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites. *J Colloid Interface Sci* 420: 101-111.
28. Grunewald A, Keyserb C, Sautereau AM, Crubézyc E, Ludesbet B et al. (2014) Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Appl Surf Sci* 292: 867-875.
29. Ong HT, Loo JSC, Boey FYC, Russell SJ, Ma J, et al. (2008) Exploiting the high-affinity phosphonate-hydroxyapatite nanoparticle interaction for delivery of radiation and drugs. *J Nanopart Res* 10: 141-150.

30. Iafisco M, Delgado-Lopez JM, Varoni EM, Tampieri A, Rimondini L, et al. (2013) Cell surface receptor targeted biomimetic apatite nanocrystals for cancer therapy. *Small* 9: 3834-3844.
31. Mondejar SP, Kovtun A, Epple M (2007) Lanthanide-doped calcium phosphate nanoparticles with high internal crystallinity and with a shell of DNA as fluorescent probes in cell experiments. *J Mater Chem* 17: 4153-4159.
32. Welzel T, Radtke I, Meyer-Zaika W, Heumann R, Epple M (2004) Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. *J Mater Chem* 14: 2213-2217.
33. Al-Kattan A, Dufour P, Dexpert-Ghys J, Drouet C (2010) Preparation and Physicochemical Characteristics of Luminescent Apatite-Based Colloids. *J Phy Chem C* 114: 2918-2924.
34. Al-Kattan A, Dufour P, Drouet C (2011) Purification of biomimetic apatite-based hybrid colloids intended for biomedical applications: A dialysis study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 82: 378-384.
35. Al-Kattan A, Girod-Fullana S, Charvillat C, Ternet-Fontebasso H, Dufour P, et al. (2012) Biomimetic nanocrystalline apatites: Emerging perspectives in cancer diagnosis and treatment. *Int J Pharm* 423: 26-36.
36. Laskin DL, Laskin JD (2001) Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* 160: 111-118.
37. Lefèvre L, Galès A, Olagnier D, Bernad J, Perez L, et al. (2010) PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. *PLoS One* 5: 12828.
38. Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ (2009) Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int* 20: 1013-1021.
39. Tourbin M, Al-Kattan A, Drouet C (2014) Study on the stability of suspensions based on biomimetic apatites aimed at biomedical applications. *Powder Technol* 255: 17-22.
40. Bouladjine A, Al-Kattan A, Dufour P, Drouet C (2009) New advances in nanocrystalline apatite colloids intended for cellular drug delivery. *Langmuir* 25: 12256-12265.
41. Rothfield L, Finkelstein A (1968) Membrane biochemistry. *Annu Rev Biochem* 37: 463-496.
42. Al-Kattan A, Santran V, Dufour P, Dexpert-Ghys J, Drouet C (2014) Novel contributions on luminescent apatite-based colloids intended for medical imaging. *J Biomater Appl* 28: 697-707.
43. Doat A, Fanjul M, Pellé F, Hollande E, Lebugle A (2003) Europium-doped bioapatite: a new photostable biological probe, internalizable by human cells. *Biomaterials* 24: 3365-3371.
44. Antony AC (1992) The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 79: 2807-2820.
45. Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE, Goldman ID (1995) Distinguishing between folate receptor-alpha-mediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells. *J Biol Chem* 270: 7842-7849.
46. Geszke M, Murias M, Balan L, Medjahdi G, Korczynski J, et al. (2011) Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomater* 7: 1327-1338.
47. Dixon KH, Mulligan T, Chung KN, Elwood PC, Cowan KH (1992) Effects of folate receptor expression following stable transfection into wild type and methotrexate transport-deficient ZR-75-1 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 267: 24140-24147.



Adsorption of nucleotides on biomimetic apatite: The case of cytidine 5' monophosphate (CMP)

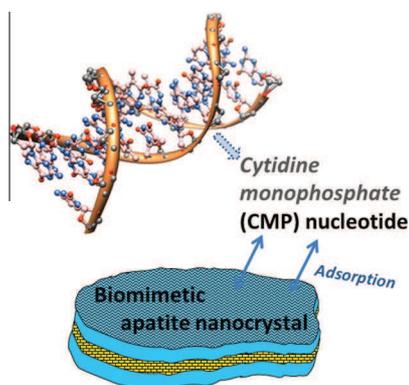


Maëla Choimet^{a,b}, Audrey Tourrette^b, Christophe Drouet^{a,*}

^a CIRIMAT Carnot Institute, UMR CNRS/INPT/UPS 5085, University of Toulouse, Ensicaet, 4 allée E. Monso, 31030 Toulouse cedex 4, France

^b CIRIMAT Carnot Institute, UMR CNRS/INPT/UPS 5085, University of Toulouse, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 Chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2015

Accepted 11 June 2015

Available online 17 June 2015

Keywords:

DNA
Adsorption
Biomimetic apatite
Cytidine monophosphate
Paleogenetics
Hydroxyapatite

ABSTRACT

The chemical interaction between DNA macromolecules and hard tissues in vertebrate is of foremost importance in paleogenetics, as bones and teeth represent a major substrate for the genetic material after cell death. Recently, the empirical hypothesis of DNA “protection” over time thanks to its adsorption on hard tissues was revisited from a physico-chemical viewpoint. In particular, the existence of a strong interaction between phosphate groups of DNA backbone and the surface of apatite nanocrystals (mimicking bone/dentin mineral) was evidenced on an experimental basis. In the field of nanomedicine, DNA or RNA can be used for gene transport into cells, and apatite nanocarriers then appear promising. In order to shed some more light on interactions between DNA molecules and apatite, the present study focuses on the adsorption of a “model” nucleotide, cytidine 5' monophosphate (CMP), on a carbonated biomimetic apatite sample. The follow-up of CMP kinetics of adsorption pointed out the rapidity of interaction with stabilization reached within few minutes. The adsorption isotherm could be realistically fitted to the Sips model (Langmuir–Freundlich) suggesting the influence of surface heterogeneities and adsorption cooperativity in the adsorption process. The desorption study pointed out the reversible character of CMP adsorption on biomimetic apatite. This contribution is intended to prove helpful in view of better apprehending the molecular interaction of DNA fragments and apatite compounds, independently of the application domain, such as bone diagenesis or nanomedicine. This study may also appear informative for researchers interested in the origins of life on Earth and the occurrence and behavior of primitive biomolecules.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

* Corresponding author.

E-mail address: christophe.drouet@ensicaet.fr (C. Drouet).

1. Introduction

After the death of an organism, its constitutive cells rapidly break up and release their contents, including DNA (deoxyribonucleic acid). The analysis of DNA extracts from body remains has led to much progress in domains such as paleogenetics, paleo-microbiology, animal and vegetal adaptations and even forensic sciences. Among the genetic markers studied are the uniparental markers (e.g. located on mitochondrial DNA inherited from the mother, or on the Y chromosome inherited from the father), and the biparental DNA markers located on the autosomes. All these markers are very important for following evolutionary histories of populations [1] or revealing family relationships within funeral areas burials [2]. Another area of interest related to the analysis of DNA residues is paleo-microbiology. The analysis of lice (head bugs) found on soldiers from the Vilnius battle by Napoleon in 1812 is an illustration of this point application [3].

The development of molecular biology techniques has permitted to extract information from mineralized tissues (bone and teeth remains) that are the predominant vertebrates' vestiges found in archeological searches [4]. The study of DNA extracted from hard tissues then permitted to gain information on more and more ancient periods of time. Indeed, DNA seems to be better preserved in hard tissues than in soft tissues [5]. Today, DNA sequences dating of more than 1700000 years can be extracted from skeletal remains [6]. The preservation of DNA in such ancient specimens was at first surprising, because experimental data [7] only allowed one to expect *a priori* a much faster DNA degradation.

From the better conservation of DNA associated to bone and teeth arose the hypothesis of a possible role played by a specific interaction between DNA and the apatite contained in mineralized tissues. This hypothesis has long been used by paleo-geneticists [7], but without being actually demonstrated. Recently, a physico-chemical study [8] investigated the interaction between DNA fragments and biomimetic apatite analogous to bone mineral/dentin. By exploring DNA adsorption and desorption onto apatite nanocrystals, the existence of strong chemical links was evidenced: the existence of a clear interaction between phosphate groups of DNA backbone and the surface of apatite nanocrystals was indeed evidenced on an experimental basis [8]. The absence of desorption upon simple dilution was observed (while it was favored upon adding phosphate ions in the medium). The implication of DNA phosphate backbone in adsorption processes was also reported in other studies involving different substrates and for distinct applications [9–12].

In another domain, the adsorption of plasmid DNA or RNA on nanosystems such as colloidal nanoparticles can prove helpful for gene transfection/gene silencing applications [13–17]: since apatite-based nanoparticles have been shown to have a great potential in nanomedicine, the use of DNA- or RNA-loaded apatite nanoparticles for the transportation of external genes not naturally expressed by cells appeared indeed as an encouraging route.

DNA, however, is a complex macromolecule with alternating nucleotides organized in double-stranded helicoidal structure, where a nucleotide is the result of the association of a nucleic base (typically Cytosine, Adenine, Guanine or Thymine) with a pentose (deoxyribose) and a phosphate group. With the aim to inspect further the type of interaction that may occur between DNA and apatite, and independently of the application (paleogenetics, nanomedicine, ...), the present contribution investigates the adsorptive behavior of a "model" nucleotide, cytidine 5' monophosphate (CMP), onto a biomimetic apatite substrate as previously used (see for example [8]). After summarizing the main characteristics of the apatitic substrate used in this work, the CMP adsorption kinetics and isotherm were investigated, at room

temperature, and desorption was followed in the presence or in the absence of phosphate ions. These results could serve as a complementary instructive dataset in future DNA/apatite-related works, independently of the application field.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of the biomimetic apatite substrate

The synthetic sample of carbonated biomimetic apatite used in this work was obtained by precipitation of a calcium nitrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution (52.2 g in 750 ml of deionized water) with an ammonium hydrogenphosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ solution and a sodium bicarbonate NaHCO_3 solution (90 g of each in 1500 ml of deionized water), at room temperature (20 °C). In the second solution, an excess of phosphate was used to buffer the pH of the solution at 7.2, close to the physiological values (7.4). The precipitate was then left to mature at room temperature for 1 week (7 days), filtered on Büchner funnel, and thoroughly washed with deionized water. The sample was then freeze-dried for 3 days, sieved in different size fractions, and stored at -18 °C until further use. In this study, we worked with granulometry fraction below 100 μm . In the rest of the text, this 1-week matured sample will be referred to as "hac-1w".

2.2. Physico-chemical characterization of the apatite substrate

The physico-chemical characteristics of the hac-1w apatite were detailed in a previous study using several techniques [8]. Briefly, the total calcium and phosphate contents in the apatite phase were determined by complexometry and by spectrophotometry (Shimadzu UV 1800, $\lambda = 460$ nm) respectively, while the carbonate titration was carried out by coulometric method (UIC, Inc. CM 5014 coulometer with CM 5130 acidification unit). The nature of the crystalline phase was determined by powder X-ray diffraction using an INEL diffractometer CPS 120 and the monochromatic $\text{Co K}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.78892$ Å). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses were achieved on a Thermo-Nicolet 5700 spectrometer with a resolution of 4 cm^{-1} , using the KBr pellet method. A Microtrac BELSORP mini II apparatus (BET method based on nitrogen adsorption) was used to determine the specific surface area S_w . Zeta potential (determined from electrophoretic mobility measurements) was determined at 25 °C using a Malvern Zetasizer Nano Analyzer apparatus. The apatitic substrate was studied after dispersion of the powder in water set at different pH values in the range 6–9.5 and filtration on micropore filter for avoiding the sedimentation of large aggregates ($>1\ \mu\text{m}$) during the analyses.

2.3. Cytidine 5' monophosphate (CMP) adsorption and desorption

Cytidine 5' monophosphate, in the form of di-sodium salt, was purchased from Sigma Aldrich; its chemical formula is given in Fig. 1. For all experiments of adsorption or desorption, 20 mg of apatite powder ($\varnothing < 100\ \mu\text{m}$) was dispersed in 5 ml of CMP solutions at room temperature. The CMP concentration present in the supernatant was evaluated using spectrophotometry (Shimadzu UV 1800, $\lambda = 272$ nm). At any time, the adsorbed amount could be determined by difference of the initial quantity introduced in the medium and the residual amount in solution.

Adsorption kinetics was investigated by following the amount of adsorbed CMP versus time. For these experiments, a CMP solution of 300 mg/l in KCl solution (0.01 M) was used, at room temperature and physiological pH. Different contact times ranging from 5 min to 3 h were followed so as to evaluate the adsorption

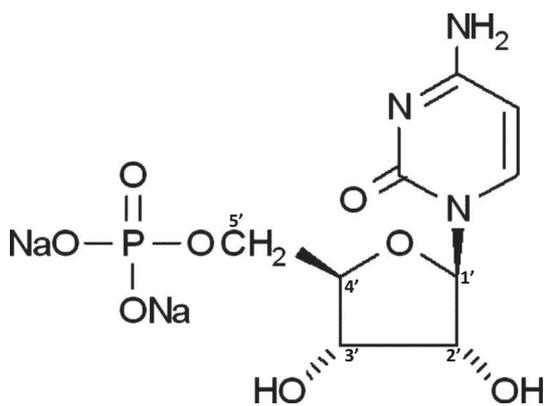


Fig. 1. Chemical formula of cytidine 5' monophosphate (CMP) di-sodium salt.

equilibrium of CMP on the apatite substrate. After the selected contact time, the mixture was centrifuged for 2 min at 5000 rpm and the supernatant was withdrawn and analyzed by spectrophotometry as indicated above. The CMP adsorption isotherm was then built by following (after 1 h of contact time) the adsorbed amount versus the equilibrium concentration in solution, varying from 0 up to 1200 mg/l.

When mentioned in the text, the amount of phosphate and calcium ions present in the supernatant after adsorption were respectively evaluated by spectrophotometry and atomic absorption (Analytik Jena ContrAA300, N₂O/acetylene flame, $\lambda = 422.67$ nm).

The eventual desorption of CMP was investigated for some datapoints corresponding to the isotherm (250, 600 and 1000 mg/L). After 1 h of adsorption, a known amount of supernatant was withdrawn and replaced by KCl solution (0.01 M). After the same immersion time, the solution was analyzed by spectrophotometry. The effect of an addition of phosphate ions on the release of CMP was also followed by the addition of KH₂PO₄ at a final concentration of 18 mM.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical characterization of apatite substrate

As mentioned above, the biomimetic apatite substrate, hac-1w, used in this work was previously characterized (see [8] for details); for the sake of completeness however its main features are summarized hereafter.

The apatitic nature of the sample was confirmed by powder X-ray diffraction (XRD) analysis, complemented by Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. In particular, the XRD pattern showed the absence of detectable secondary phases (Fig. 2a), and the biomimetic character of this sample can be assessed by the similarity of crystalline features to those of bone specimens (see Supporting Information, Fig. SI 1). The broadness of the diffraction peaks can be attributed both to the existence of microstrains in the apatitic network and to nanosized constitutive crystals. The application of Scherrer's formula to diffraction lines (002) and (3 1 0) suggested, in a first approximation, a mean crystallite length of around 16 nm and a mean width/depth close to 5 nm, underlining the nanometer dimensions of this hac-1w sample, similarly to those of bone mineral [18]. The specific surface area of the granulometry fraction selected in this work reached 122 m²/g. For additional information on the physico-chemical characteristics of the apatitic substrate used in this work, its zeta potential was also measured, in a wide pH range from 6 to 9.5. It was found to be negative throughout this pH range, and close to -30 ± 2 mV. Such negative values are consistent for such

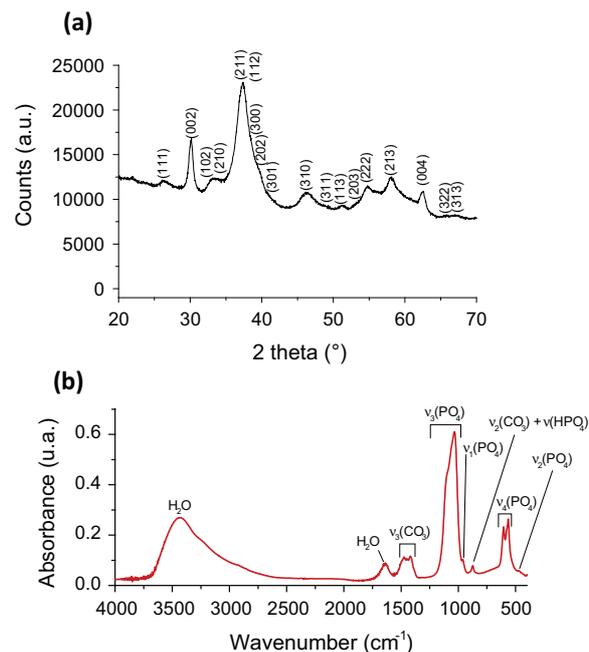


Fig. 2. (a) XRD pattern (2 theta between 20° and 70°) of the biomimetic carbonated apatite sample hac-1w (maturation of 1 week) used in this work, with (hkl) indexation after JCPDS file #09-432 relative to hydroxyapatite, and (b) FTIR spectrum for hac-1w with phosphate, carbonate and water band attributions.

nonstoichiometric nanocrystalline apatites as previously reported [19]. Note however, that this measurement only gives a global value of the surface charge and does not imply that only negatively charged surface sites are present as both calcium and phosphate (protonated) ions coexist.

The carbonation of this sample was confirmed by the presence of carbonate bands observable by FTIR (Fig. 2b), in the ranges 1350–1550 cm⁻¹ (v₃(CO₃) domain) and 840–910 cm⁻¹ (v₂(CO₃) domain). Both direct coulometric measurements and FTIR carbonate titration using a recently reported method [20] revealed a carbonate amount of 3.6 wt.%. The Ca/(P + C) overall molar ratio determined by complementary chemical titrations led to 1.36. This value, noticeably lower than 1.67 (characteristic of stoichiometric hydroxyapatite), points to the nonstoichiometry of this compound, as for bone samples [18], confirming again the biomimetic nature of this apatite compound.

The above results thus substantiate the choice of this apatite sample for the present study, aiming at inspecting the interaction of the CMP nucleotide with a substrate close to bone mineral.

3.2. Investigation of CMP adsorption and desorption

CMP adsorption onto hac-1w was investigated here in two ways. First, the sorption kinetics was followed by varying the CMP/apatite contact time, so as to determine the conditions of achievement of thermodynamic equilibrium. Then, for a selected contact time, the adsorbed amount was measured for increasing CMP concentrations in solution, in order to define the adsorption isotherm (at room temperature).

3.2.1. Adsorption kinetics

Fig. 3 shows the adsorption kinetics of CMP on hac-1w (for an initial concentration of 300 mg/l), by plotting the amount of CMP adsorbed as a function of contact time. The thermodynamic equilibrium was reached very quickly after less than 10 min. Stabilization occurred at a concentration of ca. 224 mg/l,

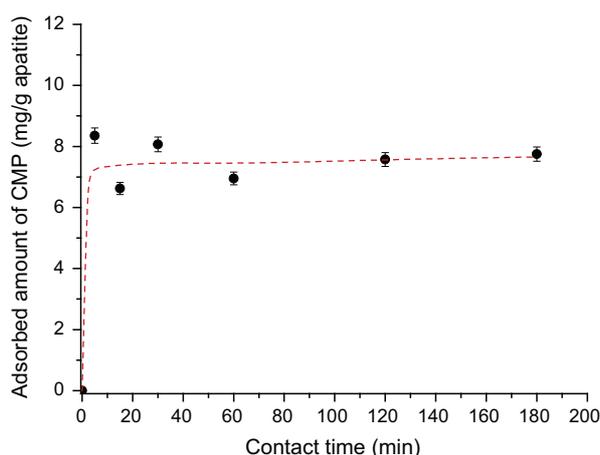


Fig. 3. Kinetics of adsorption of CMP onto biomimetic apatite hac-1w (room temperature).

corresponding to an adsorbed amount of ca. 7.5 mg/g of apatite ($0.19 \mu\text{mol}/\text{m}^2$).

Taking into account the rapidity of this adsorption process, probably pointing to a high affinity of CMP molecules for the surface of biomimetic apatite, it was not possible to draw advanced conclusions relatively to the type of kinetic model.

3.2.2. Adsorption isotherm

The adsorption isotherm of CMP on apatite is shown in Fig. 4. The shape of the plot indicates a progressive rise of the adsorbed amount (Q_{ads}) for increasing equilibrium concentrations (C_{eq}). In order to explore further the adsorption mechanism implied in the CMP/biomimetic apatite system, the experimental datapoints were then tentatively fitted to various mathematical models often encountered in adsorption studies, including with apatite substrates (e.g. [8,21,22]).

The models of Langmuir, Freundlich and Temkin were the first to be tested; being respectively described by the following equations:

$$Q_{\text{ads}} = Q_m \left(\frac{K_L \cdot C_{\text{eq}}}{1 + K_L \cdot C_{\text{eq}}} \right) \quad \text{Langmuir} \quad (1)$$

$$Q_{\text{ads}} = K_F \cdot C_{\text{eq}}^{1/n} \quad \text{Freundlich} \quad (2)$$

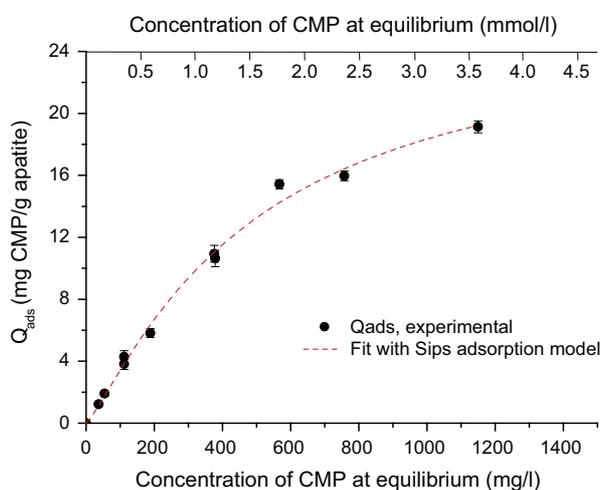


Fig. 4. CMP adsorption isotherm ($\sim 20^\circ\text{C}$) on hac-1w biomimetic apatite (concentrations given in mmol/l and in mg/l).

$$Q_{\text{ads}} = B \cdot \ln(A) + B \cdot \ln(C_{\text{eq}}) \quad \text{Temkin} \quad (3)$$

where K_L , N_m , K_F , n , A and B are the related constants, at a given temperature. The application of these models to the experimental data led to the following correlation parameters (adjusted R^2): 0.9916, 0.9637 and 0.9453. These findings suggest that pure Freundlich or Temkin adsorptive behaviors cannot adequately explain the experimental variation observed here. Instead, an improved fit was found with the Langmuir equation (with $Q_m = 32.33 \pm 2.41 \text{ mg/g}$ ($0.82 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) and $K_L = 0.0017 \pm 0.0002 \text{ l/mg}$). A recent study on the adsorption of tetracycline on biomimetic apatite [23] however pointed out the interest to test also the adequacy of another model, known as Sips equation [24,25] (also known as “Langmuir–Freundlich” isotherm) which appears as a modified version of the Langmuir model by incorporating the exponent “ m ” as follows:

$$Q_{\text{ads,e}} = Q_m \cdot \frac{K_S \cdot C_{\text{eq}}^m}{1 + K_S \cdot C_{\text{eq}}^m} \quad \text{Sips isotherm} \quad (4)$$

The application of this equation to our experimental points led to the adjusted R^2 correlation parameter 0.9933, indicating that this model is the most relevant, among the four tested, to describe adequately the obtained datapoints. The corresponding Sips parameters are $m = 1.20 \pm 0.11$, $Q_m = 26.1 \pm 2.6 \text{ mg/g}$ ($0.66 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\text{m}^2$), and $K_S = 0.00052 \pm 0.00027$. In particular, the value of “ m ”, noticeably greater than unity, confirms that the isotherm should not be considered as fully Langmuirian. The maximal adsorbed amount Q_m (monolayer coverage in our experimental conditions) thus reaches about 26.1 mg/g ($0.66 \mu\text{mol}/\text{m}^2$), which is equivalent, in micromoles per gram, to $80.8 \mu\text{mol/g}$. This value is roughly of the same order of magnitude as the one found for tetracycline on a 1-day matured [23] (the concept of maturation of nanocrystalline apatites being explained elsewhere [26]) carbonated apatite sample ($Q_m \sim 82 \mu\text{mol/g}$). On the other hand, it is difficult to directly compare this maximal adsorbed amount to that found for much larger macromolecules such as DNA (of the order of $0.49 \mu\text{mol/g}$ [8]), due to very different molecular sizes and dynamics. Nonetheless, the adsorption of CMP molecules on apatite probably involves at least an interaction via the exposed phosphate end-group which is known to have a high affinity for apatitic surfaces, as was also suggested by other studies (e.g. bisphosphonates [27,28] or DNA [8]).

The value of “ m ” in Sips equation is also informative on the type of interaction existing in the adsorbent/adsorbate system, as was discussed previously [25]: it was in particular related to the existence of lateral interactions between adsorbed molecules (which is not considered in the Langmuir theory). For $m > 1$, “positive” cooperativity between adjacent molecules is hypothesized, while $m < 1$ would correspond to “negative” cooperativity. In the present case, $m \sim 1.20$ could thus suggest a favoring role of adsorbed molecules on the adsorption process. The fact that Sips isotherm fits better the experimental data as compared to Langmuir may also highlight the heterogeneous nature of the surface of apatites.

The Sips constant K_S also carries some thermodynamic meaning as it was proposed to be linked to the change in standard Gibbs free energy of adsorption through the following equations [24] (with K_S recalculated with C_{eq} expressed in mol/l):

$$K_S = \exp \left(- \frac{\Delta C_{\text{ads}}^\circ}{RT} \right) \quad (5)$$

In the present case, this leads to the negative value $\Delta C_{\text{ads}}^\circ \cong -19 \text{ kJ/mol}$ (uncertainty estimated to $\pm 1 \text{ kJ/mol}$), indicating a favorable adsorption of CMP on biomimetic apatite in standard conditions. For information, this value is of the same order as the one (-22 kJ/mol) found for tetracycline adsorption [23].

In order to inspect further the adsorption mechanism, the amounts of calcium and phosphate ions potentially released in the medium after adsorption were measured. Indeed, previous studies have shown that the adsorption of some molecules, such as bisphosphonates [21,29], were accompanied by the concomitant release of ions from apatite nanocrystals surfaces, leading to a physical “anchoring” of the molecule on the substrate. In the present case, the titration of Ca and P in the supernatants showed however their presence only in small quantities after adsorption. After subtraction of the amounts of calcium and phosphate ions naturally released due to the partial dissolution of the apatite substrate in the medium (as any ionic compound), it is then possible to examine whether any additional release is observed due to the adsorption process itself. For Q_{ads} varying from 0 to 24 mg/g (see isotherm Fig. 4; corresponding in moles to the range 0–75 $\mu\text{mol/g}$), the amount of phosphate released remained low and comprised between 0 and 6 $\mu\text{mol/g}$, while calcium was found to vary around a mean position of 100 $\mu\text{mol/g}$. No clear trend was observed in function of the adsorbed amount. Thus, these findings suggest that the adsorption of CMP on nanocrystalline apatite is not accompanied by a significant simultaneous release of surface ions.

3.2.3. Desorption study

In continuation with the adsorption study, the possible desorption of adsorbed CMP molecules was followed by dilution of the medium (see dilution details in experimental section). Several desorption points were examined, corresponding to various degrees of surface coverage, as shown in Fig. 5. On this figure, the “hypothetical” points calculated by supposing the absence of desorption upon dilution are indicated in parentheses, for information. For each point studied, dilution of the medium led, in contrast, to partial CMP desorption as marked by the curved arrows. In the assumption that this adsorption process would be fully reversible, desorption should occur in a way that the point would follow the adsorption isotherm in the opposite way. In the case of nanocrystalline apatites, however, the adsorption of some molecules was found to be irreversible upon dilution; and this observation was related to a concomitant ion release from the surface of the nanocrystals: for example, the adsorption of bisphosphonates cited above was shown to occur simultaneously to the release of surface phosphate ions, with no clear release of calcium, thus leading to an “anchoring” of the molecule on the nanocrystal surface, in a “surface phosphate” position.

In the present case, the experimental desorption of CMP, another phosphate-bearing molecule, (see square “□” datapoints in Fig. 5) are found to clearly approach the isotherm (although without being strictly superimposed to it); therefore one can

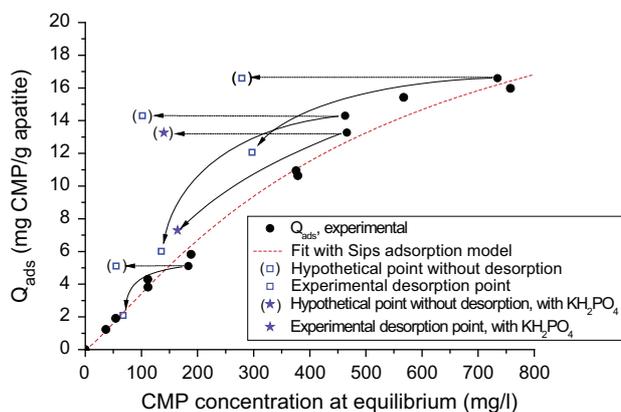


Fig. 5. Desorption study upon dilution, and effect of the addition of phosphate ions in the medium (KH_2PO_4).

conclude that the CMP/apatite adsorption process is for the most part “reversible” upon simple dilution. This conclusion seems to be corroborated by the fact that the addition of phosphate ions in the diluted medium (in the form of dissolved KH_2PO_4 salt, see star “★” datapoints in Fig. 5) does not promote desorption. Also, this is in good agreement with our above results (see previous subsection) indicating that the adsorption process was not accompanied by a significant phosphate release in the supernatant.

3.3. Concluding remarks

In this contribution, the adsorption of a nucleotide, CMP, onto a nanocrystalline apatite substrate mimicking bone mineral was investigated in detail. The adsorption isotherm, established for a contact time permitting to reach equilibrium, was found to follow a Sips (Langmuir–Freundlich) model, and data analysis suggested a cooperative adsorption of CMP molecules. The study of the desorption upon dilution and the analysis of supernatants allowed us to insinuate that CMP adsorption on nanocrystalline (biomimetic) apatite was highly reversible and not accompanied by a concomitant ion release from the apatite substrate (despite the presence of a terminal phosphate group on the molecule). This type of analysis, on a single nucleotide – forming one “building block” of DNA or RNA macromolecules – will have to be extended to polynucleotide subunits and compared to data recently obtained on the adsorption of DNA on biomimetic apatite [8]. Nonetheless, it already provides some additional data in view of better comprehending the interaction between apatite compounds and DNA, e.g. in post-mortem settings (study of bone diagenesis) or for nanomedicine applications.

By extrapolation, this work may also appear informative for researchers interested in the origins of life on Earth, where the occurrence and preservation of primitive biomolecules such as nucleotides is of prime relevance. Indeed, as in the case of DNA (see Ref. [8]), the adsorption of nucleotides onto mineral substrates constitutive of the Earth’s geochemistry such as apatites (e.g. present in metamorphic rocks [30] of pelitic, carbonate, basaltic, and ultramafic composition) may provide protection against premature degradation by environmental factors. Also, in the adsorbed state, nucleosides/nucleotides may then undergo surface reactions (possibly catalytic) to promote chemical modifications and/or their combination into polynucleotides of biological relevance [31]. Therefore, better apprehending adsorption processes involving nucleotides and minerals like apatites could participate to better understanding how “primitive” biomolecules succeeded to evolve toward more elaborate systems.

Acknowledgment

The authors wish to thank the CIRIMAT Carnot Institute for internal funding of Maela Choimet’s PhD thesis.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.06.021>.

References

- [1] C. Keyser, C. Bouakaze, E. Crubezy, V.G. Nikolaev, D. Montagnon, T. Reis, B. Ludes, *Hum. Genet.* (2009) 126.
- [2] C. Keyser-Tracqui, E. Crubezy, B. Ludes, *Am. J. Hum. Genet.* (2003) 73.
- [3] D. Raoult, O. Dutour, L. Houhamdi, R. Jankauskas, P.E. Fournier, Y. Ardagna, M. Drancourt, M. Signoli, V.D. La, Y. Macia, R. Aboudharam, *J. Infect. Dis.* (2006) 193.
- [4] E. Hageberg, B. Sykes, R. Hedges, *Nature* (1989) 342.
- [5] P. Gill, P.L. Ivanov, C. Kimpton, R. Piercy, N. Benson, G. Tully, I. Evett, E. Hageberg, K. Sullivan, *Nat. Genet.* 6 (1994).

- [6] L. Orlando, A. Ginolhac, G. Zhang, D. Froese, A. Albrechtsen, M. Stiller, M. Schubert, E. Cappellini, B. Petersen, I. Moltke, P.L.F. Johnson, M. Fumagalli, J.T. Vilstrup, M. Raghavan, T. Korneliusen, A.-S. Malaspinas, J. Vogt, D. Szklarczyk, C.D. Kelstrup, J. Vinther, A. Dolocan, J. Stenderup, A.M.V. Velazquez, J. Cahill, M. Rasmussen, X. Wang, J. Min, G.D. Zazula, A. Seguin-Orlando, C. Mortensen, K. Magnussen, J.F. Thompson, J. Weinstock, K. Gregersen, K.H. Roed, V. Eisenmann, C.J. Rubin, D.C. Miller, D.F. Antczak, M.F. Bertelsen, S. Brunak, K.A.S. Al-Rasheid, O. Ryder, L. Andersson, J. Mundy, A. Krogh, M.T.P. Gilbert, K. Kjaer, T. Sicheritz-Ponten, L.J. Jensen, J.V. Olsen, M. Hofreiter, R. Nielsen, B. Shapiro, J. Wang, E. Willerslev, *Nature* 499 (2013) 74–78.
- [7] T. Lindahl, *Nature* 362 (1993).
- [8] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubezy, B. Ludes, C. Drouet, *Appl. Surf. Sci.* 292 (2014) 867–875.
- [9] B. Liu, J. Liu, *Langmuir* 31 (2015) 371–377.
- [10] X. Zhang, F. Wang, B. Liu, E.Y. Kelly, M.R. Servos, J. Liu, *Langmuir* 30 (2014) 839–845.
- [11] B. Liu, J. Liu, *Chem. Commun.* 50 (2014) 8568–8570.
- [12] R. Pautler, E.Y. Kelly, P.-J.J. Huang, J. Cao, B. Liu, J. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 6820–6825.
- [13] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2213–2217.
- [14] S. Hossain, A. Stanislaus, M.J. Chua, S. Tada, Y.-I. Tagawa, E.H. Chowdhury, T. Akaike, *J. Control. Release* 147 (2010) 101–108.
- [15] S. Hossain, S. Tada, T. Akaike, E.H. Chowdhury, *Anal. Biochem.* 397 (2010) 156–161.
- [16] E.H. Chowdhury, T. Akaike, *Curr. Anal. Chem.* 1 (2005) 187–192.
- [17] E.H. Chowdhury, *Expert Opin. Drug Deliv.* 4 (2007) 193–196.
- [18] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubezy, B. Ludes, C. Drouet, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4691–4704.
- [19] I. Rodriguez-Ruiz, J. Manuel Delgado-Lopez, M.A. Duran-Olivencia, M. Iafisco, A. Tampieri, D. Colangelo, M. Prat, J. Gomez-Morales, *Langmuir* 29 (2013) 8213–8221.
- [20] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubezy, B. Ludes, C. Drouet, *J. Archaeol. Sci.* 49 (2014) 134–141.
- [21] P. Pascaud, P. Gras, Y. Coppel, C. Rey, S. Sarda, *Langmuir* 29 (2013) 2224–2232.
- [22] L. Benaziz, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, A. Lebugle, *J. Colloid Interface Sci.* 238 (2001) 48–53.
- [23] S. Cazalbou, G. Bertrand, C. Drouet, *J. Phys. Chem. B* 119 (7) (2015) 3014–3024.
- [24] Y. Liu, *Sep. Purif. Technol.* 61 (2008) 229–242.
- [25] L.K. Koopal, W.H. Vanriemsdijk, J.C.M. Dewit, M.F. Benedetti, *J. Colloid Interface Sci.* 166 (1994) 51–60.
- [26] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 23 (2012) 2593–2606.
- [27] P. Pascaud, F. Errassifi, F. Brouillet, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouri, C. Rey, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 25 (2014) 2373–2381.
- [28] F. Errassifi, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouri, H. Sfihi, C. Rey, *J. Colloid Interface Sci.* 420 (2014) 101–111.
- [29] A. Al-Kattan, F. Errassifi, A. Sautereau, S. Sarda, P. Dufour, A. Barroug, I. Dos Santos, C. Combes, D. Grossin, C. Rey, C. Drouet, *Adv. Eng. Mater.* 12 (2010) B224–B233.
- [30] F.S. Spear, J.M. Pyle, Apatite, monazite, and xenotime in metamorphic rocks, in: M.J. Kohn, J. Rakovan, J.M. Hughes (Eds.), *Phosphates: Geochemical, Geobiological, and Materials Importance*, vol. 48, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America, Washington, D.C., 2002, pp. 293–335.
- [31] F.G. Burton, M.W. Neuman, W.F. Neuman, *Biosystems* 3 (1969) 20–26.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Nanomedicine: Interaction of biomimetic apatite colloidal nanoparticles with human blood components



Maëla Choimet^{a,1}, Hyong-Mi Kim^{b,1}, Jae-Min Oh^{b,**}, Audrey Tourrette^a, Christophe Drouet^{a,*}

^a CIRIMAT, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Ensiacet, Toulouse, France

^b Nano Bio Materials Laboratory, Dept. Chemistry and Medical Chemistry, Yonsei University, Wonju, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form 18 March 2016

Accepted 19 April 2016

Available online 22 April 2016

Keywords:

Apatite nanoparticles

Hemolysis

Protein fluorescence quenching

Blood cells

Hemocompatibility

ABSTRACT

This contribution investigates the interaction of two types of biomimetic-apatite colloidal nanoparticles (negatively-charged 47 nm, and positively-charged 190 nm NPs) with blood components, namely red blood cells (RBC) and plasma proteins, with the view to inspect their hemocompatibility. The NPs, preliminarily characterized by XRD, FTIR and DLS, showed low hemolysis ratio (typically lower than 5%) illustrating the high compatibility of such NPs with respect to RBC, even at high concentration (up to 10 mg/ml). The presence of glucose as water-soluble matrix for freeze-dried and re-dispersed colloids led to slightly increased hemolysis as compared to glucose-free formulations. NPs/plasma protein interaction was then followed, via non-specific protein fluorescence quenching assays, by contact with whole human blood plasma. The amount of plasma proteins in interaction with the NPs was evaluated experimentally, and the data were fitted with the Hill plot and Stern-Volmer models. In all cases, binding constants of the order of 10^1 – 10^2 were found. These values, significantly lower than those reported for other types of nanoparticles or molecular interactions, illustrate the fairly inert character of these colloidal NPs with respect to plasma proteins, which is desirable for circulating injectable suspensions. Results were discussed in relation with particle surface charge and mean particle hydrodynamic diameter (HD). On the basis of these hemocompatibility data, this study significantly complements previous results relative to the development and nontoxicity of biomimetic-apatite-based colloids stabilized by non-drug biocompatible organic molecules, intended for use in nanomedicine.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, a considerable literature has grown up around the theme of materials in the area of nanomedicine, as drug nanocarriers or as nanoprobe for imaging [1–11]. This research field led to increasing interest in the study of the behavior of nanoparticles (NPs) intended for systemic circulation, including in terms of hemocompatibility. Indeed, after administration in vivo, NPs biodistribution to the immune cells and organs can be affected by interaction with the immune system of the patient. According to Dobrovolskaia et al. [12], some factors have to be taken into

account to evaluate this process. Biodistribution comprehension and biocompatibility evaluation then requires several investigations, including in particular the study of the possible interaction of the NPs with blood components, namely red blood cells (erythrocyte, or “RBC”) – comprising hemolysis assays – and plasma proteins. In this view, various publications report particle interactions with RBC [13–17], underlining the role of particle size and surface state. Research results dealing with hemocompatibility moreover tend to point out the strong influence of NPs size [18], surface charge [19] and overall surface properties [14].

In the search for appropriate and potentially multifunctional systems for nanomedicine, bio-inspired systems appear particularly appealing due to their expectedly high intrinsic biocompatibility. In this context, apatite-based systems – approaching the mineral part of bones – represent in particular a promising type of biocompatible systems; and previous works have shown the possibility to obtain colloidal-like formulations of apatite nanoparticles through surface engineering [1,20–23]. Apatite-based NPs may thus be considered as promising potential candidates for

* Corresponding author at: CIRIMAT-Ensiacet, 4 all. Emile Monso, 31030 Toulouse cedex 4, France.

** Corresponding author at: 1 Yonseidaegil, Wonju, Gangwon, Republic of Korea (South Korea)

E-mail addresses: jaemin.oh@yonsei.ac.kr (O. Jae-Min), christophe.drouet@ensiacet.fr (C. Drouet).

¹ These authors equally contributed to this work.

use in nanomedicine. Whether surface-covered with heparin, polyethyleneimine, or uncovered, a few previous literature works studied the blood compatibility of nanosized apatitic compositions exhibiting different surface properties, or of apatite-coated magnetite NPs, in view of different kinds of applications such as drug delivery [19,24,25] or for the fabrication of nano-contrast agents for in vivo imaging [26]. In all cases, these apatitic or apatite-coated NPs were not found to cause hemolysis (<5%) in the conditions tested. Some other aspects also conveyed elements informing on the high biocompatibility of apatitic or apatite-coated NPs, based on the exploration of platelet activation [26], cytotoxicity [6,26,27], in vivo acute toxicity [25], or else non pro-inflammatory potential [6]. Inspecting the behavior of (nano)particles with blood components also includes the study of their interaction with plasma proteins. Montazeri et al. [28] showed that proteins could interact with fluoride-substituted apatite powders, in a way dependent on fluoride content which may be optimized to improve biological response. Lacerda et al. reported that gold NPs showed different types of protein interaction according to their size and to the type of proteins [17].

Taking into account the promise of apatite nanosystems in medicine, the confirmation of their high biocompatibility on an experimental basis therefore remains one key point, explaining the increasing interest shown by the scientific/medical communities as highlighted above.

In particular, the interaction of dispersed apatite NPs with plasma proteins has only seldom been explored, which is one of the objectives of the present contribution. Also, apatite particles easily agglomerate; consequently, formulations intended for administrations through injections (whether intravenous or intratumoral for example) need be stabilized as colloidal-like suspensions: this can be achieved through surface modification via an organic corona. To be envisioned for use in the human body, this corona should also be composed of biocompatible constituting molecules. In our approach initiated several years ago [1,22,29], this stabilization is for example realized by surface grafting of either a phospholipid moiety (2-aminoethylphosphate, or AEP, representing hydrophilic head of the phospholipid phosphatidylethanolamine, a component of cell membranes) [30] or a phosphonate-terminated polyethyleneglycol (denoted (PEG)P). Obtained stabilized apatite colloidal nanoparticles, involving a biomimetic apatite phase close to bone mineral (nonstoichiometric apatite with surface active sites) [31] and stabilized with AEP, were for example shown to exhibit high cytocompatibility towards different types of cells (mesenchymal stem cells from adipose tissue, breast cancer cells), and no pro-inflammatory potential was detected when these NPs were contacted with human monocytes/macrophages [6]. In the present work, in addition to following the interaction of human blood plasma proteins with both AEP- and (PEG)P-stabilized biomimetic apatite NPs, the contact with red blood cells was also explored through hemolysis assays for complementing their hemocompatibility evaluation.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of colloidal apatite NPs

Colloidal formulations were performed as described in a previous work [21,22]. Briefly, the precipitation of biomimetic nanocrystalline apatite was carried out in deionised water, at room temperature and pH 9.5. After the mixing of a solution of calcium nitrate (1.15 g in 18.75 ml) and dispersing agent (AEP: 0.687 g or (PEG)P: 0.396 g) and a solution of di-ammonium hydrogen phosphate (0.21 g in 6.25 ml), the pH was adjusted to 9.5, by addition of ammonia. The suspension was then placed in an oven preset at

100 °C in a sealed vial for maturation of 16 h. In this study, two types of colloids, with different stabilizing agents, were investigated: AEP, acting as an electrostatic stabilizing agent, and (PEG)P acting by steric hindrance (MW: 5200 g/mol). Both types of colloids obtained were then purified by dialysis to remove unattached dispersing agent and any unreacted reagents, at room temperature, with membranes of different Molecular Weight Cut-Off (MWCO), respectively 6000–8000 and 12,000–14,000 MCWO for AEP and (PEG)P colloids. The dialysis process, used to remove unreacted species, is detailed elsewhere [32]. For AEP samples, an increase of suspension viscosity may occur during dialysis. The addition of sodium hexametaphosphate (denoted HMP) to this sample then allowed obtaining well dispersed AEP-stabilized nanoparticles, as well as a pH close to neutral. The final pH of each colloid was finally adjusted to the physiological value, which was undergone on (PEG)P colloids by addition of HCl 0.37%. To study NPs interactions with human blood components, some colloids were used directly in the suspension state, and some others were lyophilized and re-dispersed at the time of use. Prior to lyophilization, glucose was added to each sample (0.066 M) to keep colloidal properties with unchanged particle HD after re-dispersion [23]. Each colloid was then prepared to have a final NaCl concentration of 0.9 w/v%. The notation “AN” and “AG” correspond to AEP-stabilized colloids respectively in suspension (with NaCl) and in lyophilized form (with glucose and NaCl). Similarly, for (PEG)-P-stabilized colloids, the notations “PN” and “PG” will be used.

When mentioned in the text, a non-colloidal reference sample was also prepared by following the same protocol as above but in the absence of stabilizing agent.

2.2. Physico-chemical characterization of apatite colloidal NPs

The structure of the calcium phosphate nanoparticles contained in freeze-dried suspensions was characterized by powder X-ray diffraction using an Equinox 1000 curved-counter INEL diffractometer (acquisition time 2 h) with a cobalt anticathode ($\lambda_{Co} = 1.78892 \text{ \AA}$). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses were performed on a Thermo-Nicolet 5700 spectrometer with a resolution of 4 cm^{-1} , in the wavenumber range of $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$, using the KBr pellet method. Particle HD (determined by dynamic light scattering, DLS) was measured on a Nanosizer ZS apparatus (Malvern Instruments, $\lambda = 630 \text{ nm}$). In order to evaluate surface charge of NPs, suspension or powder NPs were diluted or dispersed in deionized water at an appropriate range of concentration ($1 \sim 1.8 \text{ mg/ml}$) and subjected to zeta potential measurement utilizing Otsuka ELS-Z 1000 instrument. Zeta potential and hydrodynamic diameter of each apatite sample were also evaluated after treatment in human plasma. Plasma obtained from human whole blood (approved by the Yonsei University Wonju College of Medicine (Approval No. YWMR-12-6-030)) was diluted 50 times with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) and mixed with 0.25 mg/ml (for zeta potential) and 1 mg/ml (for DLS) of apatite sample in 1:1 volume ratio.

2.3. Hemolysis assays

Hemolysis assay allowed evaluating the toxicity of our colloids on red blood cells (RBC) by following the possible release of hemoglobin upon contact with the NPs. The procedure used was inspired from other studies [33–35]. For these tests, whole human blood samples were freshly obtained from a healthy volunteer and directly used for the assay. These experiments utilizing human whole blood were approved by the Yonsei University Wonju College of Medicine (Approval No. YWMR-12-6-030). Deionized water and saline were added to RBC suspension, as the positive and negative controls, respectively.

First, colloidal NPs were suspended in saline in different concentrations, 1, 5 and 10 mg/ml. Whole blood and colloid samples were mixed in a 1:1 volume ratio, shaken with tapping, and then incubated at 36.5 °C for 30 min and 24 h according to previous report [16,33]. After centrifugation at 3000 rpm for 5 min, the supernatant plasma was removed and let at room temperature during 30 min to allow oxyhemoglobin formation. The absorbance was then measured at 540 nm with a UV/Vis spectrophotometer (SHIMADZU UV-1800). For the estimation of hemolysis percentage, the following equation was used [36]:

$$\text{Hemolysis\%} = \frac{(\text{Sample absorbance} - \text{Negative control absorbance})}{(\text{Positive control absorbance} - \text{Negative control absorbance})} \times 100 \quad (1)$$

Three apatite samples prepared on different days were subjected to hemolysis assay to verify reproducibility. Each sample was tested, and all nine test data were utilized to obtain average and standard deviation.

2.4. Interaction with human plasma proteins—protein fluorescence quenching assay

It may be reminded that among most abundant plasma proteins are human serum albumin (~58%), immunoglobulin (~38%) and fibrinogen (~4%). Experiments aiming at investigating interactions between colloidal apatite NPs and plasma proteins were carried out in this work by using individual albumin, fibrinogen and immunoglobulin proteins as well as whole human blood plasma. This study, approved by the Yonsei University Wonju College of Medicine (Approval No. YWMR-12-6-030), was carried out by following the possible quenching of protein fluorescence, which is attributed to the tryptophan residues in protein [37], upon interaction with the NPs via adsorption, agglomeration and/or complexation [38].

Colloids at concentrations of 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/ml were added to plasma (50 times diluted in DPBS) aliquots in a 1:1 volume mixture, and put in a thermos-fine-mixer (FINEPCR SH2000-DX) at 36.5 °C for 30 min with gentle shaking. Luminescence spectrophotometry (Perkin-Elmer LS55, excitation wavelength 280 nm, and emission recorded at 340 nm) was then used on suspension, to determine fluorescence emission intensities. A protein fluorescence quenching ratio was then quantified by the relation:

$$Q = \frac{(I_0 - I)}{I_0} \quad (2)$$

where I_0 and I represent, respectively, fluorescence intensities in the absence and presence of colloids.

Three apatite samples prepared on different days were subjected to fluorescence quenching assay to verify reproducibility of synthesis. Each sample was tested, and all nine test data were utilized to obtain average and standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical characterization of apatite substrate

Figs. 1 and 2 show respectively the XRD and IR patterns of non-colloidal (without dispersing agent) and colloidal particles stabilized by AEP and (PEG)P.

XRD results (Fig. 1) confirm the apatitic nature of the particles as evidenced by comparison with JCPDS file #09-432 relative to stoichiometric hydroxyapatite. However, data analysis points out a lower degree of crystallinity for colloidal samples compared to the non-colloidal reference. This lowered crystallinity has already been discussed previously in the case of AEP-stabilized apatite colloids [29], and was explained by an inhibitory role of AEP blocking some growth surface sites on forming nanocrystals. In the case of

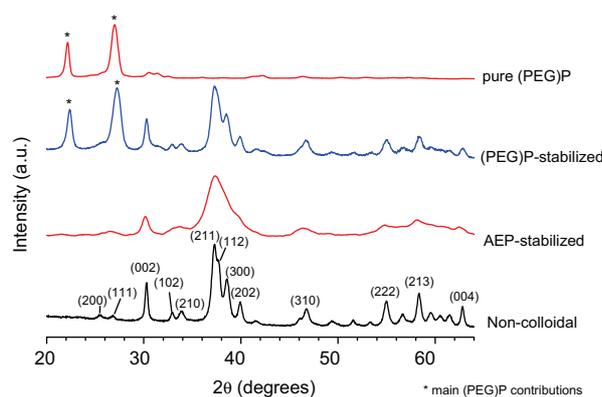


Fig. 1. XRD patterns of biomimetic apatites: AEP- and (PEG)P-stabilized colloids, as well as non-colloidal reference with main indexations after JCPDS file #09-432, and pure (PEG)P.

(PEG)P-stabilized colloids, the crystallinity of the apatite phase is less altered than in the case of AEP. This can be explained by the larger size of the (PEG)P molecule, less prone to hinder apatite crystal growth. The XRD pattern relative to colloidal NPs in the presence of (PEG)P also shows additional broad diffraction lines (especially at 22.4 and 27.3°) which are characteristic of dried (PEG)P. As a control experiment, we also validated by XRD (not shown here for the sake of brevity) that pure (PEG)P did not undergo structural alterations under the conditions used for the preparation of colloids (16 h at 100 °C followed by freeze-drying).

FTIR spectral features (Fig. 2) confirmed XRD conclusions, evidencing vibrations bands characteristic of moderately-well crystallized apatite; a lower resolution was observed for both colloids as compared to the non-colloidal reference sample. The presence of water bands was also revealed, which is customary for biological or biomimetic apatites [39]. Moreover, the stretching vibration mode of apatitic OH⁻ ions, at 3572 cm⁻¹ for hydroxyapatite, as well as the liberation band at 632 cm⁻¹, become less pronounced for the colloids than for the non-colloidal reference, indicating a nonstoichiometry of the apatite phase in presence, as in bone apatite. Additional bands were however also observed in the case of the colloidal NPs, and can be related to the presence of the stabilizing agent. AEP-based apatite colloids displayed in particular a band at 754 cm⁻¹, as previously reported, which is assignable to the P-O-(C) group of AEP molecules in close contact with surface calcium ions [29], as well as vibrational contributions in the region 2900–3400 cm⁻¹ related to the ammonium end-group in AEP. In the case of (PEG)P, as can be expected from the long CH₂-CH₂-O carbon chain, numerous additional bands become visible,

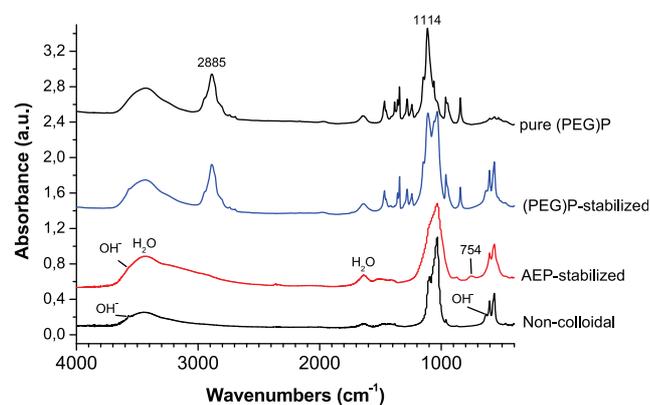


Fig. 2. FTIR spectrum for AEP- and (PEG)P-stabilized colloids, as well as non-colloidal reference and pure (PEG)P.

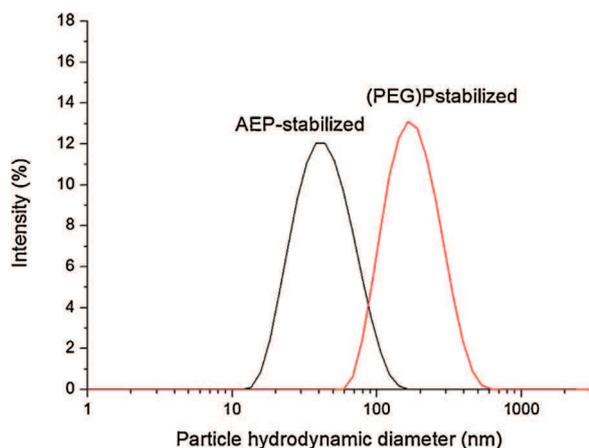


Fig. 3. Particle HD distributions of AEP and (PEG)P colloids as drawn from dynamic light scattering (DLS).

around 2885 cm⁻¹ attributable to C-H bonds, and in the region 790–1530 cm⁻¹ where multiple contributions arise (C-H, C-C, C-O and P-O), which can be more clearly visualized on the spectrum of pure (PEG)P (Fig. 2). From a chemical viewpoint, the AEP/apatite molar ratio in the nanoparticles of AEP-stabilized colloids is close to 0.7 as estimated from CHN elemental analyses, and the ratio (PEG)P/apatite is estimated to 0.17.

DLS analyses were then carried out to evaluate the particle HD distribution of the colloidal particles obtained. As shown on Fig. 3, the colloid stabilized with AEP was found to be composed of particles exhibiting a monomodal distribution (polydispersity index of 0.163) with a mean HD around 47 nm. This was observed for both the AN and AG variants of this colloid. In contrast, the (PEG)P-stabilized colloids PN and PG were characterized by NPs with mean HDs shifted to larger values, centered around 190 (polydispersity index of 0.151). These results are in good agreement with XRD results which show larger crystal domain size for PN than for AN colloids.

For both colloidal NPs types, zeta potential was also measured, and obtained values are summarized in Table 1. Non-colloidal non-stoichiometric apatite was reported to have a zeta potential value close to -10 mV [29]. As can be seen from this table, there is a significant difference of particles charge between AEP and (PEG)P samples. The smallest nanoparticles are negatively charged, around -48 mV, explained by the addition of a very negative group, HMP. This colloids presents a very electronegative global surface charge, compared to (PEG)P colloids, which zeta potential is close to neutrality (slightly positive).

Table 1
Zeta potential measurements of apatite samples in deionized water and in the presence of plasma: colloidal samples stabilized with AEP (noted A) or with (PEG)P (noted P), either in liquid form (with NaCl, noted N), or freeze-dried (noted G) in the presence of glucose and re-dispersed with NaCl.

Sample ID	Samples only		With plasma	
	pH	Average zeta potential (mV)	pH	Average zeta potential (mV)
AN	6.91	-40 ± 5	7.41	-22 ± 5
AG	7.02	-56 ± 5	7.45	-17 ± 5
PN	7.07	+6 ± 5	7.43	-4.2 ± 5
PG	7.05	+3.5 ± 5	7.35	-6.3 ± 5

3.2. Interaction between Red Blood Cells and nanoparticles—hemolysis evaluation

The investigation of biomimetic colloidal apatite NPs interaction with RBC was carried out here by following the level of hemolysis reached after 30 min or 24 h of contact (see experimental section). Results concerning this hemolytic effect, depending on colloid types and concentrations, are presented in Fig. 4. In the literature, it is customary to consider the value of 5% hemolysis as permissible for biomaterials applications (e.g. Refs. [40–42]). It is apparent from this figure that none of the samples results in serious hemolysis. The level of 5% hemolysis is never reached, except for one type of colloid (AG) and at a very high initial concentration of 10 mg/ml, which is beyond practical value. All other hemolysis rates remain low, although increasing slightly with concentration and time. For AEP-based colloidal suspension AN (not pre-lyophilized), RBC viability is even detected to be (in a reproducible manner) better than for the negative control. This can be explained either by the fact that even during in vitro incubation for negative control, a limited number of cells may however get denatured, and/or by a possible protective effect of this type of colloid. Although AEP liquid (AN) and pre-lyophilized (AG) samples have quite similar physico-chemical properties (HD and zeta potential), they present quite distinct hemolysis rates: AG colloids show somewhat larger RBC degradation, and the difference is accentuated after 24 h. The only differences between these two variants of AEP-stabilized colloid are the presence of glucose for facilitating the freeze-drying/redispersion process and a slightly more negative zeta potential. Several reports have studied the impact of glucose on human RBC membrane, which might indeed explain our present results pointing to a slightly increased degree of hemolysis on glucose-containing formulations: Quan et al. [43] highlighted the cryopreservative effect of some sugar on RBC before freeze-drying, but also some noxious effect. They showed that glucose could induce an elevation of the inner osmolarity of RBC leading to osmotic fragility. Schiar et al. [44] also indicated that glucose could increase, although in a limited extent, the toxicity of organic and inorganic compounds and raise hemolysis by maintaining reduced glutathione (GSH) level in erythrocytes. Viskupicova et al. [45] emphasized the role of glucose incubation and concentration dependences on hemolysis; degradative processes increasing with incubation time in the presence of glucose. However, even in the presence of glucose in the AG and PG formulations, no serious hemolysis rate was reached in any case, unless very high concentrations were selected (typically larger than 10 mg/ml) which would be beyond usual practical usage. Considering that hemolysis of NPs are generally carried out in the NP concentration between 0.01 and 2 mg/ml [33,34], the slight toxic effect at 10 mg/ml with current NP is not serious.

Several studies showed that particles surface properties (and in particular surface charge) could affect RBC degradation through direct interaction with erythrocyte membranes. Han et al. [19] studied the interaction between heparin-coated hydroxyapatite nanoparticles and RBC. They demonstrated that their nanoparticles had a strong tendency to favor RBC aggregation, compared to micron-sized particles. They also explained that surface modification of these NPs (initially positively charged) with negative charge through surface immobilization of the drug heparin, could help to limit this cellular aggregation phenomenon, and therefore decrease hemolysis. They concluded that hemocompatibility was rather dependent on particle properties, and especially on surface charge rather than particle size. If we exclude results on the freeze-dried (and re-dispersed) colloids AG and PG, our hemolysis results on AN and PN go also agree with these observations. In the case of the AG and PG formulations, as stated above, the presence of glucose is considered to explain the observed results.

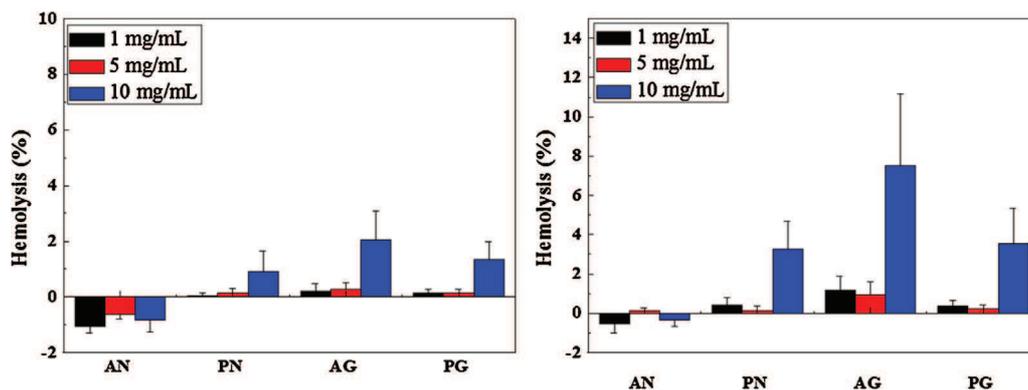


Fig. 4. Hemolytic effect of colloids at 3 different concentrations (initial suspension concentrations: 1, 5 and 10 mg/ml, then mixed in a 1:1 volume ratio with blood), after 30 min and 24 h of incubation.

Globally, this hemolysis study therefore points to a very high hemocompatibility of biomimetic apatite colloidal nanoparticles stabilized by either AEP or (PEG)P as far as the interactions of NPs with RBC go. The next section will then examine the interaction between these NPs with whole human plasma containing in particular another category of blood component: plasmatic proteins.

3.3. Interaction between plasma proteins and nanoparticles—non-specific protein fluorescence quenching study

The level of interaction between plasma proteins and our colloidal NPs is another important aspect to consider for inspecting hemocompatibility [38]. For example, the elimination of pathogens from the body will result in part by the activation of the complement system (a group of plasma proteins active in the immunological body response); and bioavailability of the particles will be altered and probably decreased owing to phagocytosis. It is thus interesting to check if NPs intended for use in contact with blood may or not lead to an important interaction with plasma proteins.

Protein binding was evaluated here, as was done previously [16], by following the degree of fluorescence (through amino acid residues such as tyrosine and tryptophan) of plasma proteins remaining in supernatants after contact with the NPs: a luminescence quenching phenomenon is expected to occur in the case of proteins adsorption on the particles.

Fig. 5 represents the obtained fluorescence quenching ratio as a function of colloids concentrations, both in the case of individual proteins (Fig. 5a) and for whole plasma (Fig. 5b). Overall, the tendencies obtained for each triplicate system were found to be very reproducible. All colloids show similar general trends, with increased fluorescence quenching versus NPs concentrations. Results do not change significantly whether individual proteins were considered or whole plasma. The AN, PN and PG colloids led to very similar results (up to 0.5–0.7 of quenching ratio), while the AG sample showed even lower quenching effect (~ 0.3 at 10 mg/ml). It may be remarked for example that these quenching ratios are found to be lower than previously reported values obtained on graphite oxide nanoparticles [16]. In order to inspect more clearly the level of interaction between NPs and plasma proteins, a fitting of the experimental data was then undergone, selecting the data for whole plasma.

Two models were used and compared to analyze the protein binding behavior of our NPs. First Hill equation (also corresponding to Sips or Langmuir-Freundlich isotherm models) was used to

Table 2

Analysis of protein fluorescence quenching data: fitted protein-NPs interaction parameters using Hill and Stern-Volmer models.

Hill equation fitted parameters				
	AN	AG	PN	PG
n	0.923	1.17	0.75	0.74
k_D	0.022	0.050	0.0084	0.012
K_b	45.14	19.86	119.5	82.09
r^2	0.970	0.972	0.980	0.992
Stern-Volmer equation fitted parameters				
	AN	AG	PN	PG
k_{sv}	21.01	46.52	99.74	71.15
r^2	0.981	0.991	0.993	0.984

describe the fluorescence quenching data, as was done previously on other systems [17]:

$$\frac{Q}{Q_{\max}} = \frac{[NP]^n}{k_D^n + [NP]^n} \text{Hill equation} \quad (3)$$

where [NP] denotes the concentration of administered NPs, Q is the quenching ratio at concentration [NP], Q_{\max} is the maximal quenching ratio of 1, “n” is Hill parameter showing progressive protein binding type on NPs, and k_D is the protein-NP equilibrium constant (at the experimental temperature of 36.5 °C). Hill equation describes here protein-nanoparticles interaction in terms of binding and dissociation. Application of this equation can lead to two major outcomes: Hill parameter “n” and the binding constant “ K_b ”. Cases where $n > 1$ correspond to adsorptive systems with a “positive cooperativity” among adsorbed proteins (proteins affinity to NPs progressively increases), while $n < 1$ indicates that the binding strength of the protein to the NP becomes progressively weaker as further proteins adsorb. The particular case $n = 1$ comes back to an adsorption following a regular Langmuir model. K_b , the protein-NP binding constant, is defined by: $K_b = 1/k_D$.

The second model that was used here to analyze the protein quenching results was Stern-Volmer equation [46]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_{sv} \cdot [NP] \text{Stern-Volmer} \quad (4)$$

where [NP] is the concentration of NPs, I_0 the intensity or rate of fluorescence without a quencher, I the intensity or rate of fluorescence with a quencher, and k_{sv} the protein-NP equilibrium constant. This model is generally more suitable for low concentrations (a “domain where quenching is dominated by diffusive transport” [17]); it was considered here for [NP] up to 4 mg/ml. The fitted parameters obtained when applying both models to our data are reported on Table 2.

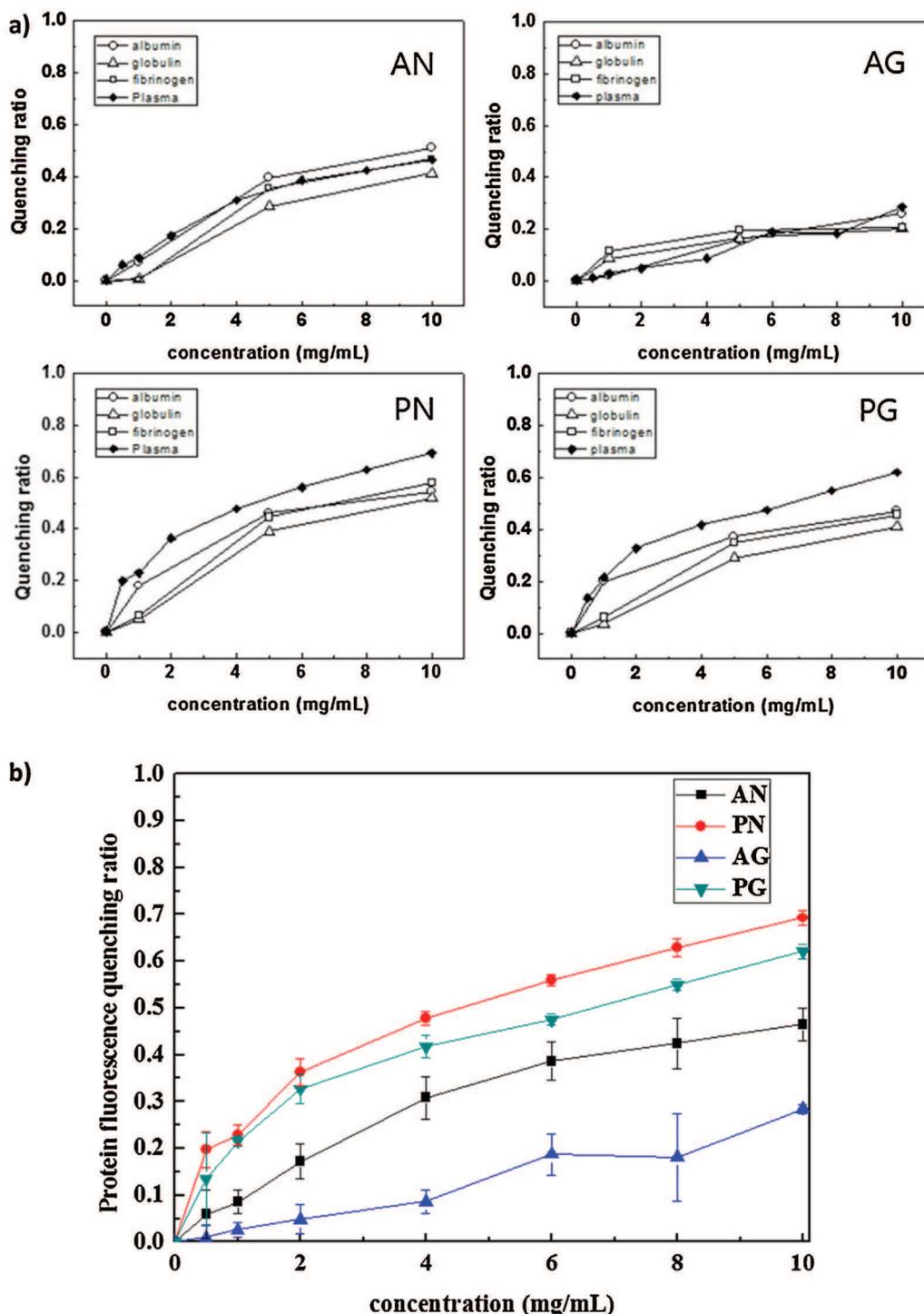


Fig. 5. Fluorescence quenching properties of (a) human serum proteins and full serum (b) summary of data for pure serum, after contact with (PEG)P and AEP colloids.

In each case, correlation coefficients r^2 larger than 0.97 (for Hill plot $r^2 \geq 0.970$, for Stern-Volmer plot $r^2 > 0.98$) were noticed independently of the model (Hill or Stern-Volmer), pointing out the pertinence of these fits. The n parameters found with the Hill equation are close to 1 or larger than 1, in the case of AEP colloids, suggesting cooperative adsorption of proteins. In contrast, a value of ~ 0.75 was observed for (PEG)P. While AEP (and HMP counterions) are small organic molecules with low space occupancy, thus provoking low steric hindrance to protein adsorption, polyethyleneglycol molecules are voluminous; this difference in the size of organic coronas between AEP- and (PEG)P-stabilized

colloids could explain the difference in the observed proteins adsorptive behaviors for the two types of colloids.

In terms of binding constants, both models lead to values with an order of magnitude in the range $10^1 - 10^2$ (between 19 and 120 for Hill K_b and between 20 and 100 for Stern-Volmer K_{SV}). Comparatively, significantly larger values were reported in the literature for several other types of nanoparticles (e.g. of the order $10^4 - 10^7$ for citrate-coated gold nanoparticles [17], of the order of 10^3 for graphite oxide nanoparticles [16]). Also, values of the order of $10^4 - 10^5$ were reported for the interaction of flavonoids (a group of polyphenols with potential biomedical applications) with bovine

serum albumin [46]. These findings suggest that the biomimetic apatite-based colloidal nanoparticles tested in this work are fairly inert toward plasma proteins. These results appear all the more appealing that these colloidal biomimetic apatite nanoparticles are fairly inert to plasma proteins thanks to “passive” organic coronas (AEP phospholipid moiety or phosphonated polyethyleneglycol) and do not necessitate additional stabilization via adsorption of a drug such as heparin [19].

Upon treating the samples with blood plasma, it may be noted that DLS measurements led to similar results (within less than 3.5% of difference) before and after plasma contact. In contrast, zeta potential values were significantly modified: highly negative zeta potential of AN and AG shifted to less negative region and positive apatites like PN and PG began to have slightly negative values (see Table 1). These results can be explained by partial protein coverage upon contact with plasma, proteins being known to exhibit negatively-charged residues at physiological pH.

The above discussion thus pointed out the relative inertness of the colloidal NPs tested here with plasma proteins in all cases, which is desirable for usage in nanomedicine. Among the four types of colloids evaluated, some differences of adsorptive behavior can however be distinguished. For any given model, the same general pattern AN < AG < PG < PN is found for interaction constants. Protein-apatite interaction is bound to be greatly governed by NPs characteristics where several parameters may come into play such as surface properties (surface charge, accessibility to surface sites despite organic corona steric hindrance, molecular composition of the corona, specific surface area. . .) and particle HD. If particle HD was considered alone, AEP colloids (composed of NPs with HD ~ 47 nm) would be expected to have a larger interaction surface and thus to lead to greater interaction with proteins than (PEG)P colloids (NPs ~ 190 nm), especially taking into account the larger space occupancy of polyethyleneglycol. However, this tendency does not fit experimental results (Table 2), indicating that other factors should also be considered, such as surface charge. Indeed, AEP-stabilized colloids are negatively-charged (by way of the HMP treatment) which could explain their lower affinity for proteins (which expose negative end-groups from amino acid residues) compared to the positively-charged (PEG)P-stabilized colloids (PN and PG).

3.4. Concluding remarks

In this contribution, we followed the interaction of two types of biomimetic-apatite colloidal nanoparticles with blood components, namely red blood cells (via hemolysis assays) and plasma proteins (follow-up of non-specific protein adsorption via protein fluorescence quenching).

Hemolysis degrees lower than 5% were observed, pointing out the high hemocompatibility of such colloids with respect to red blood cells. Only one condition (glucose-containing AEP-based freeze-dried colloid) led to a larger level of hemolysis, but this was noticed for high concentration (10 mg/ml) which is beyond expected practical usage, and this result is likely related to the presence of glucose in the formulation. For such colloids, additional research is in progress to select even more suitable soluble matrices for the preparation and re-dispersion of freeze-dried apatite colloids.

In a second stage, the interaction of the NPs with whole human blood plasma as well as with individual proteins was investigated. By following protein luminescence quenching in the presence of the colloids, the extent of NPs/plasma proteins interaction was evaluated experimentally, and the data were then fitted with two models, namely Hill and Stern-Volmer. In all cases and independently of the selected model, interaction constants of the order of 10^1 – 10^2 were found. These values, significantly lower than those

reported for other types of nanoparticles or molecular interactions, indicate the fairly inert character of these colloidal NPs with respect to plasma proteins, again stressing their high hemocompatibility.

It may be noted that, among the four types of colloids (intended for a systemic administration pathway) tested in this study, both hemolysis assays and protein fluorescence quenching data indicated that the AEP-stabilized colloid (not lyophilized) corresponded to the most hemocompatible formulation. It is delicate at this point to determine whether particle size or surface charge is the most relevant factor to take into account in relation with hemocompatibility of such systems. Indeed, both particle size and zeta potential tend to vary simultaneously when changing AEP by (PEG)P. However, it may be concluded from our observations that apatite nanoparticles having initially negative to slightly positive surface charge are compatible to blood components. Also, since the surface charge appears to have eventually a tendency to become slightly negative in all cases after plasma contact, probably due to some extent of protein coverage (partial), then the surface charge parameter is probably less relevant than particle size to distinguish between different categories of apatite colloids, as size remains a characteristic feature of the particles.

This study complements the existing research carried out on biomimetic-apatite-based colloids stabilized by non-drug biocompatible organic molecules. It adds hemocompatibility evidences to the already reported low cytotoxicity and non-pro-inflammatory properties of AEP-stabilized apatite colloids. Future work will aim, among other things, at exploring NPs/cells membranes interactions, and following NPs biodistribution in vivo.

Acknowledgement

The authors wish to thank the CIRIMAT Carnot Institute for financing of M. Choimet's PhD thesis grant.

References

- [1] A. Bouladjine, A. Al-Kattan, P. Dufour, C. Drouet, New advances in nanocrystalline apatite colloids intended for cellular drug delivery, *Langmuir* 25 (2009) 12256–12265, <http://dx.doi.org/10.1021/la901671j>.
- [2] D. Chen, Z. Luo, N. Li, J.Y. Lee, J. Xie, J. Lu, Amphiphilic polymeric nanocarriers with luminescent gold nanoclusters for concurrent bioimaging and controlled drug release, *Adv. Funct. Mater.* 23 (2013) 4324–4331, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201300411>.
- [3] S. Ferber, H. Baabur-Cohen, R. Blau, Y. Epshtein, E. Kisin-Finfer, O. Redy, et al., Polymeric nanotheranostics for real-time non-invasive optical imaging of breast cancer progression and drug release, *Cancer Lett.* 352 (2014) 81–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.022>.
- [4] D.F. Emerich, C.G. Thanos, The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis, *Biomol. Eng.* 23 (2006) 171–184, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.026>.
- [5] J.E. Schroeder, I. Shweky, H. Shmeeda, U. Banin, A. Gabizon, Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles, *J. Control. Release* 124 (2007) 28–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.028>.
- [6] A. Al-Kattan, S. Girod-Fullana, C. Charvillat, H. Ternet-Fontebasso, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, et al., Biomimetic nanocrystalline apatites: emerging perspectives in cancer diagnosis and treatment, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 26–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.005>.
- [7] K.Y. Choi, G. Liu, S. Lee, X. Chen, Theranostic nanoplateforms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives, *Nanoscale* 4 (2012) 330–342, <http://dx.doi.org/10.1039/c1nr11277e>.
- [8] M.S. Murahari, M.C. Yergeri, Identification and usage of fluorescent probes as nanoparticle contrast agents in detecting cancer, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 4622–4640.
- [9] M. Iafisco, J.M. Delgado-Lopez, E.M. Varoni, A. Tampieri, L. Rimondini, J. Gomez-Morales, et al., Cell surface receptor targeted biomimetic apatite nanocrystals for cancer therapy, *Small* 9 (2013) 3834–3844, <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201202843>.
- [10] F. Oltolina, L. Gregoletto, Monoclonal antibody-targeted fluorescein-5-isothiocyanate-labeled biomimetic nanoapatites: a promising fluorescent probe for imaging applications, *Langmuir* (2015) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1021/la503747s>.
- [11] B. Sandhöfer, M. Meckel, J.M. Delgado-López, T. Patrício, A. Tampieri, F. Röscher, et al., Synthesis and preliminary in vivo evaluation of well-dispersed biomimetic nanocrystalline apatites labeled with positron emission

- tomographic imaging agents, *ACS Appl Mater. Interfaces* 7 (2015) 10623–10633, <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b02624>.
- [12] M.A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil, Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 487–495, <http://dx.doi.org/10.1021/mp800032f>.
- [13] N.R. Kuznetsova, C. Sevrin, D. Lespigneux, N.V. Bovin, E.L. Vodovozova, T. Mészáros, et al., Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer, *J. Control. Release* 160 (2012) 394–400, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.010>.
- [14] A. Yildirim, E. Ozgur, M. Bayindir, Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 1909, <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb20139b>.
- [15] C. Fornaguera, G. Calderó, M. Mitjans, M.P. Vinardell, C. Solans, C. Vauthier, Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies, *Nanoscale* 7 (2015) 6045–6058, <http://dx.doi.org/10.1039/C5NR00733J>.
- [16] H.-M. Kim, K.-M. Kim, K. Lee, Y.S. Kim, J.-M. Oh, Nano-bio interaction between graphite oxide nanoparticles and human blood components, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012 (2012) 5343–5349, <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201200587>.
- [17] S.H.D.P. Lacerda, J.J. Park, C. Meuse, D. Pristiniski, M.L. Becker, A. Karim, et al., Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins, *ACS Nano* 4 (2010) 365–379, <http://dx.doi.org/10.1021/nn9011187>.
- [18] A. Mayer, M. Vadon, B. Rinner, A. Novak, R. Wintersteiger, E. Fröhlich, The role of nanoparticle size in hemocompatibility, *Toxicology* 258 (2009) 139–147, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.015>.
- [19] Y. Han, X. Wang, H. Dai, S. Li, Nanosize and surface charge effects of hydroxyapatite nanoparticles on red blood cell suspensions, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 4616–4622, <http://dx.doi.org/10.1021/am300992x>.
- [20] T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann, M. Eppler, Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2213, <http://dx.doi.org/10.1039/b401644k>.
- [21] A. Al-Kattan, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, C. Drouet, Preparation and physicochemical characteristics of luminescent apatite-based colloids, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 2918–2924, <http://dx.doi.org/10.1021/jp910923g>.
- [22] C. Drouet, A. Al-Kattan, M. Choimet, A. Tourrette, V. Santran, J. Dexpert-Ghys, et al., Biomimetic apatite-based functional nanoparticles as promising newcomers in nanomedicine: overview of 10 years of initiatory research, *J. Gen. Pract. Med. Diagnosis* (2015), http://oatao.univ-toulouse.fr/14233/1/drouet_14233.pdf (accessed 10.09.15).
- [23] M. Tourbin, A. Al-Kattan, C. Drouet, Study on the stability of suspensions based on biomimetic apatites aimed at biomedical applications, *Powder Technol.* 255 (2014) 17–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2013.08.008>.
- [24] V. Sarath Chandra, G. Baskar, R.V. Suganthi, K. Elayaraja, M.I. Ahymah Joshy, W. Sofi Beaula, et al., Blood compatibility of iron-doped nanosize hydroxyapatite and its drug release, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 1200–1210, <http://dx.doi.org/10.1021/am300140q>.
- [25] E.M. Múzquiz-Ramos, D.A. Cortés-Hernández, J.C. Escobedo-Bocardo, A. Zugasti-Cruz, X.S. Ramírez-Gómez, J.G. Osuna-Alarcón, In vitro and in vivo biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 1035–1041, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-013-4862-0>.
- [26] A. Ashokan, G.S. Gowd, V.H. Somasundaram, A. Bhupathi, R. Peethambaran, A.K.K. Unni, et al., Multifunctional calcium phosphate nano-contrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging, *Biomaterials* 34 (2013) 7143–7157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.077>.
- [27] W.S. Vedakumari, V.M. Priya, T.P. Sastry, Deposition of superparamagnetic nanohydroxyapatite on iron-fibrin substrates: preparation, characterization, cytocompatibility and bioactivity studies, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 120 (2014) 208–214, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.021>.
- [28] L. Montazeri, J. Javadpour, M.A. Shokrgozar, S. Bonakdar, M. Khayyat Moghaddam, V. Asgary, The interaction of plasma proteins with nano-size fluoride-substituted apatite powders, *Ceram. Int.* 39 (2013) 6145–6152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.01.033>.
- [29] A. Al-Kattan, V. Santran, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, C. Drouet, Novel contributions on luminescent apatite-based colloids intended for medical imaging, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 697–707 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418200>.
- [30] L. Rothfield, A. Finkelstein, Membrane biochemistry, *Annu. Rev. Biochem.* 37 (1968) 463–496, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.37.070168.002335>.
- [31] J. Gómez-Morales, M. Iafisco, J.M. Delgado-López, S. Sarda, C. Drouet, Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: overview of fundamental and applied aspects, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 59 (2013) 1–46, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2012.11.001>.
- [32] A. Al-Kattan, P. Dufour, C. Drouet, Purification of biomimetic apatite-based hybrid colloids intended for biomedical applications: a dialysis study, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 82 (2011) 378–384, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.09.022>.
- [33] Y.-S. Lin, C.L. Haynes, Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4834–4842, <http://dx.doi.org/10.1021/ja910846q>.
- [34] J. Choi, V. Reipa, V.M. Hitchins, P.L. Goering, R.A. Malinauskas, Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles, *Toxicol. Sci.* 123 (2011) 133–143, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr149>.
- [35] T. Yu, A. Malugin, H. Ghandehari, Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity, *ACS Nano* 5 (2011) 5717–5728, <http://dx.doi.org/10.1021/nn2013904>.
- [36] J. Autian, *Biological model systems for the testing of the toxicity of biomaterials*, in: P. Press (Ed.), *Polym. Med. Surg.*, vol. 8, Springer Science & Business Media, New York, 1996, p. 181.
- [37] L. Lai, C. Lin, Z.-Q. Xu, X.-L. Han, F.-F. Tian, P. Mei, et al., Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin, *Spectrochim. Acta. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 366–376, <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.06.025>.
- [38] P. Aggarwal, J.B. Hall, C.B. McLeland, M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil, Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 428–437, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>.
- [39] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2593–2606, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>.
- [40] Q.Z. Wang, X.G. Chen, Z.X. Li, S. Wang, C.S. Liu, X.H. Meng, et al., Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 1371–1377, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3243-y>.
- [41] H. Hu, X.B. Wang, S.L. Xu, W.T. Yang, F.J. Xu, J. Shen, et al., Preparation and evaluation of well-defined hemocompatible layered double hydroxide-poly(sulfobetaine) nanohybrids, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 15362, <http://dx.doi.org/10.1039/c2jm32720a>.
- [42] C. Hou, Q. Yuan, D. Huo, S. Zheng, D. Zhan, Investigation on clotting and hemolysis characteristics of heparin-immobilized polyether sulfones biomembrane, *J. Biomed. Mater. Res. A* 85 (2008) 847–852, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31502>.
- [43] G.B. Quan, Y. Han, M.X. Liu, L. Fang, W. Du, S.P. Ren, et al., Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose, *Cryobiology* 62 (2011) 135–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.01.015>.
- [44] V.P.P. Schiar, D.B. Dos Santos, M.W. Paixão, C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, G. Zeni, Human erythrocyte hemolysis induced by selenium and tellurium compounds increased by GSH or glucose: a possible involvement of reactive oxygen species, *Chem. Biol. Interact.* 177 (2009) 28–33, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.007>.
- [45] J. Viskupicova, D. Blaskovic, S. Galiniak, M. Soszynski, G. Bartosz, L. Horakova, et al., Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro, *Redox Biol.* 5 (2015) 381–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.011>.
- [46] A. Papadopoulou, R.J. Green, R.A. Frazier, Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 158–163, <http://dx.doi.org/10.1021/jf048693g>.

Résumé :

L'acné est la dermatose la plus courante dans le monde. Cette pathologie, à causes multiples, peut impliquer des traitements longs dont l'efficacité reste à améliorer. Au niveau topique, le ciblage de la surface cutanée et en particulier des foyers infectieux (impliquant notamment la bactérie *P. acnes*) est un axe de recherche visant un meilleur traitement de la pathologie. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans cet objectif, et portent sur l'utilisation de particules submicroniques minéral-organiques à base d'apatites bio-inspirées pour le traitement de l'acné en vue de la vectorisation d'un antibiotique via une nouvelle formulation galénique. Dans un premier temps, les recherches se sont focalisées sur l'élaboration et la caractérisation physico-chimique de particules apatitiques préparées en présence d'un agent dispersant. Parmi les conditions testées, un protocole de référence permettant d'obtenir une suspension colloïdale de particules d'apatite de diamètre hydrodynamique moyen (DLS) de 180 nm, stabilisées à l'aide d'un polyéthylène glycol phosphonaté, a été retenu. L'analyse des particules par DRX et IRTF a mis en évidence le caractère nanocristallin biomimétique de la phase apatitique. Dans un second temps, l'adsorption d'une molécule modèle phosphatée puis d'un antibiotique – le phosphate de clindamycine (ClindP) – a été quantifiée et analysée à l'aide de différents modèles d'adsorption. Par ailleurs, la possibilité d'une incorporation d'ions biologiquement actifs (ex : antibactériens, anti-inflammatoires) tels que Cu^{2+} et/ou Zn^{2+} dans l'apatite colloïdale a été établie. Dans un troisième temps, des évaluations biologiques ainsi que divers essais de suivi des particules ont été entrepris. L'interaction avec des éléments du sang – globules rouges et protéines plasmatiques – a été explorée (dans l'éventualité d'une application sur peau lésée), mettant en évidence l'excellente hémocompatibilité de ces particules colloïdales. Différentes techniques de suivi des particules ont ensuite été abordées sur membranes synthétiques et sur explants d'oreilles de porcs, telles que l'utilisation de cellules de Franz en modes statique et dynamique, ou encore la microscopie confocale Raman. Les résultats obtenus indiquent que cette dernière technique est adaptée à l'étude de la localisation cutanée de ces particules colloïdales, et montrent une accumulation de celles-ci au niveau de l'épiderme et des follicules pileux. Enfin, une étude préliminaire d'élaboration et de caractérisation d'une forme galénique (bigel) a été abordée.

Summary :

Acne is the most frequent dermatosis in the world. This multifaceted pathology may necessitate long-term treatments which can be improved. For a topical application, the idea of targeting the skin surface and in particular infected pilosebaceous units (involving bacteria such as *P. acnes*) is one approach for a better treatment of this pathology. This thesis work follows this objective, and deals with the use of submicron mineral-organic particles based on bio-inspired apatite for the treatment of acne, in view of drug delivery via a new galenic formulation. In a first stage, research was focused on the synthesis and physicochemical characterization of apatitic particles prepared in the presence of a dispersing agent. Among the tested conditions, a reference protocol was retained, allowing the obtainment of a colloidal suspension of apatite particles with a mean hydrodynamic diameter (DLS) of 180 nm, stabilized with phosphonated polyethyleneglycol. XRD and FTIR evidenced the biomimetic nanocrystalline nature of the apatitic phase. In a second stage, the adsorption of a model phosphate molecule and then of an antibiotic – clindamycin phosphate (ClindP) – was quantified and analyzed with regard to various adsorption models. Moreover, the possibility to incorporate biologically-active ions (e.g. antibacterial, anti-inflammatory) such as Cu^{2+} and/or Zn^{2+} in colloidal apatite was established. In a third part, biological evaluations as well as particle follow-up experiments were performed: the interaction with blood components – red blood cells and plasma proteins – was explored (in the eventuality of application on damaged skin), evidencing the excellent hemocompatibility of these colloidal particles. Various particle follow-up techniques were then considered, involving synthetic membranes and porcine ear skin, such as the use of Franz cells in static and dynamic modes or else Raman confocal microscopy. Results indicate that the latter technique is suitable for the study of the localization of these colloidal particles within the skin, and point out their accumulation on the epidermis and hair follicles. Finally, a preliminary study was carried out on the setup and characterization of a galenic form (bigel).