

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Christian BIJANI, Ingénieur ENSTBB

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

.....
**Les lipoamino acides : des vecteurs d'absorption pour
l'administration transmembranaire de biomolécules**
.....

Directeur de recherche : Eric J. Dufourc

Soutenue le : 09 mars 2010

Devant la commission d'examen formée de :

Mme. CANSELL, Maud

M. BRISSON, Alain

M. DOULIEZ, Jean-Paul

M. TESTET, Eric

M. BROUSSAUD, Olivier

M. DUFOURC, Eric J

Professeur de l'Institut Polytechnique de Bordeaux

Professeur de l'Université de Bordeaux I

Directeur de recherche de l'INRA de Nantes

Maître de conférence de l'Université Bordeaux II

Directeur Scientifique

Directeur de Recherche CNRS

Rapporteur

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

à Lina...

Remerciements

La présente étude n'aurait pas été possible sans le soutien de certaines personnes. Et je ne suis pas non plus capable de dire dans les mots qui conviennent, le rôle qu'elles ont pu jouer à mes côtés pour en arriver là. Cependant, je voudrais les prier d'accueillir ici toute ma gratitude.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, **Erick Joël Dufourc**, qui a su, au cours de ces trois années, orienter mes recherches aux bons moments et m'a fait découvrir cette merveilleuse technique qu'est la RMN. Malgré sa charge de travail importante il a toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Je le remercie également pour ses généreux secours notamment en fin de thèse lorsque tout semblait perdu... Pour tout cela, sa confiance et son soutien moral, je le remercie vivement.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse **Maud Cansell** et **Jean-Paul Douliez** pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : **Olivier Broussaud**, **Alain Brisson** et en particulier **Eric Testet**, Maître de conférences à l'Université Bordeaux II qui a été l'un de mes professeurs à l'ESTBB et qui m'a grandement soutenu pour mon entrée dans la vie active.

La qualité et la continuité des données présentées ici sont le fruit d'un travail d'équipe sur le terrain et de maintenance soutenue des appareils de RMN... J'ai pour cela pleinement profité de la présence et de l'efficacité d'**Axelle Grelard** qui m'a également initiée à la technique RMN. Je la remercie pour sa disponibilité dont j'ai parfois peut-être abusé.

J'ai eu également le plaisir de collaborer avec **Juan Elezgaray** et **Clément Arnarez** qui ont effectués un travail de modélisation remarquable, ce qui a contribué à apporter une plus grande crédibilité à ce travail de recherche. Je les remercie vivement.

Un grand merci à **Sébastien Buchoux** pour avoir donné de son temps afin de développer ces petits outils informatiques redoutable d'efficacité. Tu m'as fait gagner un temps précieux, je t'en remercie.

Je tiens à remercier la région Aquitaine et l'ANRT pour leur soutien financier.

Un merci également à **Olivier, Hannah, Vanessa et Jeannot** qui ont été mes collègues de bureau et qui sont également mes amis. Olivier, j'ai adoré nos parties acharnées de petite balle blanche. Tu n'auras pas réussi à me battre mais tu as bien progressé à mes côtés petit Padawan ;) Hannah et Vanessa je n'oublierai jamais le congrès que nous avons fait ensemble, le cadre était magnifique, les pizzas succulentes, les réceptions superbes et les communiations scientifiques extrêmement intéressantes, surtout celle avec « l'anneau qui bouge ». Jeannot, tu es un être exceptionnel même si des fois tu boudes un peu, ne change surtout pas et merci pour les cours....De même, je remercie mes collègues de Physica Pharma : **Fabien, Sophie, Céline, Sabrina, Delphine** avec qui j'ai partagé de superbes moments durant toutes ces années

Il y a une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et qui me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Il s'agit de **Fériana Bijani**, ma merveilleuse, splendide et vertueuse épouse, dont je ne pourrai mesurer l'apport dans l'accomplissement de ce travail. Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, elle a été l'autre moi. Je te remercie infiniment.

De plus, mes remerciements seraient incomplets, si je ne fais pas mention de mes enfants, qui ont pu m'apporter la force nécessaire pour accomplir cette rude tâche. Je vous adresse mes chaleureux remerciements, **Lina et Samy Bijani**.

Comment peut-on échouer avec une telle armée derrière soi ?

Pour clore ce préambule, je souhaiterais préciser un dernier point. Dans une société où tout est, à l'image de la banque, rapidité, compétitivité, rentabilité, je revendique avoir fait, pour la première fois de ma vie, au travers de ce travail de thèse et dans l'esprit du philosophe et essayiste Pierre Sansot, « l'éloge de la lenteur » et son bon usage. En effet, il m'a fallu du temps pour dessiner les contours de mon sujet, comprendre ce que j'observais, avoir un certain recul, mettre en forme une thèse.... prendre en fait le temps nécessaire à tout travail de recherche.

-Abréviations-

-1-

^1H : Isotope de l'hydrogène de masse égale à 1 unité de masse atomique

-2-

^2H : Isotope de l'hydrogène de masse égale à 2 unités de masse atomique

-A-

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APCs : Cellules présentatrices d'antigène

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

AUC : Area Under the Curve (Aire sous la courbe)

-B-

BEGM : Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (Milieu de croissance épithéliale bronchique)

BSA : Bovine Serum Albumine (Sérum Albumine Bovine)

-C-

CaSR : Calcium Sensing Receptor (Récepteur sensible au calcium)

CD : Circular Dichroism (Dichroïsme Circulaire)

CDC : Cell Division Cycle (Cycle de division cellulaire)

CER : Céramide

CH : Cholestérol

CS : Sulfate de cholestérol

CMC : Concentration Micellaire Critique

CsA : Cyclosporine A

CV : Cocoyl valine

-D-

D : Coefficient de Diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DCU : dicyclohexylurée

DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion dynamique de la lumière)

Dlg : Discs large protein

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Milieu essentiel minimum de Dulbecco)

DOSY : Diffusion-ordered spectroscopy

-E-

EPO : Erythropoïétine

-F-

FID : Free Induction Decay

FT : Transformée de Fourier

-H-

H : Constante de Plank ($6,62.10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$)

HBSS : Hank's balanced salt solution

hGH : Human Growth Hormone (Hormone de Croissance Humaine)

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Corrélation hétéronucléaire)

-I-

IL2 : Interleukine 2

IV : Intraveineux

-J-

JAM : junctional adhesion molecule (Molécule d'adhésion de jonctions intercellulaires)

-K-

K : constante de Boltzmann ($1,3807.10^{-23} \text{ J/k}$)

-L-

LAAs : Lipoamino acides

LDH : lactate déshydrogénase

LUV : large unilamellar vesicles

-M-

M : Molaire (1 Mole par litre)

M₁ : Moment d'ordre 1

MAG : membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure
MLV : multilamellar vesicles (vésicules multilamellaires)
MMAD : Mass Median Aerodynamic Diameter
MUPP1 : multi-PDZ domain protein 1

-N-

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NHS : N-hydroxysuccinimide

-O-

OA : Oleic Acid (Acide Oléique)

-P-

PA : Palmitic acid (Acide palmitique)
PAD : Amplificateur discriminant à pulsation
Papp : Perméabilité du côté apical vers le côté basolatéral
PC : PhosphatidylCholine
PDB : Protein Data Bank
PE : PhosphatidylEthanolamine
PG : PhosphatidylGlycérol
PI : PhosphatidylInositol
PKC : Protéine kinase C
PMT : Photomultiplicateur
PS : PhosphatidylSérine
PSD-95 : Postsynaptic density-95

-R-

RF : RadioFréquence
Rh : Rayon hydrodynamique
rhEPO : Recombinant Human Erythropoietin (Erythropoïétine Humaine Recombinante)
rhGH : Recombinant Human Growth Hormone (Hormone de Croissance Humaine Recombinante)
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

-S-

SB : Strate basale
SC : *Stratum Corneum*
sCT : Calcitonine de saumon
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SG : Stratum granulosum

SM : Sphingomyéline
SS : Stratum Spinosum
STDFH : Tauro-24,25-dihydrofusite de sodium
SUV : Small Unilamellar Vesicles

-T-

TEER : Résistance électrique transépithéliale
THF : Tétrahydrofurane
T_m : Température de fusion

-U-

UV : Ultra Violet

-Z-

ZO : Zonula Occludens
ZOT : Zonula Occludens Toxin (Toxine de la Zonula Occludens)

-Sommaire-

CHAPITRE 1 GENERALITES	7
1. GENERALITES SUR LES PEPTIDES ET PROTEINES	9
1.1. Introduction.....	9
1.2. De l'ADN aux protéines.....	9
1.3. Polymères d'acides aminés.....	10
1.4. Structure des protéines	13
1.4.1. La structure primaire	13
1.4.2. La structure secondaire	14
1.4.3. La structure tertiaire.....	20
1.4.4. La structure quaternaire	21
1.5. Dénaturation des protéines globulaires	22
2. GENERALITES SUR LES MEMBRANES BIOLOGIQUES	25
2.1. Introduction.....	25
2.2. Principaux lipides de la membrane plasmique	26
2.3. Rôle des membranes biologiques	29
2.4. L'asymétrie de distribution des phospholipides.....	30
2.5. Les radeaux lipidiques ou « rafts »	30
2.6. Cas du stratum corneum	31
2.6.1. Structure de la peau et du stratum corneum	31
2.6.2. Fonction du Stratum Corneum	33
2.6.3. Les lipides du stratum corneum.....	34
2.6.4. Le psoriasis.....	39
2.7. Cas de la muqueuse nasale	42
2.7.1. Structure des fosses nasales	42
2.7.2. Fonction des différents types cellulaires	43
3. GENERALITES SUR LES PROMOTEURS D'ABSORPTION MEMBRANAIRE	44
3.1. Introduction.....	44
3.2. Les différentes voies d'administration.....	44
3.2.1. La voie locale	44
3.2.2. La voie orale.....	45
3.2.3. La voie parentérale	45
3.2.4. La voie rectale.....	46
3.2.5. La voie respiratoire	46
3.2.6. La voie nasale.....	47
3.3. Les différents promoteurs d'absorption	47
3.3.1. Les systèmes matriciels	47
3.3.2. Les vésicules	52
3.4. Les mécanismes d'absorption.....	55
3.4.1. Les mécanismes d'absorption nasale	55
3.4.2. Les mécanismes d'absorption cutanée.....	60
4. ETAT DE L'ART SUR LES TENSIOACTIFS	64
4.1. Structure et propriétés	64
4.2. Le polymorphisme	65
4.3. Description géométrique de l'agrégat.....	65

5.	PRESENTATION DES LIPOAMINO ACIDES ET DE LA TECHNOLOGIE BIODIS®	67
5.1.	<i>La technologie BIODIS®</i>	67
5.1.1.	Aspects généraux.....	67
5.1.2.	Cas des molécules peu solubles.....	68
5.1.3.	Cas des molécules faiblement perméables.....	69
5.2.	<i>Les lipoamino acides</i>	70
5.2.1.	Structure	70
5.2.2.	Propriétés	70
6.	OBJECTIF ET PLAN DE THESE	72
CHAPITRE 2 MATERIAUX ET METHODES.....		75
1.	MATERIAUX.....	75
1.1.	<i>Les protéines</i>	75
1.1.1.	L'hormone de croissance humaine (hGH).....	75
a.	Structure	75
b.	Pureté et composition	76
c.	Fonctions	76
1.1.2.	L'érythropoïétine humaine (hEPO)	77
a.	Structure	77
b.	Pureté et composition	78
c.	Fonctions	78
1.1.3.	La Calcitonine de saumon	79
a.	Structure	79
b.	Pureté et composition	80
c.	Fonctions	80
1.2.	<i>La cyclosporine A</i>	81
1.2.1.	Structure	81
1.2.2.	Pureté et composition	82
1.3.	<i>Les lipides</i>	82
1.3.1.	Le céramide	82
1.3.2.	Le cholestérol	82
1.3.3.	L'acide palmitique.....	82
1.3.4.	L'acide palmitique deutéré.....	82
1.4.	<i>Les lipoamino acides</i>	83
1.4.1.	Présentation des structures étudiées.....	83
1.4.2.	Synthèse et purification de LAAs et de lipoamino acides deutérés.....	84
a.	Méthodologie des synthèses.....	84
b.	Résultats et discussion.....	85
c.	Partie expérimentale	88
1.5.	<i>Préparation des complexes colloïdaux lipoamino acides – Protéines</i>	91
1.6.	<i>Dispositifs d'administration</i>	92
1.6.1.	hGH.....	92
1.6.2.	Administration de la calcitonine de saumon et de l'érythropoïétine humaine	94
2.	METHODES.....	95
2.1.	<i>Techniques d'analyse physicochimiques</i>	95
2.1.1.	Le dichroïsme circulaire	95
a.	Principe	95
b.	Méthode de déconvolution	96
2.1.2.	La diffusion de la lumière.....	99
a.	Appareillage.....	99
b.	Diffusion dynamique de la lumière.....	100
2.1.3.	La résonance magnétique nucléaire.....	101
a.	Les bases de la RMN	101
b.	La RMN à deux dimensions (RMN 2D)	115

c.	Coefficient de Diffusion translationnel, D.....	115
d.	Application aux systèmes membranaires	117
2.1.4.	La dynamique moléculaire.....	124
a.	Minimisation des énergies.....	124
b.	La dynamique	124
c.	Le champ de force	125
2.2.	<i>Technique d'analyse biologique : Modèle de cellules nasales in vitro</i>	129
2.2.1.	Étude de perméation	131
2.2.2.	Modélisation de la diffusion au travers des cellules nasales	131
2.3.	<i>Technique d'analyse sur modèles : Préparation des modèles lipidiques de peau</i>	132

CHAPITRE 3 ADMINISTRATION DE PROTEINES PAR VOIE NASALE : ÉTUDE DE L'INTERACTION LIPOAMINO ACIDES – PROTEINES PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE ET DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE 135

1.	INTRODUCTION.....	135
2.	MATERIAUX ET METHODES	137
2.1.	<i>Matériaux</i>	137
2.2.	<i>Préparation des complexes colloïdaux lipoamino acide – protéine</i>	138
2.3.	<i>Analyse par dichroïsme circulaire</i>	139
2.4.	<i>Analyse par diffusion dynamique de la lumière</i>	139
2.5.	<i>Test de perméation sur cellules nasales</i>	140
2.5.1.	Culture de cellules nasales ¹²⁸	140
2.5.2.	Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) ¹²⁸	141
2.5.3.	Tests de passage sur cellules nasales in vitro ¹²⁸	141
2.5.4.	Iodation de la rhGH.....	142
2.5.5.	Analyse de l'intégrité cellulaire.....	142
2.6.	<i>Dynamique moléculaire du complexe rhGH/ C₁₂P</i>	143
	<i>La dynamique moléculaire a été utilisée à différents buts : une première approche concerne l'étude structurale et dynamique du complexe rhGH/C₁₂P ; puis elle nous a également permis de remonter à la valeur du rayon hydrodynamique du complexe</i>	143
2.6.1.	Dynamique moléculaire.....	143
2.6.2.	Détermination du coefficient de diffusion par dynamique moléculaire et taille du complexe formé....	144
3.	RÉSULTATS	144
3.1.	<i>Compositions colloïdales préservant la structure des protéines</i>	144
3.2.	<i>Taille du complexe colloïdal protéine-LAA</i>	150
3.3.	<i>Perméation du complexe protéine/C₁₂P sur cellules nasales à confluence</i>	152
3.4.	<i>Dynamique moléculaire</i>	158
3.4.1.	Étude de l'interaction rhGH/C ₁₂ P en tout atome.....	158
3.4.2.	Détermination du coefficient de diffusion du complexe rhGH/ C ₁₂ P par dynamique moléculaire	161
3.5.	<i>Étude préclinique</i>	161
4.	DISCUSSION.....	163
5.	CONCLUSION	169

CHAPITRE 4 VALIDATIONS DES MODELES LIPIDIQUES DE STRATUM CORNEUM PAR RMN DU SOLIDE 173

1.	INTRODUCTION.....	173
1.1.	<i>Composition</i>	173
1.2.	<i>Modèles de stratum corneum</i>	174
1.3.	<i>Les promoteurs d'absorption</i>	176
2.	MATERIAUX ET METHODES	177
2.1.	<i>Matériaux</i>	177
2.2.	<i>Préparation des échantillons</i>	177
2.3.	<i>Analyse par RMN du solide</i>	178

3.	RÉSULTATS	182
4.	DISCUSSION	194
5.	CONCLUSION	196
CHAPITRE 5 ÉTUDE PAR RMN ²H DU SYSTEME COLLOÏDAL LIPOAMINO ACIDE – CYCLOSPORINE A SUR DES MODELES LIPIDIQUES DE STRATUM CORNEUM SAIN ET PSORIASIQUE		201
1.	INTRODUCTION.....	201
1.1.	<i>La cyclosporine A.....</i>	<i>201</i>
1.2.	<i>Travaux antérieurs sur l'administration de CsA par voie topique</i>	<i>201</i>
2.	MATERIAUX ET METHODES	203
2.1.	<i>Matériaux.....</i>	<i>203</i>
2.2.	<i>Méthodes</i>	<i>203</i>
2.2.1.	Réalisation d'une formulation aqueuse de CsA en présence de CV	203
a.	Description de la formule	203
b.	Mode opératoire général.....	207
2.2.2.	Résonnance magnétique nucléaire.....	207
a.	Préparation des échantillons de formulation aqueuse de CsA à analyser en DOSY	207
b.	Préparation des échantillons à analyser en RMN ² H	209
c.	Analyse par RMN du deutérium ² H.....	211
3.	RÉSULTATS	211
3.1.	<i>Expérience de DOSY sur la formulation aqueuse de CsA</i>	<i>211</i>
3.2.	<i>Analyse des échantillons de stratum corneum par RMN ²H.....</i>	<i>216</i>
3.2.1.	Effet de la CsA sur les modèles de peaux	216
3.2.2.	Effet de la CV sur les modèles de peaux	220
3.2.3.	Effet de la CV/CsA sur les modèles de peaux.....	228
4.	DISCUSSION.....	236
5.	CONCLUSION	238
CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		243
1.	CONCLUSIONS	243
2.	PERSPECTIVES	245

Chapitre 1

GENERALITES

CHAPITRE 1

GENERALITES

Dans le secteur de la santé, le terme de biotechnologie désigne en particulier les techniques de génie génétique qui permettent de transférer un gène d'un organisme à un autre, ce qui fut fait d'une bactérie à une autre en 1971.

Il devient alors possible de faire fabriquer par une bactérie, une levure ou une cellule de mammifère en culture une protéine humaine ayant un intérêt thérapeutique, puis, après purification, de l'injecter au malade. La protéine thérapeutique ainsi fabriquée est dite recombinante. Aujourd'hui, plus de 160 protéines recombinantes ont déjà obtenu leur autorisation de mise sur le marché en Europe.

La production de ces protéines par génie génétique en cellules procaryotes ou en cellules de mammifères a permis d'en disposer en abondance et sans risque de contamination. La difficulté de la thérapie protéique reste son administration. En effet, la délivrance de ces protéines se fait traditionnellement par voie injectable, ce qui ne pose pas de problèmes particuliers pour les traitements hospitaliers aigus. Cependant, certains traitements s'avèrent très contraignants puisqu'ils prévoient par exemple pour l'hormone de croissance humaine (hGH) une injection 6 jours sur 7 sur de longues durées (2 à 5 ans) et 3 jours sur 7 pour l'Erythropoïétine humaine (hEPO).

L'auto-injection plusieurs fois par jour du traitement par le patient est une vraie source de difficultés, réduisant le confort et donc l'observance des traitements.

La voie orale, la plus pratique et la plus agréable pour les patients, est inaccessible aux protéines sans un système de formulation adapté. En effet, plusieurs problèmes fondamentaux se posent. Tout d'abord, le système digestif humain est fait justement pour dissocier les protéines, par l'action conjuguée des protéases et des acides biliaires au niveau de l'estomac. Dans l'hypothèse où une protéine aurait réussi à passer cet obstacle, la seconde difficulté majeure qui se présente est le franchissement de la paroi du tube digestif, afin de rejoindre le système sanguin. Les molécules de grandes tailles n'ont pas la capacité à passer naturellement cette membrane. La quasi-totalité des protéines thérapeutiques est dans ce cas là.

D'autres voies d'administration moins contraignantes doivent être envisagées. Nous nous sommes donc intéressés dans ce travail à la formulation de l'hGH, de la hEPO et d'un peptide, la calcitonine de saumon (sCT) pour permettre leur administration par voie nasale et par voie topique.

1. Généralités sur les peptides et protéines

1.1. Introduction

Les protéines sont des polymères qui jouent un rôle crucial dans la structure et la fonction des cellules et organismes biologiques. Leur poids moléculaire se situe entre 10^4 et 10^5 Da. Leurs structures sont très variables et dépendent de leurs séquences en acides aminés. On peut les classer en 3 types : les protéines fibreuses, globulaires et désordonnées. Les protéines fibreuses sont composées de chaînes polypeptidiques qui s'arrangent autour d'un axe linéaire commun. La fonctionnalité de ces protéines fibreuses (collagène, kératine...) est largement associée à leurs propriétés mécaniques dans les tissus tels que le muscle, la peau, et les cheveux. Dans les protéines globulaires, une ou plusieurs chaînes polypeptidiques sont repliées de manière compacte pour former une structure tridimensionnelle. Une grande partie des protéines globulaires sont des enzymes (trypsine, catalase, etc.), mais certaines ont des fonctions biologiques, ce sont les hormones (insuline, calcitonine, hormone de croissance, etc.), d'autres des rôles dans les processus de transfert (hémoglobine).

Les protéines sont des polyélectrolytes capables d'être à la fois positivement et négativement chargés. Les groupements ionisables ont des pK différents, ce qui implique que la distribution de charge est dépendante du pH. Quand la charge globale en solution aqueuse est égale à zéro on dit que le système est *isoélectrique* ($pH = pI$). Pour beaucoup de protéines, le point isoélectrique est proche de 5, mais certaines ont des valeurs plus basse (pepsine pHi 2) et plus élevée (lysozyme pHi 11). La solubilité dans l'eau des protéines solubles augmente en proportion avec la quantité de groupes polaires et de leur charge relative et décroît lorsque la masse moléculaire augmente. Les protéines ont un minimum de solubilité au point isoélectrique où les interactions électrostatiques sont minimales.

1.2. De l'ADN aux protéines

Les protéines sont des chaînes d'acides aminés. Leur synthèse fait intervenir l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui se trouve dans le noyau des cellules. L'ADN est une molécule, en forme de double hélice, qui contient l'information génétique, autrement dit

l'ensemble des caractères s'exprimant dans un organisme. L'information génétique est codée sous forme de codon, une suite de trois nucléotides. Chaque codon représente un des 20 acides aminés qu'utilise la cellule dans la synthèse de n'importe quel type de protéine (figures 1.1 et 1.2).

La synthèse des protéines comprend 2 étapes :

- la transcription permet de copier l'ADN en ARN messager (ARNm). Elle se déroule dans le noyau chez les eucaryotes. On parle de transcription, car l'ADN est copié en ARNm sans changement de code, seule la thymine est remplacée par l'uracile.
- La traduction correspond au décodage de l'information portée par l'ARNm en protéines. Dans ce cas, on passe du langage de nucléotides au langage des acides aminés grâce au code génétique. La traduction a lieu dans le cytoplasme au niveau des ribosomes. Parmi les 64 (4^3) codons possibles, seuls, 61 codent pour les 20 acides aminés naturels, les trois codons restants étant des codons de fin de traduction. Plusieurs codons différents représentent donc un même acide aminé, on parle de dégénérescence du code génétique.

1.3. Polymères d'acides aminés

Une protéine est un polymère d'acide aminé. On compte 20 acides aminés naturels différents. Les acides aminés naturels sont essentiellement des acides α -aminés dont la structure de base est composée d'une fonction acide carboxylique (COOH), d'une fonction amine (NH₂), d'un atome d'hydrogène articulé autour d'un atome de carbone asymétrique (C α) dans sa conformation R et d'une chaîne latérale (R) qui différencie les acides aminés.

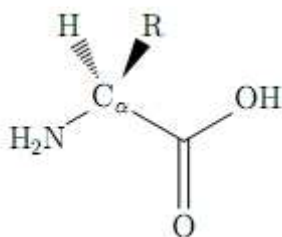


Figure 1.1 : Représentation générique des acides aminés (sauf la proline, de forme cyclique)

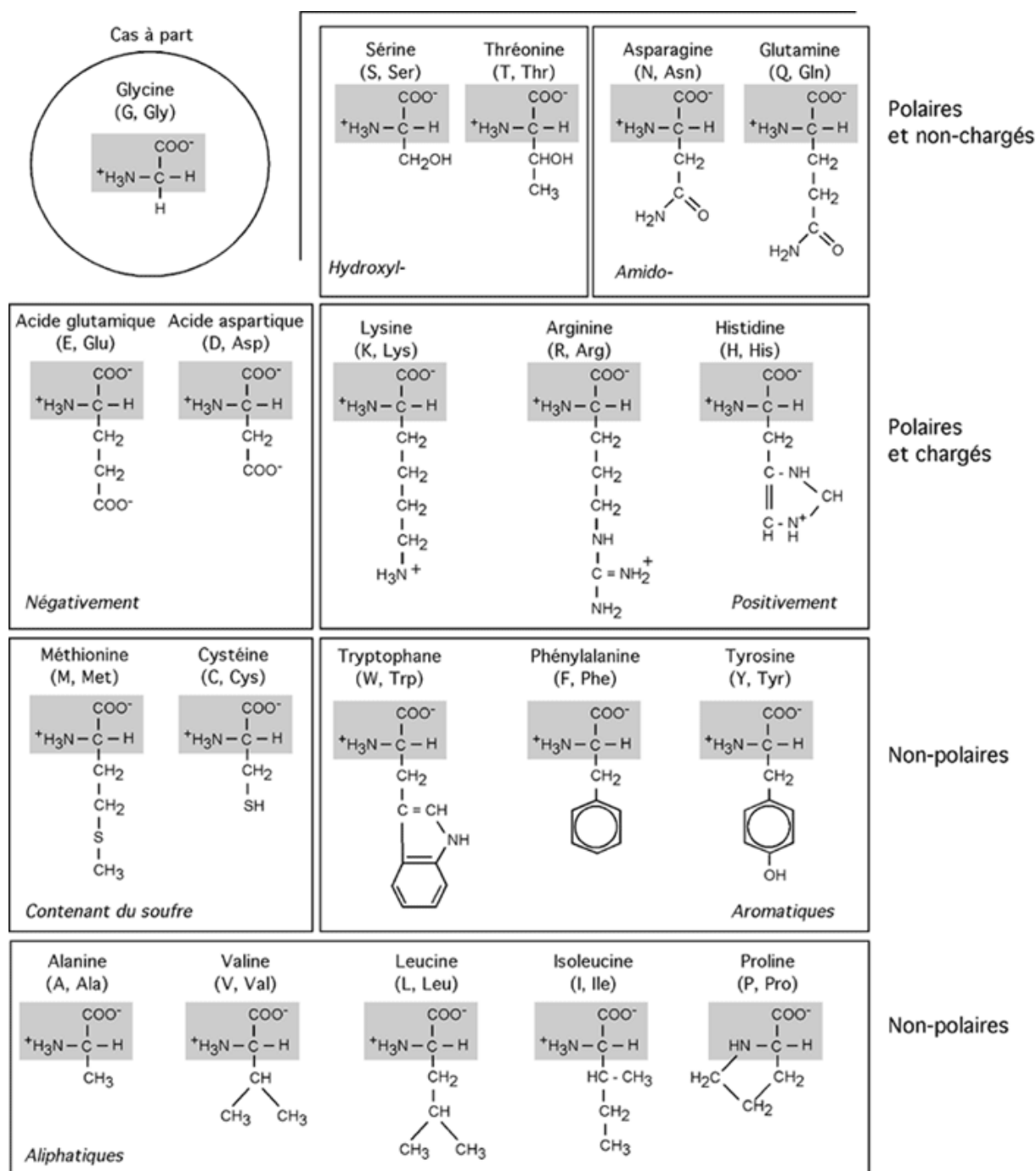


Figure 1-2 : Les 20 acides aminés naturels avec pour chacun l'abréviation biochimique en 3 lettres, le code et la formule semi-développée correspondante.

La condensation entre deux acides aminés d'une fonction amine et d'une fonction acide carboxylique forme un groupe amide, qui constitue la liaison peptidique (figure 1.3). La structure de cette liaison a été déterminée par Pauling, Corey et Branson par des mesures de diffraction aux rayons X¹. La liaison peptidique – CO – NH – est un hybride de résonnance

dans lequel les électrons du doublet de l'azote et les électrons π de la liaison C=O occupent la même orbitale délocalisée entre les atomes d'azote et d'oxygène.

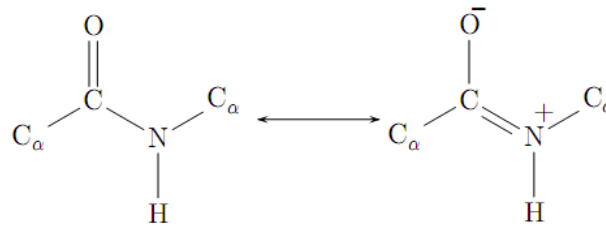


Figure 1-3 : Liaison peptidique avec sa forme mésomère

La liaison C – N a donc le caractère d'une double liaison partielle. Ainsi, la liaison peptidique est :

- Très stable
- Plane (les 6 atomes C α , C, O, N, H et C α sont coplanaires)
- Rigide : la rotation autour de la liaison C – N est impossible

La liaison peptidique s'établit par élimination d'une molécule d'eau entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement aminé de l'acide aminé voisin (figure 1.4)

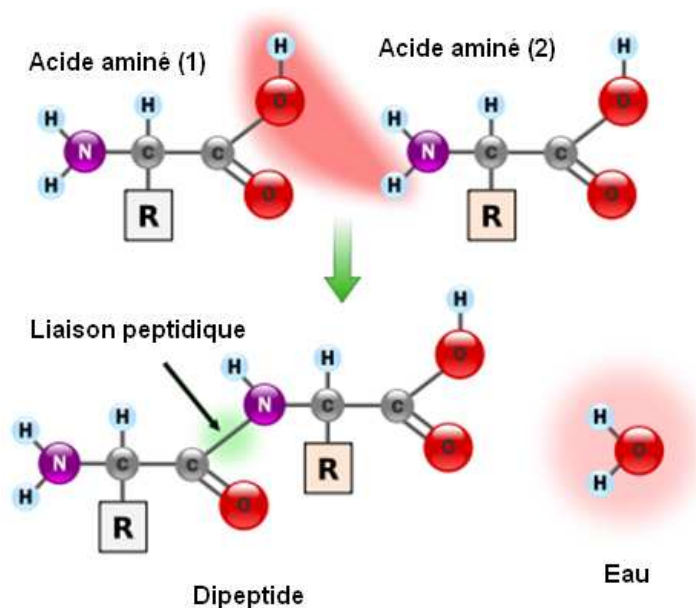


Figure 1-4 : Formation de la liaison peptidique

De proche en proche se crée un polymère d'acide aminé, autrement dit un polypeptide. Suite à la condensation, un acide aminé dans un peptide est privé d'un atome d'hydrogène sur sa fonction amine et/ou d'un groupe alcool sur sa fonction acide, on parle alors de résidu. Le résidu dont le groupe amine n'est pas engagé dans une liaison peptidique est dit N-terminal ou (N-ter). L'autre extrémité est dite C-terminale ou (C-ter) (figure 1.5).

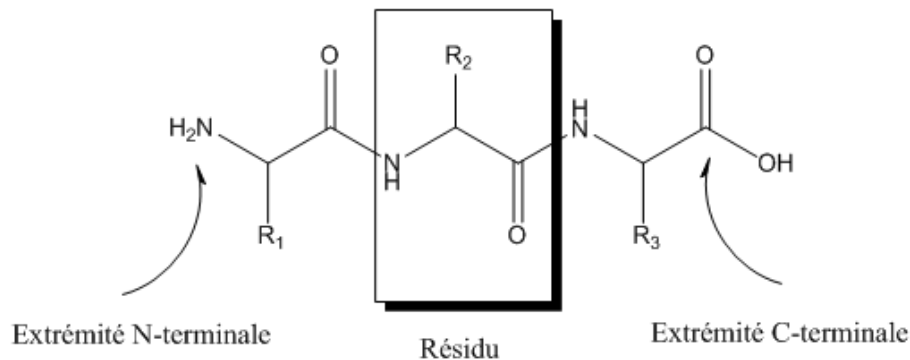


Figure 1-5 : Résidus d'un tripeptide avec les extrémités N-terminale et C-terminale.

1.4. Structure des protéines

Les protéines sont constituées d'acides aminés liés de façon covalente, plus précisément des liaisons peptidiques, mais dont les relations non covalentes permettent entre autres des repliements des chaînes d'acides aminés et des arrangements tridimensionnels. On distingue ainsi les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire

1.4.1. La structure primaire

La structure primaire, ou séquence, d'une protéine correspond à la succession linéaire des acides aminés (ou résidus) la constituant. Les protéines sont donc des polymères d'acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. La séquence primaire d'une protéine a un sens bien défini ou polarité. Le premier acide aminé de la séquence de la protéine est par convention celui qui possède une extrémité amine libre, on parle d'extrémité N-terminale ou de N-terminal. De manière symétrique le dernier acide aminé est celui qui possède une extrémité carboxylate libre, on parle de C-terminal.

Exemple d'une séquence d'acide aminé, l' α -lactalbumine humaine (figure 1.6):

MRFFVPLFLVGLFPAILAKQFTKCELSQLLKDIDGYGGIALPELICTMFHTSGYDTQAI
VENNESTEYGLFQISNKLWCKSSQVPQSRNICDISCDKFLDDDITDDIMCAKKILDIKG
IDYWLAHKALCTEKLQWLCEKL

Figure 1-6 : Séquence primaire de l' α -lactalbumine humaine (Structure extraite de la base de donnée Uniprot)

1.4.2. La structure secondaire

Cette structure a été découverte en 1951 par Pauling, Corey et Branson¹⁻³. Bien que la liaison peptidique soit rigide et plane, deux liaisons peptidiques consécutives peuvent pivoter autour du C_α commun, dans la limite des contraintes sphériques.

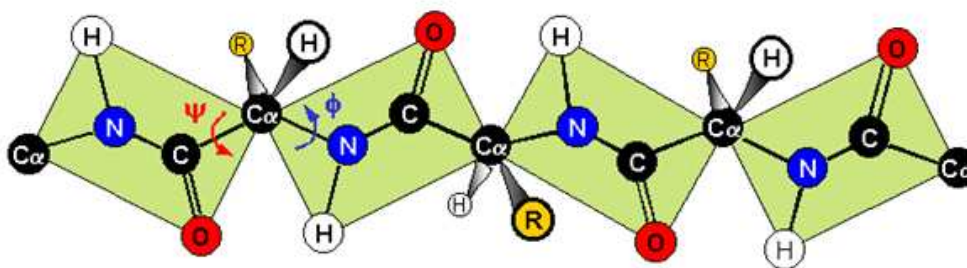


Figure 1-7 : Une fraction d'une chaîne polypeptidique montrant les possibilités de libre rotation de chaque unité peptidique. Les seules possibilités de mouvement permises sont les rotations autour de la liaison $C_\alpha - N$ (Φ) et de la liaison $C_\alpha - C$ (Ψ). D'après <http://cmgm.stanford.edu>

Par convention, l'angle de rotation autour de la liaison $C_\alpha - N$ est désigné par la lettre Φ (phi) et l'angle de rotation autour de la liaison $C_\alpha - C$ par la lettre Ψ (psy). Le plan de référence est celui passant par N, C_α et C de $C=O$. La valeur absolue de l'angle est comprise entre 0 et 180°, le signe est négatif si la rotation a lieu dans le sens des aiguilles d'une montre et positif dans le cas contraire. Les angles Φ et Ψ définissent les positions relatives des deux liaisons peptidiques autour du carbone α commun. Pour des raisons stériques la plupart des valeurs de Φ et Ψ ne sont pas permises. Celles qui sont autorisées déterminent les structures secondaires des protéines.

Les valeurs permises pour ces deux angles peuvent être visualisées en un diagramme 2D appelé Ramachandran⁴. Les zones autorisées représentent les différentes structures secondaires de la protéine. Comme le laisse apparaître le diagramme, les deux structures secondaires les plus importantes sont les hélices α droite et les feuillets β (figure 1.8).

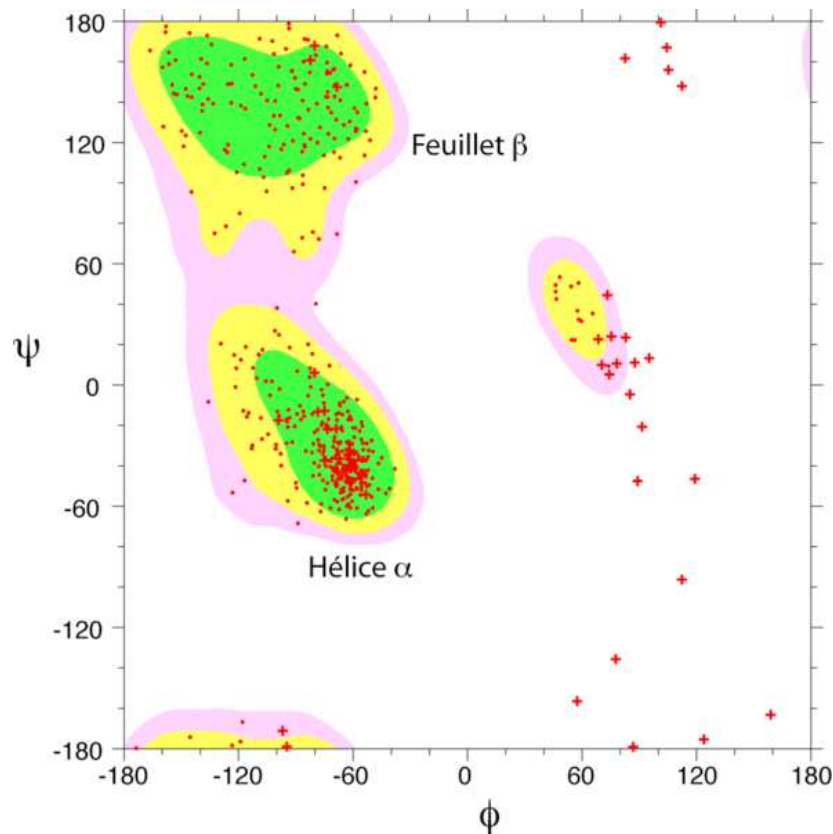


Figure 1-8 : Une représentation de Ramachandran (du nom de son inventeur) qui montre les valeurs Φ et Ψ stériquement permises. Les régions où les angles Φ et Ψ sont « normalement autorisés » sont ombrées en jaune et vert, tandis que les régions ombrées en rose correspondent à des conformations qui ont des distances de van der Waals « limites ». D'après Richardson J.S. 1981⁵.

✓ L'hélice α (figure 1.9)

L'hélice α s'élève de 0,15nm par résidu et de 0,54nm à chaque tour⁶. Elle compte 3,6 résidus par tour.

Elle est stabilisée dans sa forme hélicoïdale par des ponts hydrogène établis entre l'hydrogène d'un groupement aminé -NH et l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O et situé quatre résidus plus loin. Une telle hélice peut facilement avoir une nature amphipathique

si les chaînes latérales se trouvant toutes du même côté ont une nature hydrophile et que celles se trouvant de l'autre côté ont une nature hydrophobe. Pour chaque résidu, l'angle Φ vaut approximativement -57° et l'angle Ψ -47° . Toutes les liaisons hydrogène dans une hélice α sont quasiment alignées avec une même orientation le long de l'axe de l'hélice.

Étant donné qu'il y a 3,6 résidus par tour, les chaînes latérales auront tendance à être alternativement hydrophobes ou hydrophiles avec une périodicité de 3 à 4 résidus. Cette tendance est parfois visible dans la séquence des acides aminés, mais elle n'est pas suffisante pour permettre une prédiction fiable parce que des résidus qui font face à la solution peuvent parfois être hydrophobes et il arrive que des hélices α soient complètement enfouies à l'intérieur de la protéine ou au contraire complètement exposées.

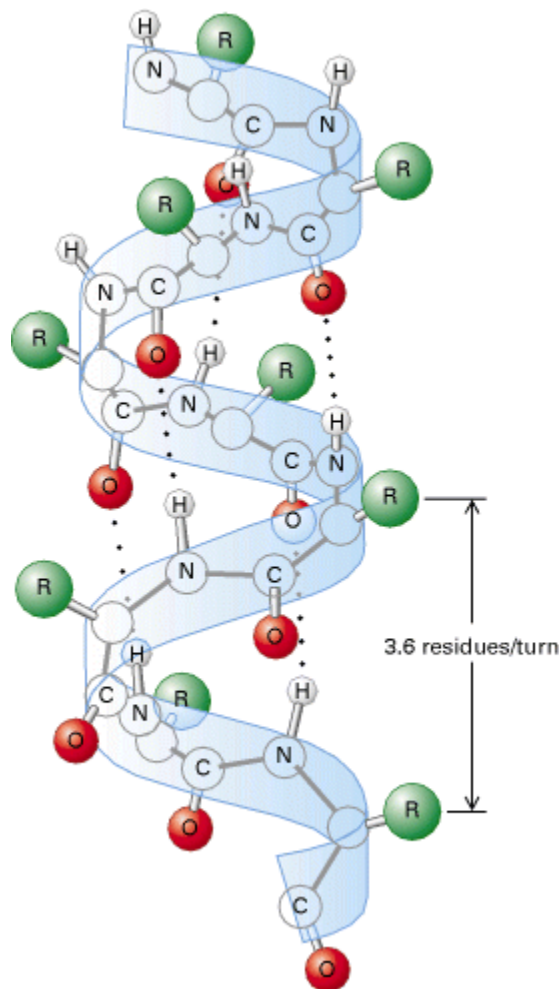


Figure 1-9 : Représentation schématique d'une hélice α droite. Les chaînes latérales sont représentées en vert. Les liaisons hydrogènes sont en pointillés noirs. D'après www.chusa.jussieu.fr

✓ L'hélice 3_{10}

L'hélice 3_{10} se caractérise par la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement $-CO$ d'un résidu i et le groupement $-NH$ d'un résidu $i+3$. Un pas d'hélice 3_{10} moyen contient 3 résidus et mesure 0,60 nm, soit une translation de 0,2 nm par résidu. Les angles dièdres ϕ et ψ des liaisons peptidiques sont en moyenne de $-49,0^\circ$ et $-26,0^\circ$. Le tour d'hélice 3_{10} est donc plus étroit et plus contraint que celui de l'hélice α . Ce type de conformation est peu fréquent et sa longueur dépasse rarement 1 à 2 tours.

✓ L'hélice π

L'hélice π se caractérise par la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement CO d'un résidu i et le groupement NH d'un résidu $i+5$. Un pas d'hélice π moyen contient 4 résidus et mesure 0,50 nm, soit une translation de 0,11 nm par résidu. Les angles dièdres ϕ et ψ des liaisons peptidiques sont en moyenne de $-57,1^\circ$ et $-69,7^\circ$. Le tour d'hélice π est donc plus large que celui de l'hélice α . Ce type de conformation est très rare.

✓ L'hélice de type II

Les hélices de type II sont des hélices gauches formées par des polyglycines ou des polyprolines. Un pas moyen d'hélice de type II contient 3 résidus et mesure 0,93 nm, soit une translation de 0,31 nm par résidu. Les angles dièdres ϕ et ψ des liaisons peptidiques sont en moyenne de $-79,0^\circ$ et $+145,0^\circ$.

✓ Le feuillet β

Le feuillet β est le deuxième élément de structure dominant des protéines globulaires. Cette structure résulte de la combinaison de plusieurs régions, les brins β , d'une chaîne polypeptidique alors que l'hélice α est constituée d'une seule région continue. Les brins β , en général longs de 5 à 10 résidus, sont dans une conformation presque totalement étirée avec des angles Φ et Ψ dont les valeurs se trouvent dans la zone du cadran supérieur gauche du diagramme de Ramachandran qui correspond globalement aux valeurs permises pour cette structure (figure 1-8). Ces brins β sont alignés les uns à côté des autres (figure 1-10) de telle

sorte que des liaisons hydrogène peuvent se former entre les groupements C=O d'un brin β et les groupements NH du brin β adjacent et réciproquement.

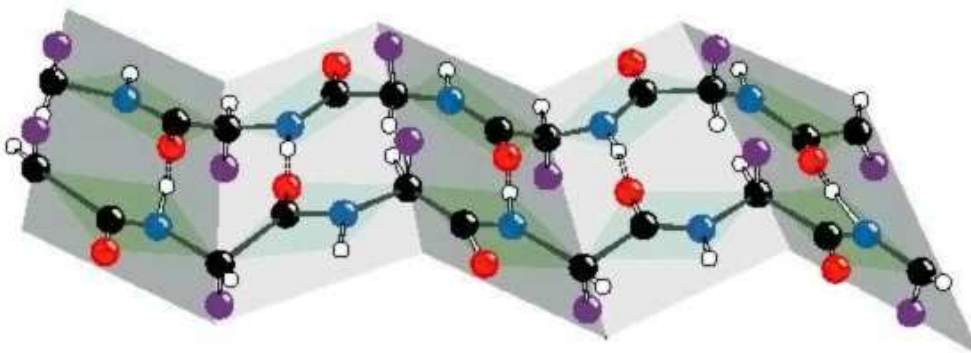


Figure 1-10 : Représentation schématique d'un feuillet β antiparallèle. D'après <http://cmgm.stanford.edu>

Les feuillets β qui sont formés à partir de plusieurs brins β sont plissés, et leurs atomes C α sont successivement positionnés un peu au-dessus et au-dessous du plan du feuillet β . Les chaînes latérales suivent cet arrangement général de sorte que les chaînes latérales d'un brin β pointent alternativement au-dessus et au-dessous du feuillet β .

Les brins β peuvent interagir de deux façons pour former un feuillet plissé. Quand les acides aminés dans les brins alignés sont orientés dans la même direction, de l'extrémité amino-terminale vers l'extrémité carboxy-terminale, on parle de feuillet parallèle. Quand les acides aminés dans les brins successifs ont des directions opposées, on parle dans ce cas de feuillet antiparallèle. Dans chacune de ces deux formes, les liaisons hydrogène ont une disposition particulière. Les feuillets β antiparallèles (figure 1-11 (a)) ont des paires de liaisons hydrogène très rapprochées qui alternent avec des paires plus largement espacées. Les feuillets β parallèles (figure 1-11 (b)) ont des liaisons hydrogène régulièrement espacées, mais qui forment un angle avec les atomes des groupements reliés. Dans les deux types de feuillets β , tous les CO et NH des brins internes sont engagés dans des liaisons hydrogène, ce qui n'est pas le cas pour les brins se trouvant aux bords du feuillet β et qui n'ont donc qu'un seul brin avoisinant.

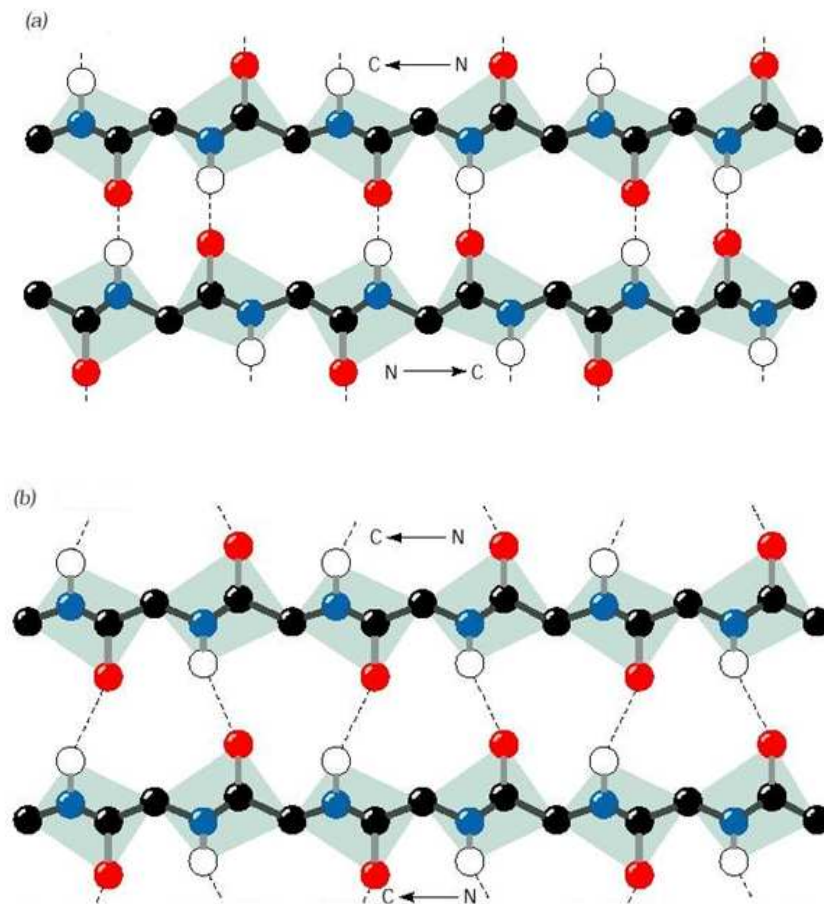


Figure 1-11 : Deux types de feuillets β (a) antiparallèle et (b) parallèle. D'après <http://cmgm.stanford.edu>

✓ Le coude β ou tour β

Le motif le plus simple impliquant des brins β est constitué de deux brins antiparallèles adjacents reliés par une boucle. Ce motif fréquemment observé est également dénommé motif en épingle à cheveux. Il est présent dans la plupart des structures β antiparallèles sous forme de ruban isolé ou en tant que partie de feuillet β plus complexe. La longueur de la boucle entre deux brins β est variable, elle comprend en général 2 à 5 résidus. On ne connaît pas de fonction spécifique associée à ce motif. Dans cette structure, la chaîne polypeptidique forme une boucle serrée par une ou deux liaisons hydrogène qui se forment entre le premier et le dernier résidu du coude (figure 1-12). Cette liaison hydrogène contribue à la stabilité du coude β .

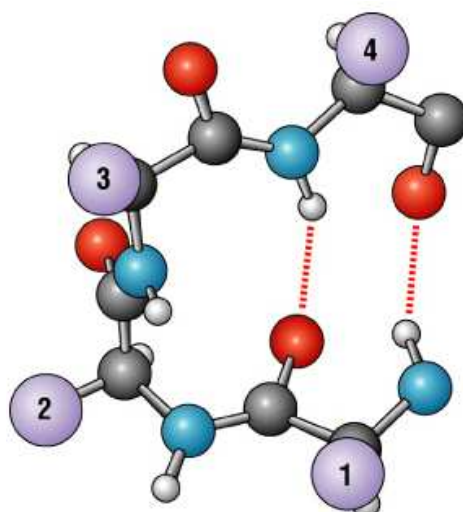


Figure 1-12 : Représentation schématique d'un coude β . Les atomes de carbone sont en gris, d'hydrogène en blanc, d'oxygène en rouge et d'azote en bleu. Les chaînes latérales sont représentées en mauve. Les liaisons hydrogènes sont en pointillés rouges. D'après <http://cmgm.stanford.edu>

1.4.3. La structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine fait référence à l'organisation dans l'espace de ses structures secondaires (figure 1.13). La structure tridimensionnelle adoptée par tous ces feuillets et toutes ces hélices est la structure tertiaire de la protéine. Plusieurs interactions entre différents résidus de la chaîne polypeptidique repliée dans l'espace maintiennent la structure de la protéine. On retrouve des interactions électrostatiques (charge-charge, charge-dipôle, liaison hydrogène), hydrophobes (groupements cycliques de la phénylalanine et de la tyrosine), des forces de Van Der Walls et des ponts disulfures. Ce repliement global donne à la protéine sa forme finale et son activité biologique. Cependant, pour certaines protéines, la structure quaternaire est nécessaire pour son activité.

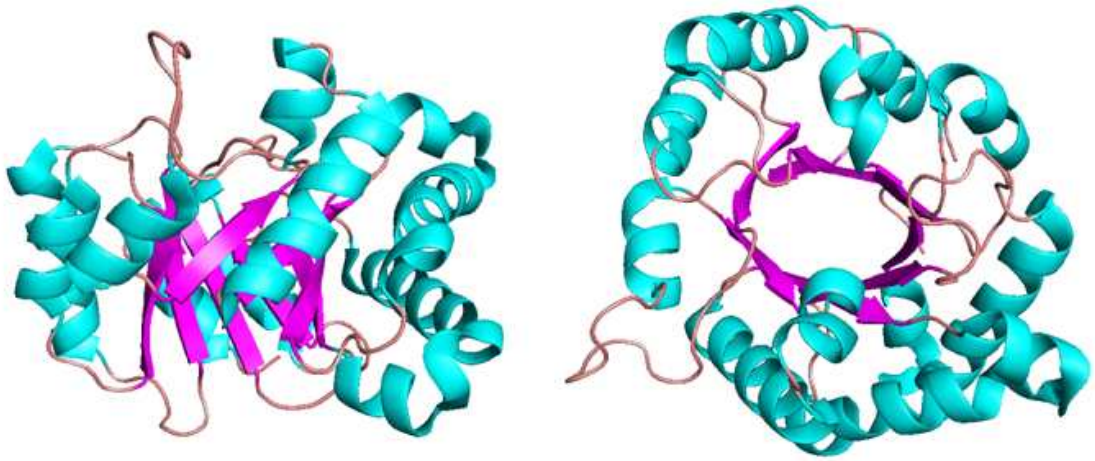


Figure 1-13 : Structure tertiaire de la chaîne A de la triose phosphate isomérase de la levure. Les hélices α sont représentées en hélices de couleur bleue, les feuillets β en flèches roses (d'après le logiciel RASMOL, figure de la PDB référencée 1tim).

1.4.4. La structure quaternaire

Cette structure ne concerne que les protéines qui sont constituées d'un certain nombre de sous-unités protéiques. Cet assemblage implique des interactions entre les parties externes de ces sous-entités protéiques par l'intermédiaire de liaisons ioniques et d'interactions hydrophobes (de van der Waals). Il n'est pas toujours possible pour une protéine de se replier sur elle-même de manière à ce que les groupes hydrophobes soient tous localisés en son centre. Certains parmi ces groupes hydrophobes se retrouvent parfois à la surface de la protéine. Si, à cet endroit, il y a apparition d'une petite aire hydrophobe, on peut logiquement imaginer qu'il doit être plus avantageux pour deux mêmes sous-unités protéiques de s'assembler en dimère, en permettant ainsi aux deux aires hydrophobes de se faire face. Ainsi, l'enzyme triose phosphate isomérase de la levure est constituée de deux chaînes A et B de deux molécules d'acide 2-phosphoglycolique comme représenté sur la figure 1-14.

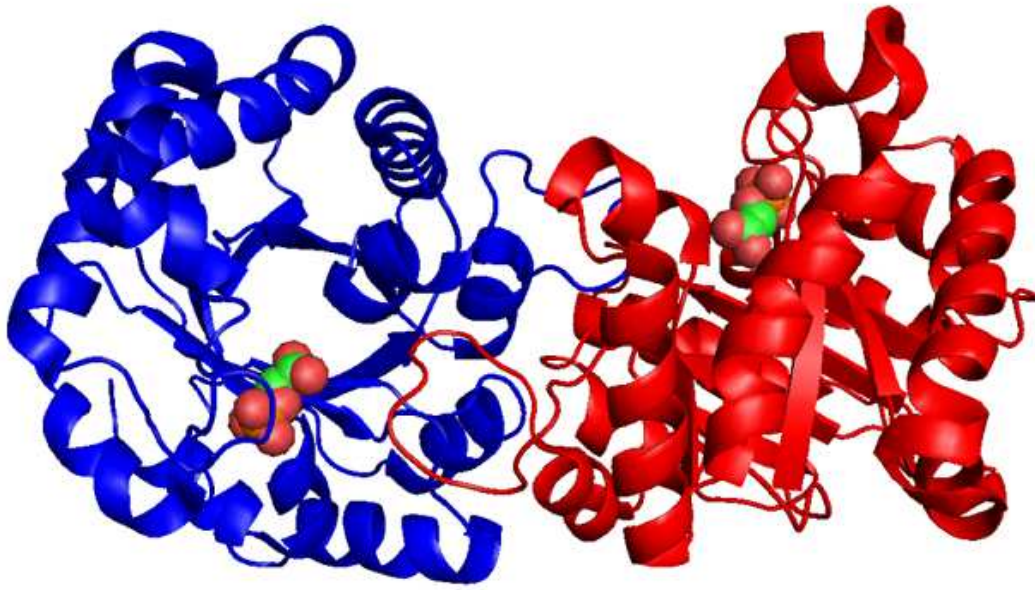


Figure 1-14 : Structure quaternaire de l'enzyme triose phosphate isomérase de la levure. La chaîne A est en bleu et la chaîne B en rouge. On aperçoit également deux molécules d'acide 2-phosphoglycolique ($C_2H_5O_6P$) (d'après le logiciel RASMOL, figure de la PDB référencée 1ypi)

1.5. Dénaturation des protéines globulaires

Les stabilités conformationnelles fragiles des protéines natives les rendent sensibles à la dénaturation par modification de l'équilibre des forces faibles non liantes qui maintiennent la conformation native. Quand on chauffe une protéine en solution, ses propriétés qui dépendent de la conformation, comme le pouvoir rotatoire, la viscosité, et l'absorption UV, changent brutalement dans une zone étroite de température (figure 1-15). Un changement aussi brutal ne peut s'expliquer que si la protéine native se déplie de façon coopérative : tout dépliement local de la structure déstabilise la structure restante, qui prend immédiatement une forme déroulée dite enroulement au hasard.

La température de demi-dénaturation est appelée température de fusion T_m de la protéine, par analogie avec la fusion d'un solide.

Outrent les températures élevées, des conditions variées et des substances diverses dénaturent les protéines :

- Les variations de pH modifient les états d'ionisation des chaînes latérales d'acides aminés, qui changent la répartition des charges de la protéine.
- Les détergents, dont certains perturbent les structures protéiques.

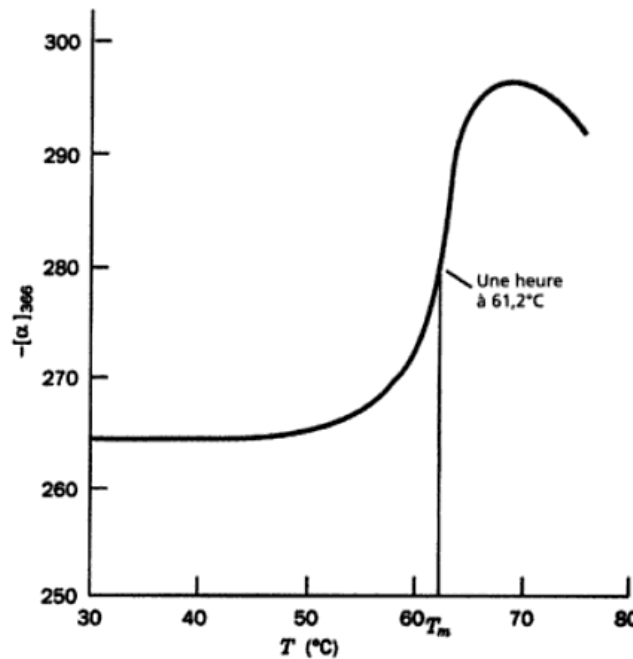


Figure 1-15 : Mesure de la rotation optique, à 366 nm, en fonction de la température de la ribonucléase A (RNase A) de pancréas de bœuf en solution dans un tampon de KCl 0,15M et de cacodylate de sodium 0,013M, pH 7. La température de fusion T_m est définie comme celle qui correspond au milieu de la transition. D'après Von Hippel. 1965⁷

- Des concentrations élevées de substances organiques solubles dans l'eau, comme les alcools aliphatiques. Les substances organiques ayant plusieurs groupes hydroxyles, comme l'éthylène glycol ou le saccharose, sont cependant de médiocres agents.
- L'influence des sels est plus aléatoire. La figure 1-16 montre les effets de plusieurs sels sur la T_m de la ribonucléase A de pancréas de bœuf. Certains sels, comme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et KH_2PO_4 , stabilisent la structure de la protéine native (la T_m augmente) ; d'autres, comme KCl et NaCl, ont peu d'effet ; alors que d'autres encore, comme KSCN et LiBr, la déstabilisent. L'ordre d'efficacité des différents ions pour stabiliser une protéine, correspond à leur capacité à précipiter les protéines. Cet ordre est appelé série d'Hofmeister⁸:

Anions : $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

Cations : $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

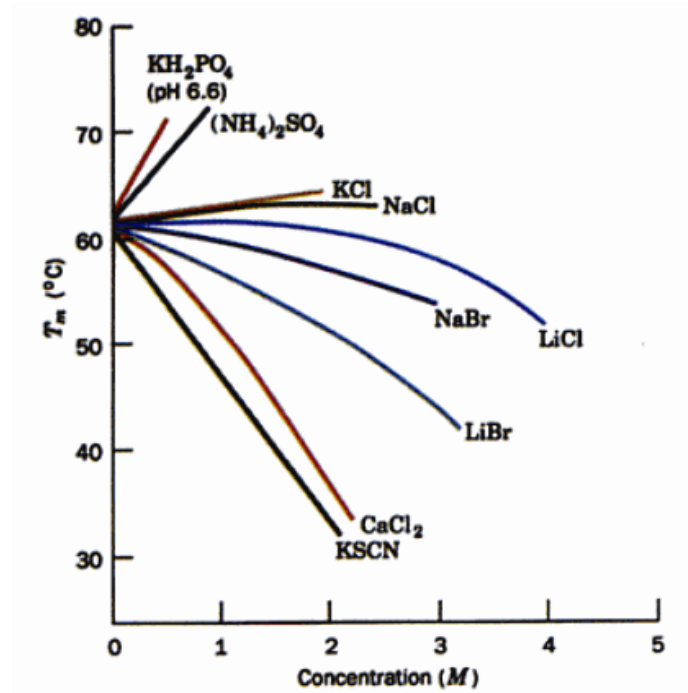
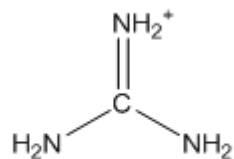
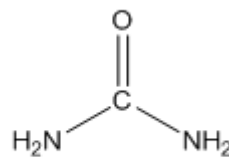


Figure 1-16 : La température de fusion de la RNase A en fonction des concentrations différentes en sels. Toutes les solutions contiennent aussi du KCl 0,15M et un tampon de cacodylate de sodium 0,013M, pH 7.

On peut ajouter à cette liste l'ion guanidinium et l'urée non ionique,



Ion guanidinium



Urée

qui, à des concentrations comprises entre 5 à 10M, sont les agents dénaturants de protéines les plus utilisés.

2. Généralités sur les membranes biologiques

2.1. Introduction

Les cellules contiennent plusieurs types de membranes. Toutes les cellules ont une membrane cytoplasmique, ou membrane plasmique, dont une des fonctions est de séparer le cytoplasme de son environnement. Dans les premiers temps de la Biochimie, on n'accordait à la membrane plasmique guère d'autres fonctions que celle de partition. Cette vision est devenue caduque, car il est maintenant admis que la membrane plasmique joue un rôle prépondérant dans un grand nombre de processus physiologiques puisqu'elle comporte la plupart des éléments essentiels aux échanges entre la cellule et son environnement. D'une part, la membrane plasmique est capable de se structurer pour participer activement à la signalisation intracellulaire nécessaire au maintien de la vie cellulaire ; d'autre part, les altérations auxquelles elle est soumise constituent sans doute autant de signaux de transfert intercellulaire d'informations biologiques.

En 1968 P. Bothorel et C. Lussan⁹ puis, en 1972, S.J. Singer et G.L. Nicolson¹⁰ ont proposé le modèle de la mosaïque fluide pour décrire la structure des membranes, modèle qui suggère que les membranes sont des structures dynamiques composées de protéines et de phospholipides (figure 1.17). Dans ce modèle, les phospholipides de la bicouche forment une matrice bidimensionnelle, fluide, se comportant comme un solvant des protéines membranaires. Singer et Nicolson ont défini deux classes de protéines membranaires. La première classe, celles des protéines périphériques, comprend les protéines qui ne pénètrent pas la bicouche de façon significative ; elles sont associées à la membrane par des interactions ioniques ou des liaisons hydrogène entre la surface de la membrane et la surface des protéines. Les protéines intrinsèques ont, au contraire, des surfaces hydrophobes qui peuvent facilement pénétrer dans la partie lipidique de la bicouche par interactions hydrophobes avec la partie non polaire des lipides. Le modèle de la mosaïque fluide sert aujourd'hui de support pour toutes les études de structure et fonction des membranes.

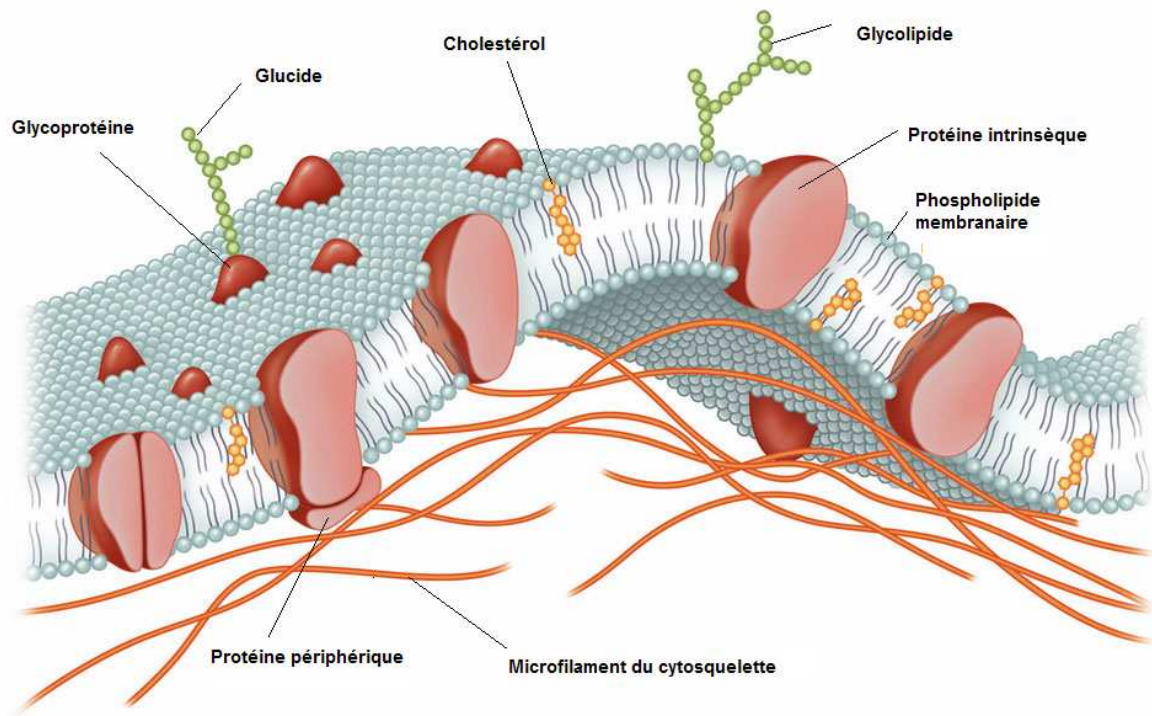


Figure 1-17 : *Modèle de mosaïque fluide proposé par S.J. Singer et G.L. Nicolson pour décrire les structures membranaires. Ce modèle suppose que les lipides et les protéines sont mobiles et qu'elles peuvent rapidement diffuser dans le plan latéral de la membrane. Un mouvement transversal de ces molécules est possible, mais il est beaucoup plus lent.*

2.2. Principaux lipides de la membrane plasmique

Les lipides des membranes plasmiques appartiennent principalement au groupe des glycérophospholipides. On y trouve également des sphingolipides et du cholestérol en quantités variables selon les types cellulaires. L'ensemble des lipides intervient en général pour quelque 50% dans la composition chimique globale des membranes, le reste étant constitué de protéines.

Tous les phospholipides sont constitués d'un glycérol phosphorylé (un acide phosphatidique), auquel sont ajoutés d'un côté deux "queues" hydrophobes d'acides gras et de l'autre une "tête" hydrophile. L'ensemble constitue une structure dite amphiphile avec une partie polaire et une partie apolaire.

En milieu aqueux les phospholipides s'organisent automatiquement en micelles ou en bicouche. Cette organisation permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes, tournées vers l'intérieur, et les parties hydrophiles, tournées vers l'extérieur. Les

lipides constituent donc le cœur de la membrane et les bicouches phospholipidiques constituent une barrière stable entre deux compartiments aqueux et sont la trame fondamentale de toutes les membranes biologiques.

La nature des "têtes" et des "queues" est éminemment variable. Les têtes que l'on trouve le plus souvent sont la choline, l'éthanolamine, la sérine et l'inositol. Les phospholipides formés sur cette base formeront respectivement les groupes de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphoéthanolamine (PE), de la phosphosérine (PS) et du phosphatidylinositol (PI) (figure 1-18).

La composition d'une membrane en lipides varie selon l'origine de la membrane (tableau 1-1) ; les phospholipides sont néanmoins les composants majeurs ; parmi eux, la PC est l'un des plus abondants dans les membranes lipidiques.

Origine/position	PC	PE + PS	SM	Cholestérol
<i>Érythrocyte</i>	21	29	21	26
<i>Myéline</i>	16	37	13	34
<i>E. Coli</i>	0	85	0	0
<i>Réticulum endoplasmique</i>	54	26	5	7
<i>Golgi</i>	45	20	13	13
<i>Mitochondrie (membrane interne)</i>	45	45	2	7
<i>Mitochondrie (membrane externe)</i>	34	46	2	11

Tableau 1-1 : Composition lipidique de différentes membranes (en % de la quantité totale de lipides). PE, PS, PC : phosphatidyl éthanolamine, sérine, choline ; SM : Sphingomyéline¹¹

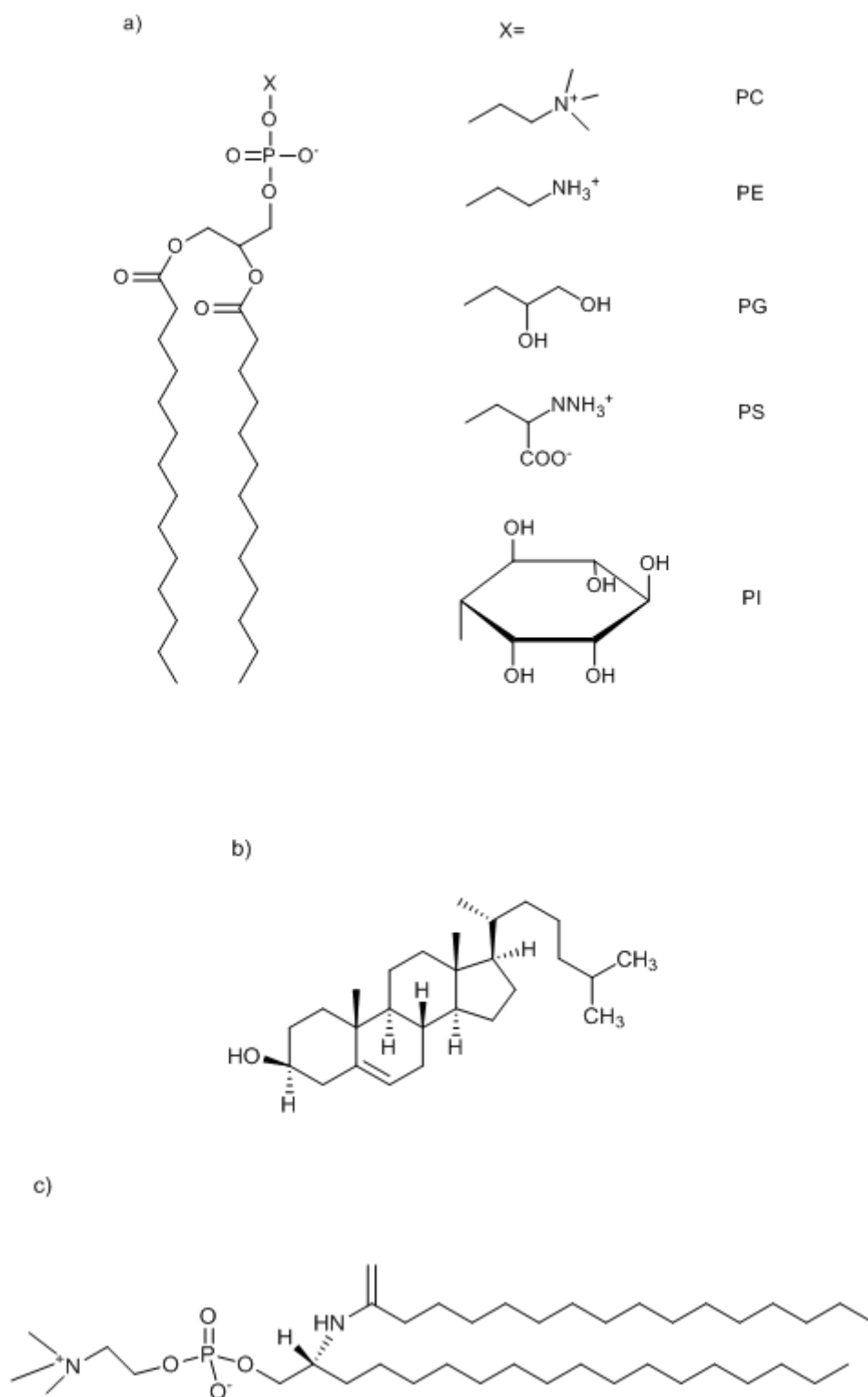


Figure 1-18 : Structure de quelques lipides membranaires a) 1,2 dimyristoyl phospholipide : phosphatidyl choline PC, -Ethanolamine PE, -Glycérol PG, -Sérine PS et -inositol PI b) Cholestérol et c) Sphingomyéline

Nous venons de voir que les phospholipides constituent la classe lipidique qui domine l'ensemble dans les membranes plasmiques. Nous verrons plus loin que dans le *stratum corneum*, la composition lipidique est largement dominée par les sphingolipides et les stéroïdes.

2.3. Rôle des membranes biologiques

Rôle de barrière de perméabilité. La double couche phospholipidique de la membrane sépare la cellule de l'extérieur, constituant ce qu'on appelle une barrière de perméabilité. Elle empêche la pénétration des molécules étrangères ou inutiles et la sortie des constituants intracellulaires. La membrane est orientée et maintient les différences de composition entre l'extérieur et l'intérieur. Par exemple, le contenu intracellulaire est riche en ions K^+ tandis que les liquides extracellulaires contiennent surtout Na^+ . Il y a très peu de diffusion spontanée des ions ou d'autres molécules à travers la double couche lipidique. Le passage des ions et des autres molécules est réalisé par des protéines intégrales spécifiques jouant le rôle de transporteurs. Certains permettent un transport passif, c'est-à-dire commandé par un gradient de concentration et correspond à des canaux. D'autres assurent un transport actif, contre un gradient de concentration et nécessitent une source d'énergie. On les appelle, de manière imagée, des pompes.

Rôle structural. Bien que la membrane soit déformable, elle présente un moyen de défense de l'intégrité cellulaire, surtout grâce au cadre et au support que lui offre le cytosquelette.

Rôle de reconnaissance entre cellules et avec les tissus conjonctifs environnants. Les glycoprotéines qui tapissent l'extérieur des membranes fournissent des signaux aux cellules voisines. Ainsi, les diverses cellules peuvent s'associer en tissus et en organes.

Rôle de support pour les récepteurs. La membrane sert de support aux récepteurs spécifiques de nombreux types de molécules, en particulier d'hormones. Ces récepteurs servent ainsi au contrôle de l'activité cellulaire par les hormones.

Rôle de support d'enzymes. Quelques enzymes sont disposées sur la surface externe ou interne de la membrane plasmique, ce qui facilite leur action, en leur fournissant une grande surface de contact avec les molécules à transformer.

2.4. L'asymétrie de distribution des phospholipides

La distribution asymétrique des phospholipides entre les deux monocouches membranaires a été mise en évidence pour la première fois dans les membranes d'érythrocytes humains¹². Cette caractéristique a ensuite été admise pour être une règle pour toutes les membranes des cellules eucaryotes¹³. Ainsi, la PC et la SM se situent préférentiellement sur la couche externe de la membrane, tandis que les aminophospholipides, PE, PS, PI sont principalement localisés sur la couche interne de la membrane.

Le maintien de cette distribution semble crucial. Par exemple, les plaquettes activées en perdant leur asymétrie membranaire déclenchent les phénomènes de la coagulation sanguine¹⁴. Pour l'ensemble des cellules, l'exposition de la PS sur la couche externe de la membrane est considérée comme un signal d'élimination des cellules par les macrophages et le système réticulo-endothélial. Ainsi, les cellules détectées comme anormales peuvent disparaître sans dommage.

2.5. Les radeaux lipidiques ou « rafts »

Il a longtemps été admis que les lipides étaient mélangés au hasard dans chaque feuillet d'une bicouche. Des études récentes ont bousculé cette croyance de longue date. En effet, au sein de la membrane plasmique se forment des domaines particuliers correspondant à l'assemblage de sphingolipides et de cholestérol (figure 1-19). Ils constituent au sein de la membrane des plates-formes mobiles qui ont la faculté de sélectionner des protéines et de se regrouper en larges domaines à la surface membranaire. Ces microdomaines sont impliqués dans les voies de transport des protéines membranaires et de transduction de signal.

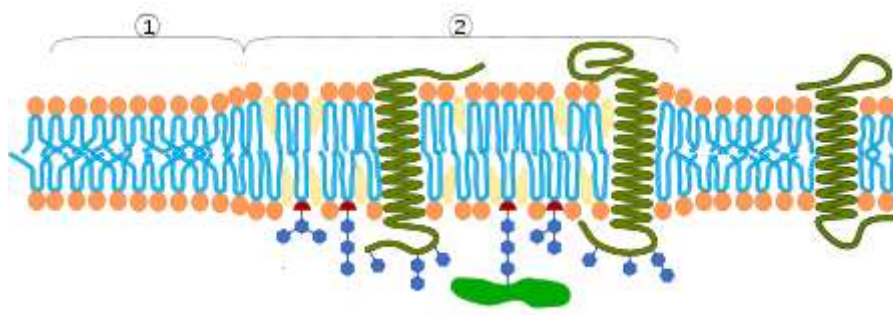


Figure 1-19 : Organisation lipidique en radeau. La région (1) est une bicouche lipidique standard, la région (2) est une organisation lipidique en « raft »

2.6. Cas du *stratum corneum*

2.6.1. *Structure de la peau et du stratum corneum*

La peau est constituée de différents tissus qui s'unissent pour accomplir des fonctions précises. Sur le plan structural, la peau est formée de deux parties principales (figure 1-20). La partie superficielle, la plus mince des deux, est composée de tissu épithélial et appelée épiderme. La partie la plus profonde et la plus épaisse est composée de tissu conjonctif et appelée derme. Elle surmonte la couche sous-cutanée, l'hypoderme, qui n'appartient pas à la peau proprement dite. Il est composé de tissu aréolaire et de tissu adipeux. Des fibres issues du derme unissent la peau à l'hypoderme et celui-ci se rattache à son tour aux tissus et aux organes sous-jacents. L'hypoderme sert de réserve de tissus adipeux et contient de gros vaisseaux sanguins qui irriguent la peau. Cette couche renferme aussi des terminaisons nerveuses appelées corpuscules lamelleux, qui sont sensibles à la pression.

La peau a une fonction de protection qui est avant tout liée au *stratum corneum*.

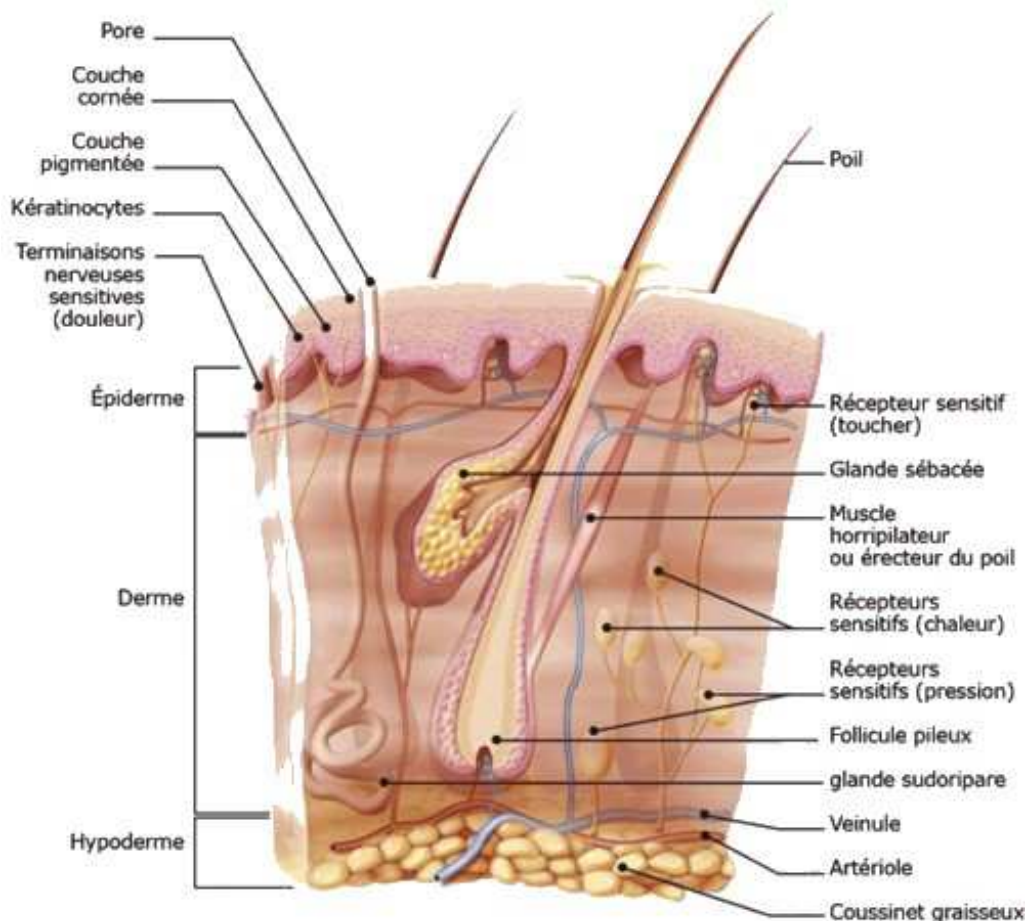


Figure 1-20 : Structure de la peau

Cette organisation en strates se retrouve au sein même de l'épiderme puisqu'il est, lui-même agencé en quatre couches qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle (figure 1-21) :

- La strate basale (SB)
- Le stratum spinosum (SS)
- Le stratum granulosum (SG)
- Le *stratum corneum* (SC)

C'est l'épiderme vivant : couche basale, stratum spinosum (SS), stratum granulosum (SG), qui est responsable de la formation et du renouvellement du *stratum corneum* (SC). Pendant leur différenciation et leur maturation, les kératinocytes synthétisent et expriment différents types de protéines de structure et différents lipides. L'étape finale de cette

différenciation, associée à de profonds changements de structure, donne naissance aux cornéocytes.

Les cornéocytes, éléments constitutifs du SC, sont des cellules mortes, plates, contenant de l'eau et de la kératine. L'enveloppe cornéocytaire est formée de protéines associées en couches denses autour des fibres de kératines. Une enveloppe lipidique est chimiquement liée à cette "membrane cellulaire" et forme une interface essentielle entre le milieu hydrophile des cornéocytes et les lipides extracellulaires non polaires. Enfin, les cornéodesmosomes, interconnexions entre les cornéocytes, jouent un rôle essentiel dans la cohésion du SC.

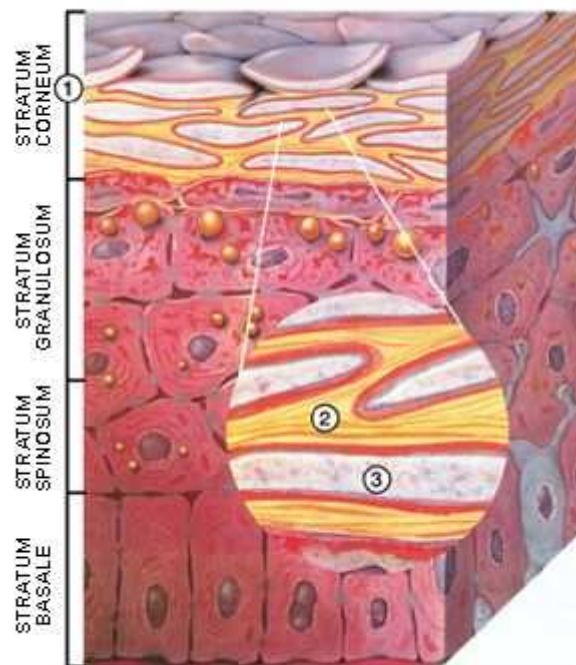


Figure 1-21 : Schéma des différentes couches de l'épiderme. ① Stratum corneum ② Phase lamellaire intercornéocytaire ③ Cornéocytes

2.6.2. Fonction du Stratum Corneum

Le SC est l'ultime frontière entre le milieu biologique et l'environnement. Il a donc une fonction essentielle pour notre organisme : la fonction de barrière. Son rôle est de protéger le corps contre l'infiltration de substances étrangères à l'organisme et d'empêcher la

perte de fluides comme le sang et l'eau. Il réduit ainsi la perte obligée en eau chez l'homme à un demi-litre environ. Sans SC, cette déperdition en eau serait théoriquement de 12 litres¹⁵.

L'opinion la plus répandue est que cette fonction de barrière sélective, semi-perméable est assurée par les lipides du SC. En effet, leur suppression par l'application de solvants organiques ou par l'utilisation de bandes adhésives (tape stripping) accroît le flux d'eau transépidermal¹⁷ ou la pénétration de molécules étrangères comme le mannitol¹⁸. D'autre part, cette délipidation artificielle du SC entraîne une accélération de la synthèse des lipides essentiels du SC si bien qu'en moins de 6 heures après le traitement, la fonction de barrière est rétablie¹⁹. Enfin, une restitution des lipides manquants du SC diminue nettement sa perméabilité¹⁹.

2.6.3. Les lipides du stratum corneum

C'est au niveau du SG qu'apparaissent dans les kératinocytes des corps lamellaires caractéristiques et essentiels pour la formation du SC. Ces corps lamellaires (ou corps d'Odland) contiennent pour majorité des lipides polaires et des enzymes nécessaires au transport de ces précurseurs des lipides intercornéocytaires. Il s'agit de glycosphingolipides, de stérols libres et de phospholipides. Lors de la différenciation kératinocytaire, à l'interface SG/SC les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes, et leur contenu est expulsé dans les espaces intercellulaires. Les lipides polaires sont alors enzymatiquement transformés en lipides non polaires et assemblés en structures lamellaires intercellulaires. Lors de ce processus, l'hydrolyse des glycolipides donne les céramides, alors que les phospholipides sont transformés en acides gras libres. C'est ce changement de composition lipidique qui donne naissance à l'organisation dense et imperméable du SC. Les lipides majoritaires du SC sont les céramides, le cholestérol et les acides gras libres.

Le tableau 1-2 rassemble les compositions lipidiques des feuillets intercellulaires dans le SC sain et psoriasique²¹. Ces valeurs doivent être considérées avec beaucoup de précautions. En effet, elles diffèrent non seulement avec la provenance du SC (personne ou région du corps)²² mais aussi avec la méthode d'extraction employée.

Lipides	%(massique) peaux saines	%(massique) peaux psoriasiques
Lipides polaires	5,6	4,8
Glycolipides	1,4	0,6
Céramides	18,8	24,8
Cholestérol	10,4	16,2
Acides gras libres	23,1	16,3
Triglycérides	33,4	23,4
Ester de stérols	5,4	3,9
squalène	1,9	1,0

Tableau 1-2 : *Composition lipidique en pourcentage massique des feuillets intercellulaires dans le stratum corneum sain et psoriasique. Les lipides le plus abondants sont indiqués en caractères gras.*

Par exemple, il a été montré que le taux en triglycérides du SC est presque nul²³. La surestimation de ces triglycérides par exemple celle visible dans le tableau 1-2 proviendrait d'une incision dans la couche sous-cutanée qui aurait eu lieu lors des étapes d'extractions²⁴.

Au niveau du SC, trois classes de lipides dominant : les céramides, les acides gras et le cholestérol.

✓ Les céramides

Ils représentent environ 25% de la masse totale lipidique du SC. Ce fort pourcentage contribue à rendre le SC unique parmi les systèmes biologiques. En effet, les céramides, bien que présents dans d'autres organes (intestin, cerveau) restent toujours minoritaires par rapport à l'ensemble des sphingolipides²⁵. La première classification et qui prévaut encore aujourd'hui, fut réalisée par Wertz et coll²⁶. Dans cette classification les céramides sont numérotés de 1 à 6 dans l'ordre de polarité croissante. En 1994, Robson et coll. Découvrent un nouveau céramide. Ils proposent alors de nommer et classer les céramides selon une nomenclature introduite par Motta et al. qui prend en compte cette fois-ci, leur structure moléculaire^{27, 28}. Les céramides sont constitués d'une longue chaîne d'amino-alcool, liée par une liaison amide à une longue chaîne d'acide gras. La nature de la base varie avec le

céramide : ce peut-être une chaîne sphingosine (identifiée par la lettre S dans la nomenclature de Motta et Robson), une chaîne hydroxysphingosine (identifiée par la lettre H) ou une chaîne phytosphingosine (identifiée par la lettre P). La chaîne d'acide gras peut-être hydroxylée en position α (identifiée par la lettre A), estérifiée en position ω (identifié par les lettres EO) ou enfin, non hydroxylée (identifié par la lettre N).

La composition du SC sain et psoriasique en céramides est rapportée dans le tableau 1-3²⁸ qui prend en compte les nomenclatures de Wertz et coll ainsi que Robson et coll.

Céramides	Peaux psoriasiques	Peaux saines
Cer[EOS] = Cer1	5,86%	9,45%
Cer[NS] = Cer2	35,41%	21,38%
Cer29 = Cer3	6,32%	18,51%
Cer[AS] = Cer4/5	33,76%	25,23%
Cer[AP] = Cer6I/6II	18,65%	25,43%

Tableau 1-3 : Composition en céramides du stratum corneum humain donnée en pourcentage massique selon Wertz et coll²⁶ ainsi que Robson et coll²⁸.

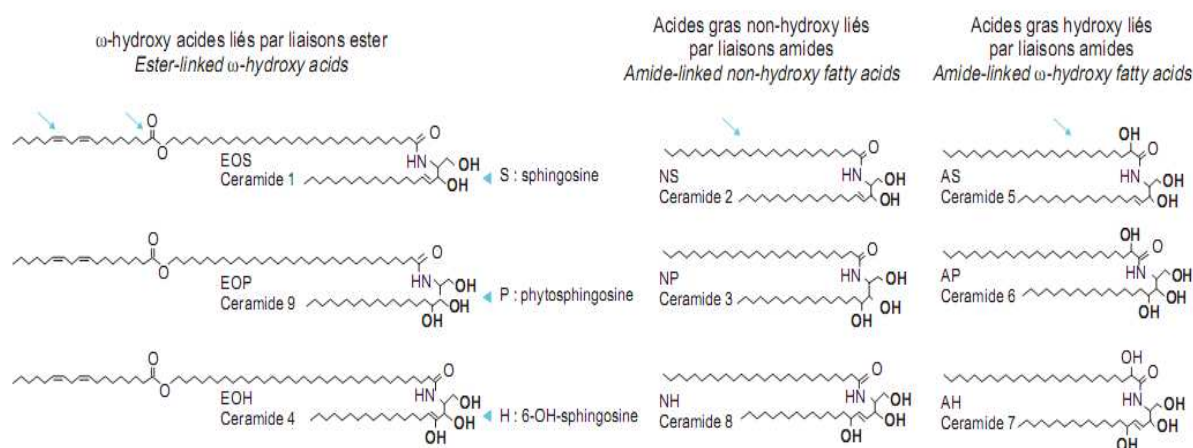


Figure 1-22 : Structure chimique et nom des céramides présents dans le stratum corneum humain.

En plus des sept classes de céramides identifiées, les longueurs et les saturations des chaînes varient. Pour exemple nous avons reporté dans le tableau 1-4 la composition en

pourcentages massiques des chaînes d'acides gras et de sphingosine trouvés dans le céramide 2 ou CER NS.

Base sphingosine	% massiques	Acides gras	% massiques
16 :1	3,1	16	2,0
16 :0	3,1	17	0,4
17 :1	3,1	18	11,4
17 :0	2,7	19	0,4
18 :1	10,9	20	2,8
18 :0	14,7	21	0,5
19 :1	6,6	22	6,9
19 :0	7,0	23	3,0
20 :1	3,1	24	36,5
20 :0	35,3	25	8,0
21 :1	2,7	26	21,7
21 :0	Traces	27	1,2
22 :1	Traces	28	4,0
22 :0	7,8	29	0,3

Tableau 1-4 : Composition en pourcentages massiques des chaînes de la base et de l'acide gras des céramides 2 ou NS dans le stratum corneum humain²⁶. Les acides gras les plus abondants sont indiqués en caractères gras.

Au vu des tableaux 1-2 et 1-3, il est clair que la composition du SC en céramides n'est pas simple et qu'elle englobe un nombre considérable de molécules de structures chimiques différentes. Cette diversité se retrouve également dans la composition en acides gras.

✓ Les acides gras

Les acides gras représentent environ 25% de la fraction lipidique massique du SC. Tout comme les céramides ils sont caractérisés par une grande diversité dans la longueur et le degré de saturation de leur chaîne aliphatique. La proportion de chacun d'entre eux dans le SC sain et psoriasique est indiquée dans le tableau 1-5.

Acides gras	Peau normale (% massique)	Peau psoriasique (% massique)
14 :0	1,11	0,84
16 :0	14,01	11,97
16:1(n-7)	2,34	3,85
18 :0	11,06	10,14
18 :1(n-9)	15,12	16,80
18 :2(n-6)	21,52	15,65
18 :3(n-6)	-	-
20 :0	1,58	1,75
20 :3(n-6)	1,46	1,42
20 :4(n-6)	6,22	5,00
22 :0	2,68	1,40
24 :0	10,00	4,17
24 :1(n-9)	-	4,27

Tableau 1-5 : Composition en pourcentages massiques des acides gras du stratum corneum sain et psoriasique³⁰. Les plus abondants sont indiqués en caractères gras.

Il existe des variations dans la composition en acides gras du SC avec la partie du corps étudiée. Toutefois, indépendamment de la région considérée, ce sont l'acide oléique (C18 :1), l'acide linoléique (18 :2), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) qui sont largement majoritaires³⁰.

✓ Le cholestérol (CH) et sulfate de cholestérol (CS)

Ce sont les stéroïdes que l'on trouve en plus grande quantité dans le SC. Ces deux molécules sont fortement dépendantes l'une de l'autre de par leur synthèse. En effet, le CH génère le CS et inversement selon la région du SC. C'est dans le SG tout d'abord que le CH est synthétisé à partir du contenu sécrété par les corps lamellaires³¹. La peau est d'ailleurs l'organe de notre corps qui synthétise la plus grande quantité massique de CH³². Au niveau du *stratum corneum* inférieur, le CH est sulfaté en CS par l'enzyme sulfotransférase stéroïde. Lors du passage du CS à travers les couches supérieures du stratum cornéum, où a lieu la desquamation, une partie du CS est hydrolysée en CH par l'enzyme sulfatase stéroïde³³. La structure chimique des deux stéroïdes est par conséquent très semblable (figure 1-23).

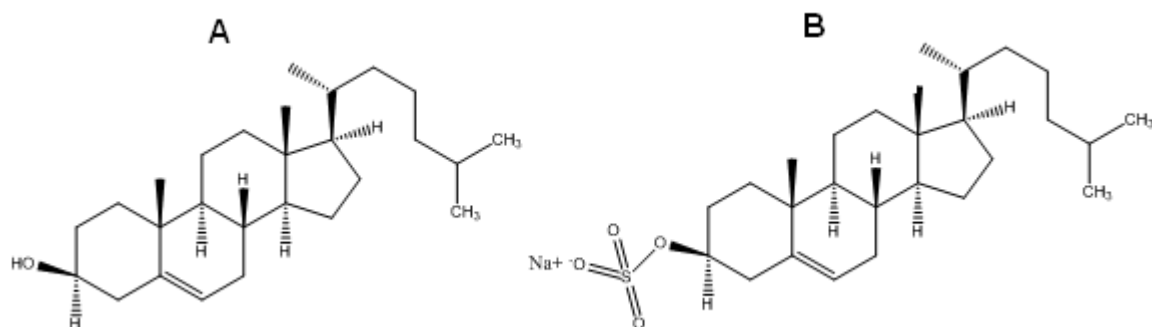


Figure 1-23 : Structure chimique du cholestérol (A) et du sulfate de cholestérol (B)

Tous deux possèdent en effet la même partie hydrophobe formée de 4 cycles aliphatiques en conformation chaise, mais leur partie polaire diffère : c'est un groupe chargé et fortement polaire, le groupe sulfate, qui remplace le groupe hydroxyle.

Le CH est connu depuis des années pour ses qualités de régulateur de la fluidité membranaire dans des systèmes modèles^{34, 35}. Il est essentiel au bon fonctionnement du SC puisque lorsque sa synthèse est artificiellement bloquée, la fonction barrière du SC est gravement affectée³⁶.

2.6.4. Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie de peau chronique caractérisée par l'apparition d'épaisses plaques de peau, rouges et sèches à différents endroits du corps. Environ 2 % de la population occidentale en serait affectée.

Le plus souvent sans gravité, le psoriasis peut cependant être très désagréable lorsque, par exemple, il se manifeste sur la paume des mains ou la plante du pied, ou même douloureux lorsqu'il se situe dans les plis des articulations. Certaines personnes peuvent être gênées par leur psoriasis, ce qui peut se répercuter négativement sur leurs rapports sociaux, personnels et affectifs.

✓ Caractéristiques

Le psoriasis se caractérise par une desquamation, un épaissement et une rougeur de la peau, souvent accompagnés de démangeaisons (figure 1-24). Les récives sont fréquentes

entre des rémissions de plus ou moins longue durée, et la guérison définitive exceptionnelle. Certaines formes étendues sur une grande proportion de la surface du corps présentent un caractère de plus grande gravité.

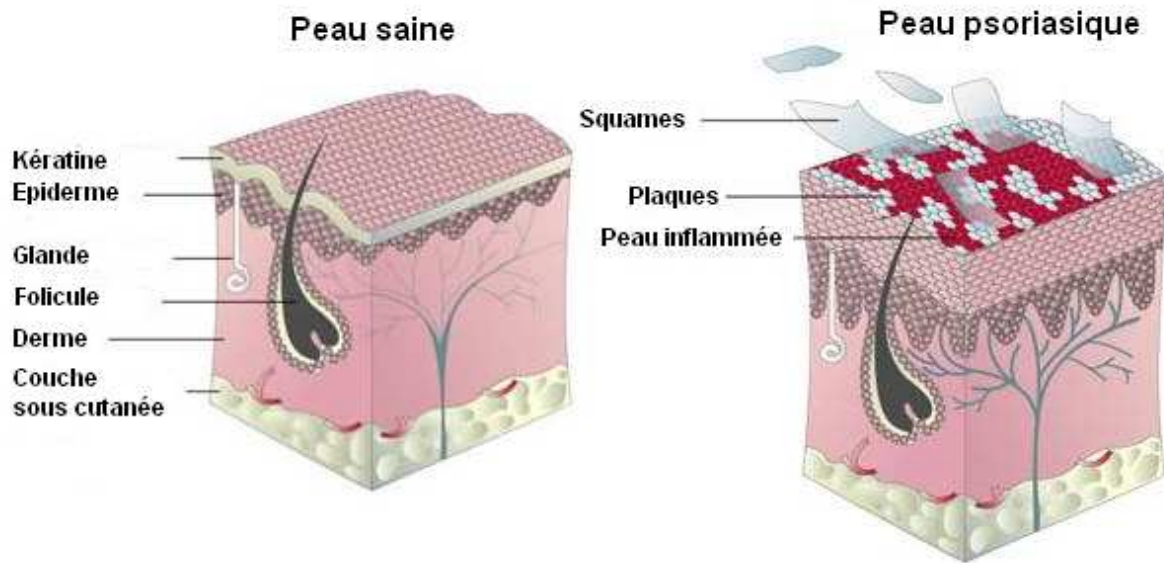


Figure 1-24 : Schéma comparatif d'une peau saine et d'une peau psoriasique.

L'épaississement de la peau et les squames sont dus à la multiplication excessive des kératinocytes, cellules de l'épiderme qui forment la couche superficielle kératinisée protectrice de la peau.

✓ Pathophysiologie du psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire caractérisée par l'accumulation de lymphocytes T activés dans l'épiderme et le derme stimulant l'hyperprolifération des kératinocytes. L'antigène qui déclenche le psoriasis est encore inconnu. Le déclenchement du psoriasis se fait en 3 étapes (figure 1-25)²⁰ :

Étape 1 : La cellule présentatrice d'antigène (APCs) située dans l'épiderme internalise l'antigène responsable du psoriasis, le dégrade par ses enzymes et le présente à sa surface. L'APCs ainsi activée se rend dans les nodules lymphatiques où elle interagit avec les lymphocytes T naïfs. Le résultat de cette interaction est la formation de lymphocytes T activés.

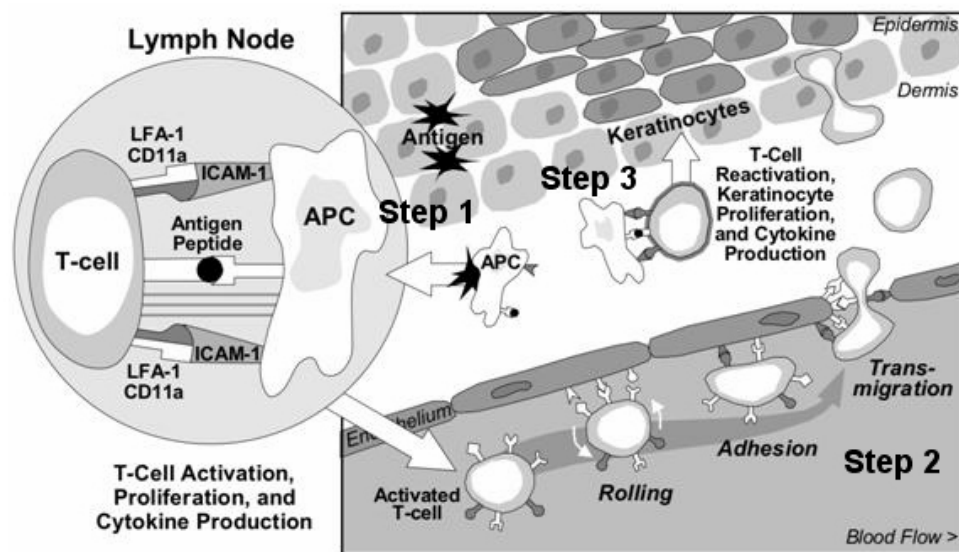


Figure 1-25 : Les trois étapes intervenant dans le déclenchement du psoriasis²⁰

Étape 2 : Les lymphocytes T activés passent alors dans la circulation sanguine et se lient aux cellules endothéliales. Les lymphocytes T activés migrent alors dans le derme et l'épiderme.

Étape 3 : Une réactivation des lymphocytes T par une deuxième exposition à l'antigène a lieu dans le derme ou l'épiderme. Les lymphocytes T réactivés sécrètent alors des cytokines qui vont engendrer la prolifération des kératinocytes.

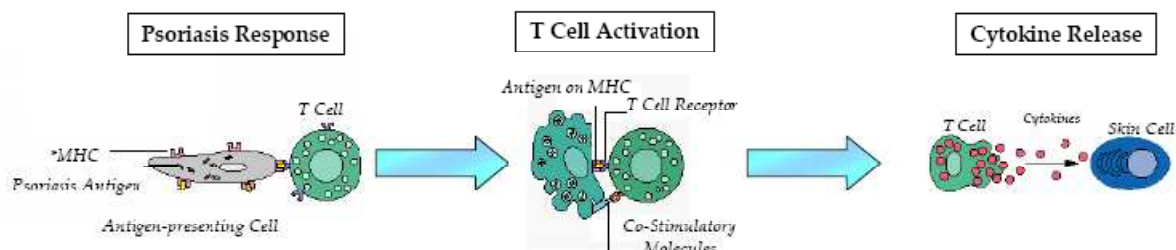


Figure 1-26 : Mécanisme de l'activation des cellules T responsables de l'apparition du psoriasis²⁰.

2.7. Cas de la muqueuse nasale

2.7.1. Structure des fosses nasales

Les fosses nasales font partie du système respiratoire. Elles s'étendent des narines jusqu'au pharynx (figure 1-27). Elles représentent une surface de 150 à 180 cm², pour un volume compris entre 15 et 19 ml. On distingue trois régions différentes :

- la zone vestibulaire, qui sert à filtrer les particules contenues dans l'air
- la zone respiratoire, richement vascularisée, qui est considérée comme la plus importante pour l'absorption des médicaments
- la zone olfactive, la plus petite, qui nous permet de sentir les odeurs et qui est capable de métaboliser les drogues

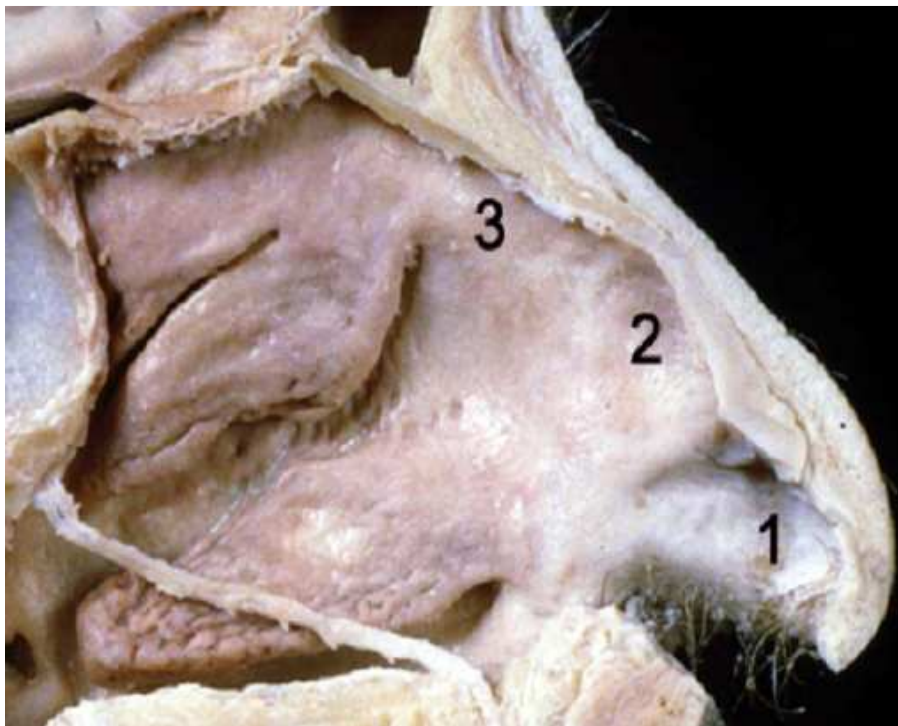


Figure 1-27 : Coupe longitudinale des fosses nasales. (1) zone vestibulaire, (2) zone olfactive, (3) zone respiratoire

Un mucus est sécrété par des cellules spécialisées et des glandes à mucus. Il recouvre les fosses nasales. Il est composé à 95% d'eau, contient diverses protéines et enzymes qui peuvent lier ou dégrader les médicaments administrés par cette voie. Son pH est compris entre

5 et 6,5. Le mucus de la zone olfactive est plus visqueux par rapport à celui de la zone respiratoire.

La zone respiratoire est composée principalement de trois types cellulaires : les cellules ciliées, les cellules sécrétrices de mucus et les cellules basales.

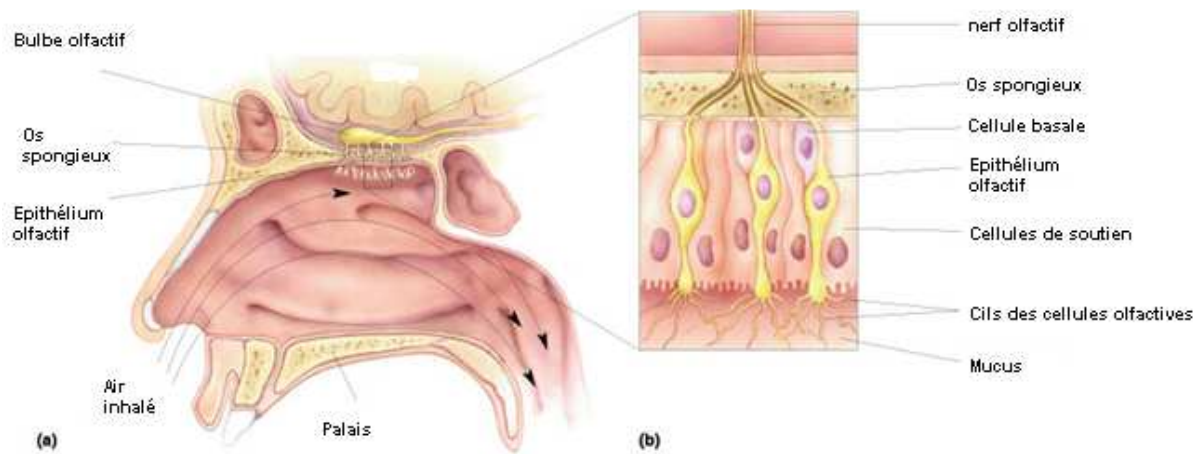


Figure 1-28 : (a) Localisation et (b) structure de l'épithélium olfactif. L'épithélium olfactif est constitué de cellules réceptrices, basales et les cellules ciliées. D'après <http://www.mpsycho.uqam.ca>

2.7.2. Fonction des différents types cellulaires

Les cellules basales se situent près de la matrice basale, qui est essentiellement constituée de collagène. Elles servent au renouvellement des cellules de la muqueuse nasale. Elles n'ont pas de jonctions étanches entre elles et baignent dans un fluide intercellulaire. Les cellules ciliées sont responsables de la clairance mucociliaire du milieu intranasal. Dans cette zone, le mucus est toujours en mouvement et remonte vers les poumons et la gorge. Les cellules ciliées des fosses nasales ont une bordure apicale composée de cils vibratiles qui permettent d'augmenter la surface d'échange de l'épithélium. Ces cils vibratiles permettent aussi de maintenir l'humidification et la température de l'air inspiré.

3. Généralités sur les promoteurs d'absorption membranaire

3.1. Introduction

La vectorisation, ou délivrance spécifique de principes actifs vers un organe, un tissu ou une cellule malade grâce à des transporteurs est un des défis majeurs de la recherche thérapeutique. En effet, de nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des barrières biologiques (charge, faible perméation, molécule de haut poids moléculaire...). Certains médicaments se heurtent aussi à des barrières enzymatiques entraînant leurs dégradations et/ou métabolisation rapides. La distribution de ces molécules actives vers les zones cibles malades peut donc être déficiente. De plus, une accumulation de molécules thérapeutiques dans les tissus sains peut entraîner une toxicité rédhibitoire, entraînant l'abandon du traitement malgré son efficacité.

Le développement de vecteurs de principes actifs connaît un essor considérable depuis une vingtaine d'années. Cette partie bibliographique résume les avancées dans ce domaine. Nous avons choisi de présenter plus particulièrement deux grandes familles de vecteurs que sont les systèmes matriciels et les vésicules, ayant fait l'objet de nombreuses études. Différentes voies d'administration de principes actifs formulés existent. Dans ce travail, nous avons privilégié deux voies d'administration : la voie nasale et la voie topique.

3.2. Les différentes voies d'administration

3.2.1. La voie locale

Elle concerne les médicaments topiques, c'est-à-dire ceux dont l'action est strictement limitée à l'endroit où ils sont appliqués.

Les médicaments administrés par voie locale permettent de traiter différentes affections de la peau, de l'œil, de l'oreille externe, des muqueuses nasale, pharyngée, bronchique, digestive, vaginale et vésicale.

Les substances médicamenteuses sont présentées sous forme d'aérosols, de comprimés, de crèmes, de gels, de liquides pour application ou pour instillation au goutte-à-goutte, de pommades ; dans le cas de la vessie, des instillations sont pratiquées à l'aide d'une sonde introduite dans l'urètre.

3.2.2. La voie orale

Cette voie utilise la bouche pour introduire dans l'organisme des médicaments ou une préparation médicamenteuse, sous forme solide ou liquide.

Le principe actif des médicaments ainsi absorbés passe en partie dans la circulation sanguine, parfois dès son arrivée dans l'estomac, mais essentiellement à hauteur de l'intestin grêle. Une fois dans le sang, le médicament est drainé par la veine porte vers le foie, où il subit des transformations chimiques plus ou moins importantes, qui ont le plus souvent pour effet de l'inactiver partiellement. La partie du principe actif demeurée intacte gagne ensuite la circulation générale.

La voie orale présente l'avantage d'être non traumatisante, simple et facile à utiliser par le patient lui-même ; en cas de surdosage, le lavage gastrique et/ou l'administration de charbon activé limitent les risques d'intoxications graves.

Outre la voie orale proprement dite, il existe deux modes particuliers d'administration qui utilisent la muqueuse tapissant la bouche et évitent ainsi le passage du médicament dans le foie. Ce sont la voie buccale et la voie perlinguale (ou sublinguale), qui consistent à placer le médicament respectivement entre la joue et les dents, ou sous la langue, puis à le laisser fondre.

Lorsque, momentanément, un malade ne peut plus déglutir, par exemple après une intervention chirurgicale, on lui administre les médicaments à l'aide d'une sonde nasogastrique, long tube introduit par le nez et poussé jusqu'à l'estomac. La sonde peut aussi être insérée par une incision pratiquée dans le cou. Les médicaments ainsi introduits le sont le plus souvent sous forme liquide, plus rarement sous forme solide (après avoir été écrasés, si cela est possible).

3.2.3. La voie parentérale

Ce mode d'administration nécessite une aiguille ou un cathéter (petit tube), à l'aide de laquelle la peau est percée ; le médicament, en solution aqueuse, huileuse ou alcoolique, est contenu dans une seringue ou un flacon à perfusion (administration au goutte-à-goutte). Plus rarement, le médicament est injecté dans une chambre implantable (petit réservoir mis en place à l'intérieur du corps, généralement sous la peau, lors d'une intervention chirurgicale

mineure, et se prolongeant par un tube qui permet de libérer le produit lentement sur son lieu d'action).

On distingue les injections par voie générale (intramusculaires, intraveineuses, sous-cutanées) – le médicament est alors destiné à se diffuser dans tout l'organisme – et les injections locorégionales, pour une diffusion plus restreinte du médicament. Ces dernières comprennent les injections intra-articulaires, ou infiltrations, et les injections intra-artérielles, intracardiaques, intradermiques et intrarachidiennes.

L'inconvénient majeur de la voie parentérale est que l'on risque d'introduire ainsi des germes pathogènes dans l'organisme si des règles d'asepsie très strictes ne sont pas appliquées : hygiène des mains, désinfection de la peau avant la piquûre, utilisation de matériel stérile à usage unique. Un autre risque, mineur lorsque l'injection est pratiquée selon les règles professionnelles, est une lésion des artères ou des nerfs.

3.2.4. La voie rectale

Elle consiste à introduire un médicament par l'anus, sous forme de pommade, de suppositoire ou de lavement, le principe actif étant directement absorbé par la muqueuse du rectum, très riche en vaisseaux sanguins.

Cette voie présente les avantages d'être utilisable chez des patients ne pouvant pas avaler, ou en proie à des vomissements, et de faire passer le médicament dans le sang en n'agressant ni l'estomac, ni l'intestin, ni le foie. Elle est en revanche peu confortable ; en outre, l'absorption du médicament est variable. Ce mode d'administration doit être utilisé avec précaution chez le très jeune enfant pour éviter une perforation des tissus.

3.2.5. La voie respiratoire

Cette voie consiste à administrer un médicament dans l'appareil respiratoire par inhalation ou par instillation.

L'inhalation consiste à faire pénétrer dans les voies respiratoires du gaz ou de la vapeur d'eau chargés de substances médicamenteuses volatiles. Elle est notamment utilisée dans le traitement de l'asthme.

L'instillation consiste à administrer dans le nez un médicament liquide, à l'aide d'un compte-gouttes ou d'un atomiseur.

Un accès facile et une utilisation rapide du produit par le patient font partie des avantages propres à la voie respiratoire : le médicament est absorbé par le tissu bronchique, qui tapisse largement les poumons et qui est irrigué par un réseau capillaire important. La limitation des effets indésirables – en raison des faibles quantités de médicaments administrés par cette voie est aussi d'un grand intérêt. En revanche, l'imprécision du dosage, le goût désagréable de certains médicaments, qui peut dans certains cas provoquer des nausées, et l'irritation des bronches et de la trachée qu'entraîne parfois l'administration fréquente d'un médicament par cette voie en sont les principaux inconvénients. Un manque d'hygiène (appareils insuffisamment nettoyés) peut également être à l'origine d'infections bactériennes.

3.2.6. La voie nasale

Les formes galéniques destinées à la voie nasale sont des préparations solides, semi-solides ou liquides renfermant un ou plusieurs principes actifs. Elles sont introduites dans les fosses nasales en vue d'une action locale ou systémique.

Ces préparations nasales se présentent sous différentes formes de conditionnement (flacon pressurisé ; flacon pulvérisateur, flacon compte-gouttes), en récipient unidose ou multidose. L'absorption du médicament a lieu au niveau de la muqueuse nasale. Pour certains médicaments, notamment les protéines thérapeutiques, la voie nasale permet d'éviter l'administration par la voie parentérale, qui est souvent peu confortable lorsque les injections sont quotidiennes et sur plusieurs années.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés essentiellement à l'administration de biomolécules par voie topique et nasale.

3.3. Les différents promoteurs d'absorption

3.3.1. Les systèmes matriciels

Les systèmes matriciels désignent ici des réseaux tridimensionnels formés par des polymères, des tensioactifs ou encore des dendrimères, et dans lesquels sont piégés les

principes actifs. Cette partie est axée sur l'étude des micelles, des émulsions, des hydrogels, des dendrimères, des nanosphères ainsi que des particules solides de lipides.

✓ Les micelles

Les micelles sont des agrégats de molécules amphiphiles dont la tête hydrophile est au contact de l'eau tandis que les parties hydrophobes sont regroupées afin de minimiser leur contact avec l'eau (figure 1-29). L'hydrophobie constitue donc la principale force motrice de l'auto-association des tensioactifs, qui forment des micelles lorsque leur concentration est supérieure à leur concentration micellaire critique (CMC). La taille moyenne de ces objets varie en général de 1 à 10 nm. Il est à noter que ces objets sont dynamiques puisque les tensioactifs s'échangent librement et très rapidement entre la structure micellaire et la solution aqueuse.



Figure 1-29 : représentation d'une micelle directe.

D'après <http://lamp.tu-graz.ac.at/~hadley/nanoscience/week4/4.html>

A la fin des années 60, les micelles ont suscité un intérêt grandissant dans le domaine de la vectorisation de principes actifs grâce au contrôle aisé de leurs propriétés ainsi que pour leurs caractéristiques pharmacologiques^{37, 38}.

La distribution anisotrope des molécules d'eau dans la structure de ces objets (la concentration en eau décroît de la surface des micelles à l'intérieur des agrégats d'où l'eau est exclue) permet de solubiliser de nombreux principes actifs hydrophobes³⁹ au sein de la micelle et de les rendre ainsi biodisponibles. Par ailleurs, les molécules actives sont protégées des enzymes pouvant entraîner leur dégradation et leur métabolisation en milieu biologique^{40,41}.

Les micelles sont donc, en général, utilisées pour solubiliser des principes actifs hydrophobes afin de les rendre biodisponibles et de prolonger leur temps de circulation en

milieu biologique. Cependant, l'inconvénient majeur des vecteurs micellaires, surtout ceux formés par les tensioactifs, est leur sensibilité à la dilution, au pH ainsi qu'à la stringence.

✓ Les émulsions

Les émulsions sont des colloïdes métastables obtenus en mélangeant deux phases liquides non miscibles. L'un des liquides est dispersé dans l'autre sous forme de gouttes de taille caractéristique de l'ordre du micromètre. Ce sont des systèmes hors équilibre thermodynamique. Elles sont stabilisées cinétiquement (dans le temps) par l'ajout d'agents de surface qui ralentissent leur évolution vers la séparation macroscopique des deux phases. Ces agents peuvent être de nature variée, il s'agit de tensioactifs, de protéines, de polymères de bas poids moléculaires ou de particules.

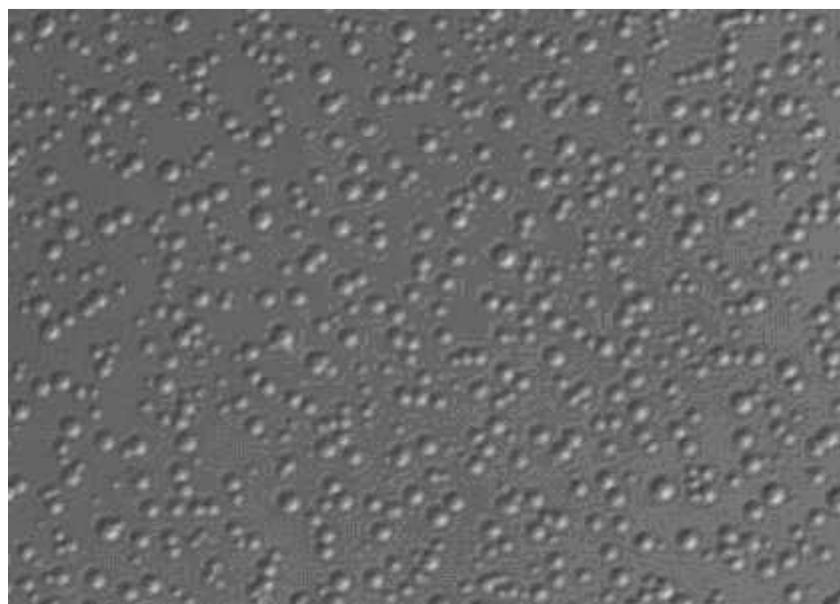


Figure 1-30 : Observation d'une émulsion en microscopie optique.
D'après <http://www.lgpm.ecp.fr>.

Les émulsions sont des systèmes de formulation de médicament flexibles dont les caractéristiques peuvent être facilement modifiées en ajustant des paramètres tels que la fraction volumique de phase dispersée, la taille des gouttes et le gradient osmotique⁴². De plus, les émulsions peuvent être produites en très grande quantité moyennant l'utilisation d'une technologie adéquate⁴³.

Bien que les émulsions offrent de nombreuses possibilités dans le domaine de la délivrance de principes actifs, quelques difficultés freinent leur utilisation. Notamment, la concentration en tensioactifs élevée (surtout dans les microémulsions) peut entraîner des risques de toxicité importants. De plus, ces systèmes ne sont utilisés que pour solubiliser des principes actifs hydrophobes afin de les rendre soluble dans les fluides biologiques.

✓ Les dendrimères

Les dendrimères sont caractérisés par trois régions bien spécifiques : le cœur central, les branches dendritiques et la périphérie. Leur structure est schématiquement représentée dans la figure 1-31. Le nombre de branches dendritiques connectées au cœur central polyvalent est défini par la connectivité du cœur N_c , et chaque unité de branchement de multiplicité N_b , caractérise une génération, G , du dendrimère.

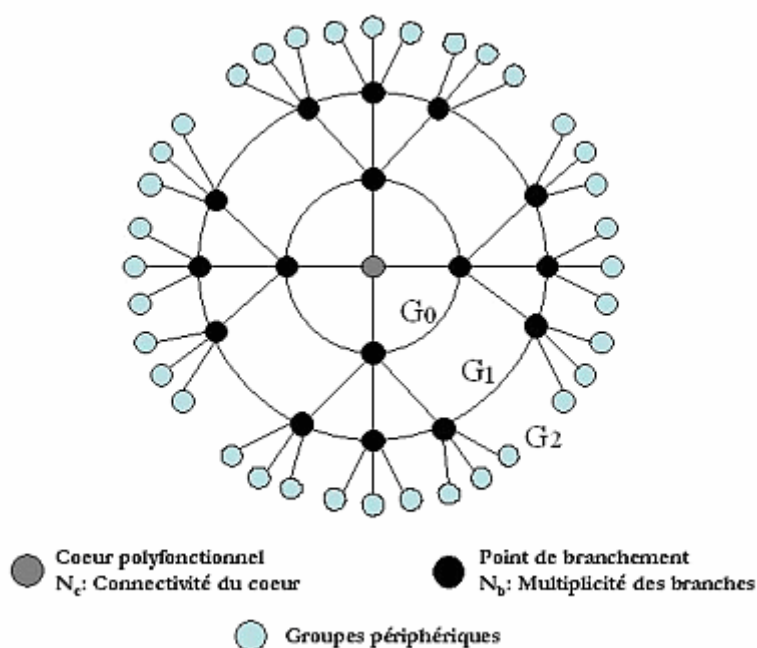


Figure 1-31 : Représentation schématique de la structure d'un dendrimère.

Tandis que les polymères hyperbranchés sont polydisperses, les dendrimères, du fait de leurs méthodes de synthèse, sont en général monodisperses. Cependant, la croissance des dendrimères n'est pas infinie et est limitée par des phénomènes de congestion stérique décrits par de Gennes⁴⁴

Les dendrimères offrent donc de nombreuses possibilités pour la vectorisation de principes actifs hydrophobes ou hydrophiles⁴⁵ grâce à leur structure globulaire et à leur nombre élevé de fonctions de surface.

Cependant, la synthèse de dendrimères est délicate et très onéreuse. Un autre inconvénient majeur de ce type de vecteurs réside dans le relargage des principes actifs en milieu biologique. En effet, dans certains cas, la gêne stérique associée au dendrimère, de structure dense, rend difficile le clivage des groupements hydrosolubles et biodégradables de la couche périphérique par les enzymes et donc la délivrance des principes actifs⁴⁶. Dans d'autres cas, les molécules encapsulées ne sont pas idéalement retenues et sont relarguées très rapidement⁴⁷.

✓ Les hydrogels

L'hydrogel est un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles dans lequel une grande quantité d'eau est présente. En général, la quantité d'eau est comprise entre 20% et 95% du poids total⁴⁸. La principale caractéristique de l'hydrogel est sa capacité à gonfler en présence d'eau et à se contracter en l'absence d'eau. Cette propriété est conditionnée par la nature des chaînes du polymère et par leur densité d'enchevêtrement. Dépendant des interactions mises en jeu, les hydrogels peuvent être soit chimiques soit physiques. Les hydrogels sont dits "chimiques" lorsqu'ils sont maintenus par des liaisons covalentes. Ces gels ne sont pas homogènes et contiennent habituellement des zones d'enchevêtrement élevé contenant peu d'eau, dispersées parmi des zones de bas enchevêtrement qui présentent un gonflement élevé⁴⁹. Les hydrogels sont dits "physiques" quand ils sont maintenus par des liaisons notamment de faible énergie incluant les forces ioniques, les liaisons hydrogène ou hydrophobes⁵⁰. Les hydrogels physiques sont moins homogènes que les hydrogels chimiques, car ils présentent de nombreuses régions d'enchevêtrements élevés.

L'encapsulation de molécules actives hydrophiles se réalise simplement par mélange de ces molécules avec les monomères, suivi d'une polymérisation, ou bien par gonflement du gel dans un milieu aqueux contenant les substances à encapsuler. Les principes actifs peuvent ensuite être relargués en milieu biologique par diffusion (suivant la loi de Fick), par dissolution de l'hydrogel, par différences de forces osmotiques ou encore par échange d'ions⁵¹.

✓ Les nanosphères

Les nanosphères sont des particules colloïdales solides, de diamètre généralement compris entre 100 et 200 nm, et formées par une matrice polymérique. Plusieurs types de polymères peuvent être utilisés pour la préparation de ces nanosphères : des polymères naturels (ou biopolymères), des polymères synthétiques dégradables ou des polymères synthétiques non dégradables.

L'intérêt des nanosphères dans le domaine de la vectorisation réside dans la nature solide de la matrice polymérique, leur conférant une grande stabilité⁵². Dans ce type de système polymérique solide, des principes actifs peuvent être dispersés à l'intérieur de la nanosphère ou bien adsorbés à leur surface. La délivrance des substances actives par les nanosphères se fait généralement par diffusion de l'espèce à travers la matrice ou par dégradation de la matrice. Les nanosphères de polymère ont un grand potentiel d'application dans le domaine de la vectorisation pharmaceutique, mais la principale limite de ces vecteurs réside dans leur mode de préparation, pouvant être contraignante à l'échelle industrielle et limitant donc les applications de ces vecteurs. De plus, la formation de ces systèmes nécessite l'utilisation de solvants et de monomères parfois toxiques et difficiles à éliminer.

3.3.2. Les vésicules

Les vésicules désignent des systèmes colloïdaux de tailles inférieures au micron pouvant être formé de polymères, de tensioactifs ou encore de lipides, et dans lesquelles le principe actif est confiné dans une cavité aqueuse ou huileuse entourée d'une membrane. Les vésicules permettent donc généralement d'encapsuler une quantité de principes actifs plus importante que les systèmes matriciels, ce qui permet de diminuer la concentration en vecteurs à administrer. De plus, la plupart de ces systèmes ont des propriétés de transport versatiles, permettant de vectoriser des substances hydrophiles comme hydrophobes.

✓ Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées d'un volume interne aqueux entouré d'une membrane lipidique. Ils se forment spontanément quand des lipides (en général des phospholipides) sont dispersés dans un milieu aqueux. Leur dimension est très variable selon la façon dont ils sont préparés. Leur diamètre peut aller de quelques dizaines de nanomètres à

quelques dizaines de microns. Dans la grande majorité des cas, les étapes générales d'obtention des liposomes sont les suivantes⁵³ :

- dissolution des lipides dans un solvant organique
- évaporation du solvant organique
- dispersion des lipides séchés dans une solution aqueuse

Les différents types de liposomes sont les suivants :

Les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles* : MLV) qui ont un diamètre allant de 0,1 μ m à 10 μ m. Les MLV sont constitués de couches membranaires superposées concentriques.

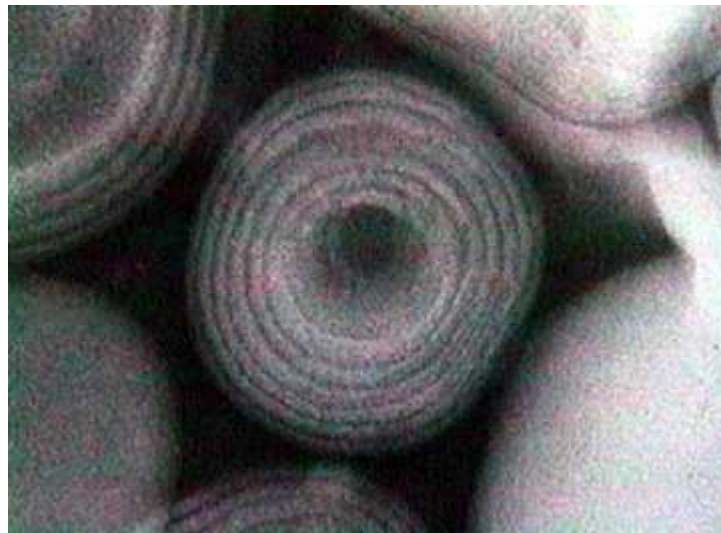


Figure 1-32 : Gros plan sur un liposome multilamellaire. D'après http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/loupe_liposomes.html

Les petites vésicules unilamellaires (*small unilamellar vesicles* : SUV) qui ont un diamètre de 15nm-25nm. Ce sont les plus petites structures vésiculaires qui peuvent être obtenues.

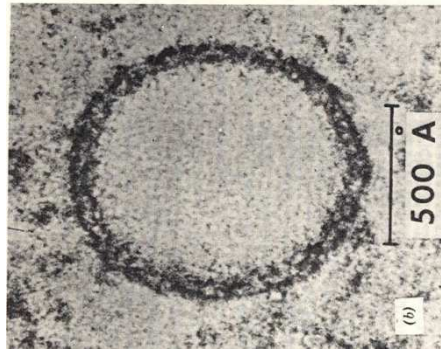


Figure 1-33 : Gros plan sur un SUV. (<http://www.espaceciences.com>)

Les grandes vésicules unilamellaires (*large unilamellar vesicles* : LUV) qui ont un diamètre de l'ordre du micromètre.

Les liposomes sont capables de vectoriser des substances hydrophobes, ancrées dans leur bicouche ainsi que des substances hydrophiles, encapsulées dans leur cavité interne. Par ailleurs, leur instabilité physique et chimique limite leur utilisation dans le domaine de la vectorisation. Chimiquement, leur instabilité peut être provoquée par l'hydrolyse des liaisons esters des lipides, et physiquement, une agrégation ou une fusion de plusieurs liposomes peut conduire à la formation d'objets de tailles très importantes et donc inutilisables en vectorisation. De plus, ces objets peuvent fuir, relargant donc les substances actives encapsulées avant l'atteinte de la cible.

✓ Les niosomes

Les niosomes sont des sphères de 1 micron constituées de plusieurs couches de lipides de synthèse. Leur architecture est similaire à celle des structures lipidiques incluses dans l'espace intercellulaire de la couche cornée, les niosomes vont franchir la couche cornée pour s'intégrer dans les couches plus profondes de l'épiderme, y libérant ainsi d'éventuels principes actifs. Ces systèmes, analogues aux liposomes, sont capables de vectoriser des principes actifs hydrophobes insérés dans leur bicouche ainsi que des substances hydrophiles, encapsulées au sein de leur cavité aqueuse. Contrairement aux liposomes formés de phospholipides, les niosomes, formés de tensioactifs, ne sont pas sensibles à l'hydrolyse et à l'oxydation, ce qui est un atout pour leur utilisation en milieu biologique. Les niosomes ont donc été développés pour atteindre les mêmes objectifs de délivrance spécifique de principes actifs qu'avec les

liposomes, tout en remédiant aux désavantages liés à l'utilisation des phospholipides. Cependant, peu d'études de toxicité des niosomes ont été réalisées bien que le profil toxicologique soit un élément essentiel pour le développement de vecteurs dans le domaine pharmaceutique.

3.4. Les mécanismes d'absorption

3.4.1. Les mécanismes d'absorption nasale

Avant de présenter les résultats de perméation effectués sur les protéines d'intérêts, il est important de s'intéresser aux différentes voies que la protéine peut emprunter pour passer la barrière épithéliale. Les muqueuses sont tapissées de cellules épithéliales jointes les unes aux autres par des jonctions serrées et qui bloquent l'entrée de ces protéines thérapeutiques à la circulation sanguine. Le passage de molécules du milieu extérieur vers la circulation sanguine peut se faire de deux manières : passage entre les cellules, c'est le passage paracellulaire ou passage à travers la cellule, c'est le passage transcellulaire.

✓ Le passage paracellulaire

Les cellules épithéliales nasales sont jointes entre elles grâce à des jonctions serrées. Pour pouvoir étudier le passage de molécules entre les cellules, il faut tout d'abord s'intéresser aux éléments constituant les jonctions serrées.

Les jonctions serrées (figure 1-34) scellent les cellules épithéliales entre elles. Elles forment une barrière sélective régulant le passage des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire en empêchant les lipides et les protéines de la membrane apicale de diffuser dans la membrane basolatérale et inversement^{54, 55}. Quatre types de protéines membranaires, claudines, occludine, JAM (junctional adhesion molecule) et Crumb ont été identifiées. Les claudines, qui composent une famille d'au moins 24 membres, sont responsables de la formation des jonctions serrées. Les claudines et l'occludine possèdent quatre domaines transmembranaires. Elles interagissent via leurs domaines extracellulaires avec celles de la cellule voisine pour établir le contact cellule-cellule. Les claudines sont capables de se polymériser et de former des pores qui permettent une diffusion sélective des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. Bien que de nombreuses études menées sur les

cellules épithéliales en culture aient indiqué l'importance de l'occludine dans la fonction de barrière des jonctions serrées, son rôle n'est pas encore établi.

Les protéines JAM, qui composent une famille de trois protéines, possèdent un seul domaine transmembranaire ; elles régulent la migration des monocytes à travers les cellules endothéliales et seraient impliquées dans la formation des jonctions intercellulaires.

Contrairement aux claudines et à l'occludine, JAM est exprimée dans les plaquettes et les leucocytes.

Crumb, protéine présentant un domaine transmembranaire unique, est exprimée dans les neurones et les cellules épithéliales. Les protéines membranaires (claudines, occludine et JAM) constituent le noyau d'un échafaudage moléculaire relié à une multitude de protéines cytoplasmiques. Celles-ci peuvent être réparties en deux groupes : le premier est composé de protéines à domaines PDZ nommé d'après les trois protéines où il a été d'abord identifié : PSD-95 (Postsynaptic density-95), Dlg (Disks large protein) et ZO-1, telles que ZO-1 à 3 (zonula occludens), MUPP1 (multi-PDZ domain protein 1), Par-3/ASIP (partitioning defective/atypical isotype-specific interacting protein), Par-6, Pals (Protein associated with Lin-7), PKC (Protein kinase C), MAG-1 à 3 (membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure). Les domaines PDZ sont capables de reconnaître des motifs de trois acides aminés (Ser/Thr-X-Val/Ile) situés à l'extrémité carboxyterminale des protéines membranaires. Les protéines à domaines PDZ sont des adaptateurs moléculaires permettant la liaison de diverses protéines membranaires au cytosquelette d'actine ou à des protéines régulatrices. Le second groupe de protéines cytoplasmiques impliquées dans la formation des jonctions serrées contient différents types de régulateurs : Rab13, Cdc42 (cell-division control protein 42), cinguline, symplekine, PKCa (PKC atypique), ZONA B (ZO-1 associated nucleic acid protein), huASH1 (abcent, small or homeotic discs 1) ou SAF-B (scaffold attachment factor-B).

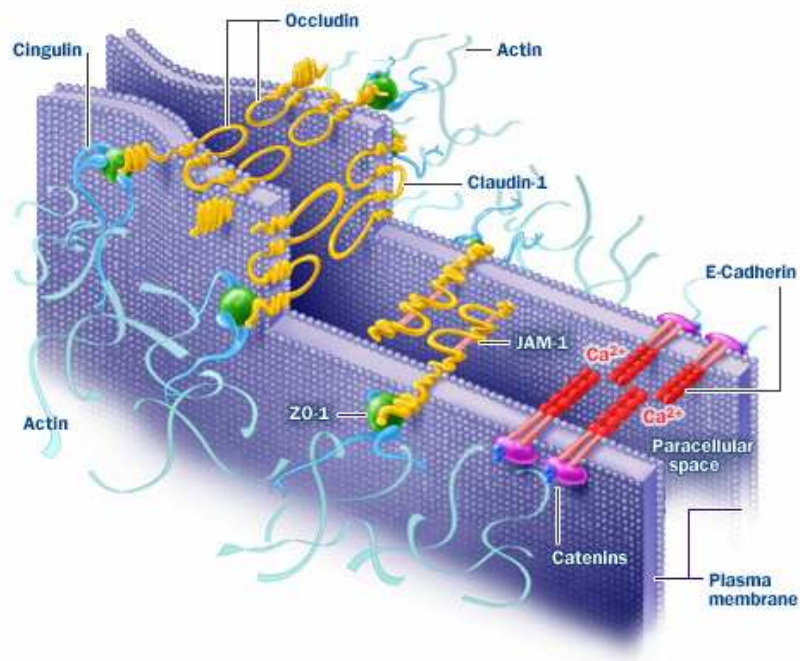


Figure 1-34 : *Jonctions serrées des cellules épithéliales. Les membranes plasmiques des cellules épithéliales sont jointes grâce à 4 types de protéines qui sont les occludines, les claudines-1 les JAM-1 et les E-cadherine. D'après http://www.fmp-berlin.de/schmieder/research/tight_junctions.htm*

Il serait donc intéressant de pouvoir maîtriser l'ouverture de ces jonctions serrées pour faire passer entre les cellules épithéliales, des macromolécules biologiques comme les protéines.

La grande majorité des protéines thérapeutiques sont capables de diffuser à travers les jonctions serrées par l'intermédiaire de pores aqueux traversant les jonctions serrées. Cette diffusion est possible grâce à l'hydrophilie de ces protéines. Cependant, on peut considérablement augmenter le passage paracellulaire de protéines en utilisant des promoteurs de passage comme des chélatants de calcium, des surfactants, des acides gras à chaîne moyenne, des acides biliaires et quelques polymères cationiques. La plupart de ces promoteurs d'absorption agissent en activant de manière indirecte une protéine kinase C (PKC). Des études ont montré que si le calcium extracellulaire était retiré grâce à des chélatants du calcium, on avait une activation de la PKC. Or l'activation de cette PKC est médiée par les cadhérines qui sont des protéines d'adhésion calcium dépendante. La PKC activée va agir sur les filaments d'actine situés dans le cytoplasme des cellules épithéliales et

entraîner l'ouverture des jonctions par l'intermédiaire des protéines ZOT (Zonula occludens toxin)⁵⁶.

Une autre explication de l'ouverture des jonctions serrées par les surfactants a été donnée par Colin Mc Martin et Lusie E. F. Hutchinson⁵⁷. Ils postulent qu'une partie des interactions protéine-protéine des jonctions serrées se fait par interaction hydrophobe et par conséquent la chaîne grasse du surfactant se fixerait sur la partie hydrophobe de ces protéines les rendant plus hydrophiles grâce à leur tête polaire et élargissent ainsi les jonctions serrées⁵⁷. Selon eux, si cette explication se révèle exacte il serait possible de fabriquer des surfactants sélectifs (modification de la chaîne grasse) et efficaces (modification de la partie polaire). Il semble que la chaîne grasse du surfactant doit être la plus rigide possible pour favoriser sa fixation sur les parties hydrophobes des protéines plutôt que sur la membrane plasmique de la cellule. Les molécules à base d'acide cholique apparaissent plus sélectives que les surfactants dont la chaîne grasse est flexible.

Un autre effet permettant d'augmenter le passage cellulaire de protéines thérapeutiques est la tonicité. Il y a très peu d'expérimentations qui ont été faites à ce sujet, mais les informations que l'on peut tirer de ces expériences indiquent qu'une déviation de l'isotonicité vers l'hypotonicité ou l'hypertonie influence grandement l'absorption. Des auteurs ont réussi à obtenir une biodisponibilité située entre 4% et 7% pour l'érythropoïétine par voie nasale en faisant simplement varier l'osmolarité de leur solution et sans utiliser de promoteur d'absorption⁵⁸.

Une étude identique a été réalisée avec la calcitonine. Dans des conditions isotoniques, la biodisponibilité de la calcitonine de saumon par voie nasale n'est que de 0,15%. Dans des conditions hypotoniques elle est comprise entre 0,7% et 0,8%. Dans des conditions hypertoniques, la biodisponibilité est comprise entre 0,6% et 0,7%. L'explication postulée est que les solutions hypertoniques causent une rétraction des cellules épithéliales alors que les solutions hypotoniques engendrent un gonflement des cellules. La résultante dans les deux cas est une modification de la taille des pores entre les jonctions serrées ce qui augmente le passage paracellulaire de molécules thérapeutiques⁵⁹.

✓ le passage transcellulaire

Il est gouverné par la diffusion libre ou la transcytose. La diffusion libre d'une substance dépendra de sa capacité de diffusion dans la phase lipidique de la membrane

plasmique. La diffusion libre dépendra donc de son coefficient de partition huile/eau. Des stratégies utilisées pour améliorer le passage des médicaments à travers la barrière épithéliale sont fondées sur une «lipidisation» des molécules thérapeutiques. Cependant, la présence d'une p-glycoprotéine sur les membranes plasmiques des cellules épithéliales favorise l'extraction du cytoplasme des molécules pharmacologiques hydrophobes. Après inhibition de la p-glycoprotéine, des auteurs ont réussi à augmenter le passage, à travers les cellules épithéliales de l'intestin, de l'hormone de croissance humaine (hGH) couplée à un vecteur la rendant plus hydrophobe⁶⁰.

Les protéines peuvent pénétrer dans la cellule épithéliale par transcytose. Certains vecteurs couplés à la protéine favorisent ce mode de passage. Dans un premier temps, la protéine vectorisée se fixe sur la membrane plasmique de la cellule endothéliale via le vecteur et des récepteurs situés sur la membrane plasmique. Cependant, la transcytose peut s'effectuer sans mettre en jeu les récepteurs de la membrane plasmique. Ce sera le cas lorsque le vecteur chargé positivement interagira avec la membrane plasmique chargée négativement. Cette interaction initie la transcytose du complexe à travers les cellules épithéliales. Le devenir de cette vésicule de transcytose est assez complexe comme le montre la figure 1-35. Une fois la vésicule formée il peut y avoir exocytose du côté basolatéral de la cellule. C'est le chemin (1).

Le chemin (2) décrit la formation d'un endosome ; à ce stade il peut y avoir exocytose du côté basolatéral ou fusion avec des saccules de Golgi. Par la suite, il peut y avoir exocytose du côté basolatéral (b) ou apical (a). L'endosome qui sort du Golgi peut également fusionner avec des lysosomes primaires (c) pour donner des lysosomes secondaires dans lesquels les protéines d'intérêt seront dégradées. Une vésicule d'endocytose peut directement fusionner avec un lysosome primaire pour donner un lysosome secondaire (d)⁶¹. Aujourd'hui on ne sait pas quel est le chemin majoritaire empreinté par ces vésicules de transcytose. On voit bien que le mode de passage par transcytose d'une protéine thérapeutique est soumis à une dégradation via la fusion avec les lysosomes.

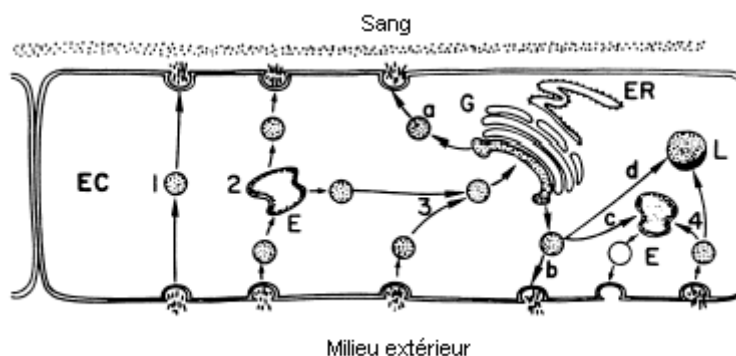


Figure 1-35 : Devenir des vésicules de transcytose dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Voir les explications dans le texte. (figure adaptée de l'article de U. Bickel⁶¹)

3.4.2. Les mécanismes d'absorption cutanée

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la peau constitue une véritable barrière au passage de molécules extérieures. Cette barrière toutefois n'est pas absolue, elle est perméable à pratiquement toutes les substances, seul le degré de perméabilité varie, il est lié à l'état physiologique de la peau et aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée.

La pénétration d'une substance à travers la peau correspond en terme physique à une diffusion passive à travers chaque structure du tégument : couche cornée, épiderme de malpighi, derme et annexes cutanées. Elle est sous la dépendance d'une étape préalable de partage, se produisant à l'interface environnement/couche cornée, sans laquelle aucun échange n'est possible. Cette étape indispensable correspond, à partir du milieu extérieur ou du véhicule, à la libération de la molécule qui va diffuser, donc à sa mise à disposition de l'organisme. Une fois absorbée la substance est distribuée dans l'organisme puis métabolisée. Pour qu'un traitement local garde tout son sens, il est impératif que l'étape de résorption soit la plus faible possible, ceci par exemple afin d'atténuer les effets toxiques de certaines molécules thérapeutiques.

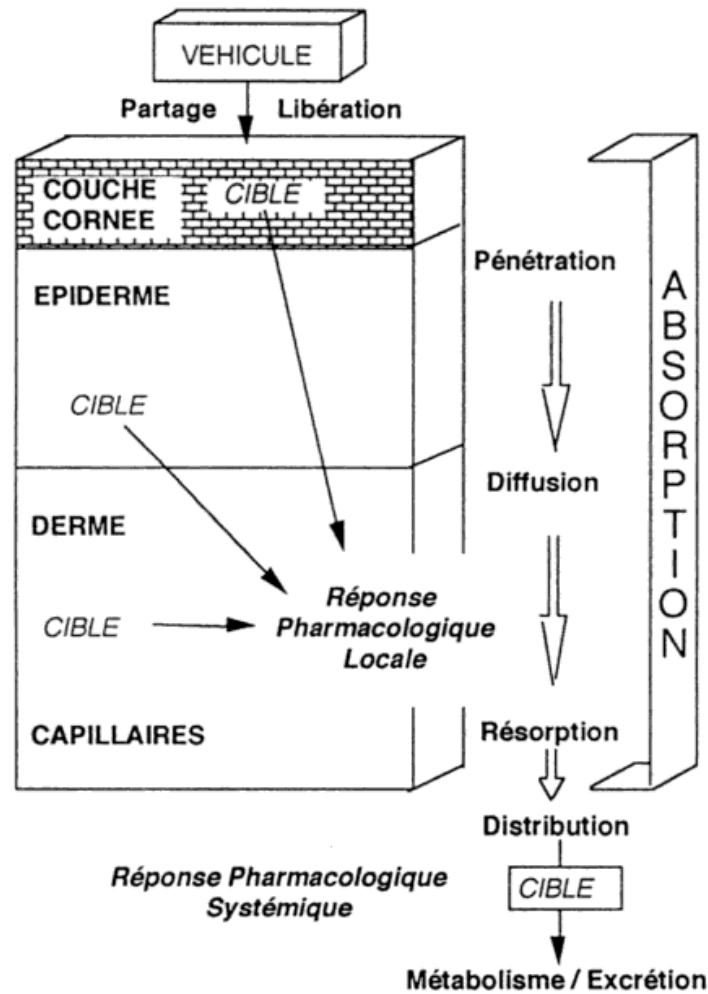


Fig 1-36 : Représentation schématique de l'absorption cutanée (d'après Progrès en dermatoallergologie, John-Libbey eurotext)

Deux voies distinctes s'offrent pour la pénétration : l'une, à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée et à travers les cellules cornées elles-mêmes (voie transépidermique), l'autre empruntant les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés et/ou glandes sudoripares). Dans la majorité des cas, la pénétration ne s'effectue pas uniquement par l'une des voies, les deux participent au phénomène et la pénétration globale est la résultante d'un passage transépidermique et d'un passage par les annexes.

✓ La pénétration transépidermique

Comme mentionnée plus haut, la structure de la couche cornée permet de la représenter schématiquement comme un mur de « briques », constituées par les cellules cornées entourées d'un « ciment » lipophile constitué par les lipides qui remplissent les espaces extracellulaires. La diffusion à travers la couche cornée peut s'effectuer soit par passage transcellulaire, avec traversée successive des cellules et des espaces extracellulaires, soit par passage intercellulaire dans les espaces laissés libres entre les cornéocytes (figure 1-37).

Compte tenu de la faible surface relative des espaces intercellulaires, qui ne représente que 0,4% à 1% de celle des cellules cornées⁶², soit environ 5% du volume de la couche cornée⁶³ il a longtemps été admis que la diffusion par la voie la plus directe, transcellulaire, constituait l'unique route d'entrée des molécules exogènes.

La diffusion intercellulaire a été longtemps considérée comme quantitativement négligeable et proposée comme voie de migration pour les molécules de faible taille et fortement lipophiles. L'analyse structurale de la couche cornée montre que les lipides intercellulaires sont organisés en bicouches orientées séparant des zones « hydrophiles » et des zones « lipophiles », créant ainsi un espace de diffusion lamellaire aux propriétés physico-chimiques opposées⁶⁴.

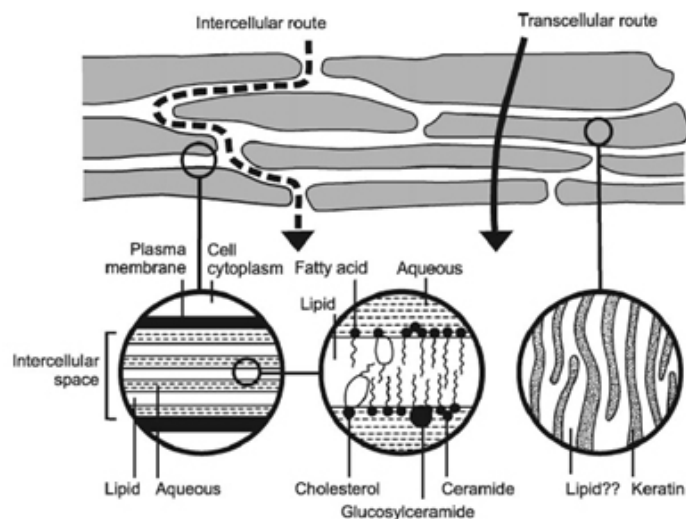


Figure 1-37 : Les voies de pénétration transépidermique (d'après *Progrès en dermatoallergologie*, John-Libbey eurotext).

Si l'importance de la voie intercellulaire est désormais reconnue, les modalités exactes de cette pénétration demeurent toutefois hypothétiques. Les molécules polaires pourraient se diriger vers les régions « hydrophiles » des couches lipidiques intercellulaires alors que les régions « hydrophobes » des chaînes lipidiques permettraient la diffusion des molécules moins polaires⁶⁵.

✓ La pénétration à travers les annexes cutanées

La couche cornée sur la plus grande partie du corps est traversée par les follicules pilosébacés et les glandes sudoripares qui offrent des zones de moindre résistance pour la pénétration des molécules. L'importance de ces voies de diffusion dépend de leur surface relative par rapport à celle de la couche cornée. Chez l'homme, ces deux types d'annexes ne représentent que 0,1 à 1% de la surface cutanée totale⁶⁶.

Les glandes sudoripares interviendraient dans le mécanisme de diffusion d'une part des électrolytes⁶⁷, et d'autre part, des formes ionisées pour les molécules ionisables, ce qui est réalisé dans le cadre d'une administration percutanée assistée par le courant électrique (ionophorèse)⁶⁸.

Les follicules pilo-sébacés ont toujours été considérés comme une voie permettant un passage plus rapide pour les substances appliquées sur la peau. Les zones possédant une forte densité en follicules (cuir chevelu, aisselles) offrent une perméabilité supérieure à celle des sites moins bien pourvus (avant bras, paume)⁶⁹. Scheuplein en 1967⁷⁰ démontra que les « shunts » jouaient, pour les molécules peu diffusables à travers la couche cornée, un rôle prépondérant et principalement pendant les premières minutes ou heures qui suivent l'application⁷¹. Cette théorie fut vérifiée expérimentalement, chez l'animal, pour la testostérone, composé rapidement absorbé qui pénètre préférentiellement par voie transépidermique, la diffusion transfolliculaire n'intervenant que pendant les premières heures de contact, et pour le benzopyrène, plus difficilement absorbé, qui migre principalement par voie transfolliculaire⁷².

4. Etat de l'art sur les tensioactifs

4.1. Structure et propriétés

Les tensioactifs sont des molécules constituées d'une extrémité hydrophile liée de façon covalente à une ou plusieurs chaînes hydrophobes, en général des chaînes carbonées (figure 1-38).

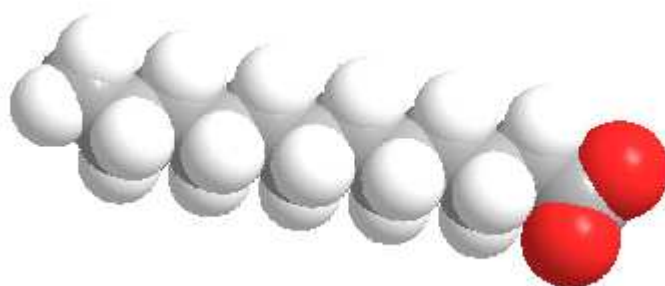


Figure 1-38 : *Représentation schématique d'un tensioactif*

La coexistence des caractères hydrophile et hydrophobe conduit les molécules à s'associer spontanément pour former des agrégats lorsqu'elles sont en solution dans certains solvants. Elles séparent ainsi l'espace en une région apolaire, contenant les chaînes hydrophobes, et une région hydrophile. Les contacts eau/chaînes hydrocarbonées, très défavorables d'un point de vue énergétique, sont ainsi minimisés. L'agrégat le plus simple est la sphère. Dans l'eau, les chaînes hydrocarbonées constituent le cœur hydrophobe, et il est appelé micelle directe.

Aux faibles concentrations, les molécules de tensioactif se dispersent à l'état de monomères. Au-delà d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), l'état énergétique stable du système est celui de micelles en coexistence avec des monomères (figure 1-39).

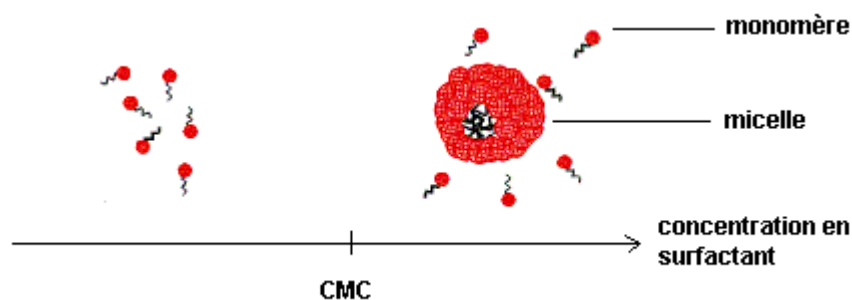


Figure 1-39 : Organisation des tensioactifs en fonction de leur concentration.

La nature des phases obtenues en mélangeant des tensioactifs avec de l'eau et éventuellement de l'huile varie avec les proportions du mélange et est extrêmement diversifiée (phases de micelles, phases lamellaires, phases de vésicules...).

4.2. Le polymorphisme

En solution, les molécules tensioactives s'associent et constituent une interface assimilable à une frontière qui sépare une région hydrophobe et une région hydrophile⁷³. Le moteur de cette association spontanée est essentiellement la compétition entre deux forces qui s'exercent au niveau du film du tensioactif⁷⁴ :

- une interaction hydrophobe attractive entre les chaînes hydrocarbonées fluides. Elle tend à diminuer la surface de contact eau/huile.
- Des interactions répulsives entre les têtes polaires. Elles tendent au contraire à augmenter l'aire interfaciale.

L'équilibre subtil entre ces interactions d'intensité élevée et opposée est à l'origine du polymorphisme structural extrêmement riche des agrégats de tensioactifs. La phase la plus simple est la phase micellaire. Les micelles observées peuvent être globulaires ou cylindriques.

4.3. Description géométrique de l'agrégat

La structure de ces micelles peut être déterminée par un certain nombre de paramètres caractéristiques de la géométrie des molécules de tensioactifs⁷⁵. Ces paramètres sont :

- l'aire optimale par tête polaire notée a . Elle est déterminée par la condition d'équilibre entre les interactions attractives et répulsives qui s'exercent au niveau de l'interface. Dans le cas des tensioactifs ioniques, elle dépend énormément de la force ionique qui modifie les répulsions électrostatiques.
- Le volume effectif de la partie hydrophobe noté v . Il dépend de la nature de la phase apolaire.
- La longueur maximale que peut avoir la partie hydrophobe du tensioactif notée l .

À partir de ces trois paramètres qui peuvent être mesurés, il est possible de calculer le rapport de la section moyenne de la partie hydrophobe (v/l) à l'aire par tête polaire a . Ce rapport, appelé paramètre d'empilement $p = v/al$ conditionne la courbure moyenne de l'agrégat. Intuitivement il est facile d'admettre que pour $p > 1$, les agrégats les plus favorables sont les micelles inverses. Mais, Israelachvili ⁷⁴ prévoit de façon générale la morphologie des agrégats en fonction de la valeur de p : des micelles sphériques pour $p < 1/3$, des micelles cylindriques pour p compris entre $1/3$ et $1/2$, des vésicules pour p compris entre $1/2$ et 1 , des bicouches planes lorsque p est de l'ordre de 1 .

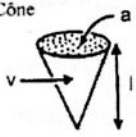
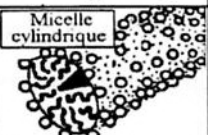
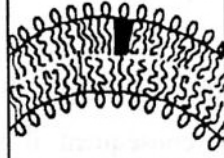
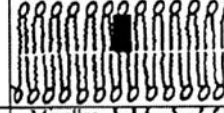
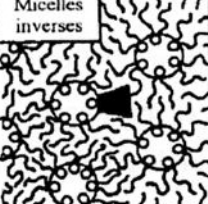
Paramètre d'empilement v_{al}	Géométrie du tensioactif	Structure des agrégats
$< \frac{1}{3}$	Cône 	Micelle sphérique 
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$	Cône tronqué 	Micelle cylindrique 
$\frac{1}{2} - 1$	Cône tronqué 	Vésicule fluctuante 
≈ 1	Cylindre 	Bicouche plane 
> 1	Cône tronqué inversé 	Micelles inverses 

Figure 1-40 : Influence de la géométrie moléculaire du tensioactif sur la morphologie des agrégats formés (Adapté de Israelachvili J.N., 1992).

5. Présentation des lipoamino acides et de la technologie BIODIS®

5.1. La technologie BIODIS®

5.1.1. Aspects généraux

Physica Pharma a développé une nouvelle technologie (brevet A61 K31/195) permettant d'augmenter la biodisponibilité de certaines molécules. La biodisponibilité d'un principe actif dépend de ses caractéristiques physico-chimiques : la solubilité dans les liquides biologiques (sang, fluides gastro-intestinaux) et la capacité à diffuser au travers des membranes sont de rigueur pour une efficacité maximale.

D'après le Professeur Gordon Amidon de l'Université du Michigan, chaque médicament peut être classé selon ses propriétés de solubilité et de perméabilité membranaire⁷⁶.

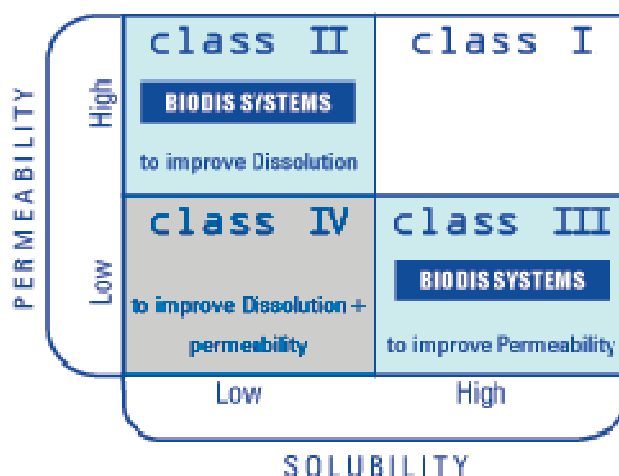


Figure 1-41 : Système de classification biopharmaceutique. Les médicaments sont classés en 4 catégories selon leurs propriétés de solubilité et de perméabilité

Physica Pharma, grâce à sa technologie brevetée (BIODIS®) peut agir sur les molécules de classe II (faible solubilité, haute perméabilité) et III (faible perméabilité, haute solubilité). Cette technologie s'appuie sur l'utilisation de composés amphiphiles innovants : les lipoamino acides (LAAs).

5.1.2. Cas des molécules peu solubles

Les molécules actives possédant une mauvaise solubilité (classe II) peuvent bénéficier de la technologie BIODIS® pour augmenter leur solubilité. En effet, la technologie BIODIS® est basée sur l'utilisation de LAAs pour former un système dispersé dans les fluides biologiques. Les LAAs présentent des propriétés tensio actives du fait de leur chaîne hydrophobe (Acide gras) et hydrophyle (Amino acide). De par leur propriété tensio active, les LAAs peuvent s'organiser en système dispersé lorsque leur concentration est supérieure à la CMC. C'est cette propriété qui est utilisée pour former des systèmes « encapsulant » les actifs hydrophobes afin de les solubiliser.



Figure 1-42 : Principe de solubilisation d'un principe actif par interaction avec un lipoaminoacide (figure de la société physica pharma)

5.1.3. Cas des molécules faiblement perméables

Les molécules possédant une bonne solubilité dans l'eau et une faible perméabilité cellulaire peuvent se solubiliser dans les liquides biologiques, mais ne peuvent pas traverser les membranes plasmiques cellulaires (classe III). L'utilisation de la technologie BIODIS® va augmenter la perméabilité cellulaire de ces molécules. En effet, les LAAs vont former des complexes ioniques avec des molécules de classe III possédant des charges opposées aux LAAs. Ce complexe passera plus facilement les barrières biologiques pour enrichir la circulation sanguine.

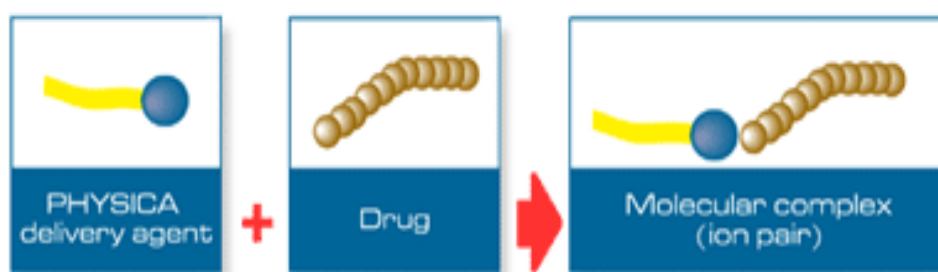


Figure 1-43 : Principe de l'amélioration de la diffusion membranaire par interaction avec un lipoaminoacide. (figure de la société physica pharma)

Grâce à cette technologie, Physica Pharma a amélioré sensiblement la biodisponibilité d'un grand nombre de molécules thérapeutiques (Sumatriptan, Lidocaïne, Aciclovir...).

Face à de tels résultats, la société a décidé d'élargir son champ d'action en appliquant BIODIS® aux biomolécules et plus particulièrement aux peptides et protéines thérapeutiques afin d'accroître leur passage par voie nasale ou par voie topique

5.2. Les lipoamino acides

5.2.1. Structure

Les lipoaminoacides (LAAs) sont constitués de l'association covalente d'un acide aminé et d'une chaîne grasse (de type C₈, C₁₈...) (figure 1-44)

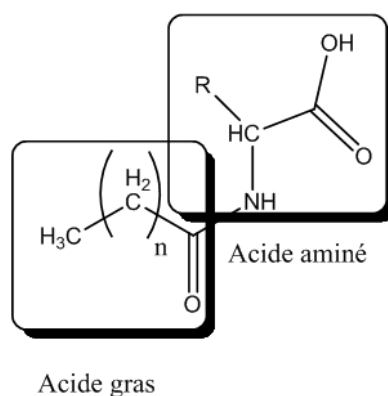


Figure 1-44 : Structure générale des lipoamino acides

Les LAAs possèdent une fonction carboxylique libre, ce qui leur permet d'être chargés négativement ou d'être neutres en fonction du pH. La coexistence des caractères hydrophiles de la fonction carboxylique et hydrophobe du squelette de l'acide aminé et de la chaîne grasse fait des LAAs des tensioactifs anioniques.

5.2.2. Propriétés

✓ Amphiphilie

Les LAAs sont largement retrouvés chez les microorganismes et du fait de leur amphiphilie, ils possèdent une bonne activité antimicrobienne, sont capables de s'organiser en micelles, sont facilement biodégradables et ne provoquent aucun effet indésirable lorsqu'ils sont appliqués sur la peau^{77, 78}. Chez les mammifères, il a été montré que les LAAs à base d'acide arachidonique sont capables de supprimer les douleurs inflammatoires⁷⁹. Physica Pharma a effectué des essais préliminaires chez l'animal par voie nasale en utilisant des LAAs et a obtenu pour le Sumatriptan une biodisponibilité de 90% par voie nasale.

Les propriétés d'absorption des LAAs ont très peu été étudiées. Leur toxicité varie en fonction de la nature de la chaîne carbonée et de la tête polaire. D'une manière générale les chaînes carbonées courtes (C6-C8) et les acides aminés hydrophobes (leucines...) présente une toxicité importante sur les cellules nasales *in vitro* à l'inverse des LAAs constitués de chaînes carbonées longues (C12-C14) et d'acides aminés hydrophyles (valine...). Comme nous l'avons démontrés, les LAAs sont de bons promoteurs d'absorption pour les voies nasale et topique.

✓ Ionisation de la fonction acide carboxylique

Les sulfates, sulfonates, carboxylates, et phosphates représentent les fonctions anioniques les plus communément rencontrés pour la classe des surfactants anioniques. La dissociation des deux derniers groupes de molécules est pH dépendant. Par exemple, l'espèce prédominante pour les surfactants à base de carboxylates à des valeurs de pH en dessous de pH 5 est la molécule dont l'acide carboxylique n'est pas dissocié. Pour des valeurs de pH supérieures à pH 10, on rencontre essentiellement la forme ionisée de la molécule. Ainsi, la lauryl proline (C₁₂P) est un surfactant à base de carboxylate. Un dosage pHmétrique nous a permis de déterminer son pKa qui est de 5,6

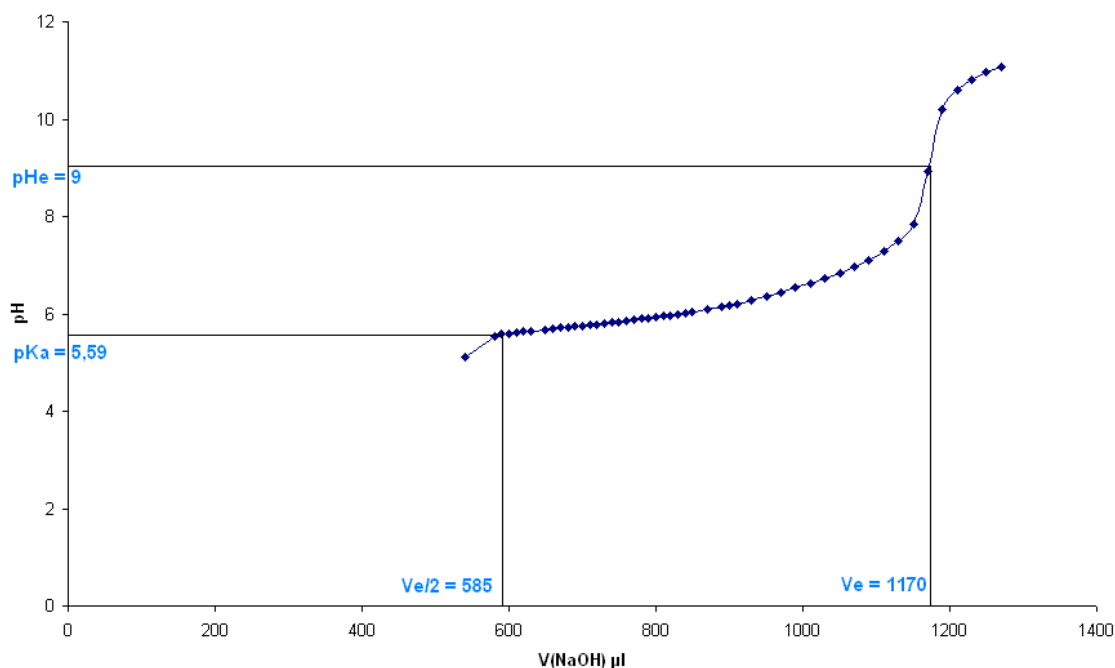


Figure 1-45 : courbe de titration de la C₁₂P par la soude 1N. Courbe caractéristique d'un acide faible. Le pKa déterminé graphiquement est de 5,6.

Suivant le pH de la solution, les espèces de LP présentent en solution ne seront pas les mêmes

- A pH = 7 on a : $\log ([A^-]/[AH]) = 1,41$ et donc $[A^-] = 26 [AH]$, cela signifie que 96% de la C₁₂P sera salifiée.
- A pH = 4 on a : $\log ([A^-]/[AH]) = -1,59$ et donc $[A^-] = 0,026 [AH]$ cela signifie que 3% de la C₁₂P sera salifiée.

C'est donc à pH 7 que la C₁₂P sera en majorité salifiée et donc susceptible d'interagir avec des composés portant des charges positives.

6. Objectif et plan de thèse

Au cours de cette thèse, je me suis attaché à la formulation de systèmes colloïdaux formés de LAAs, de peptides/protéines et à leur caractérisation physico-chimique. Ces systèmes colloïdaux ont pour but d'accroître le passage de ces peptides/protéines par les voies nasale et topique. Nous détaillons dans le chapitre 2 l'aspect théorique des techniques physiques d'analyse utilisées (dichroïsme circulaire, diffusion dynamique de la lumière, résonance magnétique nucléaire, et dynamique moléculaire), de l'utilisation de modèles de cellules nasales *in vitro* et de la préparation des modèles lipidiques mimant la structure de la peau. Le chapitre 3 décrit la formation colloïdale de LAA et de protéines. Des études en dichroïsme circulaire nous ont donné des informations sur la structure secondaire des protéines dans le colloïde formé. L'analyse en diffusion dynamique de la lumière nous a apporté des informations sur le complexe colloïdal protéine-LAA. Enfin, pour évaluer la perméabilité membranaire de ces colloïdes, des études *in vitro* sur cellules nasales et des études précliniques ont été réalisées. Dans le chapitre 4, nous nous sommes intéressés au développement et à la validation de modèles lipidiques de peau saine et psoriasique par la RMN du deutérium. Le développement d'une formulation colloïdale à base de LAAs et de cyclosporine en vue du traitement par voie locale du psoriasis est détaillé dans le chapitre 5. Une conclusion générale et des perspectives termineront ce manuscrit.

Chapitre 2

Matériaux et méthodes

CHAPITRE 2

MATERIAUX ET METHODES

1. Matériaux

1.1. Les protéines

1.1.1. L'hormone de croissance humaine (hGH)

a. Structure

L'hormone de croissance humaine (ou hGH ou somatropine) est une hormone polypeptidique (protéine non glycosylée) de 22kDa, constituée de 191 acides aminés.

Des études de cristallographie aux rayons X ont montré que l'hGH est une protéine globulaire asymétrique possédant sept hélices α principales anti-parallèles. Ces hélices sont reliées entre elles par des segments flexibles impliqués dans la liaison aux récepteurs⁸⁰.

La protéine présente 2 ponts disulfures intramoléculaires impliquant : la Cys₅₃, située dans la chaîne peptidique entre les hélices 2 et 3, et la Cys₁₆₅ de l'hélice 6 et un pont disulfure impliquant la Cys₁₈₂ et la Cys₁₈₉ proches de l'extrémité C-terminale.

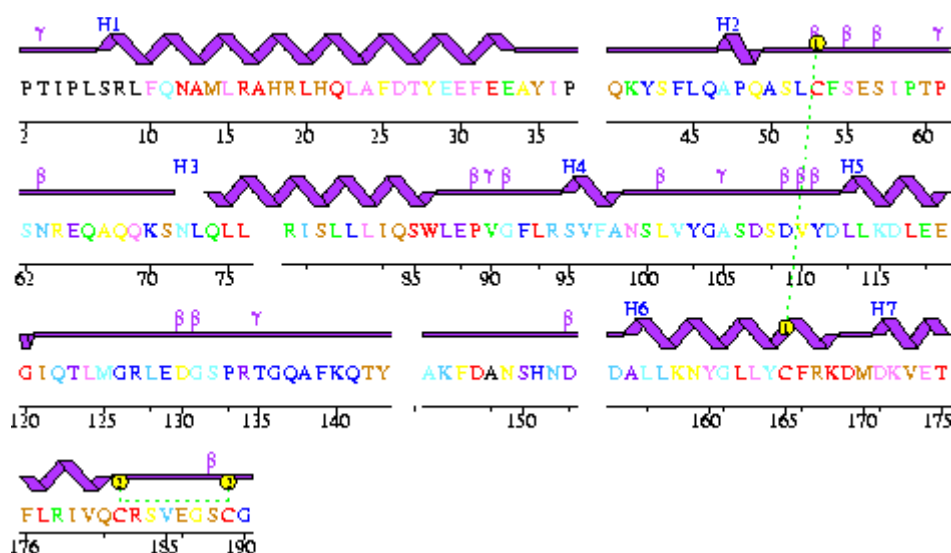


Figure 2-1 : Représentation de la séquence primaire et de la structure secondaire de l'hGH. (Figure de la base de données swissprot)

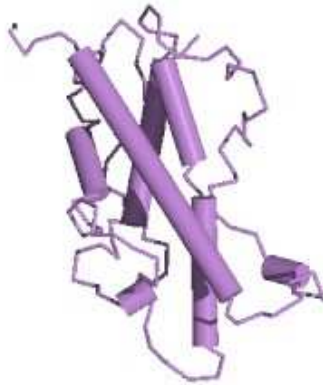


Figure 2-2 : Structure tridimensionnelle de la rhGH avec la représentation des sept hélices α principales anti-parallèles (d'après le logiciel RASMOL, figure de la PDB référencée 1hgu)

L'hGH est constituée de :

- 60% d'hélices α
- 11% de coudes
- 29% de pelotes

Ces informations structurales ont été obtenues grâce à la banque de données protéique swissprot (<http://www.expasy.ch/sprot/>) et sont d'une importance capitale pour le suivi de l'évolution de la structure secondaire de l'hGH lors de sa formulation.

b. Pureté et composition

L'hormone de croissance humaine recombinante rhGH provient de chez Auspure Biotechnology (Shanghai, Chine). Sa pureté est de 99,7%. Elle est sous forme de poudre contenant 87% de mannitol, glycine et tampon phosphate.

c. Fonctions

L'hGH est une hormone peptidique qui est sécrétée par l'antéhypophyse de chaque individu. Elle passe ainsi dans le plasma, de façon à atteindre les organes cibles et ses récepteurs.

On distingue cinq fonctions principales de l'hGH :

- Stimuler la synthèse des protéines et des acides nucléiques dans le muscle squelettique.
- Stimuler la croissance des os longs (en longueur) si les os ne sont pas encore soudés.
- Stimuler la lipolyse, conduisant à l'augmentation des concentrations en acides gras libres et à une diminution générale de la masse grasseuse.
- Augmenter la concentration sanguine de glucose (glycémie).
- Favoriser la cicatrisation des accidents musculaires.

1.1.2. L'érythropoïétine humaine (hEPO)

a. Structure

L'érythropoïétine (EPO) est une sialoglycoprotéine de 30kDa, constituée de 166 acides aminés. Les 4 chaînes glycosylées de l'EPO représentent à elles seules 40% de la masse de la protéine.

L'EPO possède 5 hélices α . La protéine présente 2 ponts disulfures intramoléculaires impliquant : la Cys₇, située avant l'hélice 1 et la Cys₁₆₁ de l'hélice 5 et un pont disulfure impliquant la Cys₂₉ et la Cys₃₃ proches de l'extrémité C-terminale

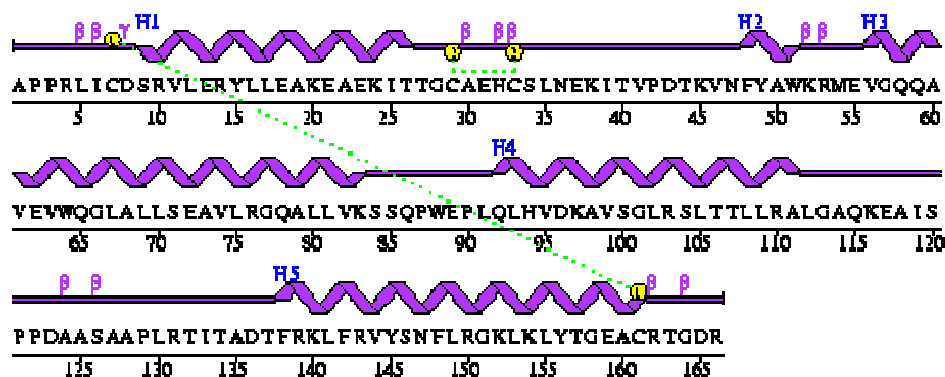


Figure 2-3 : séquence primaire et structure secondaire de l'EPO (figure de la base de donnée swissprot)



Figure 2-4 : Structure 3D de l'EPO avec ses 5 hélices α (d'après le logiciel Rasmol, figure de la PDB référencée 1buy).

L'EPO est constituée de :

- 63% d'hélices α
- 14% de coudes
- 23% de pelotes

Ces informations structurales ont été obtenues grâce à la banque de données protéique swissprot.

b. Pureté et composition

L'érythropoïétine humaine recombinante (rhEPO) provient de chez Dragon Pharmaceutical (Vancouver, Canada). Sa pureté est de 100%. Elle se trouve dans un tampon citrate-NaCl à une concentration de 1,24mg/ml.

c. Fonctions

Sécrétée naturellement par les reins (80%) et le foie (20%), l'érythropoïétine humaine (hEPO) stimule la production de globules rouges et permet d'augmenter la quantité d'oxygène transporté par le sang. Elle est sécrétée dès que la concentration sanguine en oxygène diminue.

1.1.3. La Calcitonine de saumon

a. Structure

La calcitonine de saumon (sCT) est une hormone peptidique (peptide non glycosylé) de 1340Da, constituée de 32 acides aminés et comportant un pont disulfure.

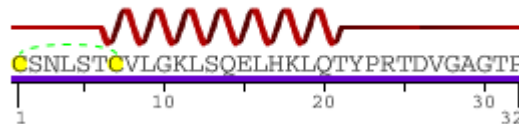


Figure 2-5 : Séquence primaire et structure secondaire de la calcitonine de saumon (figure de la base de données swissprot)

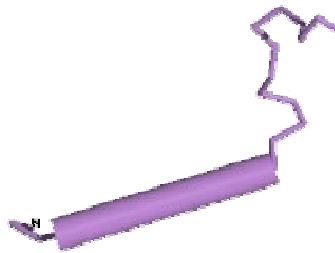


Figure 2-6 : Structure tridimensionnelle de la calcitonine de saumon avec son unique hélice α (d'après le logiciel Rasmol, figure de la PDB référencée 1fb9)

La sCT ici représentée possède une hélice α . Cependant elle est décrite dans la littérature comme étant majoritairement sous forme de pelote. Cette hélice α est en fait très flexible et la structure représentée ci-dessus, faisant apparaître l'hélice α est celle que l'on retrouve lors de l'interaction de la calcitonine avec son récepteur^{136, 137}.

La sCT, une fois liée à son récepteur est constituée de :

- 48% d'hélices α
- 6% de coudes
- 25% de feuillets β
- 22% de pelotes

Ces informations structurales ont été obtenues grâce à la banque de données protéique swissprot

b. Pureté et composition

La sCT provient de chez Welding (Hamburg, Allemagne). Sa pureté est de 98,4%. Elle contient 8,2% d'acide acétique.

c. Fonctions

Elle est sécrétée par la glande thyroïde et a un effet hypocalcémiant. Sa sécrétion est essentiellement régulée par la calcémie et plus précisément la fraction ionisée, Ca^{2+} : l'augmentation de la calcémie l'augmente et sa diminution la réduit. Le calcium extracellulaire agit par l'intermédiaire de récepteurs au calcium appelés CaSR, calcium sensing receptors. En dehors du calcium ionisé, Ca^{2+} , certaines hormones peuvent augmenter la sécrétion de calcitonine : les catécholamines par effet β , le glucagon, la gastrine, la cholécystokinine qui agissent en augmentant la concentration d'AMPC dans les cellules parafolliculaires. L'effet hypocalcémiant de la calcitonine résulte d'une diminution de la libération de calcium par l'os, du fait de la diminution de la résorption osseuse par les ostéoclastes, et accessoirement d'une augmentation de sa fixation par l'os sous l'influence des ostéoblastes. L'effet hypophosphatémiant résulte des mêmes phénomènes. L'hypocalcémie et l'hypophosphatémie sont donc la conséquence de la diminution du catabolisme osseux. La calcitonine augmente l'élimination urinaire de calcium, de phosphate et de sodium, mais cet effet reste accessoire par rapport à l'effet osseux. La calcitonine a un effet vasodilatateur, à l'origine des bouffées de chaleur observées après son injection, et un effet antalgique. Les spécialités pharmaceutiques sont toutes à base de calcitonine de saumon (sCT). Celle-ci serait plus active que la calcitonine humaine à dose égale⁸¹.

1.2. La cyclosporine A

1.2.1. Structure

La cyclosporine découverte en 1970 à l'occasion de recherches sur de nouveaux produits antifongiques, est un métabolite d'un champignon du sol (*Tolypocladium inflatum* Gams). Il s'agit d'un polypeptide cyclique de 11 acides aminés dont certains sont N-méthylés.

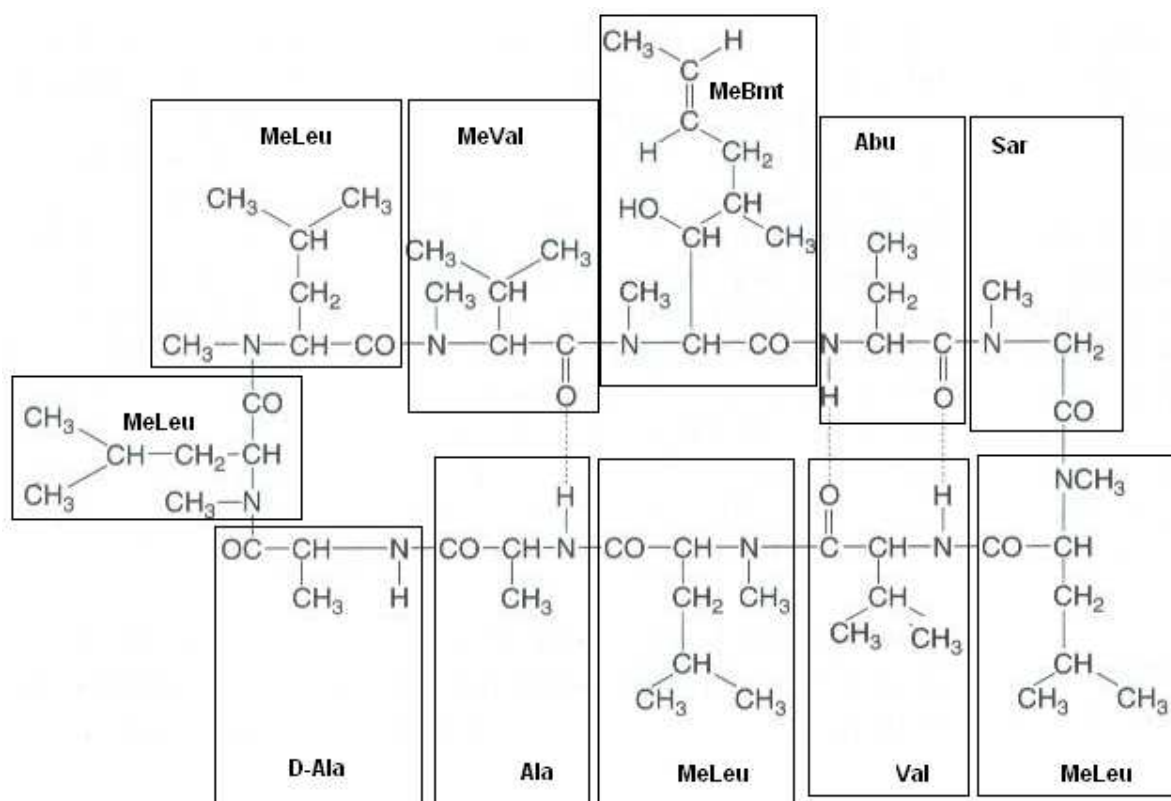


Figure 2-7 : Structure de la cyclosporine A. MeLeu: méthylleucine, MeVal: méthylvaline, MeBmt: (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-méthyl-L-thréonine, Abu: acide 2-aminobutyrique, Sar: Sarcosine

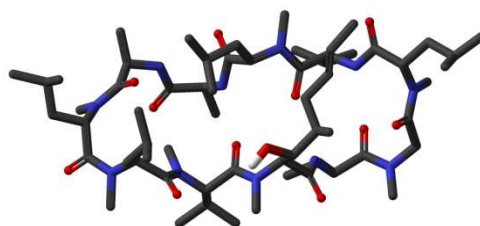


Figure 2-8 : Structure 3D de la cyclosporine A (figure de la PDB référencée 3EOV obtenue après extraction de la cyclophyline par le logiciel RASMOL).

1.2.2. Pureté et composition

La cyclosporine A provient de chez Poli Industria Chimica (Rozzano, Italie). Sa pureté est de 99,4%. Elle est sous forme de poudre sans aucun excipient.

1.3. Les lipides

1.3.1. Le céramide

L'ensemble des échantillons utilisés dans les chapitres IV et V a été préparé à partir d'un céramide de type 2 selon la nomenclature de Wertz et coll (voir chapitre 1). Ce produit, d'une pureté de 98% a été fourni par la société C. Dior (Nanterre, France).

1.3.2. Le cholestérol

Le cholestérol utilisé pour former nos systèmes lipidiques de *stratum corneum* provient de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Sa pureté est de 98%.

1.3.3. L'acide palmitique

Selon la localisation cutanée il est présent en plus ou moins grande quantité. C'est en moyenne l'acide gras majoritaire que l'on retrouve au sein du *stratum corneum*. Ce produit provient de chez interchimie (Paris, France). Sa pureté est de 97%.

1.3.4. L'acide palmitique deutéré

Incorporé lors de la fabrication de nos modèles lipidiques de *stratum corneum*, l'acide palmitique deutéré agit comme un reporter de l'état d'organisation de la membrane lipidique en RMN du deutérium. Il provient de chez Eurisotop (Saint-Aubin, France). Sa pureté est de 97%.

1.4. Les lipoamino acides

1.4.1. Présentation des structures étudiées

Un partenariat avec la société Seppic (filiale de Air liquide) spécialisée dans la fabrication de LAAs a été conclu. Une partie des LAAs utilisée lors de ce travail provient de cette société. Certains LAAs non produits par Seppic ont été synthétisés au laboratoire. Le tableau 2-1 récapitule les LAAs étudiés au cours de ce travail ainsi que leur provenance.

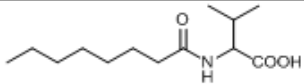
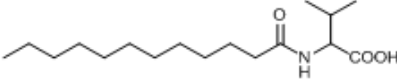
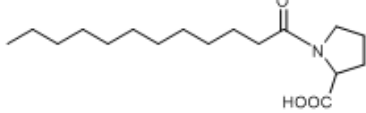
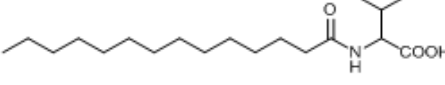
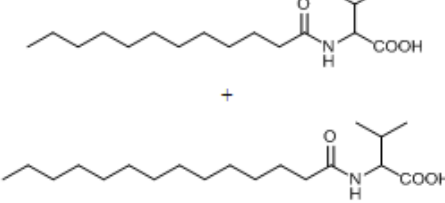
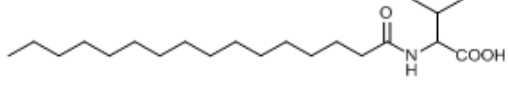
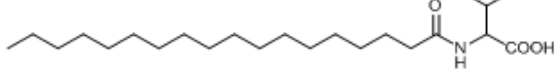
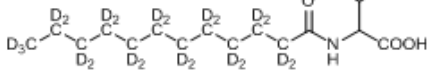
Nom	Abbréviation	Composition	Formule	Fournisseur	Synthétisé au laboratoire
Octanoyl valine	C8V	100% C8V		-	✓
Lauroyl valine	C12V	100% C12V		SEPPIC	
Lauroyl proline	C12P	100% C12P		SEPPIC	
Myristoyl valine	C14V	100% C14V		-	✓
Cocoyl valine	CV			SEPPIC	
Palmitoyl valine	C16V	100% C16V		-	✓
Stéaroyl valine	C18V	100% C18V		-	✓
Lauroyl valine perdeutéree	C12v- ² H ₂₃	100% C12v- ² H ₂₃		-	✓

Tableau 2-1 : Composition, formule et provenance des LAAs étudiés

1.4.2. Synthèse et purification de LAAs et de lipoamino acides deutérés

a. Méthodologie des synthèses

✓ Synthèse des LAAs non deutérés

La C8V, la C14V, la C16V et la C18V ont été synthétisées en suivant majoritairement le protocole de Y. Lapido et al.⁸². Les deux étapes de cette synthèse sont détaillées sur la figure 2.8 : L'acide gras **1** est condensé avec la N-hydroxysuccinimide (NHS) **2** en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) **3**. La dicyclohexylurée (DCU) **4** formée précipite et est éliminée par filtration. L'ester de NHS d'acide gras **5** est obtenu sous la forme d'un produit cristallisé. Il réagit par la suite avec le sel de sodium de l'acide gras libre **6** en solution aqueuse pour former le LAA correspondant **7**.

✓ Synthèse de la $C_{12}V-^2H_{23}$ sélectivement deutérée sur sa chaîne aliphatique.

Le principe de la synthèse de la lauroyl valine perdeutérée $C_{12}V-^2H_{23}$ est le même que pour le non deutéré, à savoir dans la première étape, une condensation de l'acide laurique deutéré sur sa chaîne aliphatique avec la NHS **2** et dans une seconde étape une condensation avec le sel de sodium de la valine en solution aqueuse pour former la $C_{12}V-^2H_{23}$

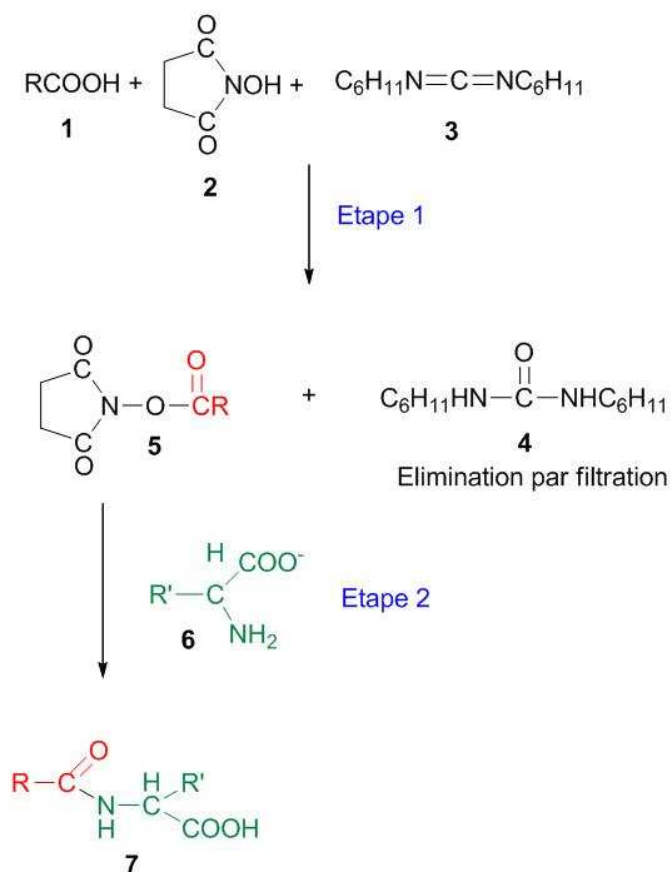


Figure 2-8 : Stratégie de synthèse des lipoamino acides

b. Résultats et discussion

Les rendements des différents LAAs synthétisés sont résumés dans le tableau 2.2.

Lipoamino acide	Rendement		
	Étape 1	Étape 2	Total
C8V			32%
C ₁₂ V	60%	50%	30%
C ₁₄ V	52%	60%	31%
C ₁₆ V	39%	70%	27%
C ₁₈ V	73%	48%	35%
C ₁₂ V - ² H ₂₃	44%	82%	36%

Tableau 2-2 : Rendement des étapes 1 et 2 et rendement total des synthèses chimiques des lipoamino acides

Le rendement total de la réaction se situe autour de 30%. Ce qui peut paraître relativement faible ; ceci provient du fait que lors de la première étape la réaction doit se faire dans des conditions anhydre. Toute trace d'eau limite considérablement la réaction. Dans la deuxième étape, une purification est nécessaire et se fait par recristallisation. Trouver la bonne proportion dans le mélange des solvants de recristallisation peut être très long. Il aurait été intéressant de renouveler les synthèses en essayant d'optimiser les conditions opératoires et de recristallisation. Toutefois, notre objectif était d'obtenir suffisamment de produit pur pour effectuer nos tests de formulation.

Les LAAs non deutérés ont été caractérisés par RMN du proton. Le spectre RMN ^1H de la lauroyl valine dans le chloroforme deutéré CDCl_3 est représenté figure 2-9.

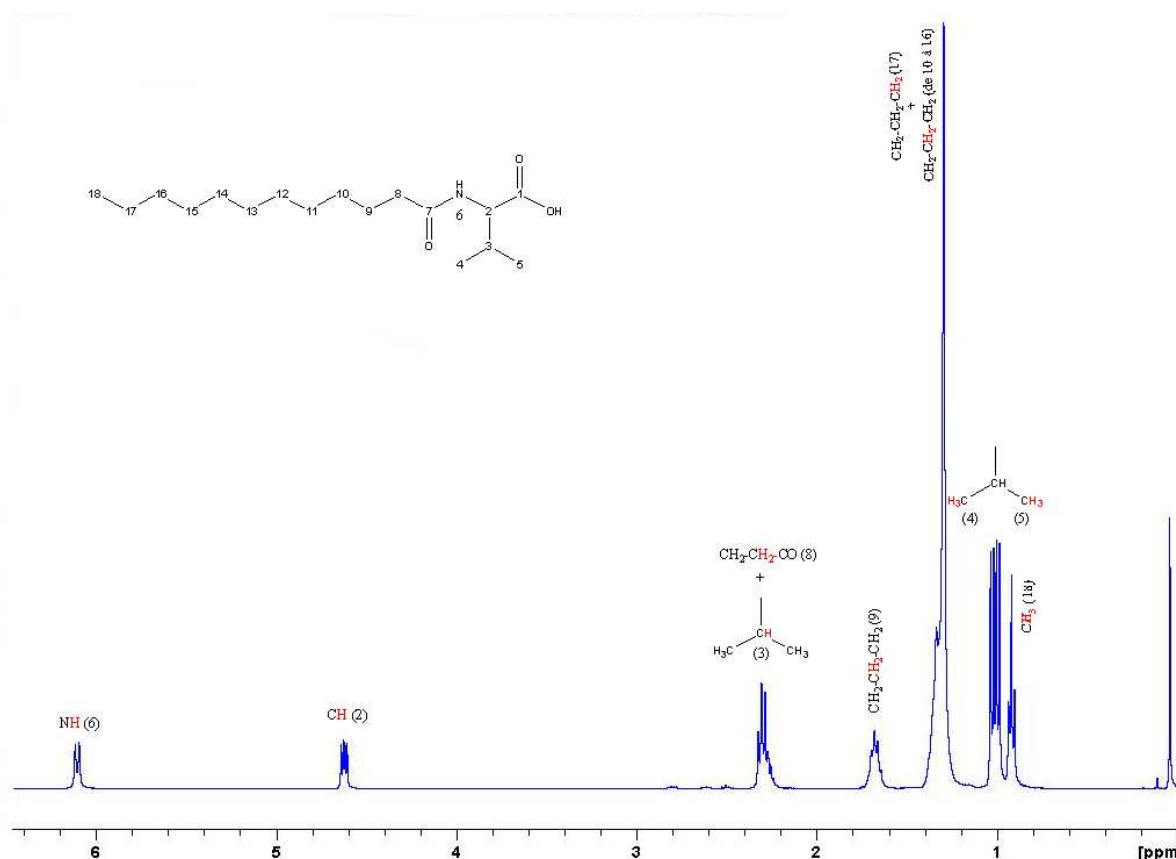


Figure 2-9 : Structure numérotée de la lauroyl valine et son spectre RMN ^1H dans le chloroforme deutéré CDCl_3

La $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}$ a été caractérisée par une HMBC. Le spectre HMBC de la lauroyl valine deutérée dans le chloroforme deutéré CDCl_3 est représenté figure 2-10.

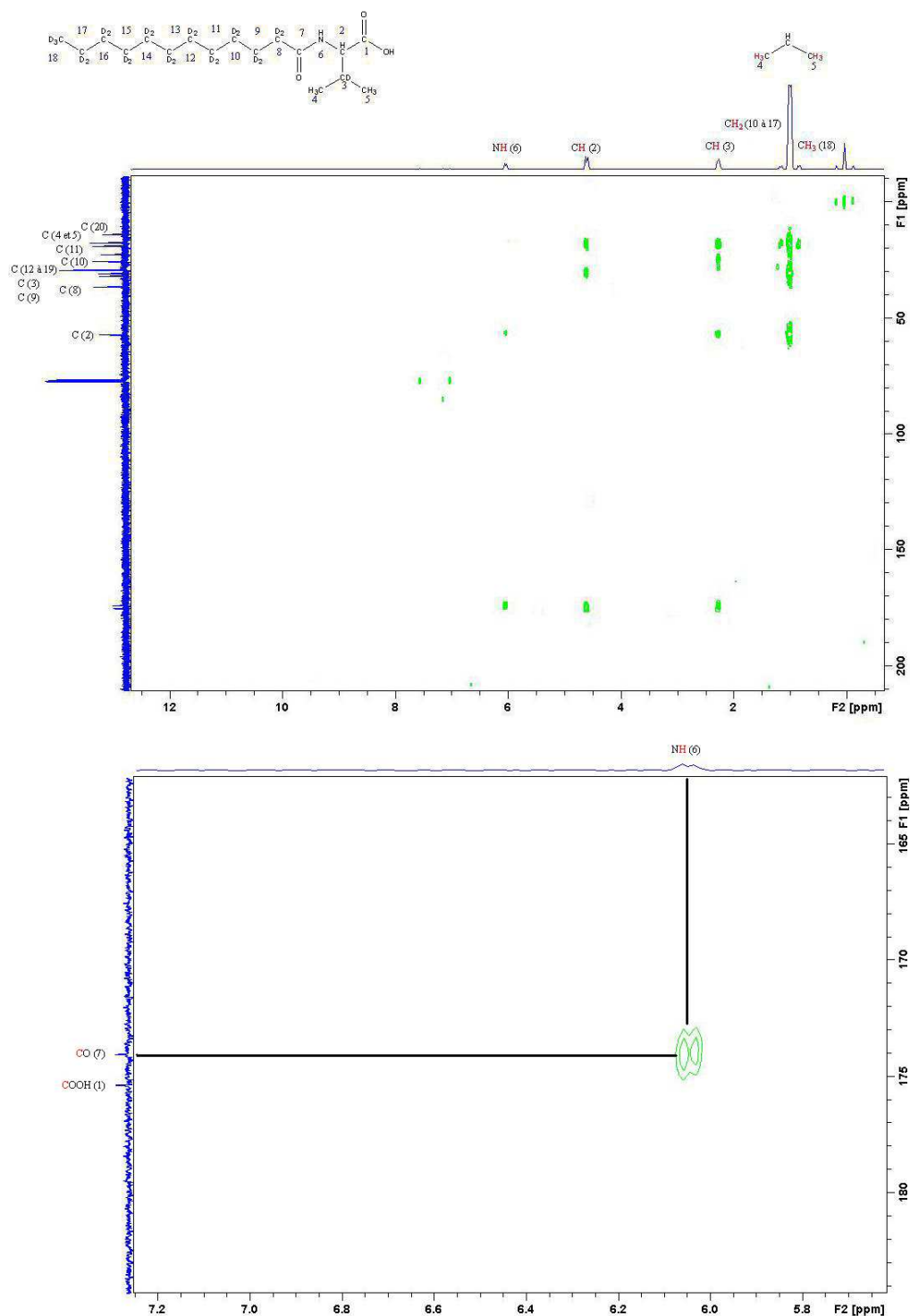


Figure 2-10 : Structure numérotée de la lauroyl valine deutérée et son spectre HMBC dans le chloroforme deutéré CDCl₃

La lauroyl valine est deutérée sur sa chaîne grasse, comme il est impossible de visualiser les atomes de deutérium en RMN-¹H, la chaîne ne sera pas visible. De ce fait, une

HMBC a été réalisée de manière à visualiser d'éventuels couplages entre les atomes de carbones de la chaîne grasse et les hydrogènes de la valine. Un couplage intéressant qui est mis en évidence sur la figure 2-10 est celui entre le carbonyle (7) et l'azote (6). Cela prouve que le couplage entre l'acide laurique deutéré et la valine a bien eu lieu et que la synthèse de $C_{12}V-^2H_{23}$ s'est déroulée avec succès.

c. Partie expérimentale

Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Mettler-Toledo (à 0,01mg). Tous les réactifs sont préalablement séchés sous vide.

✓ Synthèse de l'octanoyl valine

L'acide octanoïque (360mg, 2,5 mmoles) est ajouté à une solution de N-hydroxysuccinimide (288mg, 2,5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (0,515g, 2,5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (22 ml) est ensuite ajoutée. La mixture réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La dicyclohexylurée est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une huile impure. La purification par recristallisation n'a donné aucun résultat. 270mg du brut réactionnel sont dissouts dans 10ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (140mg) et de bicarbonate de sodium (105mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (50 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans le mélange cyclohexane/chloroforme (4 : 0,4 /v : v).

Caractérisation physique de l'octanoyl valine : RMN¹H (400MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 8,25 (s, 1H, COOH), 6,20 (d, 1H, NH), 4,30 (m, 1H, CH), 2,30 (m, 3H, CH, CH₂), 1,7 (m, 2H, CH₂), 1,3 (s, 8H, fatty CH₂), 1,0 (m, 6H, CH₃ CH₃), 0,90 (s, 3H, CH₃)

✓ Synthèse de la lauroyl valine

L'acide laurique (1g, 5 mmoles) est ajouté à une solution de N-hydroxysuccinimide (0,576g, 5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (1,08g, 5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (22ml) est ensuite ajoutée. La mixture

réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La dicyclohexylurée est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une poudre blanche impure. Le produit a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol (5 ml). 300mg du composé purifié sont dissouts dans 10ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (120mg) et de bicarbonate de sodium (89mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (30 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans le mélange éther de pétrole/chloroforme (5/0,5 : v/v).

Caractérisation physique de la lauroyl valine : RMN¹H (400MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 6,20 (d, 1H, NH), 4,60 (q, 1H, CH), 2,30 (m, 3H, CH, CH₂), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,30 (s, 16H, fatty CH₂), 1,0 (q, 6H, CH₃ CH₃), 0,90 (t, 3H, CH₃)

✓ Synthèse de la myristoyl valine

L'acide myristique (1,19g, 5 mmoles) est ajouté à une solution de NHS (0,575g, 5mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de DCC (1,08g, 5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (22ml) est ensuite ajouté. La mixture réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La DCU est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une poudre blanche impure. Le produit a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol (5 ml). 325mg du composé purifié sont dissouts dans 10ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (117mg) et de bicarbonate de sodium (84mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (30 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans du cyclohexane.

Caractérisation physique de la myristoyl valine : RMN¹H (400MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 6,20 (d, 1H, NH), 4,60 (q, 1H, CH), 2,30 (m, 3H, CH, CH₂), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,30 (s, 22H, fatty CH₂), 1,0 (q, 6H, CH₃ CH₃), 0,90 (t, 3H, CH₃)

✓ Synthèse de la palmitoyl valine

L'acide palmitique (0,64g, 2,5 mmoles) est ajouté à une solution de N-hydroxysuccinimide (0,288g, 2,5mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (0,515g, 2,5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (12ml) est

ensuite ajoutée. La mixture réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La DCU est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une poudre blanche impure. Le produit a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol (5 ml). 177mg du composé purifié sont dissouts dans 5ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (58,6mg) et de bicarbonate de sodium (42mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (15 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans du cyclohexane.

Caractérisation physique de la palmitoyl valine : RMN¹H (400MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 6,20 (d, 1H, NH), 4,60 (q, 1H, CH), 3,90 (s, 1H, COOH), 2,30 (m, 3H, CH, CH₂), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,30 (s, 42H, fatty CH₂), 1,0 (q, 6H, CH₃ CH₃), 0,90 (t, 3H, CH₃)

✓ Synthèse de la stearoyl valine

L'acide stéarique (0,71g, 2,5 mmoles) est ajouté à une solution de NHS (0,288g, 2,5mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de DCC (0,515g, 2,5 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (12ml) est ensuite ajouté. La mixture réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La DCU est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une poudre blanche impure. Le produit a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol (5 ml). 191mg du composé purifié sont dissouts dans 5ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (58,6mg) et de bicarbonate de sodium (42mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (15 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans du cyclohexane.

Caractérisation physique de la palmitoyl valine : RMN¹H (400MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 6,20 (d, 1H, NH), 4,60 (q, 1H, CH), 2,60 (s, 1H, COOH), 2,30 (m, 3H, CH, CH₂), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,30 (s, 46H, fatty CH₂), 1,0 (q, 6H, CH₃ CH₃), 0,90 (t, 3H, CH₃)

✓ Synthèse de la lauroyl valine deutérée (C₁₂V-²H₂₃)

L'acide laurique deutéré (1g, 4,48 mmoles) est ajouté à une solution de NHS (0,516g, 4,48 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec. Une solution de dicyclohexylcarbodiimide (0,92g, 4,48 mmoles) dans de l'acétate d'éthyle sec (22ml) est ensuite ajoutée. La mixture

réactionnelle est maintenue sous agitation toute la nuit à température ambiante. La dicyclohexylurée est éliminée par filtration et l'acétate d'éthyle est évaporé. On obtient une poudre blanche impure. Le produit a été purifié par recristallisation dans de l'éthanol (5 ml). 340mg du composé purifié sont dissouts dans 10ml de THF puis ajoutés à une solution de L-valine (136mg) et de bicarbonate de sodium (102mg) dans l'eau. Après 16 heures la solution est acidifiée à pH 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N. Le THF est évaporé sous vide. Après addition d'eau (30 ml) le composé est filtré, séché et purifié par recristallisation dans le mélange éther de pétrole/chloroforme (5/0,5 : v/v).

Caractérisation physique de la lauroyl valine : RMN¹H HMBC (400MHz, CDCl₃), $\delta^1\text{H}$ (ppm) / $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) : 6 / 175 (1H :NH ; 1C : CO), 4,5 / 20 (1H : CH ; 2C : CH₃ CH₃), 4,5 / 30 (1H : CH ; 1C : CH₃), 4,5 / 175 (1H : CH ; 1C : COOH ; 1C : CO), 2,3 / 30 (1H : CH ; 2C : CH₃ CH₃), 2,3 / 38 (1H : CH ; 1C : CH₂), 2,3 / 60 (1H : CH ; 1C : CH), 2,3 / 175 (1H : CH ; 1C : CO), 1 / 30 (6H : CH₃ CH₃ ; 2C : CH₃ CH₃)

1.5. Préparation des complexes colloïdaux lipoamino acides – Protéines

Le procédé de fabrication des complexes colloïdaux lipoamino acides – protéines est le suivant : La rhGH et la sCT en poudre sont dissoutes dans de l'eau déminéralisée aux concentrations respectives de 10mg/ml (0,45mM) et 2mg/ml (0,58mM). La rhEPO initialement en solution est à la concentration de 1,24mg/ml (3,6.10⁻²mM). Les solutions obtenues sont translucides. La C₁₂P est ajoutée de manière à obtenir un ratio molaire rhGH (ou rhEPO)/C₁₂P variant de 1/265 à 1/35 et un ratio molaire sCT/C₁₂P variant de 1/5 à 1/2. Le pH est ensuite ajusté entre 7 et 7,4 avec une solution de NaOH 1N pour les complexes colloïdaux rhGH/C₁₂P et rhEPO/C₁₂P et entre 4 et 5 pour le complexe colloïdal sCT/C₁₂P. Ces valeurs de pH sont optimales pour la stabilité des protéines. La rhGH est par la suite lyophilisée, car c'est sous cette forme qu'elle est la plus stable⁸³. La rhEPO et la sCT ne sont pas dégradées en solution, une lyophilisation ne s'avère donc pas nécessaire.

1.6. Dispositifs d'administration

1.6.1. hGH

La nébulisation du complexe rhGH/C₁₂P est réalisée grâce au Markos-Méfar Nebulizer (prototype) associé au ECO Markos-Méfar aérosol.



Figure 2-11 : Photo de l'Aerosol Eco (photo de la société Markos-Méphar)

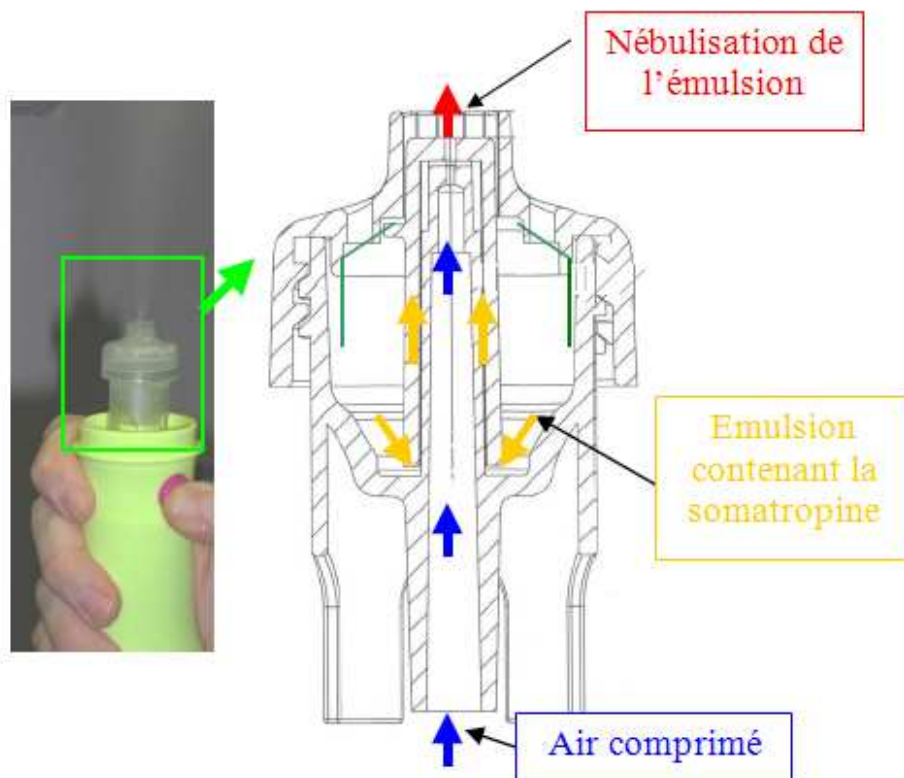


Figure 2-12 : Photo et schéma du Markos-Méfar Nebulizer prototype (échelle 5:1) (photo de la société Markos-Méphar)

Ce nébulisateur est capable d'administrer un volume de 500 μ l à 1ml en 10 secondes. Le volume mort est de 10%.

Le diamètre moyen ou MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) des gouttelettes en sortie du dispositif est déterminé grâce à l'API AEROSIZER MACH 2 développé par Markos Méfar.

La MMAD d'une particule est déduite de son temps de vol au sein de la zone de mesure de l'API AEROSIZER MACH 2 délimitée par deux faisceaux laser. Deux photomultiplicateurs détectent la perturbation des faisceaux lasers au passage d'une particule et la transforment en signal électronique. Le temps de vol est mesuré avec une précision de 25 nanosecondes.

Le choix du dispositif permettant l'administration de la rhGH par voie nasale passe par la détermination :

- des volumes maximum et minimum. On peut ainsi adapter la concentration en protéine et en vecteur en fonction du volume pulvérisable.
- De la taille des gouttelettes formées. En effet, il faut que le système expulse le minimum de gouttelettes inférieures à 5 μ m car elles sont susceptibles de passer dans les poumons et un minimum de gouttelettes supérieures à 50 μ m susceptibles d'être déglutis.

Les dispositifs d'administration nasale trouvés dans le commerce expulsent des gouttelettes polydisperses et de grandes tailles dont la MMAD est comprise entre 50 μ m et 100 μ m.

C'est pour ces raisons que Physica Pharma a établi une collaboration avec la société italienne Markos-Mefar, filiale du groupe Air liquide car le dispositif d'administration nasal qu'elle a développé expulse des gouttelettes monodisperses dont la MMAD est comprise entre 20 μ m et 30 μ m et très peu de gouttelettes présentant une taille inférieure à 5 μ m. D'autre part, ce nébulisateur permet d'expulser des volumes compris entre 500 μ l et 1ml ce qui est adapté à l'administration nasale de la rhGH. En effet, lors des études précliniques sur moutons, un volume de 500 μ l de solution de rhGH sera administré dans chaque narine de l'animal afin d'espérer atteindre la dose thérapeutique de la rhGH dans le sang.

1.6.2. Administration de la calcitonine de saumon et de l'érythropoïétine humaine

Contrairement à la rhGH, la sCT et la rhEPO seront administrées grâce au spray nasal BD AccusprayTM de BD Medical.



Figure 2-13 : Photo du spray nasal BD AccusprayTM de BD Medical

Caractéristiques techniques :

Volume maximum administrable : 205µl

Volume mort : 50µl

Ces sprays sont adaptés à l'administration de petits volumes (100-200µl). Le volume de solution d'EPO et de calcitonine administré lors des études précliniques est respectivement de 150µl et 200µl. Ces volumes administrés sont suffisant pour espérer atteindre la dose thérapeutique dans le sang.

2. Méthodes

2.1. Techniques d'analyse physicochimiques

2.1.1. Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique largement développée pour étudier la structure secondaire des protéines, car les spectres sont obtenus rapidement et sur de faibles quantités de produits. Cette spectroscopie de différence est sensible à la quantité et à l'activité optique des molécules chirales, qui, en interaction avec une lumière polarisée, modifient leur absorbance. En effet, un composé chiral aura un spectre de CD caractéristique contrairement à un mélange racémique. Dans le cas des protéines, seul l'un des composés optiquement actifs est présent, donc chaque protéine possède une empreinte spectrale. Les spectres dichroïques sont très sensibles aux repliements de la chaîne peptidique, et présentent alors des courbes différentes selon la structure secondaire et l'arrangement spatial qu'adoptent les protéines. Ainsi, le pourcentage de chaque type de structure (hélice α , feuillet β , hélice de type II ou pelote statistique...) peut être obtenu en déconvoluant le spectre de CD d'une protéine grâce à des spectres de peptides possédant des structures secondaires définies.

a. Principe

Selon la loi de Beer-Lambert, si I_0 est l'intensité de la lumière entrant dans la cellule et I l'intensité sortante, l'absorbance A est définie par la relation suivante :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon c l \quad (\text{II.1})$$

c étant la concentration dans l'échantillon (en molaire), l la longueur de la cellule de mesure (en cm) et ϵ est le coefficient d'extinction molaire (ou coefficient d'absorption molaire, en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le dichroïsme circulaire est l'absorption différentielle par un chromophore des deux composantes circulaires gauche et droite du champ électrique d'une lumière polarisée plane.

On mesure la différence d'absorption de la lumière entre les deux coefficients d'extinction molaire, définie de la manière suivante :

$$\Delta\epsilon = \left(\frac{1}{cl}\right) \Delta A \quad (\text{II.2})$$

Après la traversée de l'échantillon, la résultante de ces composantes décrit une ellipse dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation. L'ellipticité, appelée ψ , est définie par $\tan \psi = (a/b)$, a et b étant respectivement les demi-petits et demi-grands axes de l'ellipse⁸⁴.

L'ellipsité molaire est enfin décrite par la relation suivante :

$$[\theta] = \frac{100 \psi}{cl} = 3300 \Delta\epsilon \quad (\text{II.3})$$

L'ellipsité molaire $[\theta]$ est exprimée en $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$, ψ en degrés.

Dans le cas des protéines, le chromophore dominant l'absorption dans l'UV lointains (180 à 240 nm) est la liaison peptidique. Chaque liaison peptidique étant un chromophore, l'ellipsité molaire mesurée doit être pondérée par le nombre de liaisons peptidiques dans la protéine étudiée, notée n :

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{3300 \Delta\epsilon}{n} \quad (\text{II.4})$$

Elle est notée de la même manière que pour l'équation (II.3) en accord avec la littérature, mais elle devient l'ellipsité molaire par résidu $[\theta]_{\text{MRW}}$.

b. Méthode de déconvolution

Il existe de nombreuses méthodes pour déconvoluer les spectres de CD. En général, la déconvolution des spectres expérimentaux utilise une bibliothèque de structures connues

d'après des expériences préalables de RMN ou de diffraction aux rayons X⁸⁵⁻⁸⁷. La fiabilité des structures standards a été assurée par l'utilisation de peptides synthétisés.

L'ellipticité est caractéristique de chaque structure, or nous allons considérer pour nos protéines et peptide court, qu'il n'existe que les quatre conformations dont les dichrographes caractéristiques sont présentés figure 2-12. L'ellipticité globale est alors déterminée par la relation suivante⁸⁸:

$$[\theta] = [\theta]_{\alpha}f_{\alpha} + [\theta]_{\beta}f_{\beta} + [\theta]_{II}f_{II} + [\theta]_pf_p \quad (II.5)$$

où $[\theta]_{\alpha}$, $[\theta]_{\beta}$, $[\theta]_{II}$, $[\theta]_p$ sont les ellipticités molaires par résidu correspondant à chaque structure standard, et f_{α} , f_{β} , f_{II} , f_p les fractions de résidus appartenant à chaque type de structure (α pour les hélices α , β pour les feuillets β , II pour l'hélice de type II et p pour la pelote statistique). La proportion de chaque structure au sein de la protéine suit la relation : $f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{II} + f_p = 1$. Un programme de déconvolution a été mis au point au laboratoire (Dufourc et Buchoux, non publié). Ce programme étudie toutes les combinaisons possibles et détermine la meilleure solution.

✓ Obtention des courbes standards

Afin d'accéder aux structures secondaires des protéines, la réponse dichroïque des différentes structures secondaires classiques (le feuillet β , l'hélice α , l'hélice de type II ou encore la pelote statistique – désordonnée) doit être enregistrée en utilisant les standards suivants :

- La poly(L-lysine) à température ambiante et pH neutre (7,6) prend une forme intégralement en pelote statistique, représentant une structure aléatoire⁸⁹.
- La poly(L-lysine) est également capable d'adopter les conformations hélice α ou feuillet β (pH = 11,4 à température ambiante et à 60°C respectivement)⁸⁹. Cependant, en raison du manque de précision obtenu avec la poly(L-lysine) pour l'hélice α et le feuillet β il est préférable d'utiliser des peptides de référence présentant une structure en hélice α (hélice droite avec 3,6 résidus par tour, c'est le motif structural le plus répandu dans les protéines) ou

bien en feuillet β (forme particulière d'une hélice à deux résidus par tour parallèle, antiparallèle ou mixte) pour l'ensemble de leurs résidus.

- L'hélice de type II correspond à une hélice allongée, type de la poly(L-proline), qui est une hélice gauche avec 3 résidus par tour⁹⁰.

Les spectres dichroïques des quatre structures secondaires standard sont montrés figure 2-12. Chaque motif structural possède un spectre dichroïque caractéristique. En effet, le spectre de l'hélice α possède trois points singuliers : un maximum d'intensité très important à 192nm, puis deux minima d'intensités voisines à 208 et 220nm. Le feuillet β conduit à un spectre de moins grande intensité que l'hélice α avec un maximum d'absorption à 198nm et un minimum à 217nm. La structure en pelote statistique a ses maximum et minimum inversés par rapport au feuillet β : un minimum à 196nm et un maximum de très faible intensité à 220nm. L'allure du spectre représentant l'hélice de type II est proche du spectre de la pelote statistique, mis à part pour l'intensité et pour le déplacement de son minimum à 206nm.

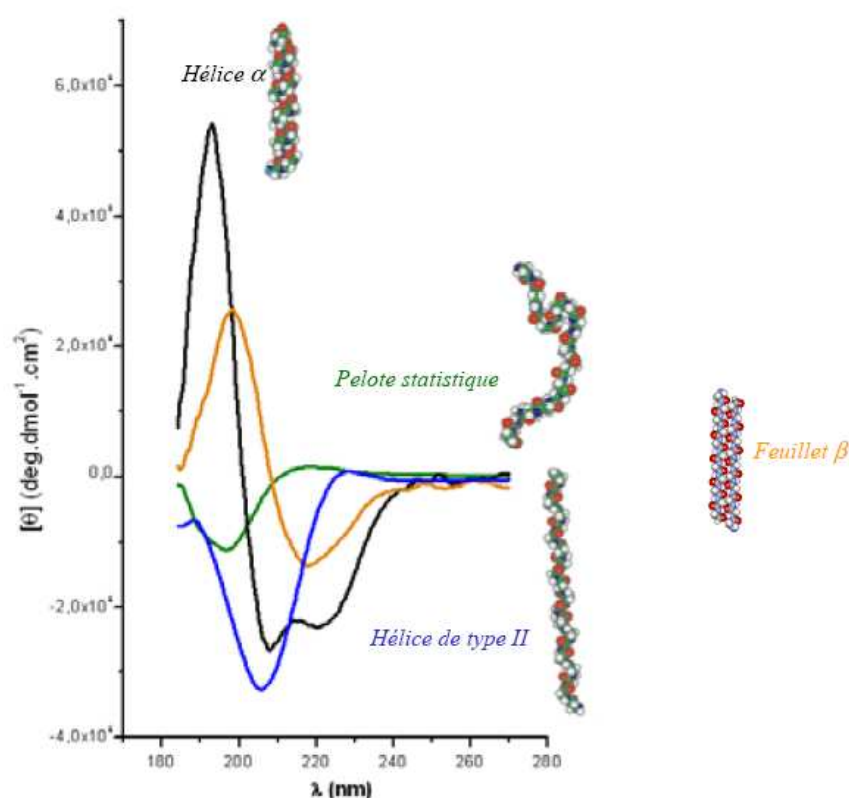


Figure 2-14 : spectres dichroïques des quatre structures secondaires standard (d'après ead.univ-angers.fr)

✓ Structure secondaire des protéines formulées

L'étape de formulation de protéines peut provoquer un stress avec perte partielle ou totale de la structure secondaire de la protéine. Le risque est d'avoir une perte d'activité de la protéine, mais également de la rendre immunogène. Il est donc capital de s'assurer que la protéine a conservé sa structure secondaire après couplage au vecteur. Cette étude sera effectuée par CD.

2.1.2. La diffusion de la lumière

a. Appareillage

La figure 2.15 représente un appareil de diffusion de la lumière. Lors de nos expériences nous avons utilisé un ALV / CGS-3 / Compact Goniometer System (ALV-GmbH, Allemagne).

Un faisceau laser polarisé verticalement est émis à une longueur d'onde de 488nm. Le faisceau est focalisé par des lentilles (L) vers la cellule de diffusion. L'analyseur (A) définit la polarisation de la lumière diffusée. Il est placé sur un bras amovible. Le détecteur est constitué d'un photomultiplicateur (PMT) et d'un amplificateur discriminant à pulsation (PAD). Le PMT amplifie les faibles signaux des photons ; le photon incident est converti en électron qui est ensuite accéléré par un champ électrique. L'électron est multiplié par un facteur 10^5 - 10^7 . Le PAD convertit ces électrons en pulsation et rejette les autres petites pulsations ne venant pas de la lumière diffusée.

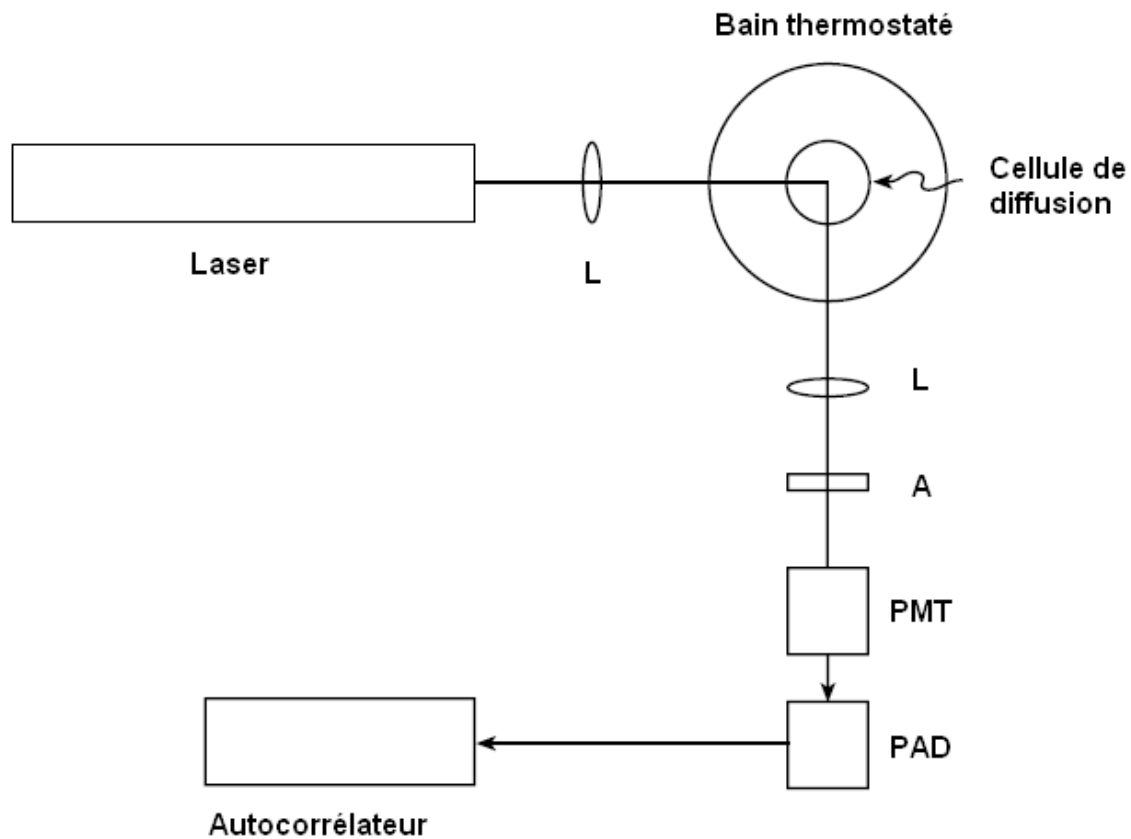


Figure 2-15 : Représentation schématique d'un appareillage de diffusion de la lumière

b. Diffusion dynamique de la lumière

Cette technique mesure les fluctuations d'intensités en fonction du temps qui apparaissent lorsque les particules sont soumises au mouvement brownien.

L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet la détermination d'une distribution de coefficient de diffusion des particules qui sont converties en distribution de tailles à l'aide de la relation de Stokes-Einstein⁹⁴.

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) sont effectuées à un angle de 90°. Les échantillons doivent être dilués pour éviter les phénomènes de diffusion multiples.

En diffusion de la lumière dynamique, le rayon de particules sphériques peut être déterminé grâce à l'équation de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (\text{II.6})$$

Avec D , le coefficient de diffusion (en m^2/s), R , le Rayon de la particule (en m), T , la température (en Kelvin), η , la viscosité (en kg/ms), k_B , la constante de Boltzmann égale à $1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$

La DLS nous donne des informations sur le rayon hydrodynamique R_h lorsque celui-ci est compris entre $0,5\text{nm}$ et $1\mu\text{m}$.

La diffusion de la lumière est une bonne technique d'analyse des protéines^{95, 96}. Les protéines sont habituellement suffisamment volumineuses pour diffuser à de faibles concentrations. La DLS a été utilisée pour déterminer les variations du R_h de la BSA en fonction de sa liaison aux surfactants anioniques^{97, 98}. D'autre part, la diffusion de la lumière est une technique très utile pour étudier les processus d'association, car c'est une technique très sensible à la présence d'agrégats, même à très faible concentration.

2.1.3. La résonance magnétique nucléaire

Dans ce paragraphe nous rappellerons dans un premier temps les principes de base de la résonance magnétique nucléaire, puis nous introduirons la technique DOSY (Diffusion Ordered spectroscopy) qui permet de déterminer le coefficient de diffusion d'une molécule et donc de remonter à son rayon hydrodynamique. Enfin, nous aborderons l'application de la RMN aux systèmes membranaires. Le développement de la théorie que nous présentons n'est pas exhaustif, nous avons préféré nous attarder sur les éléments essentiels à la compréhension des résultats expérimentaux qui suivront. De nombreux ouvrages pourront être consultés pour plus de détails⁹⁹⁻¹⁰¹.

a. Les bases de la RMN

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est fondée sur les propriétés que possèdent les atomes. Il a été déterminé par la physique atomique qu'un noyau est en rotation selon un axe donné et tout noyau possède une charge électrique positive. La charge

transportée lors de la rotation du noyau va générer un dipôle magnétique dans la direction de l'axe de rotation. En physique quantique on parlera de spin nucléaire pour décrire la rotation du noyau

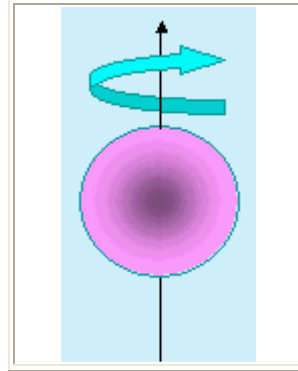


Figure 2-16 : Représentation idéalisée d'un noyau d'hydrogène en rotation générant un dipôle magnétique.

Pour un noyau possédant un nombre quantique de spin nucléaire non nul I , un dipôle est induit et son amplitude est définie par le terme μ , ce qui correspond au *moment magnétique nucléaire*. Cette valeur est caractéristique pour chacun des noyaux. Considérons que cette valeur soit un vecteur de la composante de μ , orientée selon l'axe z , μ_z . Il est possible de relier le nombre quantique de spin I à la valeur μ afin de s'approcher des valeurs énergétiques des états possibles. Le nombre de spin et le moment magnétique sont en relation de proportionnalité dont la constante, le rapport gyromagnétique, γ se définit par :

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI} \quad (\text{II.7})$$

Dans laquelle h est la constante de Plank.

Afin de décrire les couplages des spins nucléaires avec leur environnement, le concept d'hamiltonien de spin nucléaire, $\hat{H}$, a été introduit par Abragam⁹⁹. Cet hamiltonien se décompose en la somme d'hamiltoniens de couplage externe et d'un hamiltonien de couplage interne :

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{ext}} + \hat{H}_{\text{int}} \quad (\text{II.8})$$

✓ Couplage externe : l'effet zeeman

Considérons un noyau placé dans le référentiel du laboratoire (x,y,z) dont le moment cinétique $\vec{I}$ (I_x , I_y , I_z) est non nul. En l'absence de champ magnétique, les vecteurs moment magnétique des noyaux ont une orientation aléatoire. La résultante magnétique de l'ensemble et donc l'aimantation nucléaire est nulle.

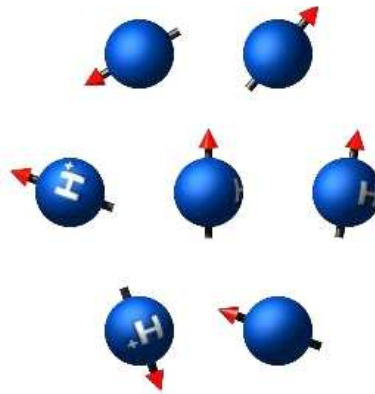


Figure 2-17 : Orientation aléatoire des vecteurs moment magnétique en l'absence de champ magnétique

D'après la théorie de la physique quantique, le moment cinétique $\vec{I}$ est quantifié : sa norme ainsi que sa composante suivant z ne peuvent prendre qu'un nombre de valeurs restreint. Ces valeurs sont définies par l'expression :

$$I_z = \hbar m_I \quad (\text{II-9}) \text{ avec } m_I \text{ compris entre } -I \text{ et } +I$$

Où $\hbar$ est la constante de Planck divisée par 2π et I est le nombre quantique de spin nucléaire. L'équation (II-9) indique que le nombre d'orientations possibles du moment cinétique du noyau est limité. Il en est de même de son moment magnétique $\vec{\mu}$ puisqu'il est relié à $\vec{I}$ par l'équation (II-7).

Prenons comme exemple un noyau deutérium. Son rapport gyromagnétique $\gamma = 41,07 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}/\text{T}$ et $I = 1$. Soumis à un champ magnétique intense B_0 (parallèle à l'axe z) le moment magnétique d'un noyau de deutérium peut alors s'orienter de trois façons selon la valeur de m_I (figure 2-16).

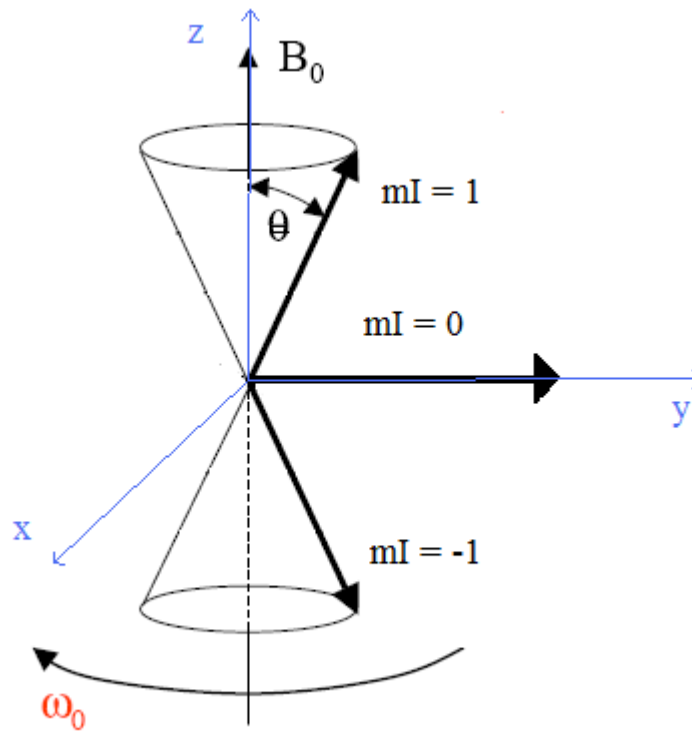


Figure 2-18 : Illustration des trois orientations possibles des moments magnétiques, μ de noyaux de deutérium ($I=1$) placés dans un champ magnétique B_0 . Seul le mouvement de précession des moments magnétiques dans l'état $m_I = 1$ est représenté. À l'équilibre de Boltzman, la répartition des populations entre les trois états est telle que l'aimantation résultante, M_0 , est alignée avec B_0 .

De même, les moments magnétiques d'un ensemble de noyaux de deutérium vont se répartir selon ces trois orientations. La mécanique statique montre que cette répartition suit la loi de Boltzmann. On peut montrer qu'à l'équilibre et aux températures de travail, l'état $m_I = 1$ est légèrement plus peuplé que les états $m_I = -1$ et 0. Par conséquent, la somme vectorielle de ces moments magnétiques est positive, c'est-à-dire que l'aimantation est dirigée selon les z positifs à l'équilibre (Figure 2-19).

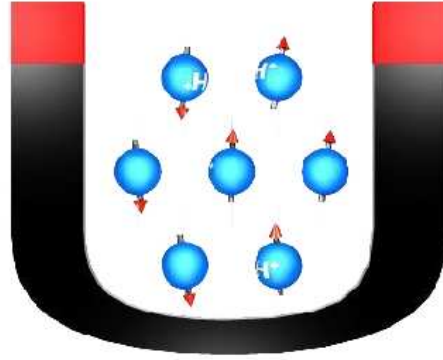


Figure 2-19 : Orientation des spins dans l'axe du champ B_0 , soit dans le même sens ("parallèle"), soit dans le sens contraire ("antiparallèle")

Le champ magnétique $\vec{B}_0$ (0, 0, B_0) va agir sur le noyau de deux façons : d'une part en levant la dégénérescence en $2I+1$ des niveaux énergétiques nucléaires et, d'autre part, en induisant un mouvement au moment magnétique nucléaire appelé précession de Larmor.

La levée de dégénérescence de l'énergie nucléaire provient de l'interaction dite de Zeeman, couplage entre le champ magnétique et le moment magnétique du noyau dont l'hamiltonien s'écrit :

$$\hat{H}_z = -\hat{\mu} \hat{B}_0 = -\gamma \hbar \hat{I} \hat{B}_0 = -\gamma \hbar \hat{I}_z B_0 \quad (\text{II.9})$$

Cette interaction se traduit par l'apparition d'une énergie :

$$E_m = -\mu \vec{B}_0 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar m_I B_0 \quad (\text{II.10})$$

Dans le cas du noyau de deutérium, m_I pouvant valoir -1, 0 et 1, le champ magnétique donne naissance à trois niveaux énergétiques équidistants. Les transitions énergétiques ne peuvent être observées que si le système obéit à la loi de Bohr : $\Delta E = h\nu$ et si $\Delta m = \pm 1$. Les deux transitions énergétiques observées pour le noyau de deutérium réclamant la même énergie, une seule raie devrait être observée si seule l'interaction de Zeeman (figure 2-24) existe. La fréquence d'absorption de cette raie, appelée fréquence de Larmor, se déduit de la relation (II.10) :

$$\omega_0 = 2 \pi \nu_0 = \gamma B_0 \quad (\text{II.11})$$

L'autre effet induit par le champ magnétique sur le moment magnétique est de l'entraîner dans un mouvement dit de précession autour de lui-même. Ce mouvement, illustré sur la figure 2.20 se fait avec la vitesse angulaire ω_0 dont l'expression est donnée par la relation (II.11).

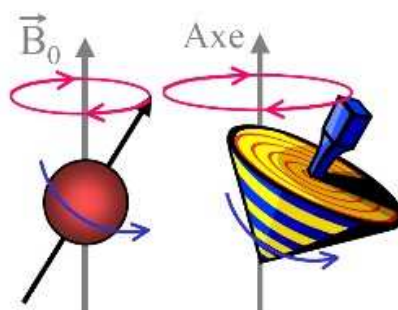


Figure 2-20 : Mouvement de précession d'un spin, également appelé précession de Larmor

✓ Couplage interne

L'hamiltonien relatif aux interactions internes $\hat{H}_{\text{int}}$, décrit les interactions entre le moment magnétique μ et les champs locaux présents dans l'échantillon (Mehring, 1983) :

$$\hat{H}_{\text{int}} = \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_\sigma + \hat{H}_Q + \hat{H}_Z \quad (\text{II.12})$$

L'hamiltonien $\hat{H}_J$ décrit les interactions spin-spin indirectes entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule, via les électrons de liaison. Les couplages J , indépendants de la valeur du champ B_0 , peuvent être homo- ou hétéro-nucléaires. Dans le cas de couplage proton-proton, on peut admettre qu'au-delà de trois liaisons les couplages deviennent faibles. Ce couplage est responsable des structures en multiplets observées en RMN des liquides.

L'hamiltonien $\hat{H}_D$ exprime l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques voisins μ_A et μ_B associés respectivement aux noyaux A et B, voisins dans l'espace. Cette interaction, indépendante de B_0 , est aussi appelée couplage dipolaire et décroît rapidement avec la distance r_{AB} . Elle peut se produire entre deux noyaux de même nature (couplage homonucléaire) ou de nature différente (couplage hétéronucléaire).

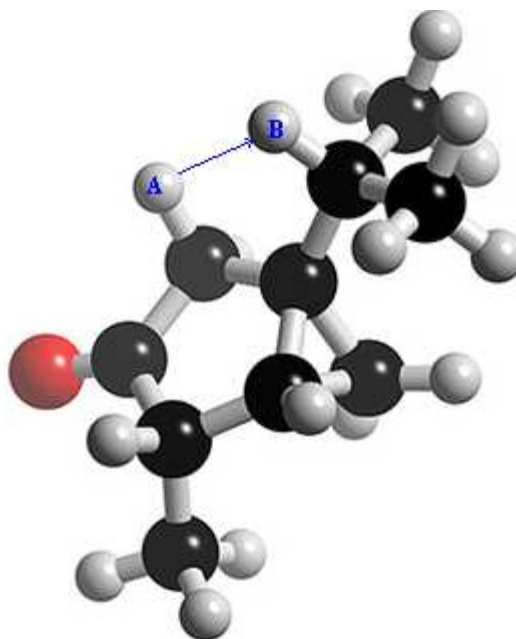


Figure 2-21 : *Interaction spin-spin directe entre un noyau d'hydrogène A et un noyau d'hydrogène B.*

Le blindage électronique, $\hat{H}_\sigma$, représente le couplage entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique local induit par la circulation des électrons autour du noyau sous l'effet du champ magnétique statique. La densité de distribution des électrons autour du noyau et son anisotropie provoque un déplacement de la fréquence de résonance. C'est pour cette raison que cette interaction est également appelée déplacement chimique. $\hat{H}_\sigma$ est dépendant de B_0 et est sensible à tout ce qui perturbe l'environnement électrique du noyau.

L'interaction électrique quadripolaire $\hat{H}_Q$ n'intervient que pour les noyaux possédant un moment électrique quadripolaire eQ (e est la charge électrique élémentaire et Q le moment quadripolaire du noyau). C'est le cas des noyaux de spins supérieur à $1/2$ comme le deutérium ($I=1$). Ces noyaux se comportent en effet comme un ensemble de charges électriques n'ayant pas de symétrie sphérique d'où la présence d'un moment quadripolaire.

Ces interactions ne sont pas équivalentes et dépendent du type de noyau étudié et de la nature de l'échantillon. Les ordres de grandeurs des hamiltoniens sont donnés en Hertz dans le tableau 2-3 pour des échantillons dits « solides » (interactions internes anisotropes) et pour des échantillons « liquides » (isotropes)

	$\hat{H}_Z$	$\hat{H}_D$	$\hat{H}_J$	$\hat{H}_\sigma$	$\hat{H}_Q$
Solides	10^8	10^2	10^4	10^4	10^6
liquides	10^8	10^2	0	10^4	0

Tableau 2-3 : ordre de grandeur des hamiltoniens dans le cas d'échantillons « solides » et « liquide »

Les deux principales interactions en RMN des liquides sont l'interaction Zeeman ($\hat{H}_Z$) et le blindage électronique ($\hat{H}_\sigma$). En RMN des solides s'ajoutent en plus, l'interaction spin-spin indirectes ($\hat{H}_J$) et l'interaction électrique quadripolaire ($\hat{H}_Q$).

✓ Principe d'une expérience de RMN

Le déroulement d'une expérience de RMN est représenté figure 2-22. Celle-ci comprend trois phases qui sont l'équilibre, l'excitation et la relaxation.

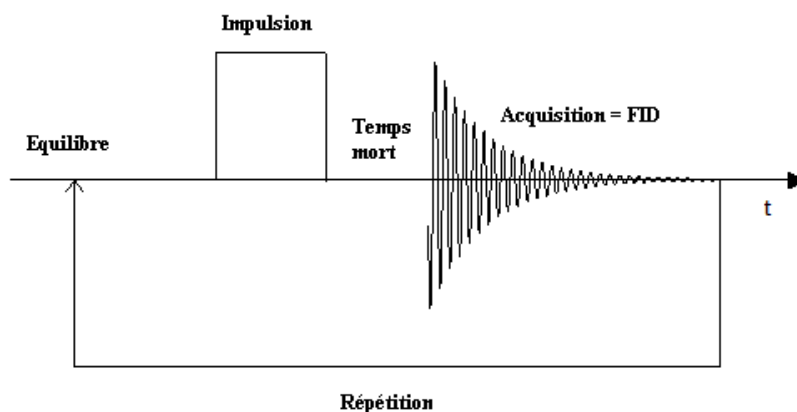


Figure 2-22 : Schéma représentant l'expérience de RMN

① **L'équilibre** : Les spins nucléaires, placés dans un champ magnétique, précessent à la fréquence de Larmor ω_0 . Les spins se répartissent sur les $2I+1$ niveaux d'énergie selon la loi de Boltzman. L'aimantation résultante le long de l'axe z (colinéaire à B_0) est notée M_0 .

② **L'excitation** : La distribution des spins sur les différents niveaux d'énergie est perturbée par l'apport d'un champ radiofréquence (RF) B_1 . Le champ radiofréquence va entraîner un phénomène de résonance seulement si sa fréquence est la même que celle de précession des spins. Elle va apporter de l'énergie au système de spins : c'est la phase d'excitation. Le champ radiofréquence RF provoque une bascule de l'aimantation résultante du groupe de spins placés dans un champ magnétique. Cette bascule est liée à un transfert d'énergie vers le système de spins.

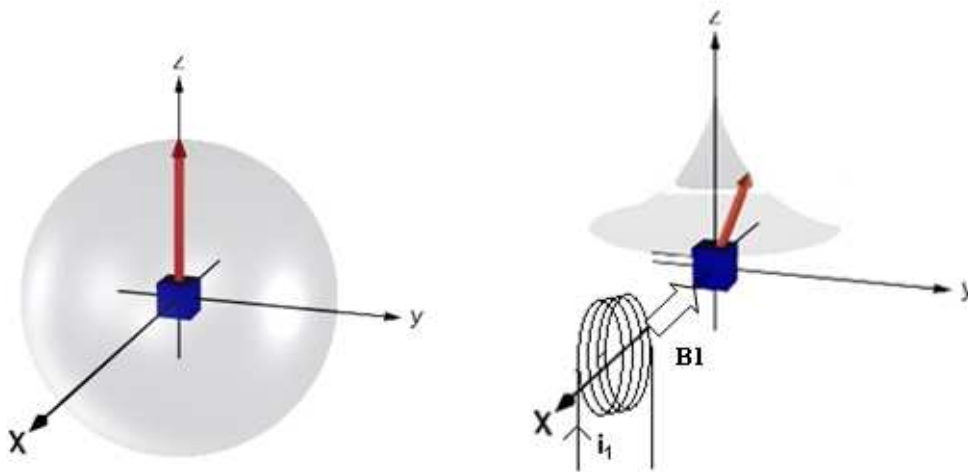


Figure 2-23 : *Bascule de l'aimantation résultante suite à l'application d'un champ radiofréquence (RF) B_1 .*

L'angle de bascule de l'aimantation résultante dépend de l'intensité et de la durée pendant laquelle est appliquée l'onde RF. À cause de la précession de Larmor il est nécessaire de définir un référentiel tournant (x' , y' , z') dont l'axe z' est parallèle à l'axe z du référentiel du laboratoire (x , y , z). On peut décomposer l'aimantation résultante en une composante longitudinale (selon l'axe Z , dans l'axe de B_0) et une composante transversale. La phase d'excitation, et la bascule se traduisent par une diminution de l'aimantation longitudinale (qui peut aller jusqu'à s'inverser), et l'apparition d'une aimantation transversale (sauf pour une bascule à 180°).

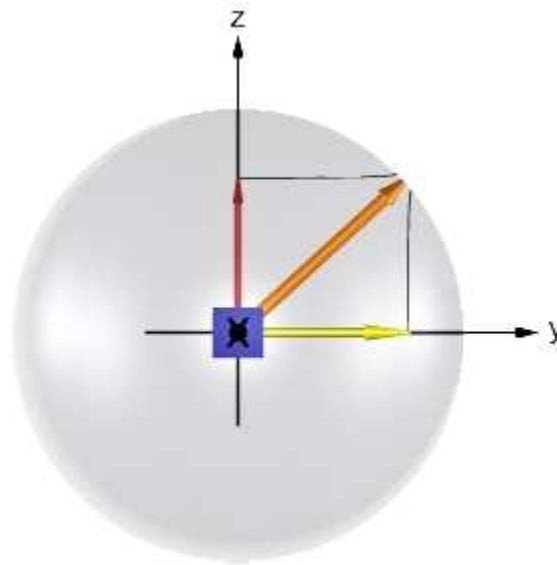


Figure 2-24 : Décomposition de l'aimantation résultante en une composante longitudinale et une composante transversale

L'aimantation longitudinale est la traduction de la différence de population entre spins "parallèles" et "antiparallèles". L'aimantation transversale est la traduction de la mise en phase plus ou moins complète des spins. Si l'on prend l'exemple d'un champ radiofréquence RF appliqué pour une durée correspondant à un angle de bascule de 90° : il n'y a plus de composante longitudinale, car il y a égalisation des populations "parallèle" et "antiparallèle". Par contre, il apparaît une composante transversale, car les spins sont mis en phase¹⁰².

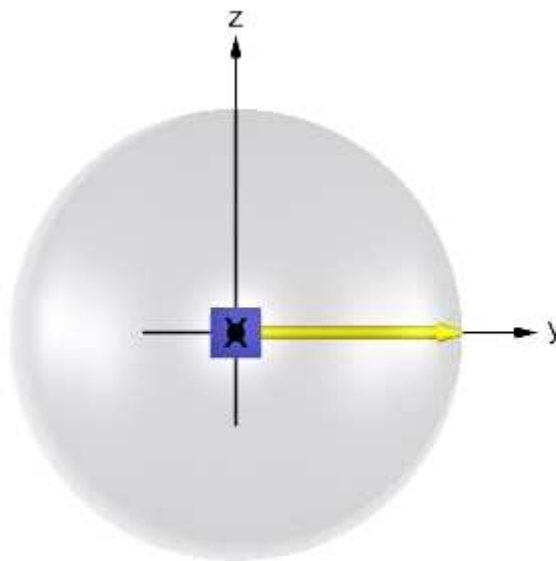


Figure 2-25 : Disparition de la composante longitudinale et apparition de la Composante transversale suite à l'application d'une impulsion de champ radiofréquence RF dite de 90°

En fait, lorsque les protons changent d'énergie, ils le font en se mettant en phase les uns par rapport aux autres ce qui fait apparaître une composante transversale de l'aimantation (figure 2-26)

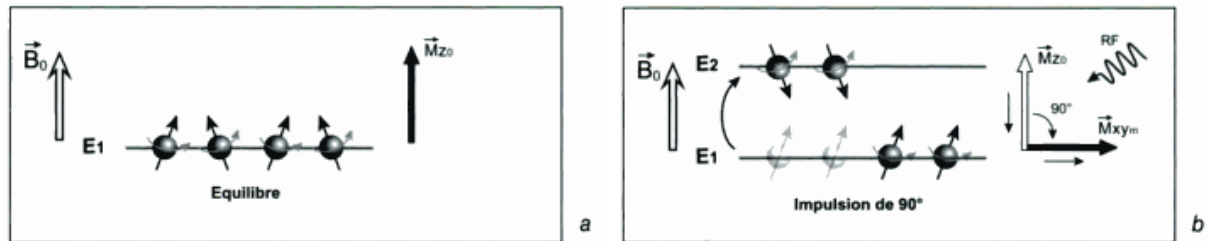


Figure 2-26 : Effet des impulsions RF sur le vecteur d'aimantation macroscopique M . (a) Avant l'impulsion RF il y a 4 protons parallèles en surnombre qui vont être à l'origine de l'apparition d'un vecteur macroscopique M aligné sur B_0 , sans composante transversale car les protons sont déphasés. (b) L'impulsion RF provoque des transitions $E_1 \rightarrow E_2$ et un rephasage des protons. Lorsque deux des protons en surnombre sont passés du niveau E_1 au niveau E_2 il y a égalisation des populations sur les deux niveaux d'énergie ; il n'y a plus de composante longitudinale¹⁰².

③ **La relaxation** : La relaxation correspond au retour à l'équilibre de l'aimantation résultante. Elle se décompose en 2 phénomènes obéissant à des mécanismes très différents : la relaxation longitudinale qui correspond à la repousse de la composante longitudinale, et la relaxation transverse, qui correspond à la chute de l'aimantation transverse.

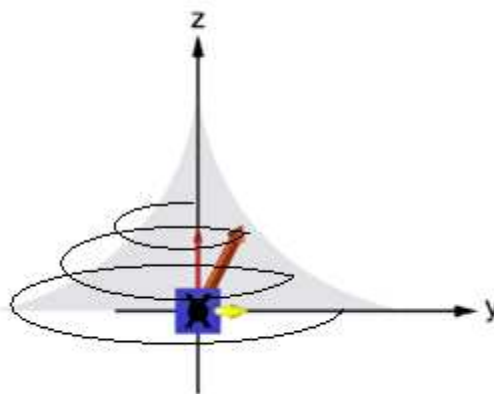


Figure 2-26 : Repousse de la composante longitudinale et chute de la composante transversale lors du phénomène de relaxation

La repousse longitudinale correspond au retour au niveau de basse énergie ("parallèle") des spins excités. C'est la relaxation spin-réseau. La croissance de l'aimantation longitudinale lors de la relaxation suit une courbe exponentielle. Elle est caractérisée par le temps T_1 . Le T_1 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63 % de sa valeur finale. Le temps T_1 est de l'ordre de quelques millisecondes à plusieurs heures.

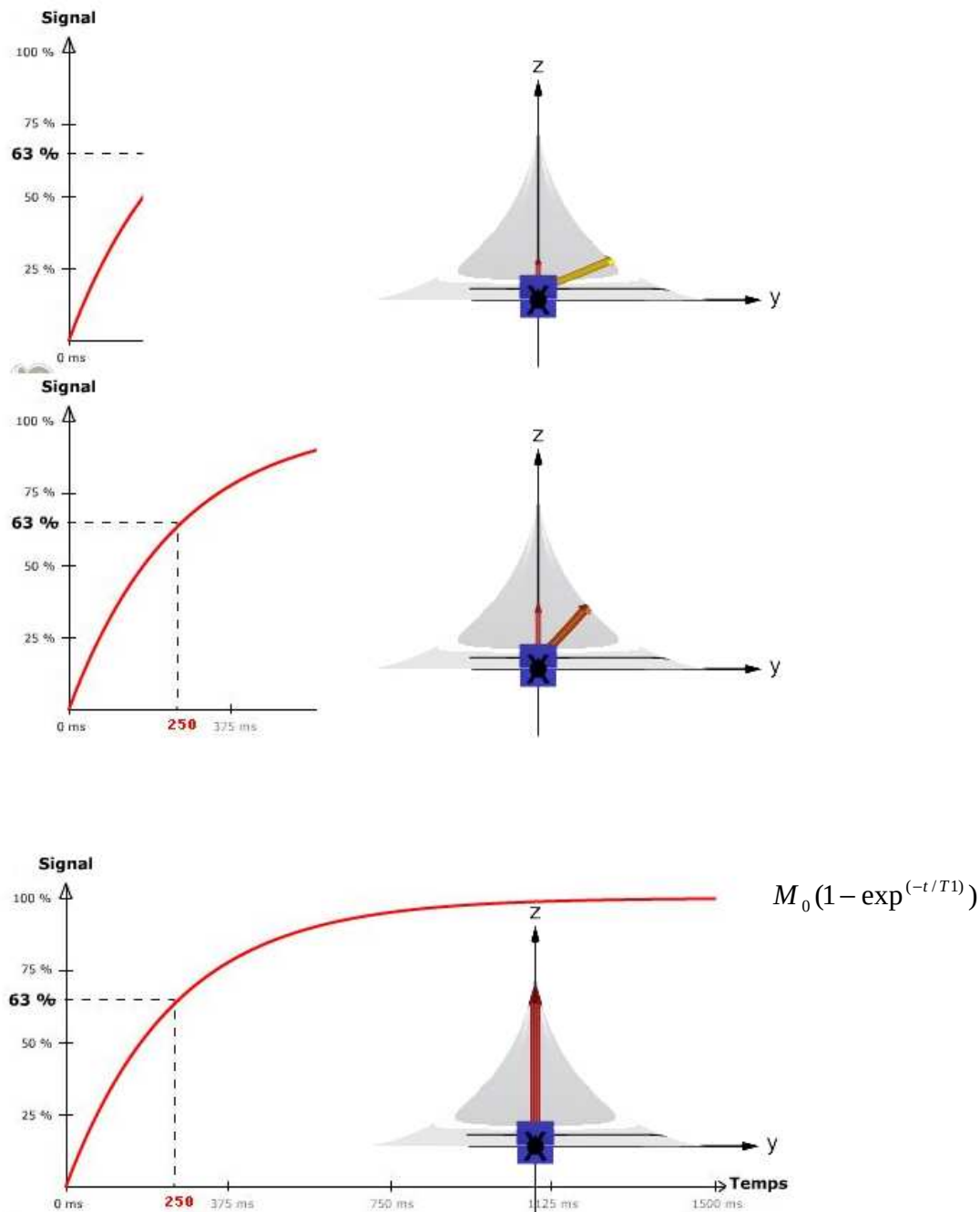


Figure 2-27 : Croissance de l'aimantation longitudinale lors de la relaxation spin-réseau

La relaxation transversale est due au déphasage des spins : le déphasage est lié aux interactions spins-spins qui créent des hétérogénéités de champ, et donc de fréquence de précession. Les spins n'ayant pas exactement la même fréquence, ils se déphasent rapidement. Cette chute de l'aimantation transversale suit en général une courbe exponentielle décroissante caractérisée par le temps T_2 . Le T_2 correspond au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale. La relaxation transversale est beaucoup plus rapide que la relaxation longitudinale : T_2 est toujours plus court ou égal à T_1 .

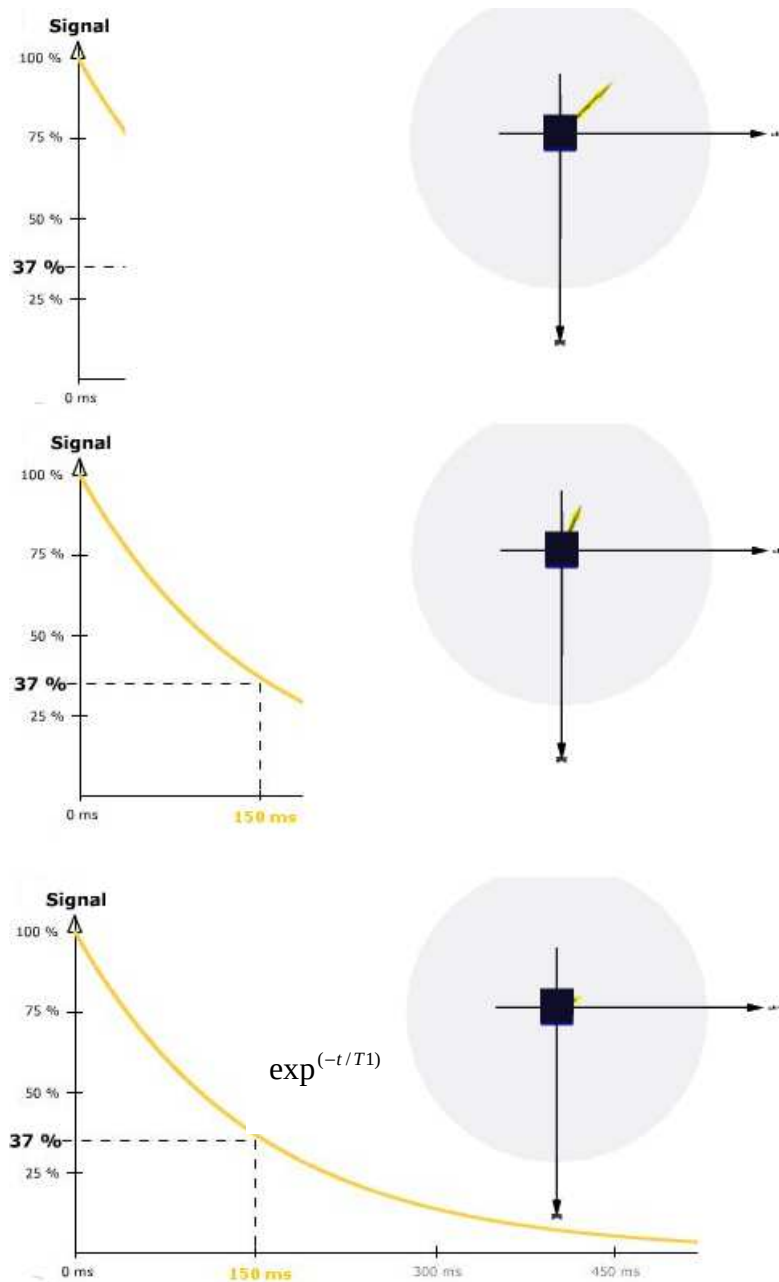


Figure 2-28 : Chute de l'aimantation transversale lors de la relaxation spin-spin

La relaxation longitudinale est liée à la dynamique rapide de l'environnement moléculaire du noyau considéré ; son étude donne des informations sur les mouvements moléculaires à l'échelle de la nanoseconde. La relaxation transverse donne quant à elle des informations sur la dynamique lente des molécules ou de leurs assemblages (à l'échelle de la microseconde ou de la seconde). Le signal de précession libre des spins ou FID (Free induction decay) que l'on peut détecter en plaçant une bobine dans le plan transverse est une cosinussoïde d'argument ($\omega_0 t$) convoluée par une exponentielle décroissante caractérisant la relaxation transverse.

Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel est assuré par un outil mathématique, la transformée de Fourier (figure 2.29) ; celle-ci conduit à l'obtention d'un spectre composé de raies dont la position en fréquence rend compte des couplages internes électriques et magnétiques des noyaux, et dont la largeur est associée à la dynamique et à l'orientation des molécules¹⁰³.

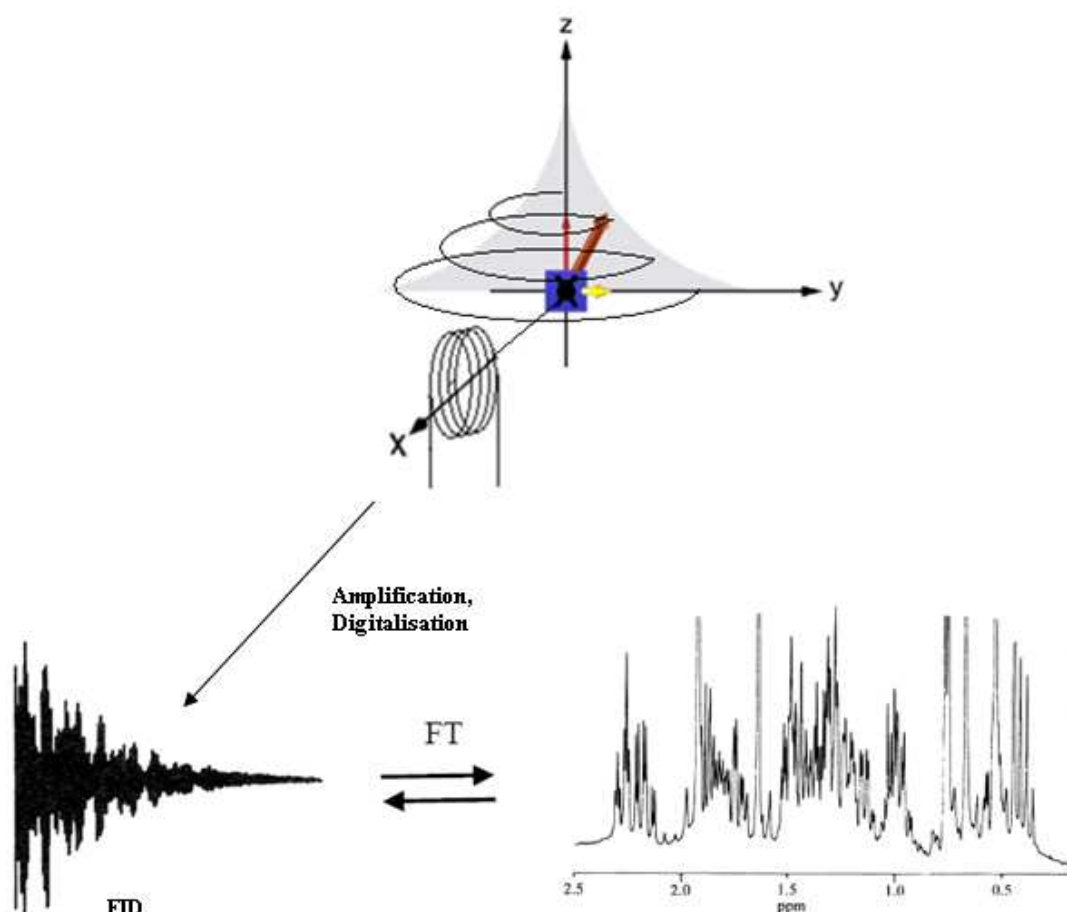


Figure 2-29 : Utilisation de la transformée de Fourier (FT) pour passer du domaine temporel (gauche) à celui des fréquences (droite). La FID (gauche), constituée de cosinussoïdes est transformée en un spectre constitué de raies Lorentziennes.

Lorsque l'émission de radiofréquence est interrompue, le système va restituer l'énergie absorbée pour retourner à l'état d'équilibre de départ : c'est la phase de relaxation.

b. La RMN à deux dimensions (RMN 2D)

La RMN 2D permet de montrer les corrélations existant entre un spin A et un spin B. Ces spectres sont donc particulièrement utiles dès que les molécules étudiées sont complexes (comportant beaucoup d'atomes couplés entre eux, couplage à longue portée entre spins ou à travers l'espace...) et que l'interprétation du spectre 1D devient difficile. Ces spectres permettent de trouver les corrélations entre les déplacements chimiques des différents spins qui sont couplés entre eux. Nous avons utilisé la RMN 2D hétéronucléaire ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) pour vérifier le bon déroulement de la synthèse de la C_{12}V perdeutérée. En effet, la synthèse de ce type de lipoamino acides s'effectue par couplage entre une chaîne grasse deutérée et un acide aminé. Le deutérium ne donnant aucun signal visible en RMN du proton il n'est pas possible de s'assurer du bon déroulement du couplage. La liaison formée suite à ce couplage étant une liaison peptidique il suffit de montrer qu'il y a bien un couplage 2J entre le $\text{C}13$ du carbonyle et l'hydrogène de l'azote. Cette étude est réalisée en utilisant la séquence RMN HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Cette technique permet d'observer les couplages 2J . La figure 2-10 montre qu'il y a un couplage entre le $\text{C}13$ du carbonyle et l'hydrogène de l'azote, ce qui prouve que la synthèse s'est déroulée avec succès.

c. Coefficient de Diffusion translationnel, D

La diffusion translationnelle d'une molécule dans un solvant suit un mouvement brownien de temps de corrélation τ_c caractérisé par un coefficient de diffusion D. Ce dernier est associé à la taille de la molécule comme le montre l'équation de Stokes-Einstein (II.6). Cette détermination se fait par RMN DOSY et sera appliquée à la détermination du rayon hydrodynamique des systèmes colloïdaux à base de lipoamino acide et de cyclosporine.

La séquence d'écho de spin de Stejskal et Tanner¹⁰⁴ aussi appelée PFG-SE (Pulse Field Gradient Spin Echo), est la méthode la plus simple et la plus communément employée. Elle est présentée en Figure 2-31. et se décompose comme suit : une première impulsion RF à 90° est appliquée et est suivie par une impulsion de gradient d'intensité g et de durée δ qui

entraîne un déphasage progressif qui est d'intensité différente selon la position des spins dans le tube.

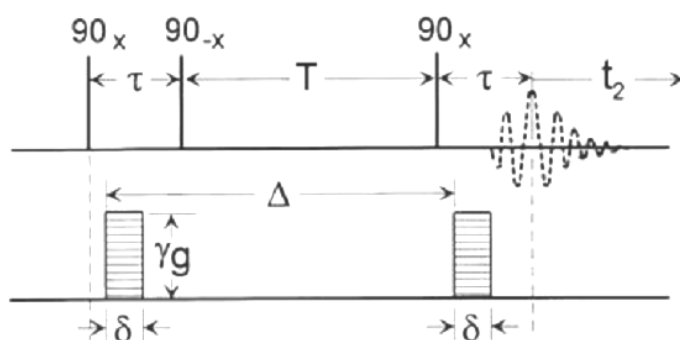


Figure 2-31 : Représentation schématique de la séquence d'écho stimulé ou PFG-STE (Extrait de Johnson ¹⁰⁵).

Une impulsion RF à 180° est ensuite appliquée afin de changer le signe du déphasage. Enfin, une seconde impulsion de gradient présentant les mêmes caractéristiques que la première est appliquée afin de refocaliser les spins. Cette refocalisation ne sera possible que si les spins n'ont pas diffusé pendant le délai séparant les deux impulsions de gradients (Δ). Dans le cas contraire, la refocalisation ne sera pas parfaite et le signal de l'écho sera atténué.

En augmentant progressivement la force des gradients (g), on obtient ainsi une série de spectres dont les signaux s'atténuent progressivement comme illustré en Figure 2-32.

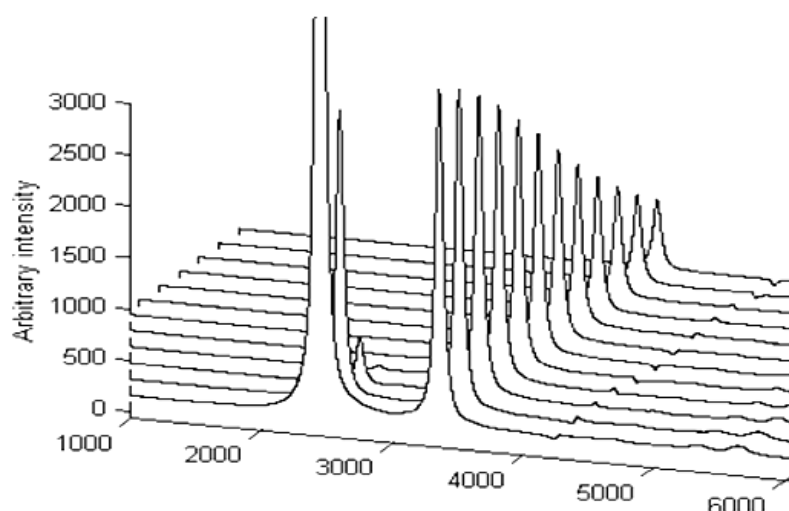


Figure 2-32 : Exemple de spectres obtenus lors de la mesure d'un coefficient de diffusion.

La puissance et le temps d'impulsion des gradients sont calibrés de telle sorte qu'entre l'application de 2% et 95% de gradient z , il ne reste qu'environ 5 à 10% du signal. Il existe une relation directe entre l'intensité du signal résiduel et le gradient appliqué, définie par la relation¹⁰⁶ :

$$\ln(I / I_0) = -\left[\gamma^2 \cdot \delta^2 \cdot G_z^2 \cdot (\Delta - \delta / 3)\right] D \quad (\text{II.14})$$

avec I_0 , l'intensité du pic avec un gradient z de 2%, et I l'intensité résultante ; γ étant le rapport gyromagnétique. Δ et δ sont respectivement le temps de diffusion et la durée d'application des gradients. Tous ces paramètres sont connus, ainsi lorsqu'on trace la courbe $\ln(I/I_0)$ versus G_z^2 , la pente permet de remonter à D .

d. Application aux systèmes membranaires

✓ Les interactions du noyau deutérium

Le deutérium a un spin nucléaire $I=1$ et possède un moment électrique quadripolaire noté eQ où e représente la charge élémentaire et Q le moment quadripolaire du noyau. Plusieurs interactions peuvent être prises en compte, mais dans nos systèmes, l'interaction quadripolaire est beaucoup plus importante que les autres. L'hamiltonien total du système est soumis à l'interaction quadripolaire et à l'interaction Zeeman et s'écrit de la manière suivante :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_Q$$

✓ L'éclatement quadripolaire

Nous avons vu que l'interaction quadripolaire n'intervient que sur les noyaux de spins supérieurs à 1/2 comme le deutérium ($I=1$). Sous l'effet Zeeman et quadripolaire il y a trois niveaux d'énergie non équidistants pour lesquels deux transitions sont possibles. Ces transitions sont à l'origine d'un doublet de raies, centré sur la fréquence de Larmor ω_0 (figure 2-33).

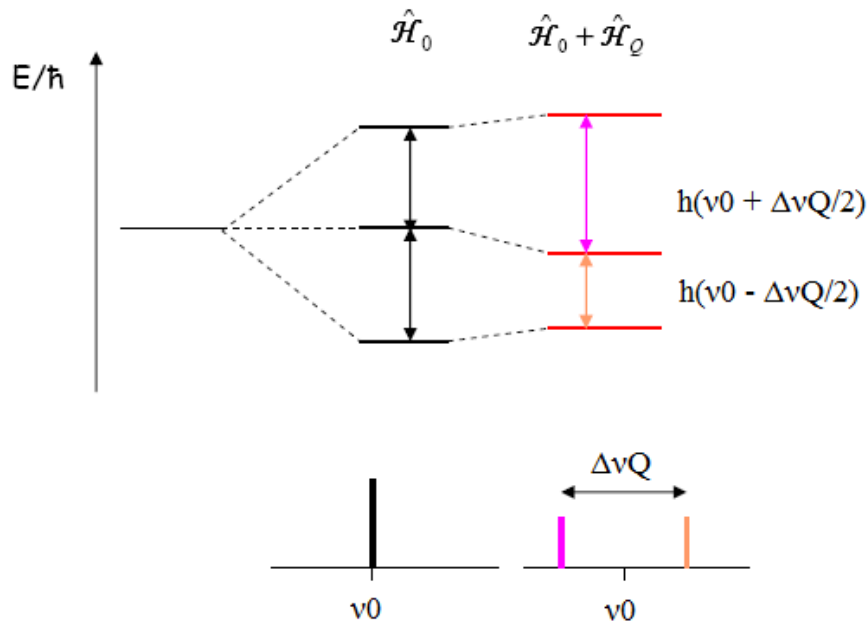


Figure 2-33 : Effet des interactions Zeeman et quadripolaire sur les niveaux énergétiques et le spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire d'un noyau de deutérium.

L'écart en fréquence entre ces deux raies est appelé l'éclatement quadripolaire. Dans le cas des lipides possédant une symétrie axiale l'éclatement quadripolaire est défini par la relation :

$$\Delta \nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right]$$

✓ Spectre de poudre

Les liaisons C-D des membranes biologiques ont une distribution sphérique. En effet, la phase lamellaire ne s'oriente pas dans le champ magnétique et les atomes de deutérium sont alors orientés de façon aléatoire. Chaque orientation se caractérise par un doublet en RMN du deutérium. La distribution des liaisons C-D peut-être schématisée par une sphère comme illustrée sur la figure 2-34. Cependant, toutes les orientations ne sont pas équiprobables. On voit sur la figure 2-34 que l'orientation de la liaison la moins probable correspond à l'angle $\beta = 0^\circ$ tandis que la plus probable correspond à $\beta = 90^\circ$.

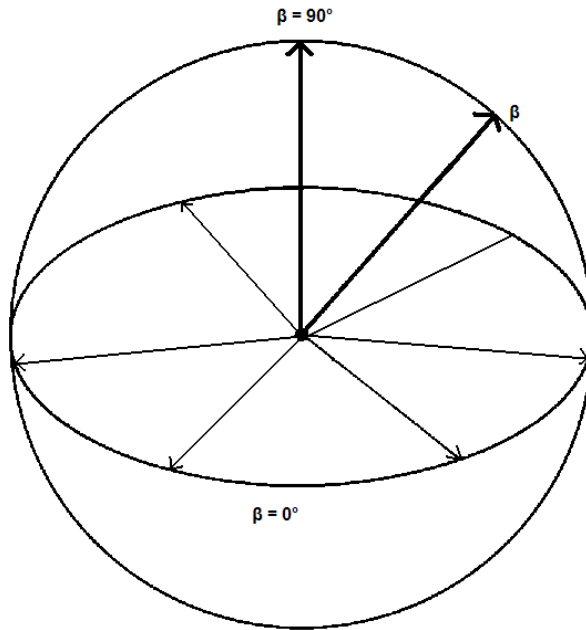


Figure 2-34 : Représentation de la distribution sphérique des liaisons C-D ($\rightarrow$) dans le cas des systèmes membranaires. L'orientation la plus probable est obtenue lorsque β vaut 90° , la moins probable lorsque β vaut 0°

Le spectre se présente donc comme la superposition de doublets convolués par la probabilité d'existence de l'orientation correspondante¹⁰¹. Le spectre correspondant est présenté figure 2-35. Un tel spectre porte le nom de doublet de « Pake ».

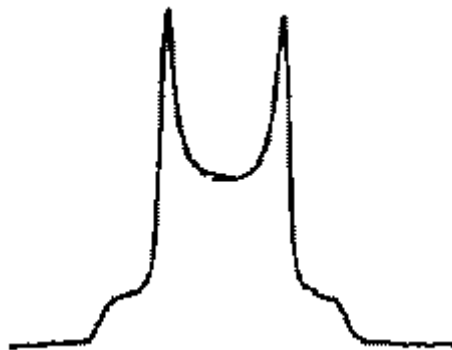


Figure 2-35 : Spectre de poudre caractéristique des membranes biologiques

Expérimentalement c'est l'écart entre les raies les plus intenses (qui correspondent à $\beta = 90^\circ$) que l'on mesure :

$$\Delta V_{90^\circ} = \frac{3}{4} A_Q$$

Sa valeur devrait être de 125 KHz dans le cas d'une liaison C-D. Dans les systèmes membranaires à température ambiante, ce n'est jamais le cas, car il faut considérer les mouvements des liaisons qui induisent un rétrécissement de Δv_Q .

✓ Influence des mouvements sur l'éclatement quadripolaire

Les liaisons C-D d'une chaîne aliphatique de lipides sont soumises à des mouvements susceptibles de modifier l'orientation de ces liaisons au cours du temps. Ces mouvements sont des changements conformationnels de la chaîne induits par des isomérisations de type gauche-trans, des vibrations, la rotation du lipide autour de son axe long, la diffusion latérale des lipides et les ondulations des bicouches

La présence de mouvements moléculaires et intramoléculaires va changer la largeur des spectres de RMN. La figure 2-36 décrit l'influence des mouvements moléculaires sur la forme des spectres.

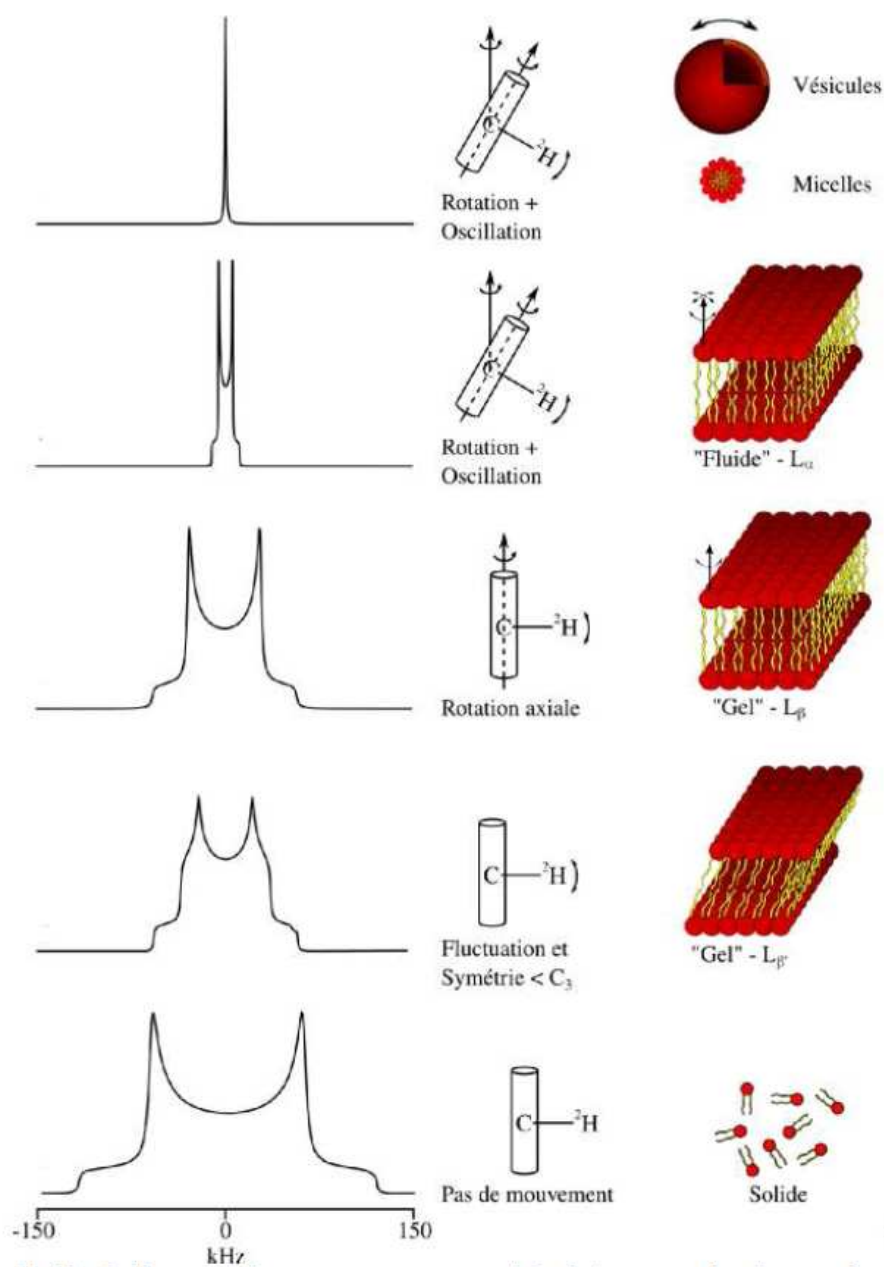


Figure 2-36 : Influence des mouvements moléculaires sur la forme des spectres RMN 2H

✓ Paramètres d'ordre

La description détaillée de l'ensemble des mouvements ainsi que la quantification de leur effet respectif sur l'éclatement quadripolaire est très difficile dans nos systèmes. Nous avons cependant accès à une grandeur globale, le paramètre d'ordre, qui permet de décrire les fluctuations dues aux mouvements moléculaires.

Considérons une bicouche membranaire. Attachons un système d'axes P (x, y, z) à un site particulier d'une molécule (par exemple une liaison C-D, l'axe z étant colinéaire à cette liaison) et un autre système d'axe B (x', y', z'), associé à la normale à la bicouche n .

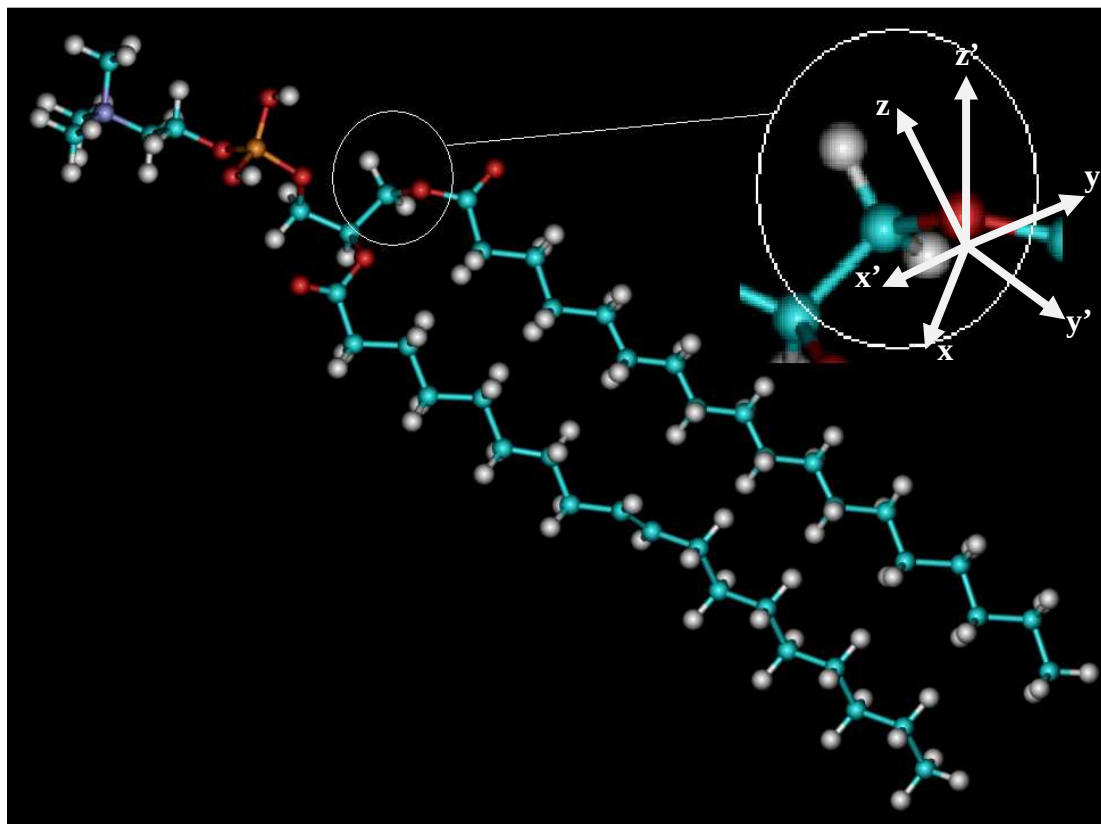
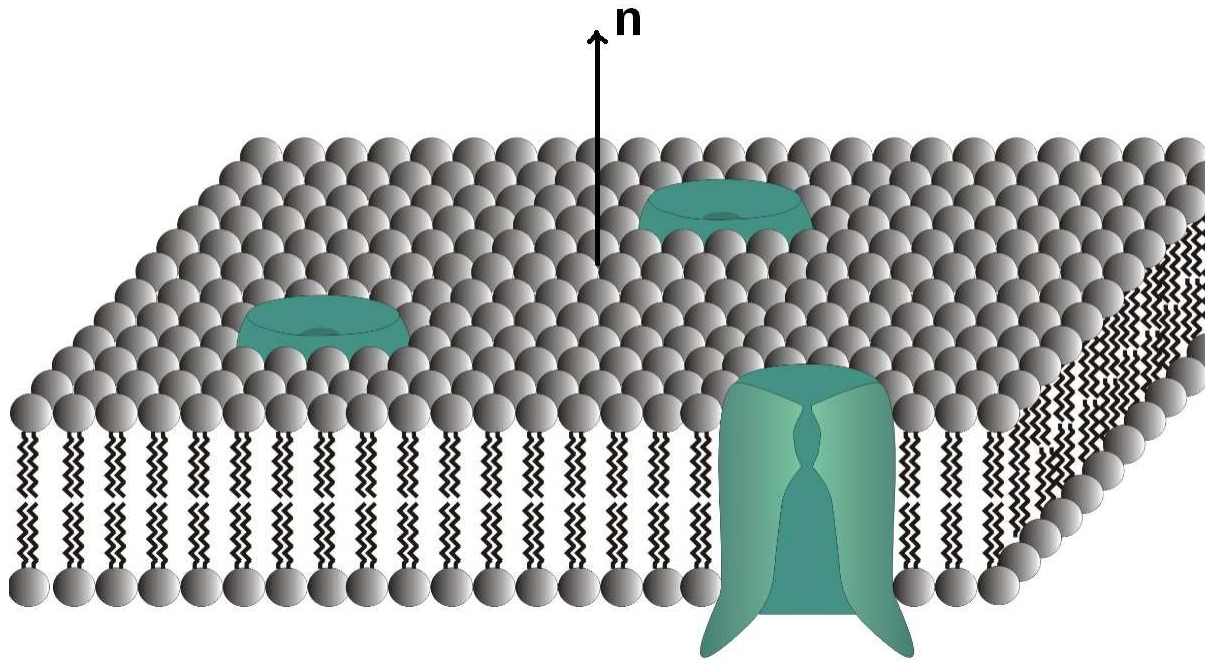


Figure 2-37 : Structure de la diméthyl phosphatidyl choline et représentation des axes $P(x, y, z)$ et $B(x', y', z')$.

Les fluctuations dans l'espace et dans le temps des axes de P par rapport à z' (ou n) peuvent alors être estimés par les paramètres d'ordre, notés S_{ii} , qui s'expriment par :

$$S_{ii} = \frac{1}{2} (3\langle \cos^2 \beta_i \rangle - 1) \quad (\text{II.13})$$

Où $i = x, y, z$. Le terme $3\langle \cos^2 \beta_i \rangle$ indique une moyenne dans le temps les fluctuations angulaires par rapport à l'axe directeur du lipide z' . Grâce à la rotation du lipide sur lui-même, le paramètre d'ordre S_{zz} est suffisant pour rendre compte des fluctuations. S_{zz} est compris entre 0 pour une chaîne totalement désordonnée à 1 pour une liaison qui ne subit pas de fluctuation. Le paramètre d'ordre est donc une méthode simple qui permet de dire si un système est rigide (S proche de 1) ou fluide (S proche de 0).

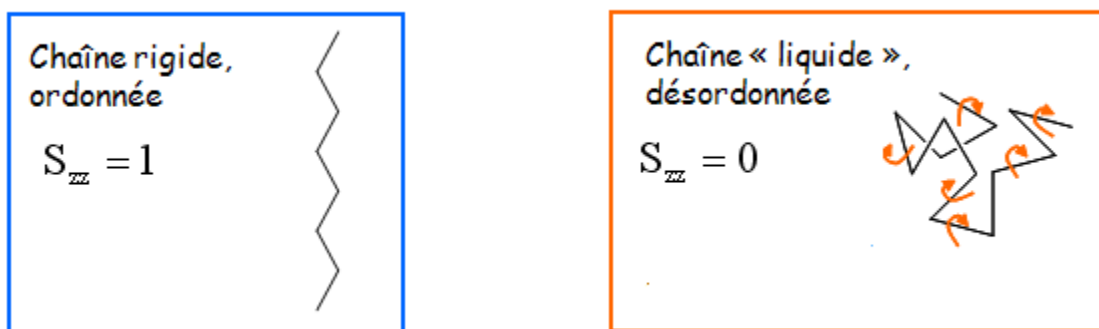


Figure 2-38 : Schématisation du paramètre d'ordre. À gauche, chaîne rigide, ordonnée avec peu de fluctuations. À droite, chaîne « liquide », désordonnée avec de grosses fluctuations.

Le produit des paramètres d'ordre est noté S_{C-D} et est appelé paramètre d'ordre orientationnel de la liaison C-D¹⁰⁷

$$S_{C-D} = \prod_{j=1}^n S^j_{zz}$$

L'évaluation de ce paramètre d'ordre à un endroit déterminé de la molécule pourra être obtenue par la simple mesure de l'éclatement quadripolaire entre les raies les plus intenses ($\beta = 90^\circ$) puisqu'il est relié à

$$\Delta \nu_{90^\circ} = \frac{3}{4} A_Q S_{C-D}$$

2.1.4. La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire consiste à étudier la trajectoire d'une molécule en appliquant les lois de la mécanique classique newtonienne c'est-à-dire à simuler les mouvements atomiques au cours du temps. Ces mouvements correspondent à des vibrations autour d'un minimum ou au passage d'un minimum à un autre minimum d'énergie. Cette technique permet de répondre aux questions que se posent les scientifiques sur la structure et la dynamique des molécules.

a. Minimisation des énergies

Avant le lancement d'une expérience de modélisation moléculaire, il faut s'assurer que l'énergie du système soit la plus basse possible. Ce travail s'appelle la minimisation. Appliquer un champ de force alors qu'il y a un trop-plein d'énergie conduit à « l'explosion » des molécules et du système entier¹⁰⁸.

Il n'existe pas de méthode mathématique générale qui permette de trouver le minimum global (c'est-à-dire le plus bas) de cette fonction. On emploie donc des méthodes d'analyse numérique qui permettent de trouver des minima locaux.

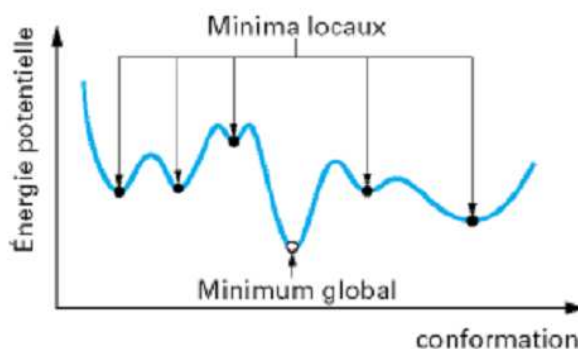


Figure 2-39 : Énergie potentielle d'une molécule en fonction de sa conformation.

b. La dynamique

✓ Principe

En Dynamique Moléculaire (DM), on fait l'hypothèse que les différentes configurations du système peuvent être générées par intégration des équations de mécanique

classique de NEWTON. Le résultat de cette intégration donne la trajectoire (positions) et les vitesses des atomes au cours du temps. L'algorithme permet de calculer l'accélération a_i s'appliquant sur chaque atome i de masse m_i ¹⁰⁹:

$$F_i = m_i \times a_i \quad \text{et}$$

$$\left(\frac{d^2 r_i}{dt^2} \right) = \frac{F_i}{m_i}$$

✓ Résolution des équations de Newton : algorithme de Verlet

Dans la méthode de VERLET, les positions et les accélérations au temps t , ainsi que les positions au temps $(t-dt)$ servent à calculer les nouvelles positions au temps $(t+\Delta t)$ ¹¹⁰.

Les vitesses et les positions sont connues aux mêmes instants ce qui permet de calculer les énergies cinétique et potentielle et donc l'énergie totale. L'énergie totale étant conservée, il s'agit d'un ensemble thermodynamique NVE où le nombre d'atomes N , le volume V et l'énergie interne E sont imposées.

c. Le champ de force

Le mouvement des molécules se traduit par une extension et une compression des liaisons ou par la variation des angles de valence ou de torsion. Ainsi une molécule est considérée comme un ensemble d'atomes dont les interactions mutuelles peuvent être décrites par une fonction d'énergie potentielle ou de champ de forces. L'énergie potentielle E_{tot} est calculée avec un modèle empirique ("champ de forces) où le système est constitué d'un ensemble de "boules" (atomes) et de "bâtonnets" (liaisons). Les interactions entre les atomes se décomposent en une composante intramoléculaire (énergies de déformation harmoniques des liaisons, des angles et dièdres) et une composante "intermoléculaire" décrivant les interactions entre atomes "non liés" (c'est à dire séparés par plus de deux liaisons)¹⁰⁸.

$E_{\text{tot}} =$ Estretching (déformation des liaisons)
+ Ebending (déformation des angles)
+ Etorsion (déformation des angles dièdres)
+ Enon-bonded (interactions non liées)

Le champ de force dépend de la nature du matériau simulé, car il contient toutes les données physiques caractérisant les atomes et éventuellement leur chimie.

✓ Énergie des interactions liées

Les déformations des liaisons et des angles sont représentées par un oscillateur harmonique avec une sommation sur toutes les liaisons covalentes ou sur tous les angles entre atomes liés par liaisons "covalentes". Les potentiels correspondants sont les suivants :

- Déformation des liaisons

$$\sum_{liaisons} K_b (r - r_0)^2 \quad (II.16)$$

où r est la longueur de liaison instantanée (en Å), r_0 la valeur de liaison à l'équilibre et k_b la constante de force (en kcal.mol⁻¹.Å⁻¹).

- Déformation des angles

$$\sum_{liaisons} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (II.17)$$

où θ est l'angle instantané (en °), θ_0 la valeur à l'équilibre (en °) et K_θ la constante de force associée (en kcal.mol⁻¹).

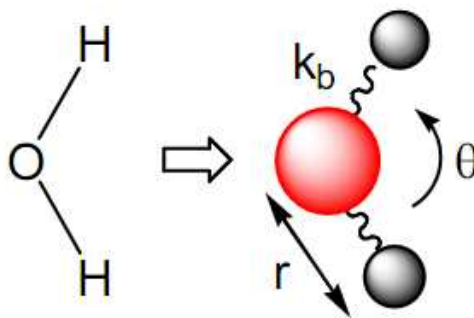


Figure 2-40 : Déformation des liaisons « r » et des angles de valences « θ » d'une molécule d'eau

- Déformation des dièdres

Le terme énergétique de déformation des dièdres Φ concerne trois liaisons et donc quatre atomes A, B, C et D consécutifs. L'angle dièdre Φ correspond à l'angle entre les liaisons AB et CD, donc à la rotation autour de la liaison BC. Ce terme contribue à la barrière d'énergie lors de la rotation d'une liaison. Le terme de torsion est défini de la manière suivante :

$$\sum_{\text{dièdres}} \sum_{\text{liaisons}} V_n (1 + \cos(n\Phi - \gamma)) \quad (\text{II.18})$$

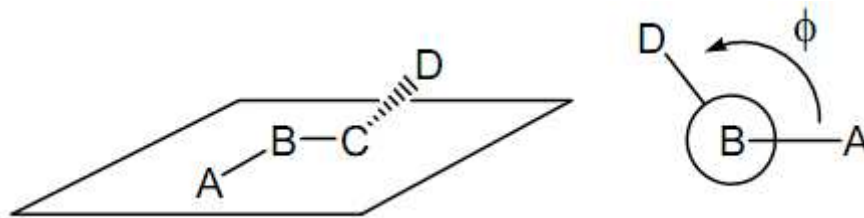


Figure 2-41 : Déformation de l'angle Φ dans le cas des dièdres

L'angle de torsion (dièdre) A-B-C-D (Φ) est l'angle entre les plans (ABC) et (BCD)

✓ Énergie des interactions liées

Toutes ces interactions non liées concernent les atomes qui appartiennent à des molécules différentes ou qui sont liés par plus de trois liaisons covalentes. Les interactions sont décrites par deux termes : un terme de LENNARD-JONES, aussi appelé terme de VAN DER WAALS et un terme électrostatique.

- Interaction de Van Der Walls

Les interactions de VAN DER WAALS sont représentées par un potentiel en 6-12 dont l'expression est la suivante¹¹¹ :

$$\sum_{i < j} -2\varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^6 + \varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^{12} \quad (\text{II.19})$$

où ε_{ij} et R_{ij}^* sont les paramètres de LENNARD-JONES pour les interactions entre les atomes i et j , et ε_{ij} représente la profondeur du puits de VAN DER WAALS à la distance R_{ij}^* . Le terme en $-R_{ij}^6$ représente la dispersion attractive de LONDON entre deux atomes et celui en R_{ij}^{12} la répulsion due à l'exclusion de PAULI.

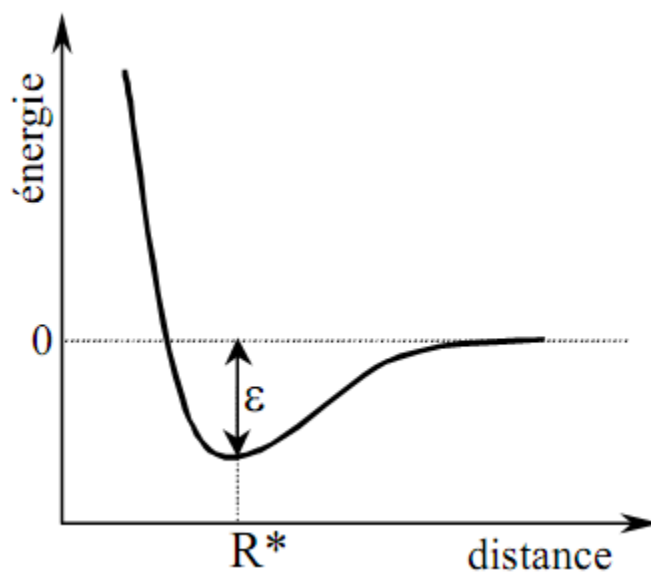


Figure 2-42 : Modèle des paramètres de Van der Waals pour une molécule diatomique de type X-X. Énergie d'interaction en fonction de la distance interatomique.

- Interactions électrostatiques

Les interactions coulombiennes sont représentées par un potentiel en R_{ij}^{-1} :

$$\sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{R_{ij}} \quad (\text{II.20})$$

où q_i et q_j sont les charges partielles des atomes i et j .

Un exemple de dynamique moléculaire est représenté figure 2-43. La figure a représente le système de départ pour lequel l'énergie a été minimisée. La figure b est obtenue après déroulement de la dynamique moléculaire. On voit que le système a évolué entre l'état initial (a) et l'état final (b).



Figure 2-43 : Exemple de dynamique moléculaire avec minimisation de l'énergie du système de départ (a) et évolution de la dynamique vers le système final (b)

2.2. Technique d'analyse biologique : Modèle de cellules nasales *in vitro*

L'ensemble des études *in vitro* a été réalisé au sein de l'Institut Pharmacologique Moléculaire et Cellulaire (IPMC) de Sophia Antipolis. Les cellules épithéliales nasales humaines qui constituent notre modèle sont issues de culture primaire à partir de prélèvements chirurgicaux des cornets inférieurs, suite à une turbinectomie lors de chirurgie ORL (figure 2-44).

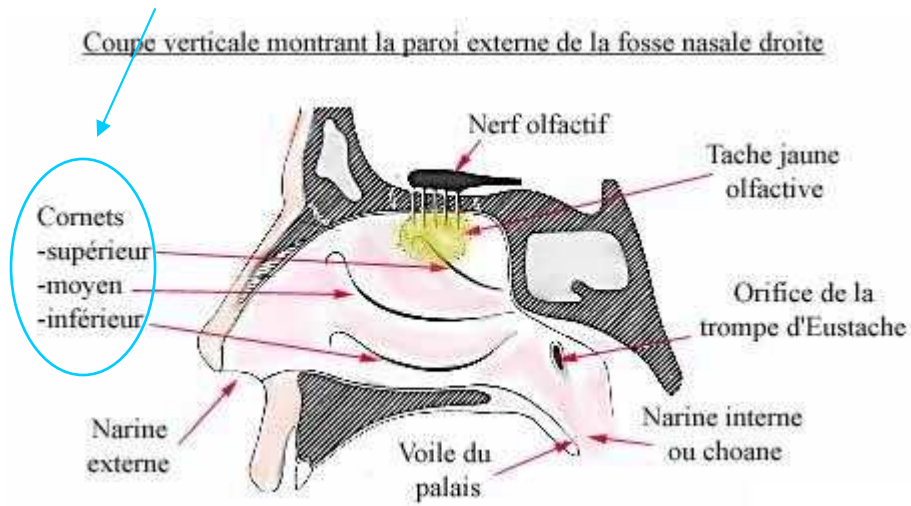


Figure 2-44 : Coupe verticale de la paroi externe de la fosse nasale droite

Les cellules nasales sont ensemencées sur des membranes semi-perméables traitées au collagène. Une fois à confluence, les cellules sont mises dans des conditions de culture particulières : elles sont placées dans un milieu pauvre en facteur de croissance épithélial humain, et uniquement du côté basal, le côté apical restant en contact direct avec l'air. Dans ces conditions de culture « Air-Liquide », les cellules épithéliales nasales humaines sont capables de former une monocouche étanche. Elles développent des jonctions intercellulaires, ce qui se traduit par une augmentation de la résistance transépithéliale. Après un plateau de 8 à 10 jours, la résistance diminue. Les expériences réalisées avec ces cellules le sont donc entre le jour 5 et le jour 8.

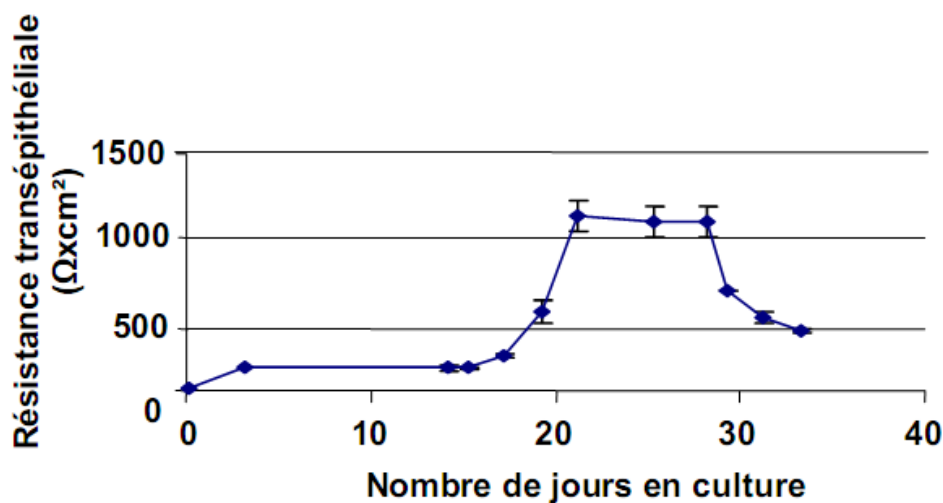


Figure 2-45 : Variation de la résistance transépithéliale dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 en culture au cours du temps

2.2.1. Étude de perméation

La résistance transépithéliale (TEER) est mesurée, avec l'EVOM™ Epithelial Voltohmmeter de World Precision Instruments, avant et après l'expérience de perméation afin de vérifier l'étanchéité de la monocouche de cellules après traitement¹¹². Cependant, une baisse du TEER pendant l'expérience de perméation signifie qu'il y a ouverture des jonctions serrées avec possibilité de passage de protéines thérapeutiques du compartiment apical au compartiment basolatéral. Dans le cas où le TEER reste constant au cours de l'expérience de perméation cela signifie qu'il n'y a pas eu ouverture des jonctions serrées pour laisser passer les protéines thérapeutiques¹¹³.

Les tests de perméation sont réalisés sur le système de filtre en polycarbonate « transwell » (diamètre 24 mm, porosité 0,4 µm). Seuls les puits présentant une résistance trans-épithéliale totale (filtre+cellules) supérieure à 500 ohms sont utilisés.

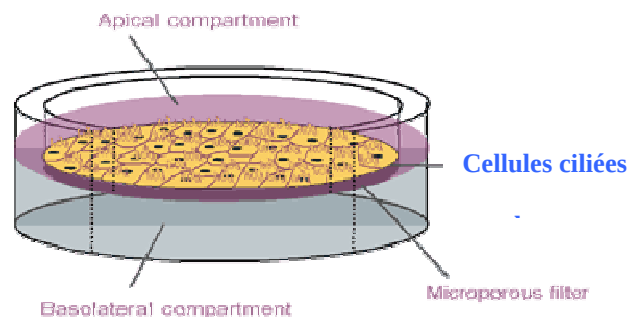


Figure 2-46 : photo du système « Transwell » **Figure 2-47 :** schéma du système Transwell »

2.2.2. Modélisation de la diffusion au travers des cellules nasales

En supposant que la diffusion des protéines au travers de la monocouche de cellules ciliées nasales suit la loi de Fick¹¹⁴, on a :

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} = -D.A \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (\text{II.21})$$

Avec ΔN : quantité d'hormone (cpm)

Δt : temps de diffusion (s)

Δx : distance (épaisseur de la membrane) (cm)

ΔC : différence de concentration (cpm/cm³)

D : coefficient de diffusion (cm².s⁻¹)

A : surface du plan de migration (filtre) de la protéine (cm²)

L'épaisseur de la membrane Δx étant difficile à connaître, on associe au terme coefficient de diffusion D un coefficient de perméabilité K :

$$K = \left| \frac{D}{\Delta x} \right| = \frac{\Delta N}{\Delta t} \times \frac{1}{A \cdot \Delta C} \quad (K \text{ en cm}^{-1}) \quad (\text{II.22})$$

2.3. Technique d'analyse sur modèles : Préparation des modèles lipidiques de peau

La préparation de modèles lipidiques de peau se fait suivant un protocole dérivé de celui de Fenske, D. B. et al.¹¹⁵. La préparation passe par la formation de vésicules multilamellaires (MLVs). De l'acide palmitique perdeutééré (PA-²H₃₁), du cholestérol et un céramide sont dissous dans un mélange Chloroforme/Méthanol (7/3). Le solvant est ensuite évaporé en utilisant un évaporateur de type speedvac system AES1010 de chez Savant. La poudre est resuspendue dans de l'eau déminéralisée. Les traces de solvant sont éliminées par lyophilisation de la suspension aqueuse. La poudre obtenue est ensuite resuspendue dans de l'eau dédeutérée. Plusieurs cycles chaud-froid et agitation à l'aide d'un vortex sont réalisés de manière à homogénéiser la suspension.

Chapitre 3

Administration de protéines par voie nasale :
Étude de l'interaction lipoamino acide-
protéine par dichroïsme circulaire et diffusion
dynamique de la lumière

CHAPITRE 3

ADMINISTRATION DE PROTEINES PAR VOIE NASALE : ÉTUDE DE L'INTERACTION LIPOAMINO ACIDES – PROTEINES PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE ET DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE

1. Introduction

De nos jours la plupart des protéines thérapeutiques sont administrées par voie injectable plusieurs fois par jour / semaine. Ces injections répétées causent des douleurs au point d'injection, c'est pour cette raison que le développement de voies d'administrations alternatives telles que la voie orale ou nasale devient urgent. Malheureusement, les protéines sont dégradées par les enzymes protéolytiques du tractus digestif et par conséquent ont une faible biodisponibilité lorsqu'elles sont administrées par voie orale.

La société Physica Pharma a récemment utilisé des lipoamino acides (LAAs) capables de former des colloïdes facilement sprayables et qui ont augmenté l'absorption intranasale d'une molécule antimigraineuse : le sumatriptan¹¹⁶. Dans ce chapitre nous avons étudié la capacité des lipoamino acides à complexer l'érythropoïétine humaine, l'hormone de croissance humaine et la calcitonine de saumon afin de former des systèmes colloïdaux facilement sprayables. Ces trois protéines servent respectivement à traiter l'anémie, les problèmes de croissance et l'hypercalcémie. Les conditions de formation des colloïdes entre ces trois protéines et le LAA ont été déterminées en utilisant le dichroïsme circulaire et la diffusion dynamique de la lumière. Un ratio molaire spécifique pour lequel la protéine conserve sa structure secondaire tout en ayant un rayon hydrodynamique légèrement augmenté a été déterminé.

Les études de modélisation moléculaire montrent que le LAA se fixe aux protéines en les recouvrant. Il a été montré également que le complexe ainsi formé passe très facilement au travers des cellules nasales en culture, arrivées à confluence.

De nombreuses études sur l'administration nasale de l'hormone de croissance humaine recombinante (rhGH) ont déjà été menées. Par exemple, l'effet d'un tensio actif anionique, le tauro-24,25-dihydrofusite de sodium (STDHF) sur l'absorption nasale de la rhGH chez le rat, le lapin et le mouton a été évalué¹¹⁷. Comparé à une solution aqueuse de rhGH, l'addition de STDHF permet d'augmenter 11 fois l'absorption nasale chez le rat et le lapin et 21 fois chez le mouton. La solution de STDHF-rhGH a également été testée chez des patients déficients en

hormone de croissance humaine (hGH)¹¹⁸. La biodisponibilité relative de la forme intranasale versus la forme sous-cutanée (s.c.) est comprise entre 1,6 – 3,0 %. Dans le même registre, des formulations contenant de la rhGH et du didecanoyl-L- α -phosphatidylcholine ont été administrés par voie nasale à des patients déficients en hGH¹¹⁹. La biodisponibilité était dose dépendante et comprise en 3,8 et 8,9%. Chez le rat, l'utilisation de microsphères de gélatine pour l'administration nasale et intramusculaire de sCT a été examinée¹²⁰. Un effet hypocalcémiant a été obtenu après l'administration intranasale de sCT-gélatine de microsphère. L'administration efficace de rhGH vers la circulation sanguine par l'intermédiaire de la voie intranasale est possible, cependant les promoteurs d'absorption entraînent dans la plupart des cas des dommages au niveau des cellules nasales. Par exemple, le STDFH entraîne des dommages morphologiques de l'épithélium nasal. Il est capable d'arrêter de manière irréversible les mouvements ciliaires des cellules épithéliales en l'espace de quelques minutes et entraîne de graves dommages sur les membranes épithéliales¹²¹. Afin d'éviter ces effets toxiques, Physica Pharma a développé une technologie basée sur l'utilisation de LAAs pour former des colloïdes facilement sprayables.

Il a déjà été montré que l'association de LAAs aux molécules d'intérêts augmente leur absorption par voie orale^{122, 123}. Les LAAs en plus d'augmenter la lipophilicité des molécules d'intérêt, facilitent leur interaction avec les membranes biologiques et ainsi favorisent leur pénétration à travers les barrières biologiques¹²².

À notre connaissance il n'y a pas d'études sur l'utilisation de LAAs comme promoteur d'absorption de la voie nasale de protéines thérapeutiques à haut poids moléculaire (>3kDa).

Dans ce travail nous avons donc étudié les capacités des LAAs à complexer l'EPO, la rhGH et la sCT pour former des colloïdes facilement sprayables. Le LAA utilisé pour cette étude est la lauroyl proline (C₁₂P) constituée d'un acide gras lié de manière covalente à un acide aminé par une liaison amide (figure 3-1). Notre choix s'est porté sur ce LAA car il est déjà commercialisé par la société SEPPIC dans des produits cosmétiques, avec laquelle la société Physica Pharma partenaire de la convention CIFRE collabore.

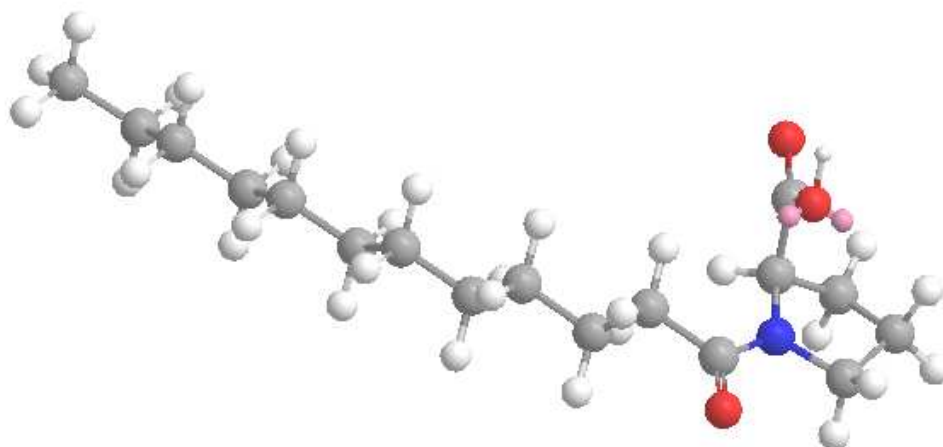


Figure 3-1 : Structure de la Lauroyl proline ($C_{12}P$)

La $C_{12}P$ est un tensio-actif et par conséquent son association avec une protéine peut la déstructurer. Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à l'étude des modifications de la structure secondaire de la protéine d'intérêt en présence de quantités variables de $C_{12}P$ afin de déterminer le plus petit ratio protéine / $C_{12}P$ pour lequel il n'y a pas ou très peu de modifications structurales de la protéine. Le rayon hydrodynamique (R_h) du complexe colloïdal a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière. La mesure du R_h nous donnera des informations sur la nature des colloïdes formés.

Dans ce chapitre nous avons exploré les possibilités de former des complexes protéines - $C_{12}P$ en solution.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Matériaux

L'hormone de croissance humaine recombinante rhGH provient de chez Auspure Biotechnology (Shanghai, Chine). Le produit se présente sous la forme d'une poudre contenant 13% d'e rhGH et 87% de mannitol, glycine et tampon phosphate. L'érythropoïétine humaine recombinante (rhEPO) provient de chez Dragon Pharmaceutical (Vancouver, Canada). Elle se trouve dans un tampon citrate-NaCl à une concentration de 1,24mg/ml. La calcitonine de saumon (sCT) provient de chez Welding (Hamburg, Allemagne). Sa pureté est

de 98,4%. Elle est composée de 8,2% d'acide acétique. La lauroyl proline nous a gracieusement été fournie par la société Seppic (Paris, France). Le S-MEM, et la chloramine-T proviennent de chez SIGMA (Saint Quentin Fallavier, France). L'iode 125 provient de la société Amersham (Buckinghamshire, Angleterre), Le HBSS provient de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Le kit GEGM (Clontech) et le milieu DMEM proviennent de Cambrex (Paris, France). Le matériel de culture et les cellules polycarbonate 24 mm de Transwells® proviennent de chez Fisher (Illkirch, France). Le kit LDH provient de chez Roche (Neuilly sur Seine, France).

2.2. Préparation des complexes colloïdaux lipoamino acide – protéine

La rhGH lyophilisée est mise en solution dans de l'eau déminéralisée à la concentration de 10mg/ml (0,45mM). La C₁₂P est apportée par la suite à la solution de rhGH précédemment préparée. La quantité de C₁₂P apportée a été ajustée en fonction du ratio rhGH/C₁₂P souhaité, à savoir : 1/265 ; 1/133 ; 1/70 ; 1/35 ; 1/18 et 1/10. Le pH est ensuite ramené à 7,4 (pH de stabilité de la rhGH) en utilisant une solution de soude 1N. La rhGH sera par la suite lyophilisée et conservée à 4°C. C'est sous la forme lyophilisée qu'elle est la plus stable⁸³.

La rhEPO est initialement en solution à une concentration de 1,24mg/ml (3,6.10⁻²mM). La C₁₂P est apportée à la solution de rhEPO et l'apport sera ajusté en fonction du ratio rhEPO/C₁₂P souhaité à savoir : 1/265 ; 1/133 ; 1/70 ; 1/35. L'EPO ainsi formulée sera conservée en solution à pH 7,4 et à 4°C. La protéine est stable en solution, sa lyophilisation n'est donc pas nécessaire.

La sCT lyophilisée est mise en solution dans de l'eau déminéralisée à la concentration de 2 mg/ml (0,58mM). La C₁₂P est apportée par la suite à la solution de sCT précédemment préparée. La quantité de C₁₂P apportée sera ajustée en fonction du ratio sCT/C₁₂P souhaité, à savoir : 1/5 et 1/2. Le pH est ensuite ajusté à 4-5 (pH de stabilité de la sCT). La calcitonine ainsi formulée sera conservée en solution à 4°C. Elle est stable en solution, sa lyophilisation n'est donc pas nécessaire.

2.3. Analyse par dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés au laboratoire sur un Mark VI Jobin Yvon dichrograph avec un pas de 0,5nm entre 180 et 270 nm en utilisant une cellule de 0,1mm d'épaisseur ; quatre scans ont été accumulés. Le blanc correspondant au tampon a été soustrait. L'ellipicité molaire par résidu ($[\theta]_{MRW}$, $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) est calculée en utilisant la formule¹²⁴:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{3300 \Delta\epsilon}{n} \quad (\text{III-1})$$

où n est le nombre de liaisons peptidiques et $\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$ est la différence des coefficients d'extinction molaire des polarisations parallèle et perpendiculaire en $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Juste avant l'expérience, le complexe protéique rhGH-C₁₂P lyophilisé est dissout dans de l'eau déminéralisée jusqu'à une concentration de 10mg/ml (0,45mM). Le complexe rhEPO-C₁₂P est ajusté à une concentration de 1,24mg/ml ($3,6.10^{-2}$ mM) par de l'eau déminéralisée. Enfin, le complexe sCT-C₁₂P est dilué à l'aide d'eau distillée jusqu'à atteindre une concentration de 2mg/ml (0,58mM). Les échantillons à analyser sont laissés 30 minutes à température ambiante avant d'enregistrer le signal dichroïque. Les courbes sont lissées avec un filtre FFT de 5 points avant d'effectuer la déconvolution avec le logiciel CDFriend, développé au laboratoire CBMN par Sébastien Buchoux. Ce logiciel est basé sur l'utilisation de courbes standard d'hélices α , de feuillets β , d'hélice II et de pelote statistique, obtenues de structure secondaire^{125, 126} de peptides LiKj connus. Bien que moins aisé d'utilisation, le programme CD Pro¹²⁷ a également été testé et donne des résultats similaires.

2.4. Analyse par diffusion dynamique de la lumière

Le rayon hydrodynamique des colloïdes a été déterminé en mesurant la fonction d'autocorrélation à un angle de 90° sur un ALV/CGS-3 Compact Goniometer (ALV-GmbH, Allemagne). Le rayon hydrodynamique moyen basé sur une distribution en volume, a été calculé grâce à la fonction d'autocorrélation en utilisant l'analyse des cumulants. La précision du rayon hydrodynamique obtenue grâce à l'équation de Stokes-Einstein dépend de la

température. La température de la salle maintenue constante est relevée par l'appareil et prise en compte dans le calcul du rayon hydrodynamique. Le complexe rhGH-C₁₂P est dissout dans de l'eau déminéralisée à une concentration de 0,5mg/ml (0,023mM). Le complexe rhEPO-C₁₂P en solution est dilué jusqu'à une concentration de 0,12mg/ml (3,5.10⁻³mM) et le complexe sCT-C₁₂P est dilué jusqu'à une concentration de 0,5mg/ml (0,15mM).

Les échantillons passés en DLS sont très dilués, la viscosité de l'eau a donc été utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion.

2.5. Test de perméation sur cellules nasales

Ce travail a été réalisé par Sabrina Brasselet Sicé à l'Université de Nice-Sophia Antipolis lors de sa thèse financée par Physica Pharma. La culture de cellules nasales, la mesure de la Résistance Électrique Transépithéliale ainsi que les tests de passage sur cellules nasales ont été effectués selon une modification du protocole de Werner et Kissel¹²⁸.

2.5.1. Culture de cellules nasales¹²⁸

Les cellules épithéliales nasales humaines qui constituent notre modèle sont issues de culture primaire à partir de prélèvements chirurgicaux des cornets inférieurs, suite à une turbinectomie lors de chirurgie ORL. Les tissus ont été traités rapidement après ablation avec un mélange de protéase-DNase dans le milieu S-MEM (15mmol/l HEPES, 0,5ml gentamicine, 2,5ml penstrep) pendant 4h à 4°C sous agitation douce.

Les cellules épithéliales isolées ont été lavées trois fois avec le milieu S-MEM. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à 1000 tours/minutes, et diluées dans le milieu de croissance épithélial (BGEM) complété avec de l'insuline (2,5mg/l), de la transferrine (5mg/l), de l'hydrocortisone (0,036mg/l), de la triiodothyronine (3,5µg/l), de l'adrénaline (0,25mg/l), de l'hEGF (12,5µg/l), de l'acide rétinolique (5x10⁻⁸M), de l'extrait pituitaire de bovin (15mg/l), de la gentamicine, du BSA-FAF (250mg/l) des antibiotiques et enfin 1% d'acides aminés non essentiels.

Les cellules sont mises en culture sur des filtres perméables dans le même tampon que précédemment à une densité de 25000 cellules/cm². Après une nuit à 37°C dans un incubateur (5% CO₂ et 95% d'humidité relative), les cellules sont lavées deux fois afin d'éliminer les

cellules endothéliales et sont resuspendues dans le milieu BEGM. Le milieu est changé tous les deux jours.

Après 5 à 7 jours le milieu BEGM est remplacé par un mélange de milieux BEGM : DMEM 1:1 supplémenté avec 0,31µg/l de hEGF du côté basal pour induire la différenciation cellulaire. Le milieu est remplacé tous les jours.

2.5.2. Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER)¹²⁸

La sonde utilisée est le modèle EVOM (World Precision Instruments). Seules les monocouches de cellules dont la valeur du TEER total (filtre + cellules) est supérieure à 500 ohm.m² ont été utilisées pour les expériences de transport.

2.5.3. Tests de passage sur cellules nasales in vitro¹²⁸

Les cellules différenciées sont lavées deux fois avec le tampon HBSS (Hank's balanced salt solution, Invitrogen) et sont préincubées avec le même tampon ou avec de l'eau déminéralisée pendant 15 minutes à 37°C.

Pour les tests de passage de la rhGH, 0,5ml de tampon HBSS contenant 0,06mg/cm² ou 0,03mg/cm² de rhGH (contrôle), de rhGH/C₁₂P : 1/35 ou de rhGH/C₁₂P : 1/70 sont ajoutés sur la partie apicale des cellules. Après deux heures, la solution du compartiment basal est récupérée et stockée à 4°C jusqu'au moment du dosage. Du tampon HBSS thermostaté à 37°C est rapidement ajouté dans le compartiment basal. Pour la rhEPO, 0,5ml d'eau déminéralisée contenant 3% (w/w) de NaCl ou 15% (w/w) de mannitol sont ajoutés afin d'augmenter l'osmolarité de la solution. La solution contient 0,015mg/cm² de rhEPO (contrôle), de rhEPO / C₁₂P : 1/35, de rhEPO / C₁₂P : 1/70 ou de rhEPO / C₁₂P : 1/133. La solution est ajoutée au niveau du compartiment apical. Après deux heures la solution du compartiment basal est récupérée et stockée à 4°C jusqu'au moment du dosage. Du tampon HBSS thermostaté à 37°C est rapidement ajouté dans le compartiment basal. Pour la sCT, 0,5ml d'eau déminéralisée contenant 0,007 mg/cm² de sCT (contrôle) ou de sCT / C₁₂P : 1 / 5 est ajouté au niveau du compartiment apical des cellules. Deux conditions de pH ont été testées, pH 5 pour garantir la stabilité de la sCT et pH 7 pour être dans les conditions de pH physiologique. Après deux heures, la solution du compartiment basal est récupérée et stockée à 4°C jusqu'au moment du

dosage. Du tampon HBSS thermostaté à 37°C est rapidement ajouté dans le compartiment basal. Pour toutes ces expériences, les cellules sont replacées à 37°C pendant 15 minutes et le TEER est mesuré afin de contrôler l'intégrité de la monocouche de cellule. La perméabilité du côté apical vers le côté basolatéral de la molécule d'intérêt Papp (cm/s) est déterminée grâce à la formule : $Papp = (dQ/dt) * (1/(A * C_0))$ Où A est la surface de la membrane perméable, C₀, la concentration de départ de la molécule et dQ/dt, le débit de passage de la molécule d'intérêt vers le côté basolatéral.

2.5.4. Iodation de la rhGH

L'hormone de croissance humaine (Saizen) a été radiomarkée à l'iode¹²⁵ par oxydoréduction à la chloramine T. Ce radiomarquage va permettre de doser l'hormone lors des tests de perméation sur cellules nasales. La séparation de l'hormone iodée, de la chloramine T et de l'iode libre se fait par tamisage moléculaire sur colonne Sephadex G-100, d'après le protocole de Ribela¹²⁹.

2.5.5. Analyse de l'intégrité cellulaire

La cytotoxicité est mesurée à la fin de l'expérimentation en quantifiant le taux de lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire en utilisant le test « Cytotoxicity Detection Kit (LDH) » (Roche). En effet, la LDH est libérée lorsque l'intégrité membranaire est perturbée¹³⁰. La LDH catalyse la réaction d'oxydation du lactate en pyruvate avec transformation de NAD (nicotinamide-adénine dinucléotide réduit) en NADH + H⁺. Cette réaction peut être visualisée en ajoutant dans le milieu réactionnel un autre enzyme, la diaphorase, qui prend en charge les deux ions hydrogène pour les fixer au sel de tétrazolium, donnant cette fois aussi du formazan coloré (Figure 3-2). Le test consiste à incuber les cellules avec le composé à tester puis à prélever le surnageant de culture. Après centrifugation, qui permet d'éliminer les cellules qui se seraient décollées, les divers réactifs, diaphorase et sel de tétrazolium, sont ajoutés dans le milieu. Plus la densité optique sera élevée, plus il y aura perte de l'intégrité membranaire.

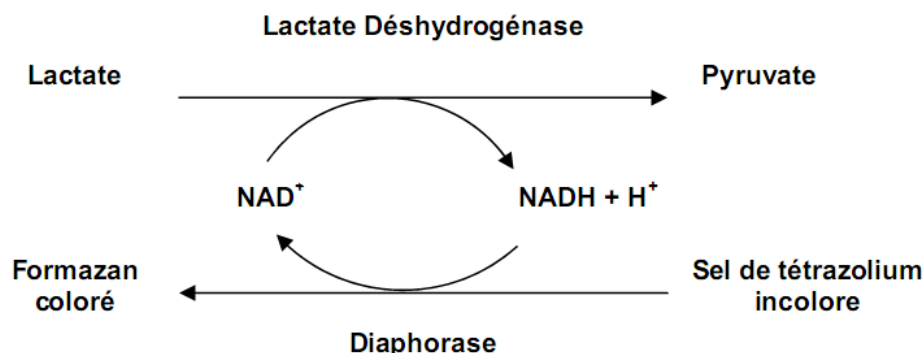


Figure 3-2 : Étude de l'intégrité membranaire par mesure de l'activité déshydrogénase

2.6. Dynamique moléculaire du complexe rhGH/ C₁₂P

La dynamique moléculaire a été utilisée à différents buts : une première approche concerne l'étude structurale et dynamique du complexe rhGH/C₁₂P ; puis elle nous a également permis de remonter à la valeur du rayon hydrodynamique du complexe.

2.6.1. Dynamique moléculaire

Des études de dynamique moléculaire ont été réalisées afin de mimer les interactions pouvant avoir lieu entre la rhGH et la C₁₂P. Les ratios molaires rhGH/C₁₂P : 1/32 et rhGH/C₁₂P : 1/86 ont été testés. Toutes les simulations ont été réalisées grâce au programme GROMACS en tout atome avec le champ de force GROMOS 43.a2. Deux types de conditions initiales ont été considérées : « Au hasard » et « en surface ». Dans le premier cas, les molécules de C₁₂P sont positionnées autour de la protéine alors que dans la deuxième condition les LAAs sont proches de la surface de la protéine. Les expériences sont réalisées dans de l'eau explicite, c'est-à-dire que l'eau est représentée sous forme de molécule, à l'inverse des solvants implicites où seulement une constante diélectrique est représentée. La taille de la boîte de simulation, le temps de la dynamique et le nombre de molécules d'eau pour chaque condition sont résumés tableau 3-1. Les expériences sont réalisées à pression constante (1 bar).

Conditions initiales	Nombre de rhGH	Nombre de C ₁₂ P	Nombre de molécules d'eau	Durée de la dynamique (ns)	Taille de la boîte (Å ³)
Au hasard	1	32	15484	52	60X60X60
Au hasard	1	86	21616	40	90X90X90
En surface	1	32	15484	13	60X60X60
En surface	1	86	21616	36	90X90X90

Tableau 3-1 : Résumé des différents paramètres utilisés pour les études de dynamique moléculaire entre la rhGH et la C₁₂P

2.6.2. Détermination du coefficient de diffusion par dynamique moléculaire et taille du complexe formé

Les valeurs de coefficient de diffusion (D) sont obtenues à partir de la relation d'Einstein. La pente de la courbe, divisée par 6.N.t avec N, le nombre d'Avogadro (6,023.10²³), représentant le carré du déplacement moyen, $r_i(t)$, de la molécule en fonction du temps, t est égale à D. Cette relation n'est valable que dans le cas d'un système dilué.

$$D = \frac{1}{6.N.t} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{d}{dt} \sum_{i=1}^n \langle [r_i(t) - r_i(0)]^2 \rangle$$

3. Résultats

3.1. Compositions colloïdales préservant la structure des protéines

Les spectres de CD après formulation de la rhGH, de la rhEPO et de la sCT seront comparés aux spectres de la rhGH, de la rhEPO et de la sCT native. Après une recherche bibliographique il apparaît que pour les protéines structurées en solution telles que la rhGH et la rhEPO, les hélices α nous donnent des informations sur les paramètres structuraux de la protéine^{57, 91-93}. Autrement dit, une baisse du taux d'hélices α se traduit par des changements au niveau de la structure secondaire de la protéine. Nous verrons par ailleurs que la sCT se comporte de manière particulière ; Non structurée en solution des hélices alpha se forment en présence de lipoamino-acide.

Les ratios protéine/C₁₂P ont été déterminés de la manière suivante : pour chaque protéine, le nombre d'acides aminés dont la chaîne latérale est chargée positivement (Lysine et arginine) a été déterminé. Ces charges positives sont autant de sites pouvant accueillir par interaction électrostatique les charges négatives portées par la C₁₂P. Ainsi, la rhGH possède 18 acides aminés dont la chaîne latérale est chargée positivement pour un pH autour de 7 et la rhEPO en possède 23. Un ratio commun rhGH(rhEPO) / C₁₂P : 1/18 a été testé, mais donne un résultat identique au ratio rhGH(rhEPO) / C₁₂P : 1/35. Afin d'éviter de surcharger les figures le ratio rhGH(rhEPO) : 1/18 n'a pas été représenté. Par la suite, la quantité de C₁₂P a été multipliée par 2 jusqu'à atteindre un ratio rhGH/C₁₂P : 1/265. La figure 3-3 montre un spectre de CD dans l'UV lointain de la rhGH à pH 7,4 et à un ratio molaire rhGH / LAA de 1/0, 1/35, 1/70, 1/133 et 1/265. La rhGH native en solution est caractérisée par des minimums à 222 nm et 209 nm et une bande d'absorption positive à 190 nm. Ces informations sont caractéristiques de protéines possédant une forte proportion d'hélices α . En augmentant la quantité de C₁₂P il apparaît sur les spectres de CD une diminution de l'absorption entre 250 et 210 nm pour les ratios molaires rhGH / C₁₂P 1/35 et 1/70. Une plus forte diminution de l'absorption du signal de CD entre 250 nm et 210 nm est observée pour les ratios molaires rhGH / C₁₂P : 1/133 et 1/265.

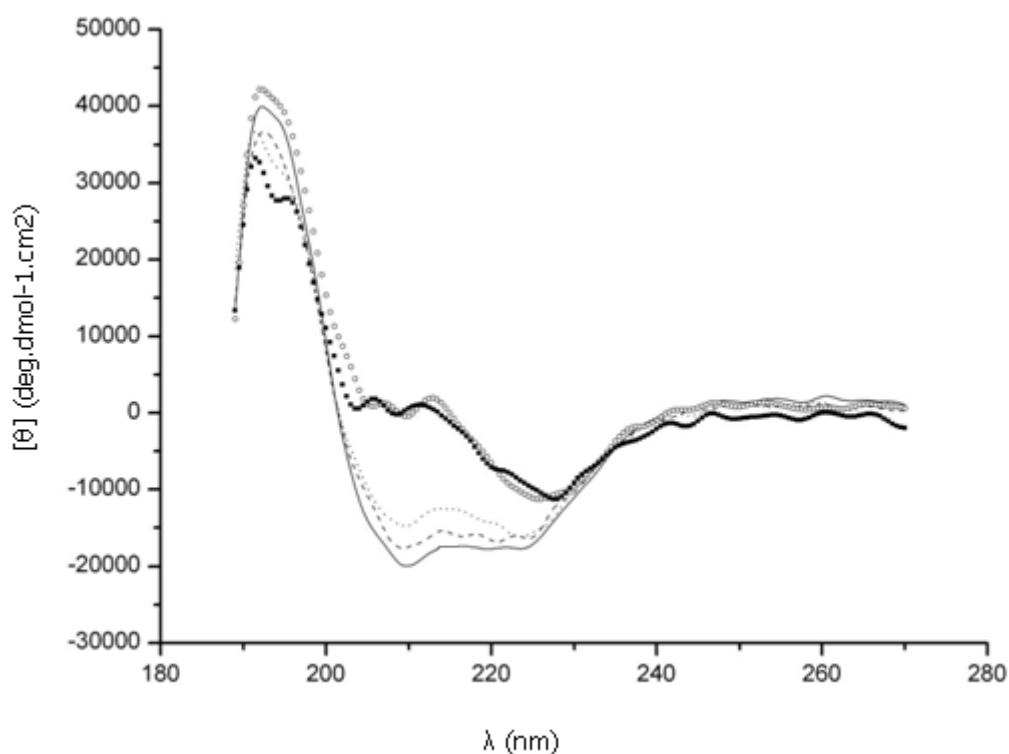


Figure 3-3 : Spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain de la rhGH (10mg/ml, 0,45mM) en présence de quantités variables de C₁₂P. Le ratio molaire rhGH / C₁₂P est : 1/0 (—), 1/35 (-----), 1/70 (.....), 1/133 (°°°°°) et 1/265 (•••••)

La figure 3-4 montre un spectre de CD dans l'UV lointain de la rhEPO à pH 7,4 et aux ratios molaires rhEPO / C₁₂P identiques à ceux de la rhGH. Comme la rhGH, la rhEPO est caractérisée par une forte proportion d'hélices α .

En excellent accord, en augmentant la quantité de C₁₂P il apparaît sur les spectres de CD une faible diminution de l'absorption à 190 nm pour les ratios molaires rhEPO / C₁₂P 1/35 et 1/70. Une plus forte diminution de l'absorption du signal de CD entre 250 nm et 210 nm est observée pour les ratios molaires rhEPO / C₁₂P : 1/70 et 1/133. Ces résultats indiquent une diminution de la proportion en hélice α . Une diminution de l'absorption entre 250 et 210 nm est conservée pour les ratios molaires rhEPO / C₁₂P 1/35. Cette diminution ne peut pas être interprétée comme une baisse de la proportion en hélice α du fait de la présence des minimums à 222 nm et 209 nm. Il faut noter que les spectres de CD dans le cas de la rhEPO sont bruités car les concentrations en hormone utilisées sont faibles. En effet, l'hormone ayant un coût prohibitif, seules de très faibles quantités étaient disponibles pour réaliser toutes les expériences physico-chimiques ainsi que les essais de formulation.

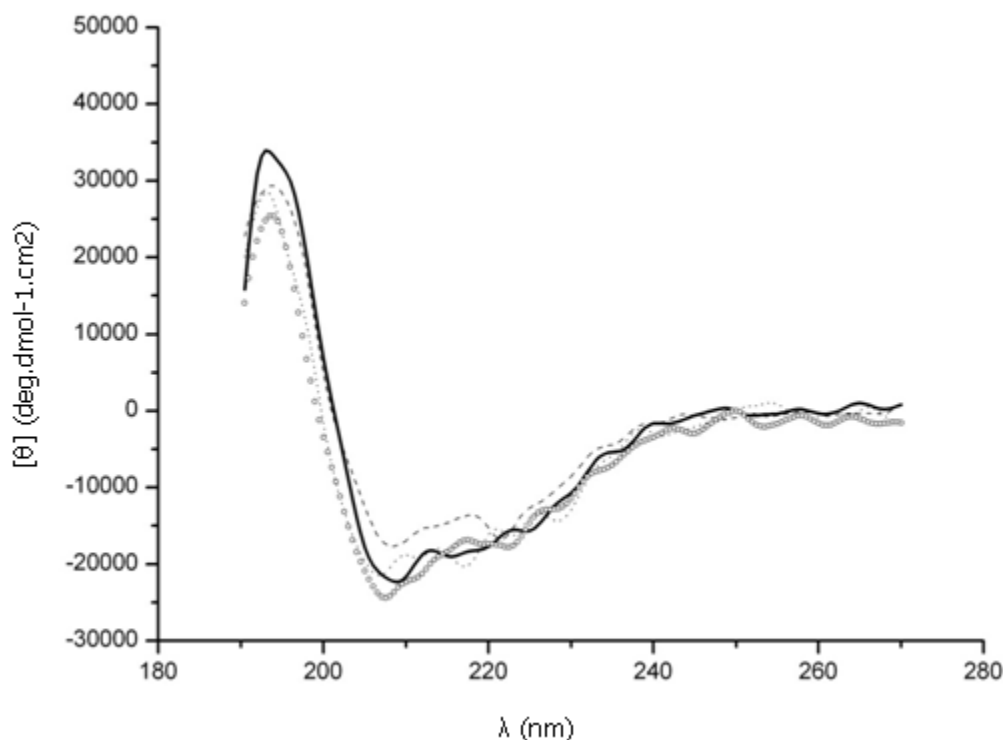


Figure 3-4 : Spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain de la rhEPO (1,24mg/ml, $3,6 \cdot 10^{-2}$ mM) en présence de quantités variables de C₁₂P. Le ratio molaire rhEPO / C₁₂P est : 1/0 (—), 1/35 (-----), 1/70 (.....), 1/133 (ooooo)

La sCT possède 4 acides aminés dont la chaîne latérale est chargée positivement pour un pH de 5. Ces sites positifs ont d'abord été partiellement écrantés par la C₁₂P en choisissant un ratio sCT/C₁₂P : 1/2. L'étude n'a pas été poursuivie au-delà du ratio sCT/C₁₂P : 1/5 car un précipité apparaît dû à l'excès de C₁₂P non complexé avec la sCT et qui est insoluble à ce pH. La figure 3-4 montre un spectre de CD dans l'UV lointain de la sCT native et de l'association sCT / C₁₂P aux ratios molaires 1/2 et 1/5 dans l'eau à pH 5. La sCT native et le complexe sCT / C₁₂P 1/2 présentent en solution un spectre CD en U négatif avec un maximum à 200 nm. Ces informations sont caractéristiques de protéines possédant une forte proportion de pelote statistique. Le complexe sCT / C₁₂P 1/5 présente des minimums à 222 nm et 209 nm, ce qui est caractéristique d'un spectre CD d'hélice α .

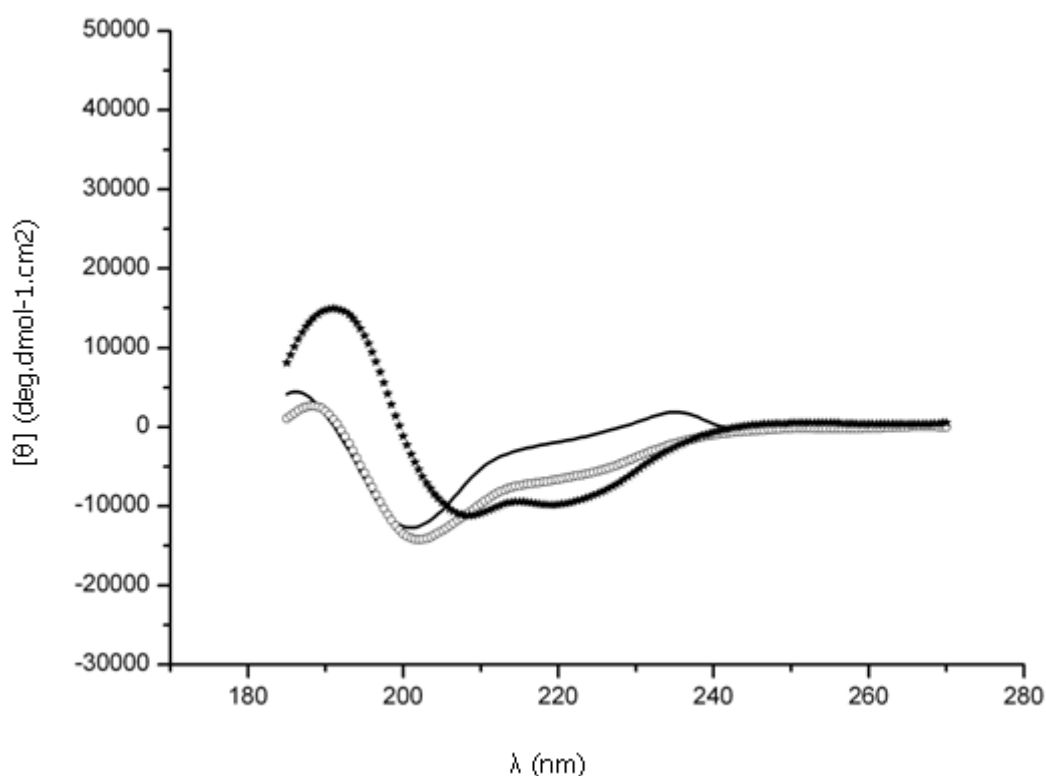


Figure 3-5 : Spectre de dichroïsme circulaire en UV lointain de la sCT (2,00mg/ml, 0,58mM) en présence de quantités variables de C₁₂P. Le ratio molaire sCT / C₁₂P est : 1/0 (—), 1/2 (°°°°°°) et 1/5 (★ ★ ★)

L'étude des spectres de CD a été complétée et confirmée par déconvolution spectrale. Le tableau 3-2 résume le pourcentage d'hélice α , de feuillet β et de pelote de chacune des protéines étudiées. Ces résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel CDFriend (S.Buchoux). Il apparaît que les résultats de la PDB sont très similaires à ceux obtenus par le logiciel CDFriend pour les protéines natives rhGH et rhEPO. Cette similitude permet de nous conforter sur la validité des résultats fournis par le logiciel. La sCT est un cas particulier étant donné que les résultats présentés dans la PDB ont été obtenus en présence de SDS.

D'après la Protein Data Bank (PDB) la proportion d'hélices α de la rhGH est de 65%. La déconvolution spectrale donne une proportion de $67 \pm 5\%$, Tableau 3-2. La déconvolution spectrale confirme les résultats des spectres CD : la proportion d'hélices α diminue et celle de feuillets β augmente lorsque le Ri est compris entre 1/35 et 1/265, Tableau 3-2. Le tableau montre également que la protéine conserve sa structure pour Ri = 1/35 et 1/70. Pour une proportion plus élevée de C₁₂P, la structure secondaire de la protéine n'est pas maintenue.

D'après la Protein Data Bank (PDB) la proportion d'hélices α de la rhEPO est de 63%. La déconvolution spectrale donne une proportion de $63\pm 5\%$, Tableau 3-2. La déconvolution spectrale nous apprend que la proportion d'hélices α diminue et celle de feuillets β augmente lorsque le Ri est compris entre 1/35 et 1/265, Tableau 3-2. Comme dans le cas de la rhGH, la protéine conserve sa structure pour Ri = 1/35 et 1/70. Pour une proportion plus élevée de C₁₂P, la structure secondaire de la protéine n'est pas maintenue.

L'analyse des spectres de CD de la sCT a mis en évidence la présence d'une forte proportion de structures désordonnées. La déconvolution spectrale confirme ce résultat avec 89% de pelote statistique, Tableau 3-2. La déconvolution spectrale nous apprend que la proportion d'hélices α augmente et celle de pelote statistique diminue lorsque la quantité de C₁₂P augmente. Tableau 3-2. Pour un ratio sCT/ C₁₂P : 1/5 le pourcentage d'hélice α est de $40\pm 5\%$, ce qui est proche des 48% annoncé par la PDB pour la sCT en présence de SDS. On peut en conclure que la C₁₂P a un effet structurant sur la sCT.

Protéine	Structure secondaire	Ratio molaire rhGH / C ₁₂ P						Protéine native en solution	Protéine dans la PDB**
		1/265	1/133	1/70	1/35	1/5	1/2		
rhGH	Hélice α	34 $\pm$ 5%	33 $\pm$ 5%	55 $\pm$ 5%	58 $\pm$ 5%	-	-	67 $\pm$ 5%	65 $\pm$ 10%
	Feuillet β	42 $\pm$ 5%	65 $\pm$ 5%	18 $\pm$ 5%	18 $\pm$ 5%	-	-	16 $\pm$ 5%	11 $\pm$ 10%
	Désordonnée	24 $\pm$ 5%	2 $\pm$ 5%	27 $\pm$ 5%	24 $\pm$ 5%	-	-	17 $\pm$ 5%	29 $\pm$ 10%
rhEPO	Hélice α	-	34 $\pm$ 7%	42 $\pm$ 7%	49 $\pm$ 7%	-	-	63 $\pm$ 7%	63 $\pm$ 10%
	Feuillet β	-	30 $\pm$ 7%	27 $\pm$ 7%	29 $\pm$ 7%	-	-	13 $\pm$ 7%	14 $\pm$ 10%
	Désordonnée	-	36 $\pm$ 7%	31 $\pm$ 7%	22 $\pm$ 7%	-	-	24 $\pm$ 7%	23 $\pm$ 10%
sCT	Hélice α	-	-	-	-	40 $\pm$ 5%	19 $\pm$ 5%	11 $\pm$ 5%	48 $\pm$ 10%*
	Feuillet β	-	-	-	-	4 $\pm$ 5%	0 $\pm$ 5%	0 $\pm$ 5%	25 $\pm$ 10%*
	Désordonnée	-	-	-	-	56 $\pm$ 5%	81 $\pm$ 5%	89 $\pm$ 5%	22 $\pm$ 10%*

Tableau 3-2 : Structure secondaire native de la rhGH, rhEPO et sCT puis couplée à différentes quantités de C₁₂P. La déconvolution des spectres de dichroïsme circulaire a été accomplie en utilisant le logiciel CDFriend (S.Buchoux). *Structure secondaire de la sCT en présence de SDS. **L'estimation des structures secondaires des protéines de la PDB est réalisée grâce à l'algorithme « display external sequence » (DSSP) interne à la PDB.

3.2. Taille du complexe colloïdal protéine-LAA.

Afin de caractériser les changements du rayon hydrodynamique qui apparaissent lors de la modification de la structure tertiaire de la rhGH, de la rhEPO et de la sCT en fonction de la concentration en LAA, des mesures de DLS ont été entreprises. Sur la figure 3-6, on peut voir que la C₁₂P présente une distribution inhomogène en solution. Son rayon hydrodynamique est compris entre 20nm et 2000nm (Tableau 3-3). La solution est cependant limpide à l'oeil. La formation de quelques agrégats de C₁₂P est certainement responsable de cette distribution inhomogène observée en DLS. En effet, il a été démontré que les lipoamino acides et les tensio-actifs en général étaient capables de former des agrégats à des concentrations bien inférieures à la CMC^{131, 132}. La distribution en volume utilisée en DLS permet d'exacerber les grosses particules. En réalité, lorsque cette distribution est ramenée au nombre de molécules, on obtient une population monodisperse dont la taille moyenne de la C₁₂P en solution est de 14nm. Cela signifie que la grande majorité des objets ont une taille moyenne de 14nm. En effet, il apparait que 99,6% des objets ont une taille comprise entre 13nm et 17nm et que seulement 0,4% des objets ont une taille au-delà de 40nm. Ceci explique pourquoi la solution de C₁₂P apparait limpide à l'œil nu. Une taille de 14nm reste cependant élevée pour une micelle dont la taille ne dépasse pas 5nm¹³². Contrairement à ce qui est observé pour la C₁₂P, les protéines en solution présentent toutes une distribution monodisperse. Pour la rhGH et la rhEPO l'ajout de C₁₂P n'entraîne pas l'apparition d'une population polydisperse et le rayon hydrodynamique des complexes rhGH (rhEPO) / C₁₂P est pratiquement le même que celui des protéines natives correspondantes. Pour la sCT, comme pour la rhGH et la rhEPO l'ajout de C₁₂P n'entraîne pas l'apparition d'une population polydisperse. On observe cependant une augmentation importante du rayon hydrodynamique de la sCT.

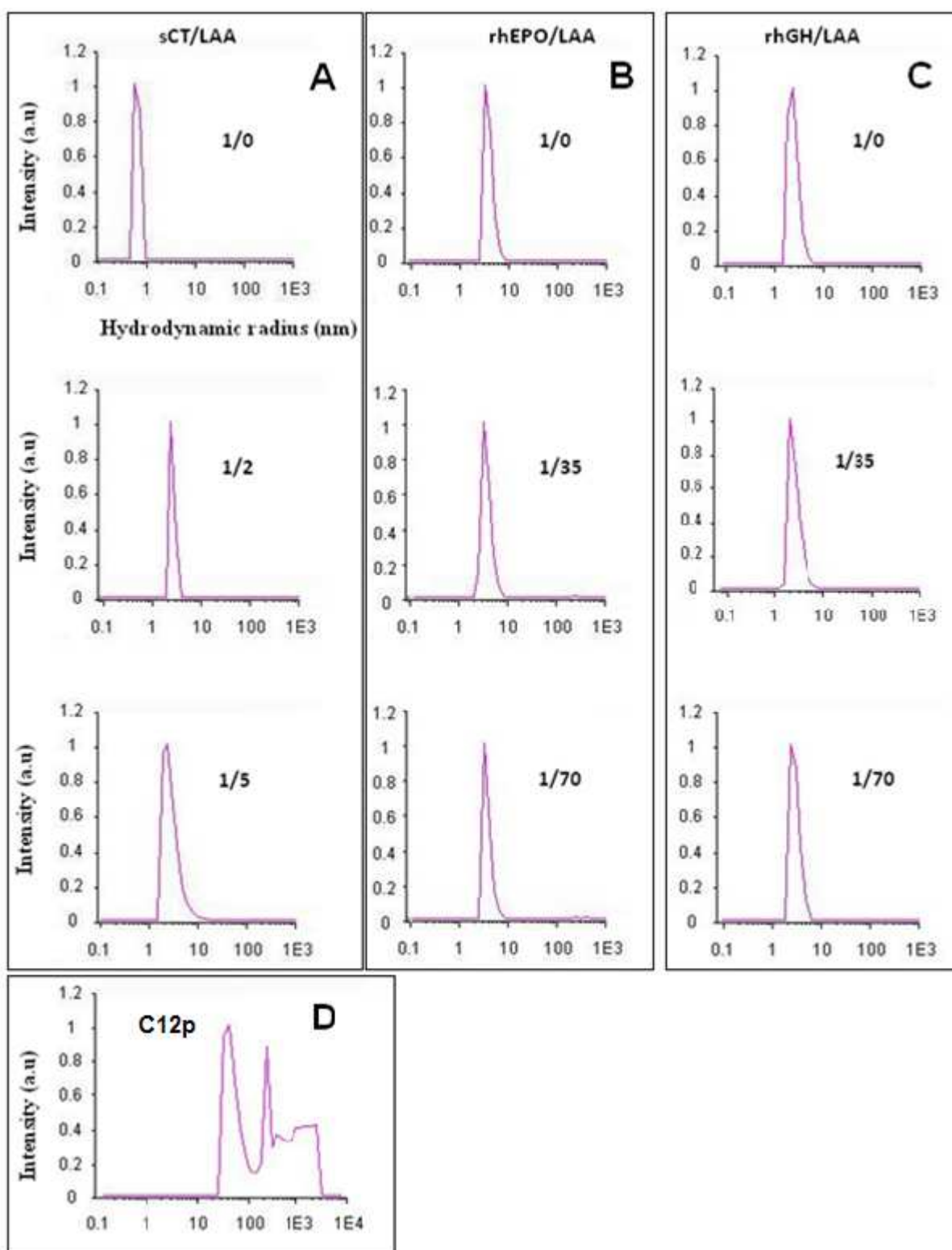


Figure 3-6 : Répartition et abondance de tailles obtenues par diffusion dynamique de la lumière des complexes colloïdaux sCT/LAA (A) : 1/0, 1/2 et 1/5, rhGH/C₁₂P (B) : 1/0, 1/35 et 1/70, rhEPO/ C₁₂P (C) : 1/0, 1/35 et 1/70 et de la C₁₂P en solution (D)

La rhGH native a un rayon hydrodynamique de $2,4 \pm 0,2$ nm (Tableau 3-3). Aucun changement sur le rayon hydrodynamique n'est observé au-delà de l'erreur expérimentale, pour un ratio molaire rhGH / C₁₂P : 1/35. Pour un ratio molaire rhGH / C₁₂P : 1/70 on observe un léger accroissement du rayon hydrodynamique de la rhGH à $2,9 \pm 0,2$ nm (Tableau 3-3).

La mesure du rayon hydrodynamique de la rhEPO native par DLS est de $3,8 \pm 0,1$ nm (Tableau 3-3). Aucun changement significatif n'a été observé lorsque la quantité de C₁₂P a été augmentée.

La conservation du rayon hydrodynamique de la rhGH et de la rhEPO après ajout de C₁₂P s'explique vraisemblablement par le fait que la totalité des molécules de C₁₂P recouvrent les protéines et que par conséquent l'augmentation de taille du complexe colloïdal est très faible.

La sCT en solution a un rayon hydrodynamique de 0,6 nm (Limite de détection de la DLS) (Tableau 3-3). Une augmentation importante du rayon hydrodynamique est observée avec un maximum à $2,7 \pm 0,4$ nm pour le ratio molaire sCT/ C₁₂P : 1/5 (Tableau 3-3). L'augmentation du rayon hydrodynamique d'un facteur 4 à 5 peut s'expliquer par la formation d'une micelle mixte composée d'environ 80 à 90 monomères de sCT associés à plusieurs centaines de molécules de C₁₂P.

Rayon hydrodynamique (nm)	Ratio molaire protéine / C ₁₂ P				Protéine native
	1/70	1/35	1/5	1/2	
rhGH	$2,9 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$	-	-	$2,4 \pm 0,2$
rhEPO	$3,7 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	-	-	$3,8 \pm 0,1$
sCT	-	-	$2,7 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$

Tableau 3-3: Rayon hydrodynamique des complexes colloïdaux sCT/C₁₂P : 1/0, 1/2 et 1/5, rhGH (rhEPO) / C₁₂P : 1/0, 1/35 et 1/70

3.3. Perméation du complexe protéine/C₁₂P sur cellules nasales à confluence

- ✓ Effet de la lauroyl proline sur la perméabilité de la rhGH, de la rhEPO et de la sCT sur cellules épithéliales nasales humaines.

Les résultats sont compilés dans le tableau 3-4. Lorsque l'on compare la perméabilité des protéines natives entre elles, on observe des valeurs très différentes d'une protéine à l'autre. Ces différences peuvent s'expliquer d'une part par le fait que les techniques de dosage utilisées pour chaque protéine sont différentes et d'autre part que les protéines étudiées sont de nature différentes. La rhGH a été quantifiée par comptage radioactif, la rhEPO par dosage immunologique et la sCT par HPLC. L'idéal aurait été d'effectuer un dosage immunologique sur toutes les protéines, cependant la rhGH et la sCT ont une réponse atténuées aux dosages immunologiques lorsqu'elles sont associées à la C₁₂P. En effet, des tests de validations des kits immunologiques de la rhGH et de la sCT ont montré qu'en présence de C₁₂P le dosage était sous-estimé d'un facteur 2,5. Ceci s'explique par le fait que la C₁₂P vient certainement se fixer sur la protéine, au niveau des épitopes de fixations des anticorps utilisés pour les tests immunologiques. Nous avons donc été contraints d'utiliser d'autres techniques d'analyse pour ces protéines. En revanche la rhEPO répond très bien aux dosages immunologiques. L'interprétation de la perméabilité obtenue pour chaque protéine ne pourra donc être que relative. On calculera donc l'augmentation relative de la perméabilité ($P/P_{\text{contrôle}}$) et la diminution relative du TEER ($\text{TEER}_{\text{contrôle}}/\text{TEER}$). Certaines techniques étant plus sensibles que d'autres cela explique les différences de perméabilités observées pour les protéines natives. Après deux heures d'incubation, la perméabilité de l'hormone de croissance seule est similaire pour les deux concentrations testées : $P = 6,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une concentration de 0,03 mg/cm² et $P = 5,4 \cdot 10^{-7} \pm 0,1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour une concentration de 0,06 mg/cm². Lorsque l'hormone de croissance humaine est formulée avec la lauroyl proline avec un rapport 1/35 dans du tampon HBSS, quelle que soit la concentration testée, on observe une diminution de la perméabilité par rapport au contrôle. Les valeurs du TEER sont nettement inférieures à celles de la rhGH native ce qui signifie qu'il y a une ouverture des jonctions serrées. Pour le rapport rhGH/C₁₂P 1/70 on observe une légère augmentation de la perméabilité de la protéine pour une concentration de 0,06 mg/cm². Pour une concentration en rhGH de 0,03 mg/cm², on observe comme dans le cas du ratio rhGH/C₁₂P 1/35 une diminution de la perméabilité par rapport à la rhGH native. Cependant, la mesure du TEER baisse indiquant une augmentation de la perméabilité.

Les résultats les plus significatifs du point de vue de la baisse du TEER ayant été obtenus avec une quantité de 0,06 mg/cm² de protéines déposée sur cellule, c'est cette concentration qui sera utilisée pour les tests de perméations de la rhEPO et de la sCT. Les

tests de perméations sur le complexe colloïdal rhEPO / C₁₂P révèlent que la perméabilité est considérablement augmentée quel que soit le ratio rhEPO / C₁₂P testé contrairement au complexe colloïdal rhGH / C₁₂P. La perméabilité ne semble pas liée à la valeur du ratio rhEPO / C₁₂P. L'augmentation de la perméabilité observée pour les complexes colloïdaux rhEPO/C₁₂P par rapport à la rhEPO native est associée à une très forte baisse de la TEER de l'ordre de 3 à 6 fois par rapport à la TEER de la rhEPO native.

La sCT native et son complexe colloïdal sCT/C₁₂P : 1/5 ont été testés aux pH 5 et 7. Le pH 5 étant le pH de stabilité physico-chimique du peptide et le pH7 étant le pH de survie optimum des cultures de cellules nasales *in vitro*. Un effet de pH est observé pour le complexe colloïdal sCT/C₁₂P. Un pH de 5 augmente légèrement la perméabilité, de l'ordre de 1,5 fois par rapport à la perméabilité de la sCT native et diminue légèrement le TEER de l'ordre de 1,6 fois par rapport à la TEER de la sCT native sans augmenter la mortalité cellulaire puisque le relargage de LDH est identique au contrôle. Cette augmentation est très modeste et ne peut pas être considérée comme significative.

Pour toutes les conditions testées, il n'y a pas de mortalité cellulaire étant donné que le relargage de LDH reste sensiblement le même, dans l'erreur expérimentale.

En résumé, le dosage immunologique et le dosage par HPLC donnent des résultats concordants avec les valeurs de la TEER mesurée après 2 heures. En effet, pour la rhEPO on observe une augmentation de la perméabilité d'un facteur 7 à 12 par rapport à la perméabilité de la rhEPO native. On observe la même tendance pour la sCT. En revanche, le dosage par comptage radioactif utilisé pour la rhGH donne des résultats inattendus et ne concorde pas avec la mesure de la TEER. Lorsqu'on mesure une baisse du TEER de 2 à 6 fois par rapport à la TEER de la rhGH native on observe conjointement une baisse de moitié de la perméabilité de la rhGH. Ces résultats sont surprenants, car une baisse de la TEER se traduit par une ouverture des jonctions serrées et donc une augmentation de la perméabilité.

	Protéine déposée sur cellules (mg.cm ⁻²)	Perméabilité après 2 h (10 ⁻⁷ cm ² .s ⁻¹)	Augmentation relative de la perméabilité après 2h (P/P _{contrôle})	TEER (Ω.cm ⁻²) à t+ 2h	diminution relative du TEER après 2h (TEER _{contrôle} /TEER)	Relargage LDH (absorbance)
rhGH native (contrôle 1)	0,06 0,03	5,4±0,1 6,2±0,3	1,0 1,0	1102±112 824±74	1,0 1,0	- -
rhGH/C ₁₂ P : 1/35	0,06 0,03	2,6±0,1 3,0±0,1	0,5 0,5	335±30 439±52	3,3 1,9	- -
rhGH/C ₁₂ P : 1/70	0,06 0,03	6,6±0,2 3,2±0,1	1,2 0,5	174±10 289±32	6,3 2,8	- -
rhEPO native	0,06	180±10	1,0	173±12	1,0	1.1±0,1
rhEPO/C ₁₂ P : 1/35	0,06	2185±565	12,1	45±3	3,8	1.5±0,1
rhEPO/C ₁₂ P : 1/70	0,06	1240±30	7,9	35±3	4,9	0.8±0,1
rhEPO/C ₁₂ P : 1/133	0,06	1665±525	9,2	10±0,3	17,3	1.3±0,2
sCT pH 7	0,06	0.8±0,1	1,0	502±44	1,0	0.5±0,1
sCT pH 5	0,06	0.9±0,1	1,0	500±32	1,0	0.4±0,1
sCT / C ₁₂ P : 1/5 pH 5	0,06	1.4±0,1	1,7	300±26	1,7	0.4±0,1
sCT / C ₁₂ P : 1/5 pH 7	0,06	1,0±0,1	1,1	420±40	1,2	0.4±0,1

Tableau 3-4 : Permeabilité, TEER et relargage de LDH des protéines natives rhGH, rhEPO, sCT et complexés par diverses quantités de C₁₂P incubées sur une monocouche de cellules nasales humaines. 0,03mg.cm⁻² ou 0,06mg.cm⁻² de protéines sont déposés sur cellules à température ambiante. Les résultats présentés sont une moyenne de 3 mesures expérimentales

En conclusion, l'évolution de la TEER est un bon indicateur de l'état des jonctions serrées des cellules nasales et donc de la perméabilité. Il apparait que les formulations à base de C₁₂P augmentent de manière significative le passage de la rhGH et de la rhEPO. Pour la sCT l'augmentation du passage n'est que d'un facteur 2 au maximum.

- ✓ Effet de la lauroyl proline et des variations des conditions hyperosmotiques sur la perméabilité de l'érythropoïétine sur cellules épithéliales nasales humaines

Des études préalables ont montré que l'osmolarité des formulations administrées peut faire varier le passage d'un principe actif à travers l'épithélium des voies aériennes⁵⁸. Dans ces travaux, l'absorption intranasale de l'EPO chez le rat, la perméabilité de l'EPO est visualisée par la mesure des réticulocytes circulants. Cette étude montre que l'administration nasale de l'EPO est possible, mais surtout que l'EPO qui a traversé l'épithélium nasal a conservé son activité biologique. Nous avons voulu tester l'effet de l'hypertonie sur la perméabilité du complexe rhEPO/C₁₂P. Deux paramètres ont été mesurés au cours de cette étude : la résistance transépithéliale et la libération de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu apical, qui signale une perte de l'intégrité membranaire. L'hyperosmolarité a été obtenue grâce à l'utilisation de mannitol ou de NaCl. L'effet de ces deux molécules sur la perméabilité de complexe rhEPO/C₁₂P va être comparé. Les conditions hyper-osmotiques créées par la présence de 3 % de NaCl permettent à elles seules d'augmenter la perméabilité de la rhEPO dans les cellules nasales (Tableau 3-5). En revanche, le mannitol, qui dans ce système n'affecte pas la résistance transépithéliale, augmente la perméabilité mais à un degré moindre. L'association de lauroyl proline et de NaCl augmente le passage de l'EPO, sans augmenter le rejet de LDH et entraîne une baisse de la résistance transépithéliale, traduisant une perturbation des jonctions intercellulaires. Les études de perméabilité permettent de montrer un effet cumulé des conditions hyper-osmotiques et de la présence de lauroyl proline sur l'augmentation de la perméabilité de l'érythropoïétine sur le modèle de cellules nasales épithéliales humaines.

	Quantité en protéine déposée sur cellules (mg.cm ⁻²)	Perméabilité après 2 h (10 ⁻⁷ cm ² .s ⁻¹)	Augmentation relative de la perméabilité après 2h (P/P _{contrôle})	TEER (Ω.cm ⁻²) à t+ 2h	diminution relative du TEER après 2h (T _{contrôle} /T)	Relargage LDH (absorbance)
rhEPO native (contrôle)	0,06	180±10	1,0	1.1±0,1	1,0	1,1±0,1
rhEPO native + 15% mannitol (w/w)	0,06	320±20	1,8	188.6±19	0,9	1.2±0,1
rhEPO/LP 1/35 + 15% mannitol (w/w)	0,06	180±12	1,0	137.4±9	1,3	1.4±0,1
rhEPO/LP 1/70 + 15% mannitol (w/w)	0,06	375±35	2,1	57.5±4	3,0	1.3±0,1
rhEPO/LP 1/133 + 15% mannitol (w/w)	0,06	1125±125	6,3	73.5±8	2,4	1.5±0,1
rhEPO native + 3% NaCl (w/w)	0,06	2550±360	12,5	38.4±2	4,5	1.1±0,1
rhEPO/LP 1/35 + 3% NaCl (w/w)	0,06	2530±30	12,5	32.0±1	5,4	1.1±0,1
rhEPO/LP 1/70 + 3% NaCl (w/w)	0,06	4550±75	25,3	32.0±1	5,4	1.1±0,1
rhEPO/LP 1/133 + 3% NaCl (w/w)	0,06	5860±500	31,6	32.0±2	5,4	1.1±0,1

Tableau 3-5 : Permeabilité, TEER et relargage de LDH de la rhEPO native et complexée par diverses quantités de C₁₂P incubés sur une monocouche de cellules nasales humaines. 0,06mg.cm⁻² de protéines sont déposés sur cellules à température ambiante. Les résultats présentés sont une moyenne de 3 mesures expérimentales

En résumé, le NaCl, associé à la C₁₂P permet d'augmenter considérablement la perméabilité de la rhEPO. Le mannitol associé à la C₁₂P n'entraîne pas d'augmentation de perméabilité, mais à un degré moindre.

3.4. Dynamique moléculaire

3.4.1. Étude de l'interaction rhGH/C₁₂P en tout atome

La dynamique moléculaire de l'interaction entre la rhGH et la C₁₂P a été étudiée selon deux conditions, « au hasard » et « en surface ». Dans le premier cas, les molécules de C₁₂P sont positionnées autour de la protéine alors que dans la deuxième condition les molécules de C₁₂P sont proches de la surface de la protéine, ceci afin de favoriser l'interaction C₁₂P – rhGH plutôt que l'interaction C₁₂P – C₁₂P qui se traduit par la formation d'agrégats micellaires. Sur la figure 3-7 est représentée pour la condition « au hasard » la protéine en présence de 32 molécules de C₁₂P (a) à t=0ns, t=5ns et t=52ns et de 86 molécules de C₁₂P (b) à t=0ns, t=5ns et t=40ns.

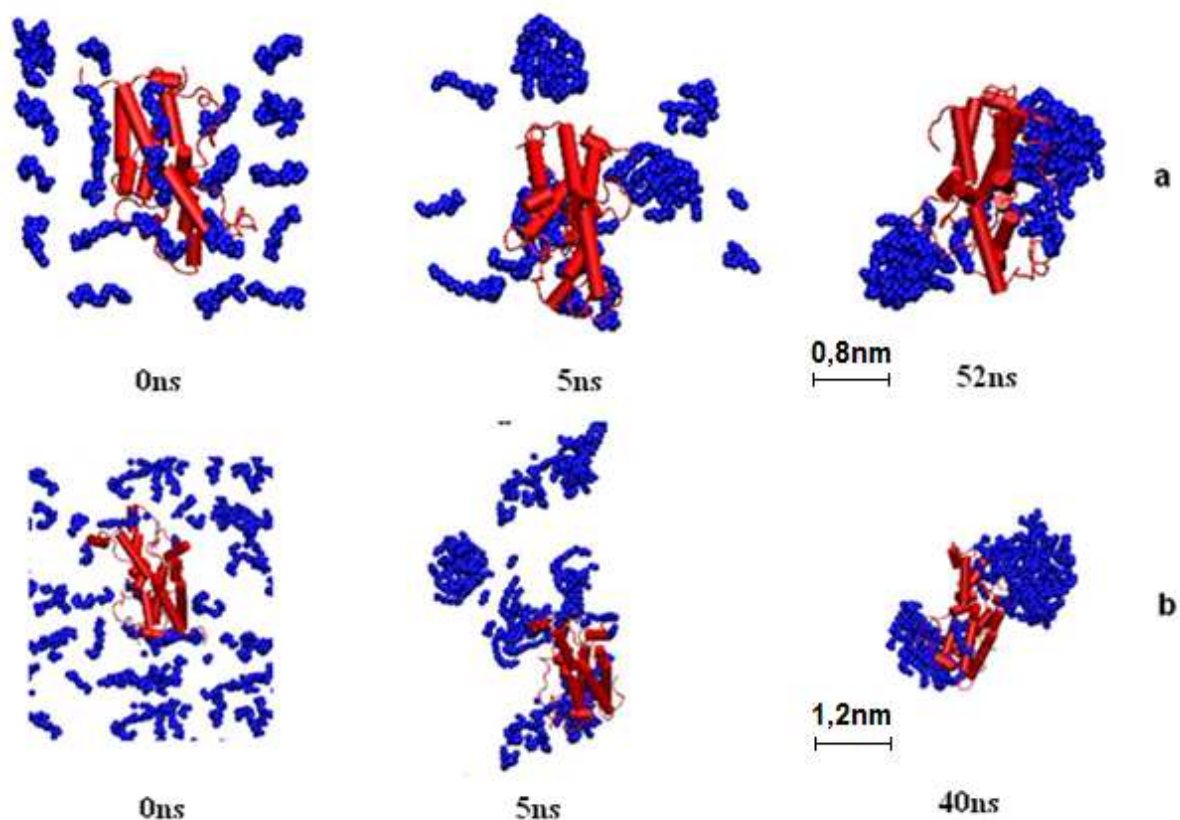


Figure 3-7 : Étapes de formation du complexe rhGH/C₁₂P pour la condition « au hasard » en présence de rhGH et de 32 molécules à t=0ns, t=5ns et t=52ns (a) ou de 86 molécules de C₁₂P à t=0ns, t=5ns et t=40ns (b).

À la condition initiale, les molécules de C₁₂P sont placées au hasard dans la boîte de simulation. Au bout de 5ns les molécules de C₁₂P forment des agrégats micellaires de 10 à 15 molécules de C₁₂P. Ce processus est donc très rapide, de l'ordre de quelques nanosecondes. À la fin de la dynamique, ces agrégats se fixent ensuite sur la rhGH comme le montre la figure 3-7. Les structures secondaire et tertiaire de la protéine restent inchangées.

La figure 3-8 représente la dynamique moléculaire réalisée pour la rhGH avec la condition « en surface » en présence de 32 molécules de C₁₂P à t=0ns, t=5ns et t=13ns (a) et de 86 molécules de C₁₂P (b) à t=0ns, t=5ns et t=36ns

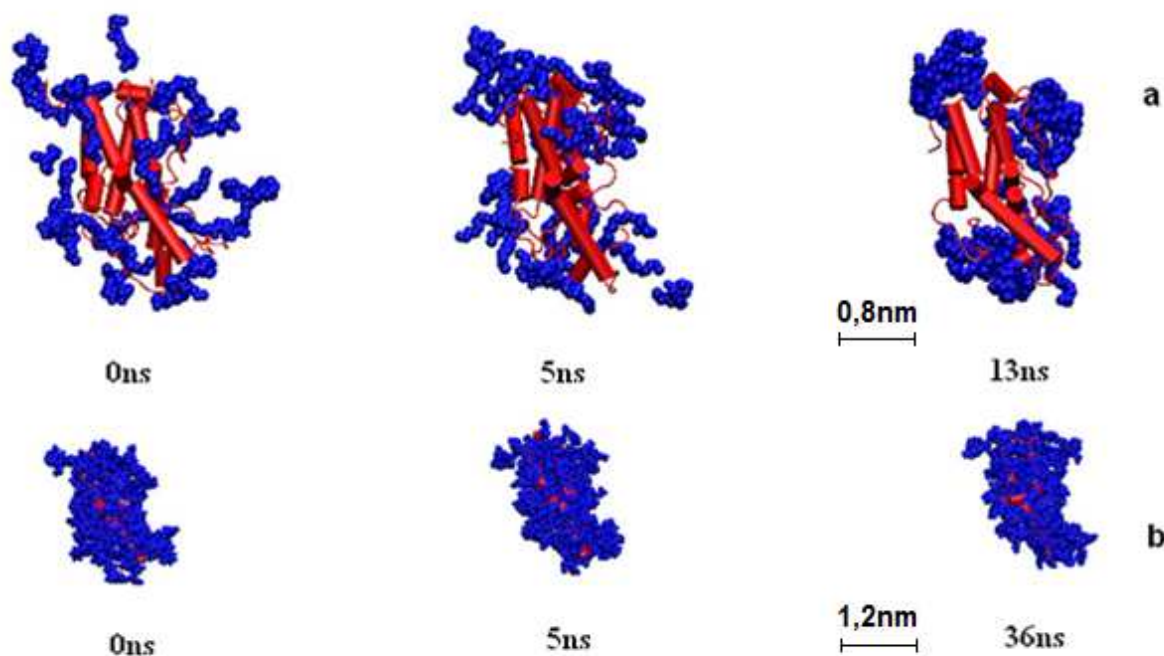


Figure 3-8 : Étapes de formation du complexe rhGH/C₁₂P pour la condition « en surface » en présence de rhGH et de 32 molécules à t=0ns, t=5ns et t=13ns (a) ou de 86 molécules de C₁₂P à t=0ns, t=5ns et t=36ns (b).

À t=0 les molécules de C₁₂P sont réparties à proximité de la surface de la protéine. À t=5ns les molécules de C₁₂P commencent à se fixer à la rhGH. A la fin de la dynamique, la grande majorité des molécules de C₁₂P se sont fixées à la surface de la rhGH sans formation initiale d'agrégats micellaires de C₁₂P.

Une interprétation possible de la différence entre les deux simulations est que les agrégats formés dans le premier cas finiront au bout d'un temps très long par se dissocier et se répartir le long de la protéine (figure 3-8). En effet, il a été montré pour le système « au hasard », que dans un premier temps la C₁₂P s'agrange avant de venir se fixer sur la protéine. Cet état n'a pas eu le temps d'évoluer car la dynamique a été très courte (13ns).

Il est intéressant de noter que dans les deux cas de simulation aucun changement dans la structure secondaire de la protéine n'a été observé.

Les structures finales des systèmes « au hasard » et « en surface » avec le ratio rhGH/C₁₂P : 1/86 sont représentés figure 3-9. Pour la condition « au hasard » les agrégats de C₁₂P se distribuent aux extrémités de la rhGH. Il est probable qu'avec une simulation plus longue le système évolue avec diffusion des molécules de C₁₂P et répartition des molécules autour de la rhGH. Pour la condition « en surface » les molécules de C₁₂P se répartissent de manière homogène autour de la rhGH sans formation initiale d'agrégats.

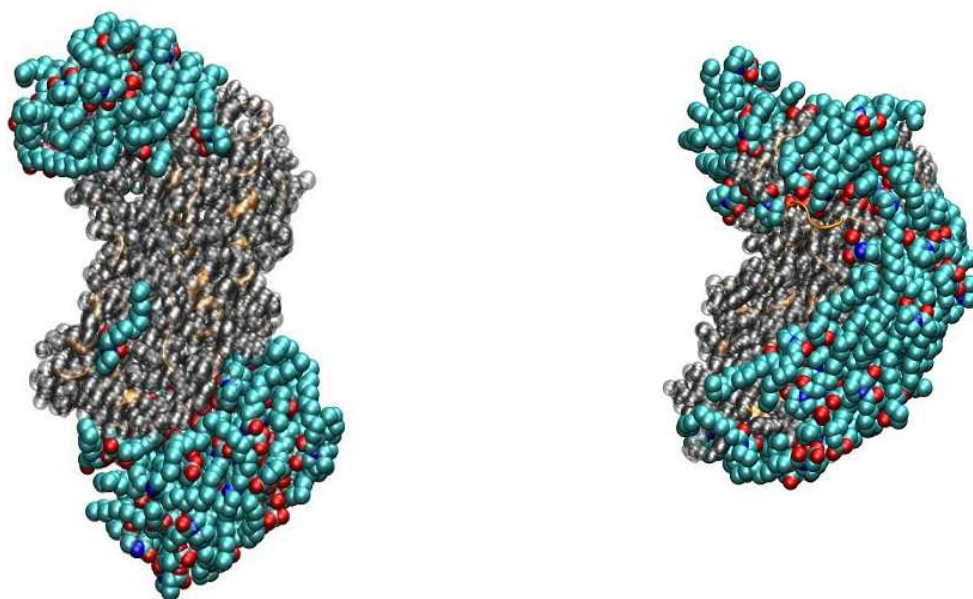


Figure 3-9 : Structures finales du système. À gauche : condition initiale 'Au hasard', à droite : condition initiale 'En surface'. La C₁₂P est représentée par des sphères de Wan der Vaals (Bleu : carbones, rouge : oxygène), la rhGH est représentée par sa structure secondaire (rubans oranges) et par des sphères de Wan der Vaals (gris). La condition initiale 'Au hasard' génère des micelles. La condition initiale 'En surface' engendre une distribution homogène de la C₁₂P à la surface de la rhGH.

3.4.2. Détermination du coefficient de diffusion du complexe rhGH/ C₁₂P par dynamique moléculaire

Par dynamique moléculaire le coefficient de diffusion du complexe rhGH/C₁₂P se situe autour de $0,06.10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ et $0,09.10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ soit un rayon hydrodynamique compris entre 2,5 et 3,5 nm (tableau 3-6) sauf pour la condition initiale « en surface » réalisée avec 86 molécules de C₁₂P, pour laquelle on obtient un coefficient de diffusion de $0,24.10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ correspondant à une taille d'environ 1nm. Cette valeur ne concorde pas avec les rayons hydrodynamiques trouvés pour les trois autres conditions et avec les valeurs trouvées par DLS. Le grand nombre de molécules de C₁₂P recouvrant la protéine engendre certainement une erreur dans le calcul du coefficient de diffusion effectué par l'algorithme.

Conditions initiales	Nombre de rhGH	Nombre de C ₁₂ P	Coefficient de diffusion (cm ² /s)	Rayon hydrodynamique par dynamique moléculaire (nm)	Ordre de grandeur du Rayon hydrodynamique par DLS (nm)
Au hasard	1	32	$0,07 \pm 0,01.10^{-5}$	$3,1 \pm 0,4$	2
Au hasard	1	86	$0,09 \pm 0,01.10^{-5}$	$2,5 \pm 0,3$	3
En surface	1	32	$0,06 \pm 0,01.10^{-5}$	$3,5 \pm 0,6$	2
En surface	1	86	$0,24 \pm 0,01.10^{-5}$	$1,0 \pm 0,1$	3

Tableau 3-6 : Coefficient de diffusion et rayon hydrodynamique des complexes colloïdaux rhGH/ C₁₂P déterminés par dynamique moléculaire

3.5. Étude préclinique

Les études précliniques sont réalisées chez le mouton. Nous avons choisi d'administrer la rhGH formulée avec le ratio rhGH/C₁₂P : 1/70 à pH 7,4 car c'est le ratio auquel on observe une légère augmentation de la perméabilité membranaire *in vitro* sans modification sensible de la structure secondaire de la rhGH. La sCT a été administrée avec le ratio sCT/ C₁₂P : 1/5 à pH 5 car d'une part c'est le ratio auquel on observe l'augmentation de la perméabilité membranaire la plus significative *in vitro* et d'autre part c'est le ratio pour lequel on a une augmentation du pourcentage d'hélice α permettant une meilleure interaction de la calcitonine avec son récepteur. La rhEPO a été administrée à l'aide d'une solution à 3% en NaCl de pH

7,4, avec le ratio rhEPO / C₁₂P : 1/70. A ce ratio on n'observe pas de modifications significatives de la structure secondaire de la rhEPO d'une part et d'autre part c'est le ratio pour lequel on observe, en présence de 3% de NaCl, l'augmentation de la perméabilité membranaire la plus significative *in vitro*. La rhGH est administrée par voie nasale à l'aide du nébulisateur API AEROSIZER MACH 2 développé par Markos Méfar. La sCT et la rhEPO ont été administrées grâce au spray nasal BD AccusprayTM de BD Medical. La dose administrée, la voie d'administration les temps de prélèvements, l'AUC (Aire sous la courbe) ainsi que la biodisponibilité sont résumés dans le tableau 3-7. La biodisponibilité a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Biodisponibilité (\%)} = \text{AUC}_{\text{nasale}} / \text{AUC}_{\text{IV}}$$

Dosage	Voie	Présentation	Volume administré (ml)	Nbr moutons	Prélèvements (minutes)	AUC (mUI/l/min)	Biodisponibilité (%)
8UI	IV	Solution de GENOTONORM TM	0,25	1	0-5-10-15-30-60-90-120-180	6599	-
24UI	nasale	Aérosol (préparation Physica Pharma)	1	1	0-10-20-40-60-80-100-120-180-240-300-360 et 480	0	0%
100UI	IV	Solution de CALSYN TM	1	1	0-5-10-15-20-30-40-50-75-90-120-180 et 240	36902	-
200UI	nasale	Spray (préparation Physica Pharma)	0,2	1	0-5-10-15-20-30-40-50-75-90-120-180 et 240	0	0%
200UI	nasale	Spray (préparation Physica Pharma)	0,2	1	0-5-10-15-20-30-40-50-75-90-120-180 et 240	0	0%
2500UI	IV	Solution d'EPREX TM	0,5	2	5 – 10 – 15 – 30 – 60 – 120 – 180 et 300	505387	-
45000UI	nasale	Spray (préparation Physica Pharma)	0,15	2	5 – 10 – 15 – 30 – 60 – 120 – 180 et 300	0	0%

Tableau 3-7 : Dose de protéine administrée, voie d'administration, temps de prélèvement, surface sous la courbe des concentrations (AUC) et biodisponibilités des protéines administrées par voie injectable (IV) et nasale

Les dosages des protéines dans le sérum de mouton après administration nasale n'ont pas fourni de résultats satisfaisants puisqu'aucune trace de protéine n'a été détectée. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer, les tests de perméabilité effectués *in vitro* sur cellules nasales des complexes colloïdaux rhGH et sCT en présence de C₁₂P ne sont pas corélés aux résultats obtenus *in vitro*. De plus, le dosage des protéines *in vivo* ne peut être effectué qu'avec des tests immunologiques, or nous avons montré qu'en présence de C₁₂P les tests immunologiques donnent une réponse atténuée d'un facteur 2,5 dans le cas du dosage de la rhGH et de la sCT. Cette baisse de sensibilité du kit de dosage est suffisamment grande pour empêcher de détecter et quantifier la présence de ces deux protéines dans le sang. Pour la rhEPO, les résultats précliniques sont aussi peu concluants, mais dans ce dernier cas les tests immunologiques fonctionnent et les tests de perméabilités *in vitro* étaient concluants. La protéine a donc pu perdre son activité biologique ou être métabolisée.

4. Discussion

Nous avons mis au point des suspensions colloïdales pour lesquelles :

- i) La structure secondaire mesurée par CD ainsi que le rayon hydrodynamique mesuré par diffusion dynamique de la lumière et calculé par dynamique moléculaire de la rhGH et de la rhEPO restent globalement inchangées.
- ii) La sCT acquiert une structure secondaire et voit son rayon hydrodynamique augmenter d'un facteur 4.
- iii) La perméation des protéines à travers les cellules nasales *in vitro* est globalement augmentée en présence de C₁₂P et dépendant de la nature de la protéine.
- iv) Le complexe rhGH/ C₁₂P a été modélisé par dynamique moléculaire, la C₁₂P se fixe à la surface de la protéine, de manière à l'envelopper et à offrir une nouvelle surface.

Il convient de bien différencier les résultats obtenus avec les protéines globulaires que sont la rhGH et la rhEPO des résultats obtenus sur la sCT qui est un petit peptide. En effet, dans le cas de protéines globulaires, ayant une structure secondaire en solution on s'est attaché à vérifier par dichroïsme circulaire que cette structure n'était pas perturbée par l'ajout

de C₁₂P. Dans le cas de la sCT, un changement structural n'est pas signe de dénaturation étant donné que ce peptide est sous forme pelote statistique en solution.

Mise au point d'une formulation conservant la structure secondaire et modifiant peu le rayon hydrodynamique de la rhGH et de la rhEPO

Les spectres de dichroïsme circulaire après formulation de la rhGH, et de la rhEPO ont été comparés aux spectres de la rhGH, et de la rhEPO. Après une recherche bibliographique, il apparaît que les hélices α nous donnent des informations sur les paramètres structuraux de la protéine^{57, 91-93}. Autrement dit, une baisse du taux d'hélices α se traduit par des changements au niveau de la structure secondaire de la protéine.

Nous avons recherché le ratio molaire rhGH (rhEPO)/ C₁₂P pour lequel la quantité de C₁₂P est maximale, mais sans engendrer de modifications de la structure secondaire de la protéine. Le ratio rhGH/ C₁₂P 1/70 est le meilleur compromis entre stabilité structurale de la rhGH et quantité de C₁₂P fixée. Au-delà de ce ratio une baisse importante de la proportion en hélices α est observée. Cette baisse est due à l'effet dénaturant que peut avoir un tensio-actif anionique comme la C₁₂P. La C₁₂P s'apparente structurellement à un tensio-actif très étudié, le sodium dodécyl sulfate (SDS). Adersen K et al¹³³ ont montré en utilisant différentes techniques spectroscopiques que le SDS était capable de diminuer la proportion d'hélices α de la bovine acyl-coenzyme-A (ACBP) à partir du ratio molaire ACBP/SDS 1/13.

Comme la rhGH, la rhEPO est caractérisée par une proportion importante en hélice α à l'état natif. L'addition de C₁₂P à un ratio molaire rhEPO / C₁₂P 1/35 induit une faible modification structurale. Pour un ratio molaire rhEPO/ C₁₂P 1/70 et 1/133 une baisse importante en hélices α est observée. Comme dans le cas de la rhGH cette baisse est due à l'effet détergent de la C₁₂P. Le ratio rhEPO/ C₁₂P 1/35 est le meilleur compromis entre stabilité structurale de la rhEPO et quantité de C₁₂P fixée.

À pH 8 la C₁₂P présente une distribution inhomogène en solution aqueuse avec des tailles allant de 20nm à 2000nm. Cependant, le rayon hydrodynamique et la monodispersité de la rhGH et de la rhEPO restent inchangés même lorsque le C₁₂P est ajouté à la protéine à un ratio molaire protéine / C₁₂P engendrant des modifications de la structure secondaire des protéines visibles en CD. Ces résultats indiquent que les modifications importantes de la

structure secondaire engendrée par des quantités élevées de C₁₂P n'entraînent pas de modifications de la structure tertiaire des protéines. La faible taille du complexe colloïdal permet certainement de faciliter le passage à travers les cellules nasales.

Le rayon hydrodynamique peut-être calculé par dynamique moléculaire en évaluant le coefficient de diffusion de la protéine associée à la C₁₂P. Les résultats obtenus sont assez approximatifs à cause du manque de précision lié à la faible durée des trajectoires. On obtient un Rh ~3nm pour les 3 premières simulations du tableau ce qui est compatible avec le fait que pour un nombre peu élevé de C₁₂P la diffusion à la surface de la protéine est identique aux conditions initiales. Ces résultats confirment ceux obtenus en diffusion dynamique de la lumière. Cependant, les simulations effectuées avec 32 C₁₂P ont un Rh plus élevé que celles effectuées avec 86 C₁₂P. Ceci est dû au fait que les simulations contenant 32 C₁₂P ont été réalisées dans des boîtes plus petites que celles utilisées pour les simulations à 86 C₁₂P.

Les formulations aux ratios molaires rhGH/ C₁₂P 1/70 et rhEPO/ C₁₂P 1/35 sont les candidats pour lesquels il n'y a pas de modification de la structure secondaire de la protéine et pour lesquels la taille du complexe colloïdal est monodisperse et reste pratiquement inchangé comparé à la protéine native.

Mise au point d'une formulation pour laquelle la sCT acquiert une structure secondaire active dans un complexe colloïdal

Nous avons recherché le ratio molaire sCT/ C₁₂P pour lequel la quantité de C₁₂P fixée à la sCT est maximale. Au-delà du ratio sCT/ C₁₂P 1/5 la C₁₂P ne se fixe plus à la protéine et précipite en solution.

En solution aqueuse, la sCT se présente sous la forme d'une structure désordonnée. L'ajout de C₁₂P engendre la formation d'une hélice α à un ratio molaire sCT / C₁₂P : 1/5. Ce qui confirme les résultats de l'étude de l'interaction SDS-CT menée par Motta et al.¹³⁴ et Sextron et al.¹³⁵. Pour accomplir son activité physiologique, la sCT doit agir sur son récepteur spécifique, et pour que cette interaction ait lieu la sCT doit se trouver dans une conformation hélice α ^{136, 137}. Nous avons démontré par dichroïsme circulaire que la C₁₂P favorisait cette conformation. Ceci est d'une importance capitale, car le complexe colloïdal que nous avons

formé avec la C₁₂P maintient la sCT dans sa conformation active et pourrait ainsi favoriser l'interaction de la sCT avec son récepteur et donc accroître son activité.

Les modalités exactes de l'interaction entre la sCT et la C₁₂P ne sont pas encore bien connues. On peut supposer que dans un premier temps un contact bivalent a lieu entre les deux molécules, le groupe cationique de lysine de la sCT et la tête polaire anionique de la C₁₂P, comme cela a été rapporté pour le lysozyme et pour l'interaction PF4 (56-70) avec le SDS^{138, 139}. Par la suite un phénomène d'agrégation a lieu entre plusieurs molécules de C₁₂P et plusieurs sCT expliquant l'augmentation du rayon hydrodynamique observé en DLS. On forme ainsi une micelle mixte composée d'environ 80 à 90 monomères de sCT associés à plusieurs centaines de molécules de C₁₂P. En effet, l'augmentation du rayon hydrodynamique de la sCT d'un facteur 4,5 se traduit par une augmentation du volume de la sCT d'un facteur 90. Il est important de noter que la micelle mixte obtenue est monodisperse.

La perméation des protéines à travers les cellules nasales in vitro est augmentée en présence de C₁₂P.

L'association de la rhEPO avec la C₁₂P permet d'augmenter significativement la perméabilité de la rhEPO après 2 heures d'incubation. Cette augmentation de la perméabilité est simultanément corrélée à une baisse du TEER traduisant une perturbation des jonctions serrées et donc une augmentation de la perméabilité de la rhEPO. Le complexe colloïdal rhEPO/ C₁₂P qui a été sélectionné est donc capable de franchir les jonctions serrées des cellules nasales *in vitro*. Les études associant des conditions hyperosmotiques à la C₁₂P montrent que des solutions hyperosmotiques sans C₁₂P, contenant uniquement du NaCl augmentent la perméabilité de la rhEPO au travers des cellules nasales du fait de la baisse du TEER qui en découle. L'association de la C₁₂P et du NaCl provoque un effet de synergie et la perméabilité du complexe colloïdal rhEPO/ C₁₂P est fortement augmentée. L'effet osmotique du NaCl pourrait expliquer cette augmentation de la perméabilité mais les résultats ne sont pas reproductibles lorsque la solution de NaCl est remplacée par une solution de mannitol de même osmolarité. Il est alors évident que l'ouverture des jonctions serrées n'est pas simplement due à un rétrécissement des cellules causées par une solution hyperosmotique.

Pour la sCT, un effet du pH est observé. Un pH de 5 augmente la perméabilité, comparé à un pH de 7 et sans augmenter la mortalité cellulaire. D'une manière générale, plus le pH de la solution est acide et éloigné du pHi de la protéine, plus la perméabilité sera élevée¹⁴⁰. Le pHi de la calcitonine de saumon étant de 10 il paraît alors logique qu'une solution de pH de 5 augmente la perméabilité de la sCT de manière plus importante qu'une solution de pH7. La perméabilité est d'autant plus importante que la TEER est basse, ce qui confirme la cohérence des résultats obtenus. La perméabilité de la sCT a certes augmenté, mais elle n'est pas exceptionnellement élevée au regard de la faible taille de la protéine. Ceci s'explique par le fait que l'association sCT/ C₁₂P se traduit par la formation d'une micelle mixte dont le rayon hydrodynamique est 4 fois plus élevé que la sCT native. On peut supposer que si le complexe colloïdal sCT/ C₁₂P avait la taille de la sCT native, la perméabilité aurait été plus importante.

La perméabilité du complexe rhGH/ C₁₂P n'évolue pas de manière cohérente en fonction de l'augmentation de la quantité de C₁₂P. Par contre, la TEER diminue bien lorsque la quantité de C₁₂P augmente ce qui prouve qu'il y a bien augmentation de la perméabilité. Il semble donc y avoir un problème avec la technique de dosage par radioactivité de la rhGH.

Il apparaît incontestablement que la C₁₂P augmente la perméabilité de la protéine à laquelle elle est associée sans pour autant endommager les cellules nasales. La perméabilité résultante est variable selon la nature de la protéine.

Le complexe rhGH/ C₁₂P a été modélisé par dynamique moléculaire, la C₁₂P se fixe à la surface de la protéine

Lorsqu'on réalise des expériences de dynamique moléculaire sur la rhGH en présence de C₁₂P on obtient systématiquement une fixation des molécules de C₁₂P à la surface de la protéine et la formation d'un complexe rhGH/ C₁₂P quelles que soient les conditions de départ. Ce complexe est cependant différent pour les conditions « au hasard » et « en surface ». Dans le premier cas, les molécules de C₁₂P forment des agrégats qui se fixent aux extrémités de la rhGH. Il est probable que les molécules de C₁₂P auraient fini par recouvrir la rhGH de manière homogène si la dynamique moléculaire avait duré plus longtemps. Dans la condition « en surface » la répartition des molécules de C₁₂P sur la protéine est homogène étant donné

qu'il n'y a pas de formation de micelles à l'état intermédiaire de la dynamique. Il est intéressant de noter que la structure secondaire et tertiaire de la rhGH est conservée, malgré le fait que la C₁₂P soit un tensioactif anionique. L'explication du maintien de la structure tridimensionnelle de la rhGH réside d'une part dans le fait que les molécules de C₁₂P se fixent préférentiellement à la surface de la protéine et ne pénètrent pas dans le cœur de celle-ci, d'autre part, les molécules de C₁₂P semblent se fixer préférentiellement sur les parties non structurées de la rhGH.

Tests précliniques chez le mouton

Le mouton est le modèle animal qui se rapproche le mieux de l'Homme en terme d'administration nasale. Les tests précliniques sur moutons ont été réalisés à partir de suspensions colloïdales répondant au cahier des charges. En effet, ces suspensions colloïdales sont facilement sprayables pour être administrées par voie intranasale, la quantité de C₁₂P ajoutée est optimisée afin d'accroître le passage des protéines à travers les cellules nasales *in vitro* et permettre de maintenir leur intégrité structurale. Cependant, les résultats *in vivo* ne sont pas concluants. Dans le cas de la rhGH et de la sCT nous avons observé une baisse de sensibilité des kits de dosages immunologiques. L'explication la plus plausible de ce phénomène est liée à l'association protéine/ C₁₂P. Dans le cas de la rhGH, nous avons démontré par dynamique moléculaire que la C₁₂P recouvre la surface de la protéine. Si cette interaction est forte, cette configuration peut alors empêcher l'anticorps du kit immunologique dirigé contre la protéine d'interagir avec son épitope. L'anticorps non fixé est alors éliminé au lavage. Dans le cas de la sCT l'explication est différente. Nous avons montré par dynamique moléculaire que la sCT, dans le complexe sCT/C₁₂P se trouvait à l'extérieure de la micelle mixte, donc accessible aux anticorps du kit immunologique. Cependant il a été montré par dichroïsme circulaire que la sCT, en présence de C₁₂P passe d'un état non organisé et acquiert une structure secondaire en hélice α . Le kit de dosage a été réalisé sur la sCT en solution, c'est à dire sur la protéine non structurée. Le fait que la sCT est acquies une structure secondaire en présence de C₁₂p a modifié l'accessibilité de certains acides aminés pour l'anticorps. L'épitope de fixation de l'anticorps a donc été modifié. Pour la rhEPO, les résultats peu concluants ne peuvent pas s'expliquer comme pour la rhGH et la sCT par une baisse de sensibilité du kit immunologique étant donné qu'il fonctionne parfaitement avec cette

protéine. Ces résultats restent difficiles à interpréter d'autant plus que les tests *in vitro* sur cellules nasales étaient très concluants. Cependant, le faible nombre de moutons utilisés pour cette étude ne permet pas de dresser un bilan statistique fiable.

5. Conclusion

En conclusion nous avons sélectionné une formulation contenant de la C₁₂P pour chacune des 3 protéines étudiées. Pour les protéines globulaires rhGH et rhEPO on a la formation d'un complexe colloïdal homogène dont la taille est pratiquement identique à la protéine native. La structure secondaire de la protéine reste inchangée et le complexe passe facilement à travers les cellules nasales *in vitro*. L'ajout de NaCl à la formulation à base de rhEPO provoque un effet de synergie avec la C₁₂P augmentant le passage de la rhEPO à travers les cellules nasales. Pour la sCT qui est une petite protéine non organisée en solution on observe en présence de C₁₂P la formation d'une micelle mixte composée de C₁₂P et de sCT. Le complexe ainsi formé a un rayon hydrodynamique 4 fois plus important que la sCT native. De plus, la sCT acquiert dans le complexe colloïdal sa structure active. Nous avons donc mis au point une formulation à base de sCT et de C₁₂P facilement sprayable dans laquelle la sCT acquiert la structure secondaire lui permettant d'interagir avec son récepteur. Il faut cependant mettre au point une technique de dosage fiable permettant de doser dans le sang les protéines administrées par voie nasale.

Chapitre 4

Validations des modèles lipidiques de *stratum*
corneum par RMN du solide

CHAPITRE 4

VALIDATIONS DES MODELES LIPIDIQUES DE *STRATUM CORNEUM* PAR RMN DU SOLIDE

1. Introduction

1.1. Composition

Le *stratum corneum* (SC) forme la couche la plus superficielle de la peau. Il est constitué de cornéocytes assemblés par un ciment, la matrice lipidique (voir chapitre 1). Ces deux composants contribuent à la remarquable imperméabilité du SC. Cette fonction de barrière est essentielle, mais s'oppose au passage d'actifs par voie transdermale. En désorganisant la structure des lipides intercellulaires par l'intermédiaire de promoteurs d'absorption comme l'acide oléique, l'administration de principes actifs par voie transdermale devient possible. La mise en place de modèles de *stratum corneum in vitro* va permettre d'étudier les potentialités de diverses formulations à traverser le *stratum corneum* et à agir au niveau de l'épiderme et du derme pour traiter certaines maladies dermatologiques telles que le psoriasis. Le but de ce chapitre est de mettre en place un modèle lipidique de *stratum corneum* de peau saine et un modèle lipidique de peau psoriasique. Le tableau 4-1 rassemble les compositions lipidiques du *stratum corneum* de peaux saines et de peaux psoriasiques²¹. Ces valeurs peuvent différer en fonction de la provenance du SC²² mais aussi avec la méthode d'extraction employée.

Lipides	%(massique) peaux saines	%(massique) peaux psoriasiques
Lipides polaires	5,6	4,8
Glycolipides	1,4	0,6
Céramides	18,8	24,8
Cholestérol	10,4	16,2
Acides gras libres	23,1	16,3
Triglycérides	33,4*	23,4*
Ester de stérols	5,4	3,9
squalène	1,9	10

Tableau 4-1 : Compositions lipidiques du stratum corneum de peaux saines et psoriasiques. En gras : Compositions majoritaires, *Les auteurs²⁴ estiment que le pourcentage est surestimé. Il est donné ici à titre indicatif, mais n'est pas fiable.

Les classes principales de lipides dans le SC sont les acides gras libres, le cholestérol et les céramides¹⁴¹. En ce qui concerne les triglycérides, il a été montré que leurs taux dans le SC est presque nul¹⁴² alors que la composition du tableau 4-1 attribue des valeurs de 23,4% et 33,4%. Cette surestimation proviendrait d'une incision de la couche sous cutanée²⁴.

1.2. Modèles de stratum corneum

À partir du tableau 4-1, nous avons considéré que seules 3 classes principales de lipides dans le SC sont majoritaires. Alors que les pourcentages en céramides et cholestérol sont comparables, on note une forte baisse en acides gras libres pour les peaux psoriasiques. Nous avons donc construit des modèles avec ces 3 classes majoritaires (tableau 4-2). Ce résultat est confirmé par les études menées par Chapkin¹⁴². En effet, l'auteur montre dans son étude que les acides palmitique et stéarique sont faiblement exprimés dans les peaux psoriasiques comparées aux peaux saines.

Si l'on considère que la masse moléculaire moyenne des céramides est de 700, celle des acides gras libres de 386 et celle du cholestérol de 368¹⁴³ on obtient alors le ratio molaire entre les 3 classes principales de lipides dans le stratum corneum (tableau 4-2).

Lipides	Masse moléculaire (g/mole)	%(wt) peaux saines	Ratio molaire peaux saines	%(wt) peaux psoriatiques	Ratio molaire peaux psoriatiques
Céramides	700	36	1	44	1
Cholestérol	368	21	1,1	28	1,2
Acides gras	386	43	2,2	28	1,15

Tableau 4-2 : Masse moléculaire, pourcentage massique et ratio molaire des classes principales de lipides du stratum corneum

L'étude par RMN du deutérium de modèles de *stratum corneum* a déjà été réalisée. Dans ces modèles, les céramides de la peau sont remplacés par des céramides de cerveau de bovins et les acides gras libres par de l'acide palmitique deutéré¹¹⁵. Les auteurs ont utilisé la RMN du deutérium sur ces modèles membranaires et ont montré qu'entre 20°C et 50°C la membrane se trouve en phase lamellaire cristalline. Elle est caractérisée par un haut degré d'organisation dans laquelle les chaînes hydrocarbonées sont assemblées de manière régulière. En RMN du deutérium, le spectre obtenu présente un éclatement quadripolaire de $\pm 126\text{KHz}$. La proportion de cette phase diminue lorsque la température augmente jusqu'à disparaître entièrement autour de 50°C. Entre 50°C et 70°C la membrane se trouve en phase isotrope. Seul l'acide palmitique deutéré sera visible en RMN du deutérium et nous renseignera sur l'état structural de la membrane lipidique.

Les modèles membranaires que nous avons fabriqués sont donc détaillés dans le tableau 4-3.

Lipides	Masse moléculaire (Da)	Ratio molaire peaux saines	Ratio molaire peaux psoriatiques
Céramides de cerveau de bovins	700	1	1
Cholestérol	368	1,1	1,2
Acide palmitique perdeutééré	288	2,2	1,15

Tableau 4-3 : Composition lipidique des modèles stratum cornéum sain et psoriasique préparés pour notre étude.

1.3. Les promoteurs d'absorption

Ces modèles sont validés en présence d'un promoteur d'absorption connu, l'acide oléique et d'un composé inerte pour le *stratum corneum*, la vaseline (figure 4-1 a). Cette validation est nécessaire afin de s'assurer que les modèles répondent correctement aux composés qui leur sont soumis. Le ratio molaire AO/SC utilisé est de 1/2. La quantité d'acide oléique ajoutée est raisonnable étant donné que dans le cas d'une application topique les agents actifs sont en excès par rapport aux lipides du SC. Dans une étude similaire réalisée par Rowat¹⁴⁴, le ratio AO/SC variait entre 1/5 et 1/3. Pour que la comparaison soit possible, la même quantité de vaseline a été ajoutée aux modèles de SC. L'acide oléique (AO) (figure 4-1 b) est un promoteur d'absorption¹⁴⁵ capable d'augmenter le flux de molécules exogènes à travers le *stratum corneum*. Selon Rowat¹⁴⁴, l'acide oléique est capable d'extraire des fractions lipidiques de SC. Il en résulte une diminution de la phase lipidique cristalline et la création de domaines plus perméables, riches en AO. La vaseline est formée d'un mélange d'alcane allant de C16 à C20 (figure 4-1). Elle n'a qu'un rôle occlusif empêchant la perte d'eau à travers la peau. Elle ne favorise donc pas la pénétration de substances exogènes à travers la peau¹⁴⁶.

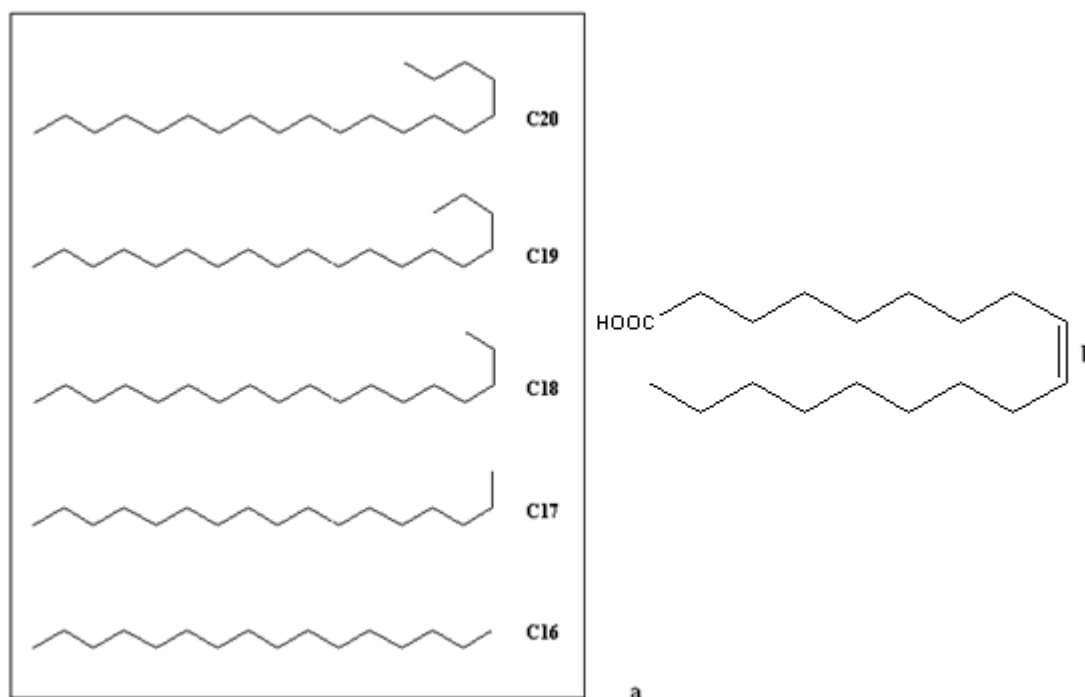


Figure 4-1 : Structure chimique de la vaseline (a) et de l'acide oléique (b)

Les interactions AO – SC et vaseline – SC ont été étudiées en utilisant la résonance magnétique nucléaire du deutérium à l'état solide (^2H NMR). Cette technique permet d'étudier les modifications locales de systèmes membranaires complexes. La ^2H NMR apporte des informations sur les changements conformationnels des constituants membranaires. En incorporant de l'acide palmitique perdeutééré (PA- d_{31}) dans le *stratum corneum* on peut étudier l'acide palmitique indépendamment des autres constituants membranaires. Il apparaît que l'acide oléique engendre une séparation de phase du SC dans laquelle une phase cristalline et une phase isotrope coexistent. La vaseline engendre le même type de modifications, mais à un degré bien moins important.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Matériaux

L'acide oléique (pureté: 98%) et l'acide palmitique (pureté 97%) nous ont gracieusement été fournis par la société interchimie (Paris, France). La Vaseline provient de la société Cooper (Paris, France). Le céramide de type 2 (pureté 98%) provient des laboratoires Christian Dior (Nanterre, France). L'acide palmitique perdeutééré (PA- d_{31}) (pureté 97%) provient de la société Eurisotop (Saint-Aubin, France).

2.2. Préparation des échantillons

Pour la préparation des modèles lipidiques de peau, le PA- d_{31} , le cholestérol et le céramide sont dissous dans le mélange chloroforme/méthanol (7/3). Le solvant est ensuite éliminé par évaporation à l'aide d'un speedvac system AES1010 de chez Savant Ramsey, USA). Les traces résiduelles de solvant sont éliminées par lyophilisation à partir d'une suspension aqueuse. La poudre blanche résultante est resuspendue dans un excès d'eau dédeutérée (63%-71% massique ou 97-98% molaire) Sigma (Saint-Gobain France). Trois cycles chaud-froid (70°C et -196°C) avec agitation à l'aide d'un vortex sont réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon. Par la suite, une série d'échantillons est fabriquée par addition de vaseline ou d'acide oléique à la suspension lipidique. Trois cycles chaud-froid (70°C et -196°C) sont réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon.

Les expériences de RMN ^2H résumés tableau 4-4 ont été réalisées à des températures variant de 25°C à 60°C sur plusieurs échantillons de lipides formant le SC sain et psoriasique.

	Ratio molaire					% (massique) eau	%(molaire) eau
	Cer	Chol	PA- $^2\text{H}_{31}$	Vaseline	Acide oléique		
SC sain	1	1,1	2,2	-	-	71	98
SC sain + vaseline	1	1,1	2,2	2,2	-	67	97
SC sain + Acide oléique	1	1,1	2,2	-	2,2	64	97
SC psoriasique	1	1,2	1,15	-	-	70	98
SC psoriasique + vaseline	1	1,2	1,15	1,7	-	67	97
SC psoriasique + Acide oléique	1	1,2	1,15	-	1,7	63	97

Tableau 4-4 : Composition lipidique des modèles stratum corneum sain et psoriasique, fabriqués et analysés en RMN ^2H

2.3. Analyse par RMN du solide

✓ Spectres

Les spectres de RMN sont réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 300 fonctionnant à la fréquence de 46 MHz pour le deutérium. La séquence echo quadripolaire avec cyclage de phase¹⁴⁷ a été utilisée avec un pulse $\pi/2$ de 4,5 μs . Chaque pulse est séparé d'un délai de 50 μs . Le temps de recyclage était de 1,5 s et l'enregistrement de chaque spectre a nécessité 2000 acquisitions. La température était réglée à $\pm 1^\circ\text{C}$ et stabilisée pendant 30 minutes avant l'acquisition.

✓ Moments et paramètres d'ordre

Malgré la relative complexité des spectres obtenus, une description quantitative de l'état des membranes lipidiques peut-être obtenue en évaluant le moment spectral d'ordre 1 (M_1)^{148, 149}.

M_1 est calculé en utilisant un programme développé au laboratoire, codé en C²⁺ (Buchoux S., non publié) et intégré au logiciel Microcal Origin de Originlab (Northampton, USA) dans lequel les données RMN sont exportées. Dans le cas d'une phase cristal-liquide, le M_1 d'une chaîne perdeutérée est relié à la mesure globale du paramètre d'ordre orientationnel le long de la chaîne, $\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ par¹⁰⁰:

$$M_1 = \frac{\pi}{\sqrt{3}} \frac{e^2 q Q}{h} \langle S_{CD} \rangle_{chaîne} \quad (IV-1)$$

avec $e^2 q Q / h = 167$ kHz qui est le couplage quadripolaire du deutérium dans la liaison C-²H. On peut ainsi, grâce à la mesure du M_1 remonter au paramètre d'ordre global $\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$ et dire si un système est rigide (S proche de 1) ou fluide (S proche de 0).

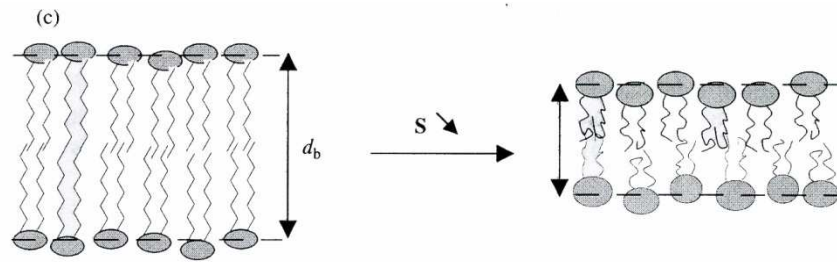


Figure 4-2 : Paramètre d'ordre global et organisation de la membrane pour S proche de 1 (à gauche) et S proche de 0 (à droite)¹⁰⁰

✓ Spectres diphasiques : phase lamellaire et isotrope

Dans certains cas, le spectre est composé d'une raie fine isotrope et d'un spectre de poudre anisotrope. Le pourcentage d'isotropie peut-être déterminé en utilisant deux méthodes différentes, la méthode par simulation de raie isotrope et la méthode de Fenske et al.¹¹⁵. Ces deux méthodes donnent des résultats équivalents, cependant la méthode par simulation de raie isotrope a été privilégiée par rapport à la méthode de Fenske et al. En effet, cette dernière méthode a tendance à surestimer le pourcentage de raie isotrope.

La méthode de Fenske et al. est basée sur le fait que la FID se compose de deux courbes décroissantes, une courbe d'écho à décroissance rapide suivi d'une courbe à décroissance lente. Afin de déterminer le pourcentage d'isotropie, une extrapolation linéaire manuelle de la courbe à décroissance lente est réalisée jusqu'au temps correspondant au sommet de l'écho.

L'intensité de la courbe d'extrapolation, au niveau du pic de l'écho, est proportionnelle à la phase isotrope.

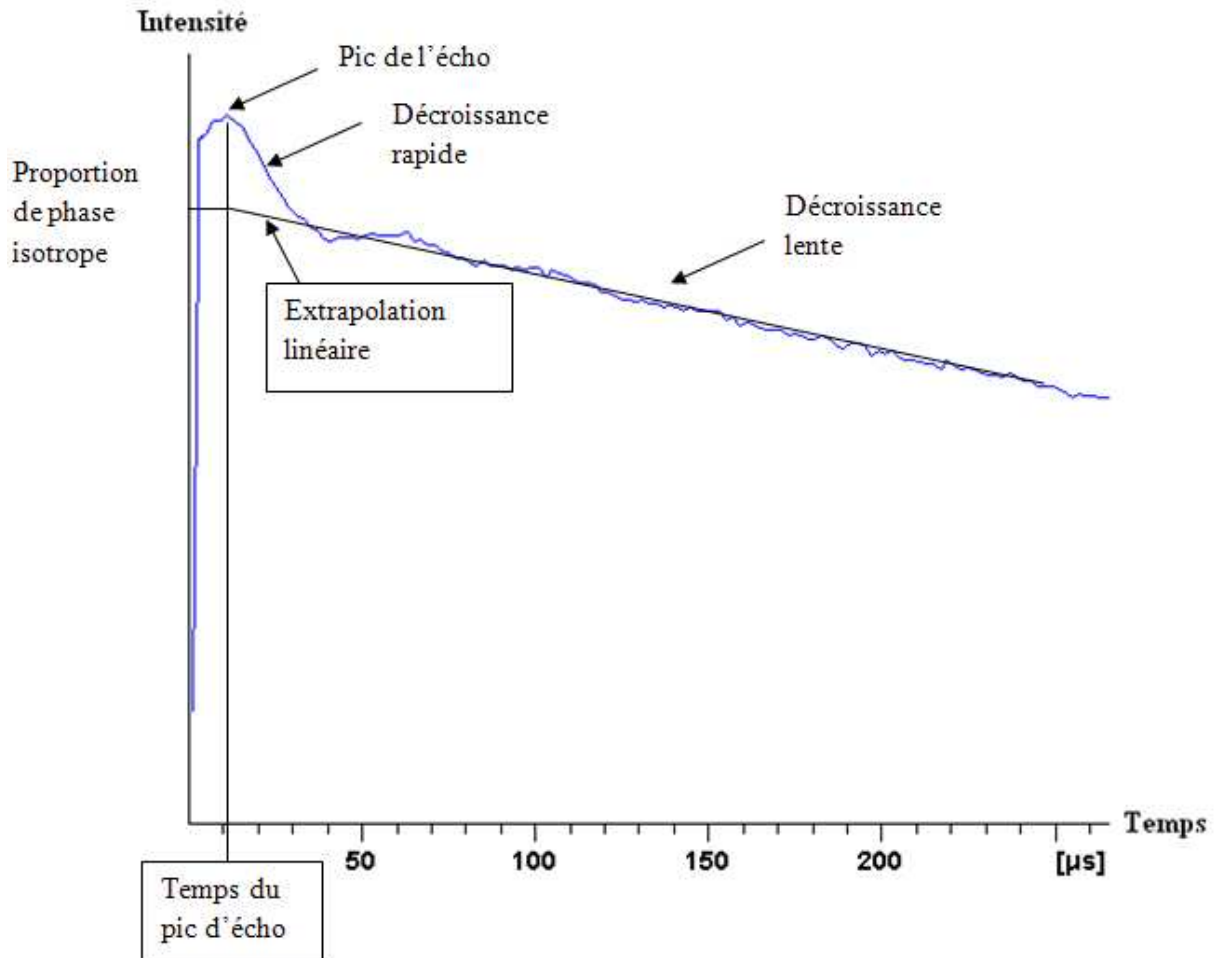


Figure 4-3 : Méthode de Fenske et al. ¹¹⁵ pour la détermination du pourcentage d'isotropie à partir de la FID.

Le principe de la méthode de simulation de raie isotrope est basé, comme son nom l'indique sur la fabrication artificielle d'une raie isotrope en utilisant l'outil NMRsim du logiciel Topspin. Cette raie isotrope est par la suite soustraite au spectre RMN ^2H d'intérêt (figure 4-4).

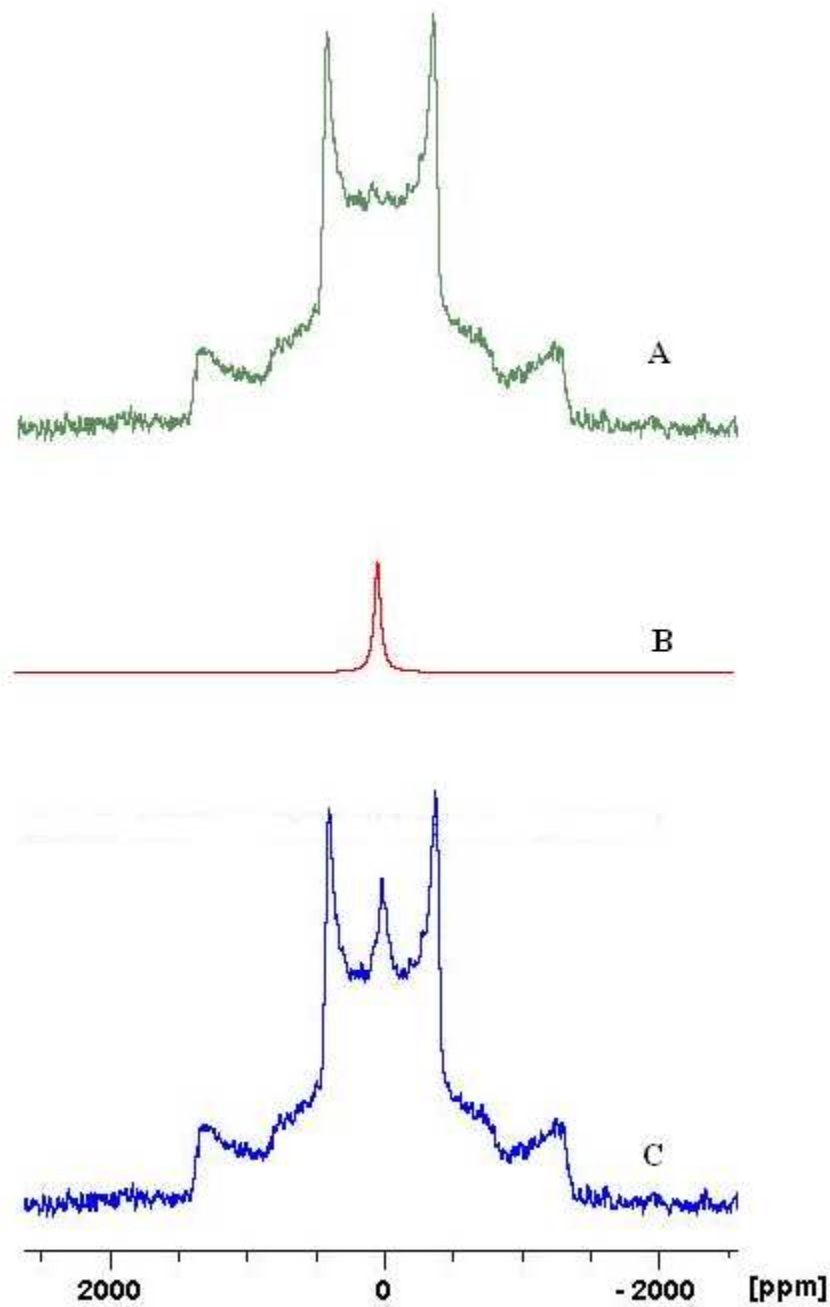


Figure 4-4 : Méthode de simulation de la raie isotrope pour la détermination du pourcentage d'isotropie. Le pic isotrope simulé (B) de paramètre LB égal à 500Hz est soustrait à un spectre total (C) pour donner le spectre de différence (A)

L'intégration du spectre total et l'intégration du spectre dont la raie isotrope a été soustraite permet de calculer le pourcentage de raie isotrope. La difficulté de la technique réside dans la fabrication d'une raie isotrope dont la largeur couvre parfaitement la raie isotrope à soustraire.

Cette opération est réalisée en faisant varier les valeurs de la largeur à mi-hauteur (LB) du pic isotrope dans le logiciel topspin.

3. Résultats

✓ RMN ^2H de modèles de peau saine et psoriasique

La figure 4-5 montre les spectres RMN ^2H du modèle peau saine (gauche) : Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et du modèle peau psoriasique (droite) Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) à trois températures caractéristiques (30°C, 45°C, and 55°C) parmi les températures étudiées (25°C-60°C). Les conditions d'acquisition sont maintenues identiques pour toutes les expériences. Pour le modèle peau saine, à 30°C les chaînes de l'acide palmitique sont rigides. En effet, le doublet de Pake à $\pm 63\text{kHz}$ représentant le signal des CD_2 est caractéristique d'un système rigide. Le doublet ayant un éclatement quadripolaire de $\pm 36\text{kHz}$ est caractéristique de la rotation autour de l'axe C3 des groupes méthyl en phase cristalline. Le spectre observé à 45°C est composé d'une phase lamellaire fluide caractérisé par un éclatement quadripolaire des CD_2 de $\pm 26\text{ KHz}$, un éclatement quadripolaire des CD_3 de $\pm 3,5\text{ KHz}$ et d'une phase isotrope. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par ceux de Fenske et al.¹⁵⁰. Selon les auteurs la phase isotrope est probablement une phase cubique. À 55°C tout l'acide palmitique présent dans le modèle peau saine est sous forme isotrope. Pour le modèle peau psoriasique on observe, comme pour le modèle peau saine une phase cristalline à 30°C. Cependant, à 45°C on a l'apparition d'une phase lamellaire fluide, mais il n'apparaît pas comme dans le cas du modèle peau saine, une phase isotrope. A 55°C il y a coexistence d'une phase lamellaire fluide et d'une phase isotrope comme dans le cas de la peau saine mais à une température de 45°C pour cette dernière.

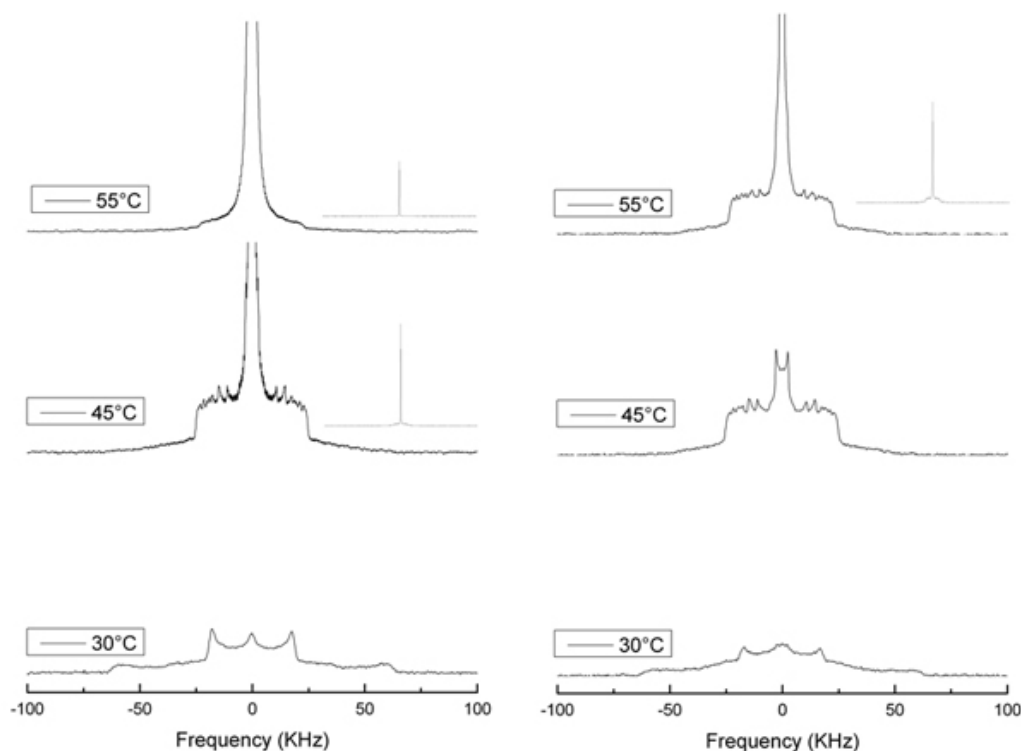


Figure 4-5 : Spectre RMN ^2H du modèle peau saine (gauche) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et du modèle peau psoriasique (droite) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) à 30°C, 45°C et 55°C. Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. En insert, spectres pleine échelle montrant l'importance de la phase isotrope.

Une forte décroissance du M_1 (figure 4-6) est observée pour le modèle peau saine entre 40°C et 50°C. Cette décroissance est due à l'apparition d'un pic isotrope et de la phase lamellaire fluide. La transition de phase entre solide et phase isotrope est observée à 42°C. A l'opposé, une décroissance lente du M_1 est observée pour le modèle peau psoriasique. Deux transitions sont observées. La première a lieu vers 40°C et est caractéristique de la transition entre phase solide et phase lamellaire liquide. La seconde a lieu à 55°C et se traduit par la transition de la phase lamellaire liquide vers la phase isotrope.

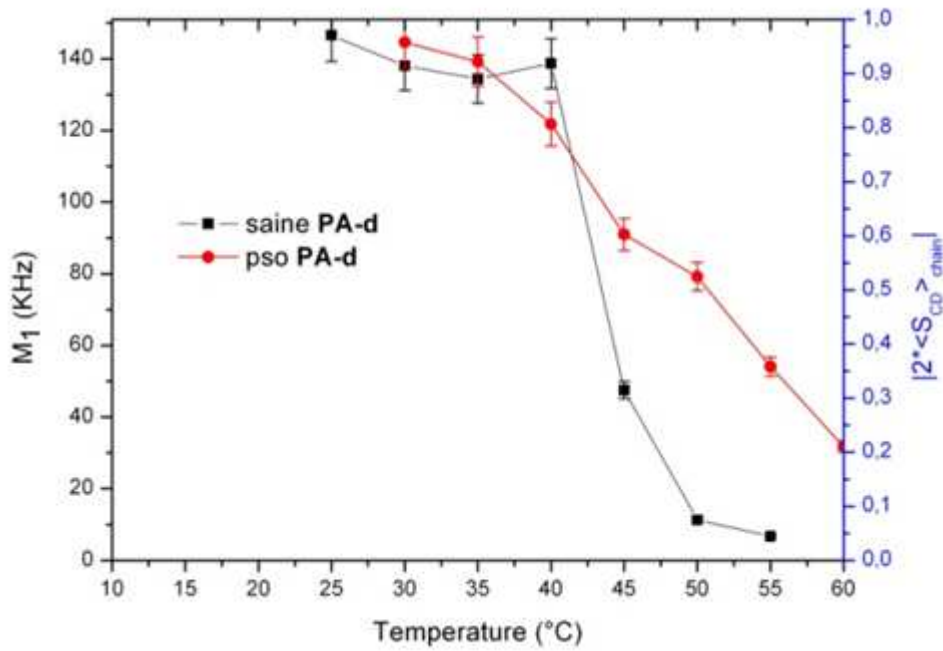


Figure 4-6 : Évolution du M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine : Cer/Chol/PA- $^2H_{31}$ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique : Cer/Chol/PA- $^2H_{31}$ (1/1.2/1.15)

Au-delà de 40°C le pourcentage d'isotropie augmente considérablement dans le cas de la peau saine (figure 4-7). Dès 50°C la phase isotrope est de 80%. Dans le cas de la peau psoriasique, le pourcentage d'isotropie est quasiment nul jusqu'à 45°C. Au-delà de cette température il augmente pour atteindre 58% à 60°C. Il est important de noter que dans le cas de la peau psoriasique le pourcentage de phase isotrope à 55°C n'est que de 35% comparé à la peau saine où il est de 80%. Ces résultats viennent compléter et confirmer les résultats précédents sur l'évolution du M_1 .

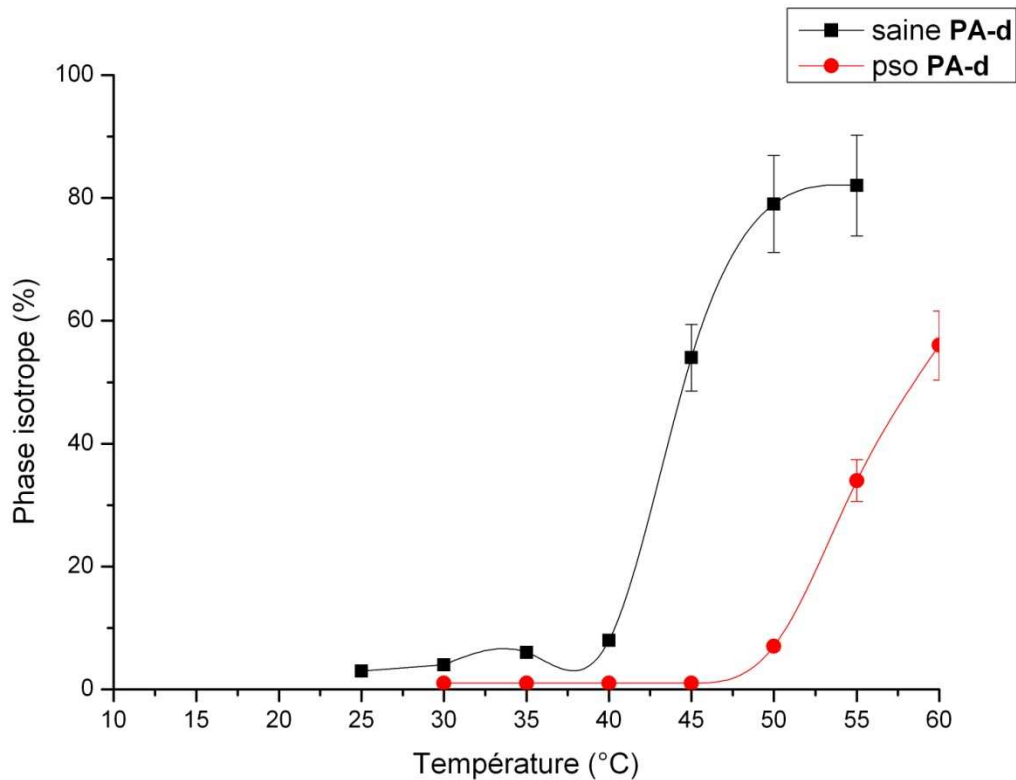


Figure 4-7 : Pourcentage d'isotropie en fonction de la température déterminé pour le modèle peau saine : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15)

✓ RMN ^2H de modèles de peau saine et psoriasique en présence de vaseline

La figure 4-8 représente le spectre RMN ^2H suite à l'ajout de la vaseline à $R_i = 0,5$ sur modèle de peau saine (gauche) : Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et modèle de peau psoriasique : Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) (droite) à 3 températures caractéristiques (30°C, 40°C et 50°C). Pour les modèles de peau saine et psoriasique une petite partie de l'acide palmitique se retrouve sous forme isotrope dès 30°C. Néanmoins la majorité du spectre enregistré est caractéristique d'un état solide. A 40°C et 50°C les spectres de peau saine et psoriasique présentent une faible teneur en phase cristalline et fluide. La majorité de la phase se trouve sous forme isotrope.

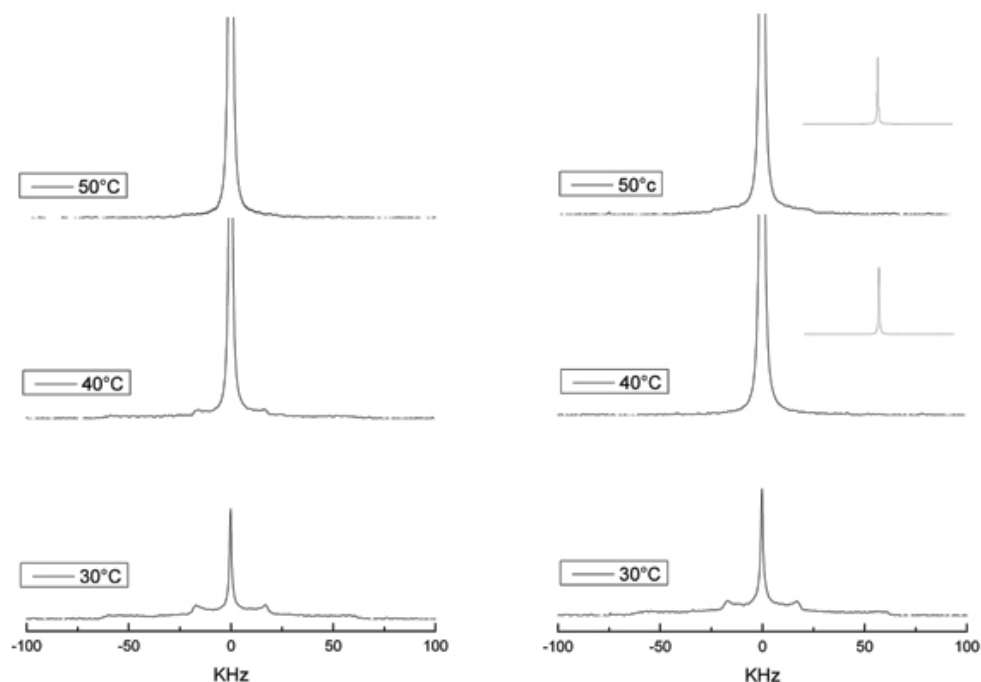


Figure 4-8 : Spectre RMN ^2H du modèle peau saine (gauche) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et du modèle peau psoriasique (droite) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) à 30°C, 40°C et 50°C après ajout de vaseline à $R_i = 0,5$. Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. En insert, spectres pleine échelle montrant l'importance de la phase isotrope.

Les figures 4-9A et 4-9B représentent respectivement le M_1 des modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence de vaseline. Jusqu'à une température de 30°C, la présence de vaseline sur les modèles de peau saine et psoriasique n'engendre que très peu de modifications. La majorité de l'acide palmitique est sous forme cristalline comme dans le cas des peaux saines et psoriasiques dénuées de vaseline. Au-delà de 30°C, on observe une baisse du M_1 dans les deux types de peau en présence de vaseline. Cette baisse est due à un changement de phase de l'acide palmitique qui passe subitement de la phase lamellaire cristalline à une phase lamellaire fluide et une phase isotrope.

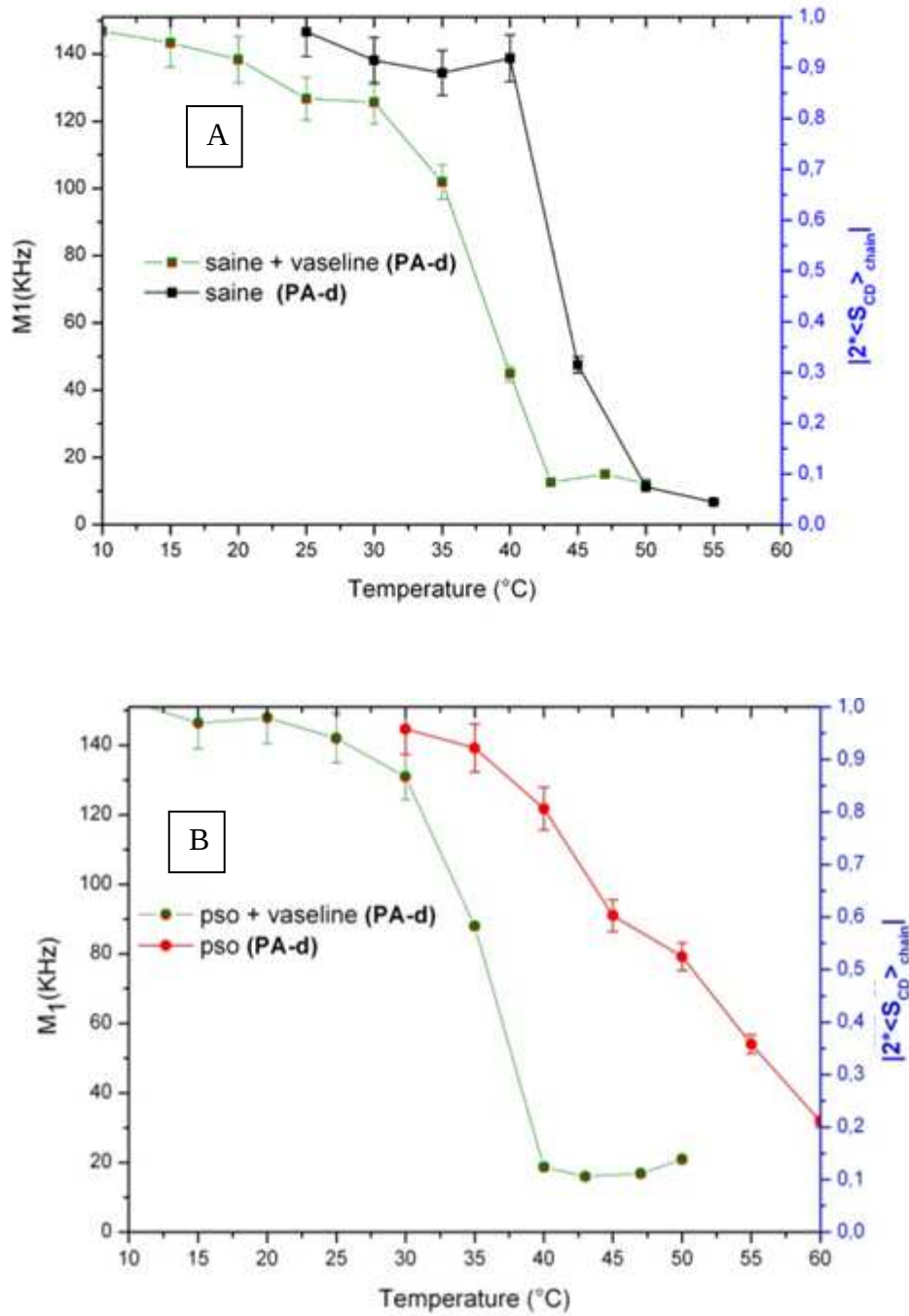


Figure 4-9 : Évolution du M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine (A) : Cer/Chol/PA- $^2H_{31}$ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique (B) : Cer/Chol/PA- $^2H_{31}$ (1/1.2/1.15) en présence et en l'absence de vaseline

La courbe du pourcentage d'isotropie dans le cas de la peau saine en présence de vaseline (figure 4-10 A) est quasiment identique à celle de la peau saine seule. On observe toutefois la présence de phase isotrope à hauteur de 5% à 20% pour des températures en

dessous de 40°C dans le cas de la peau saine en présence de vaseline, alors que la quantité de phase isotrope est au maximum de 5% dans le cas de la peau saine pour le même intervalle de température. Au-delà de 40°C on observe pour les deux conditions une augmentation subite du pourcentage d'isotropie. Dans le cas de la peau psoriasique, l'ajout de vaseline entraîne dès les plus faibles températures une augmentation du pourcentage d'isotropie qui se poursuit lentement jusqu'à une température de 35°C où on atteint une quantité de phase isotrope de l'ordre de 40% (figure 4-10 B). Au-delà de 35°C la phase isotrope augmente subitement pour atteindre une valeur proche de 100% à 45°C. Le pourcentage d'isotropie se maintient à cette valeur pour les températures supérieures. Dans le cas de la peau psoriasique, le pourcentage d'isotropie se maintient proche de 0 jusqu'à la température de 45°C.

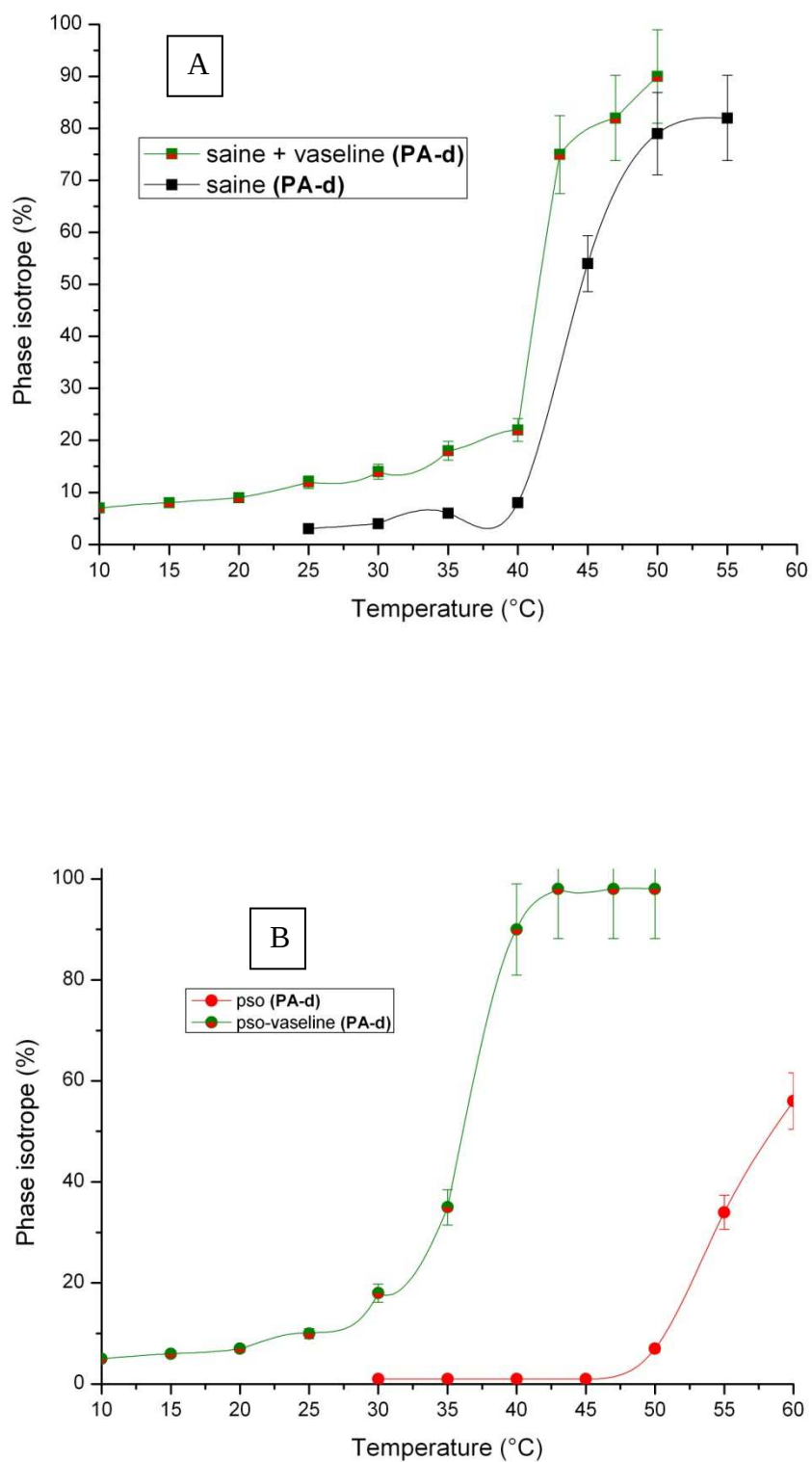


Figure 4-10 : Pourcentage d'isotropie en fonction de la température déterminé pour le modèle peau saine (A) : Cer/Chol/PA-²H₃₁ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique (B) : Cer/Chol/PA-²H₃₁ (1/1.2/1.15) en présence et en l'absence de vaseline

✓ RMN ^2H de modèles de peau saine et psoriasique en présence d'acide oléique

La figure 4-11 représente le spectre RMN ^2H suite à l'ajout d'acide oléique à $R_i = 0,5$ sur modèle de peau saine (gauche) : Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}(1/1.1/2.2)$ et modèle de peau psoriasique : Cer/Chol/ PA- $^2\text{H}_{31}(1/1.2/1.15)$ (droite) à 3 températures caractéristiques (30°C, 40°C et 50°C). Pour la peau saine un important pic isotrope apparaît des 30°C. Une partie de l'acide palmitique est cependant maintenu sous forme cristalline. Dans le cas de la peau psoriasique, la présence d'acide palmitique sous forme cristalline est quasi inexistante, la quasi-totalité de l'acide palmitique est sous forme isotrope. Dès 40°C et au-delà pratiquement 100% de l'acide oléique est sous forme isotrope pour les deux types de peau.

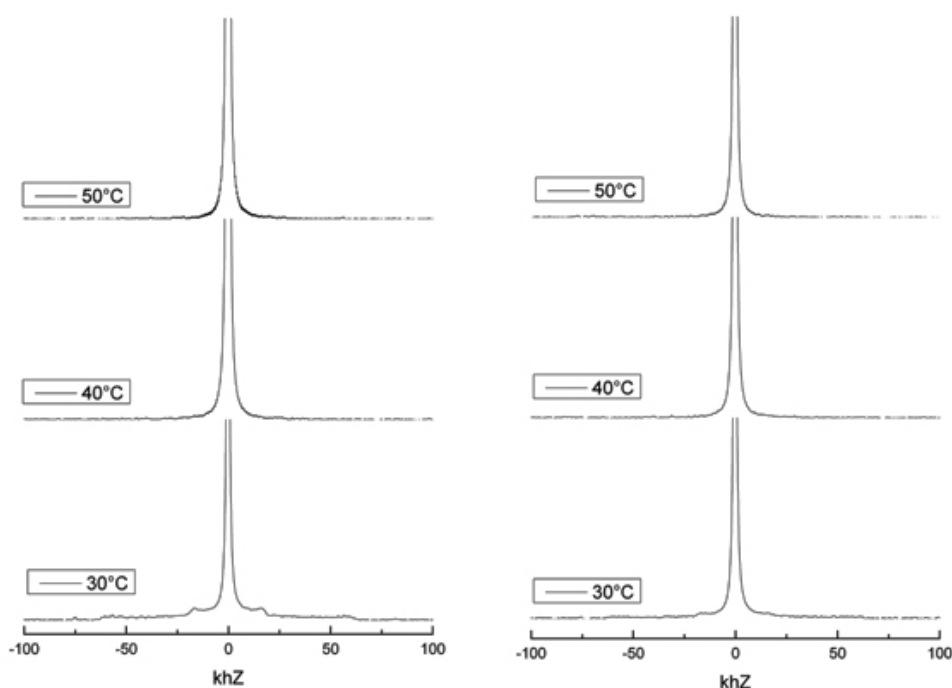


Figure 4-11 : Spectre RMN ^2H du modèle peau saine (gauche) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et du modèle peau psoriasique (droite) : Cer/Chol/Pa- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) après ajout de l'acide oléique à $R_i=0,5$ à 30°C, 45°C et 55°C. Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. En insert, spectres pleine échelle montrant l'importance de la phase isotrope.

Les figures 4-12 (A) et 4-12 (B) représentent respectivement le M_1 des modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence d'acide oléique. On remarque que l'effet de l'acide oléique sur les membranes commence à se faire sentir dès 15°C par une baisse du M_1 . Dans le cas de la peau saine en présence d'acide oléique, dès 25°C, le paramètre d'ordre est proche de 0,5 alors qu'il est proche de 1 dans le cas de la peau saine. Ainsi, dans le cas de la peau saine l'effet déstructurant de l'acide oléique est moindre comparé aux effets produits sur la peau psoriasique mais reste néanmoins important.

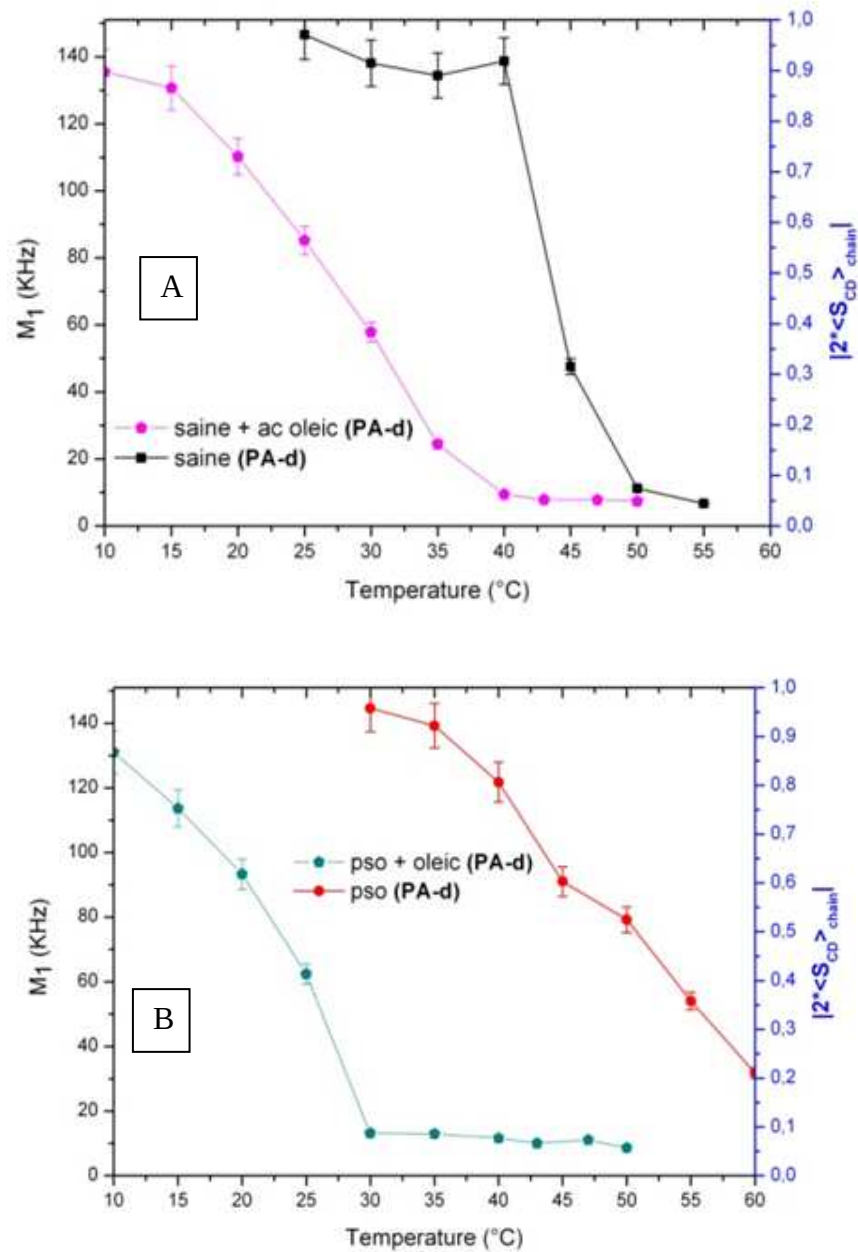


Figure 4-12 : Évolution du M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine (A) : Cer/Chol/PA- 2 H $_{31}$ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique (B) : Cer/Chol/PA- 2 H $_{31}$ (1/1.2/1.15) en présence et en l'absence d'acide oléique

La courbe du pourcentage d'isotropie dans le cas de la peau saine en présence d'acide oléique (figure 4-13 A) est décalée vers la gauche par rapport à celle de la peau saine. Ainsi à 40°C quasiment 85% de l'acide palmitique se trouve sous forme isotrope alors que le pourcentage d'isotropie n'est que de 5% dans le cas de la peau saine en l'absence d'acide oléique. L'allure de la courbe dans le cas de la peau psoriasique en présence d'acide oléique (figure 4-13 B) est la même que dans le cas de la peau saine en présence d'acide oléique. Cependant, le pourcentage d'isotropie à une température donnée est inférieur dans le cas de la peau psoriasique en présence d'acide oléique que dans le cas de la peau saine en présence d'acide oléique. Ainsi, à 30°C on observe près de 80% de phase isotrope dans le cas de la peau psoriasique en présence d'acide oléique alors qu'elle est de 65% dans le cas de la peau saine en présence d'acide oléique.

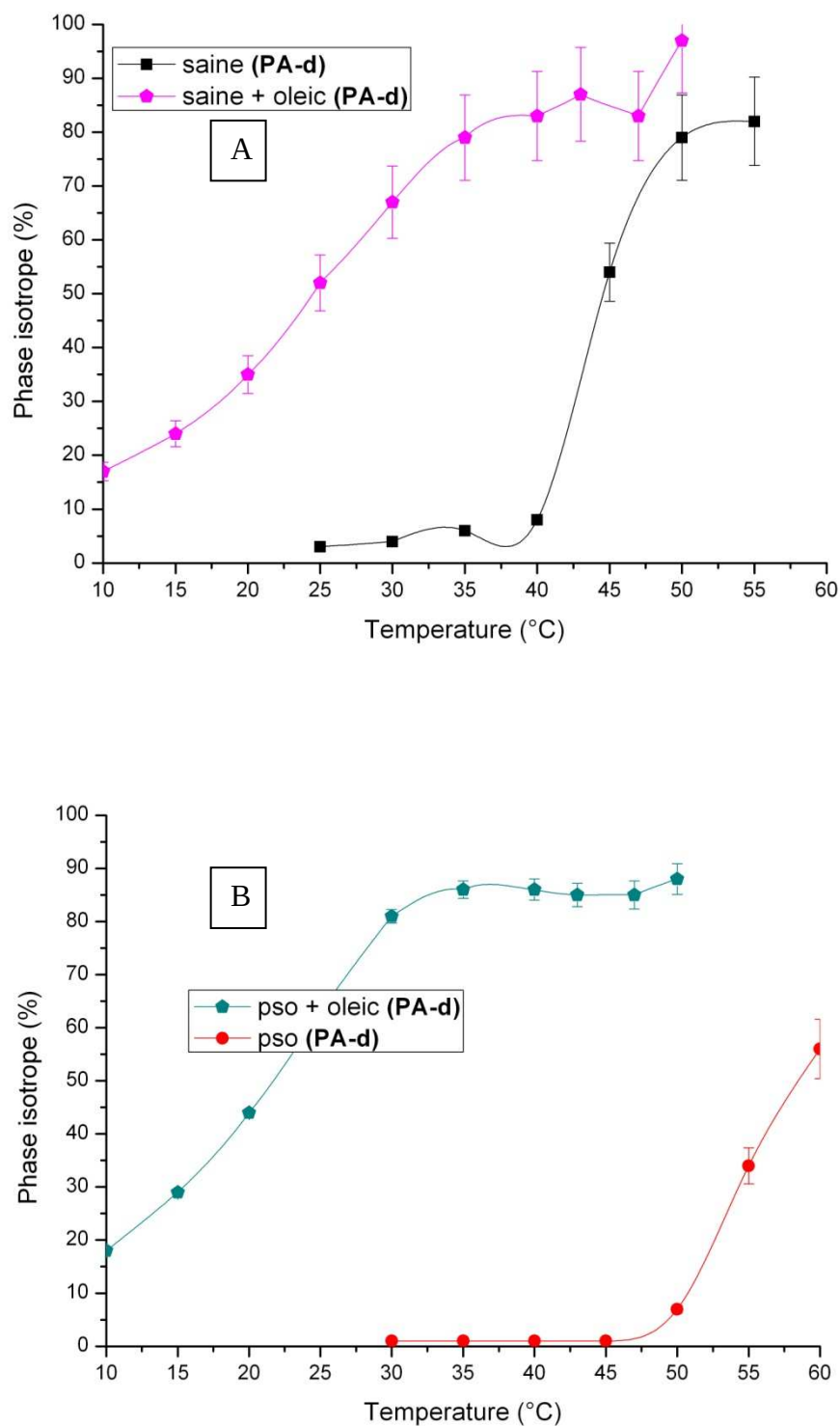


Figure 4-13 : Pourcentage d'isotropie en fonction de la température déterminé pour le modèle peau saine (A) : Cer/Chol/PA-²H₃₁ (1/1.1/2.2) et le modèle peau psoriasique (B) : Cer/Chol/PA-²H₃₁ (1/1.2/1.15) en présence et en l'absence d'acide oléique

4. Discussion

Trois principaux résultats ressortent de notre étude :

- i) Les lipides du modèle peau psoriasique forment une organisation plus rigide que ceux du modèle peau saine
- ii) La Vaseline entraîne peu de modifications membranaires en dessous de 30°C
- iii) L'acide oléique entraîne des modifications membranaires importantes dès 10°C.

Les lipides du modèle peau psoriasique forment une organisation plus rigide que ceux du modèle peau saine

Une phase lamellaire cristalline Lc (figure 4-14) est observée pour les modèles peau saine et psoriasique entre 30°C et 42°C. Cette phase lamellaire cristalline est caractérisée par un haut degré d'organisation dans laquelle les chaînes hydrocarbonées sont assemblées de manière régulière. Cette phase est très peu hydratée. Les chaînes ne sont pas orientées perpendiculairement à la bicouche et sont inclinées par rapport à la normale à la bicouche. Cette phase est caractérisée par une très faible mobilité des lipides ce qui confère un comportement très statique à la membrane¹⁵¹.

Il est intéressant de noter que cette phase cristalline existe *in vivo*¹⁵². Elle est certainement à l'origine de la diffusion limitée de molécules à travers la peau et est donc responsable de la fonction barrière du SC. Une explication similaire a récemment été faite par J.L. Thewalt¹⁵⁰. Au-delà de 42°C, les modèles lipidiques évoluent différemment. Les modèles peau saine et psoriasique passent par une phase lamellaire fluide vers 42°C. Cette phase est caractérisée par des défauts dans l'alignement des chaînes lipidiques. On parle de phase La ou encore de phase « fluide », caractérisée par une mobilité accrue des lipides. La quantité de phase isotrope pour le modèle peau saine commence à augmenter à partir de 40°C (figure 4-7) alors que dans le cas de la peau psoriasique la phase isotrope n'apparaît qu'à une température de 50°C. La déstructuration du modèle peau psoriasique demande donc d'apporter plus de chaleur et donc plus d'énergie que dans le cas du modèle peau saine. Les lipides du modèle peau psoriasique forment donc une organisation plus rigide que ceux du modèle peau saine. Cette observation peut être reliée à ce qui est observé *in vivo*. En effet, les plaques de psoriasis sont des structures sèches et épaisses formées d'un empilement important de cornéocytes.

Il est important de noter qu'une phase isotrope apparaît dès 25°C pour le modèle peau saine et dès 50°C pour le modèle de peau psoriasique. Les lipides peuvent alors se trouver sous forme micellaire, en phase cubique ou en phase éponge. Cette phase isotrope serait caractéristique d'une phase cubique. En effet, la phase cubique a été décrite dans de nombreuses membranes biologiques¹⁵³. Cette supposition a également été évoquée par Fenske et al.¹¹⁵ pour l'apparition de phases isotropes à haute température sur des modèles de stratum corneum.

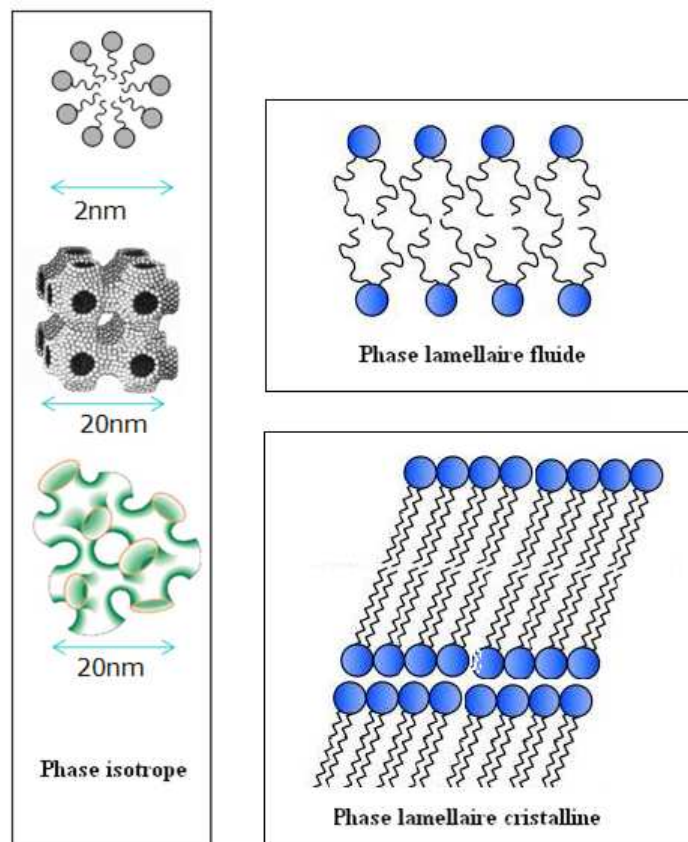


Figure 4-14 : Organisation des lipides en phase lamellaire cristalline, lamellaire fluide et isotrope.

La Vaseline entraine peu de modifications membranaires en dessous de 30°C

Il n'y a pratiquement pas de modifications de l'organisation du SC par la vaseline à une température en dessous de 30°C. Cependant au-delà de cette température la proportion de phase isotrope n'est plus négligeable. La vaseline semble avoir un effet destructurant, mais au-dessus de 30°C, surtout pour la peau psoriasique. L'hypothèse qui peut être faite est la

suivante : la vaseline est un hydrocarbure et est donc capable d'interagir à une certaine température avec des molécules lipophiles telles que l'acide palmitique et provoquer ainsi une perturbation de l'organisation du SC. On peut supposer qu'en appliquant de la vaseline sur la peau aucun effet indésirable ne sera observé. Par contre pour des températures supérieures à 30°C comme par exemple une exposition au soleil, un effet déstructurant sur les lipides intercellulaires du SC pourrait être observé. Cet effet déstructurant sera certainement plus important dans le cas de peau psoriasique comme le prouve nos résultats. En effet, une importante proportion de phase isotrope est observée dès 30°C.

L'acide oléique entraine des modifications membranaires importantes dès 10°C

L'ajout d'acide oléique aux modèles lipidiques peau saine et psoriasique fait apparaître une phase isotrope qui coexiste avec une phase cristalline dès 10°C. L'organisation structurale du pic isotrope n'est pas connue. Il peut s'agir de micelles d'acide palmitique contenant de l'acide oléique et distinct de la phase lamellaire ou d'une structure contenue dans la phase lamellaire comme une phase cubique ou éponge. Cette hétérogénéité de la membrane dans laquelle coexiste des zones « rigides » et « fluides » permettrait certainement d'augmenter le passage de molécules à travers le SC. Nous avons montré que la structure cristalline et imperméable du SC pouvait être en équilibre avec d'autres phases plus fluides modifiant la perméabilité du SC grâce à l'ajout de promoteurs d'absorption cutanés tel que l'acide oléique. Il est connu que la présence d'acide gras insaturés dans le SC tel que l'acide oléique sont capables de destabiliser l'organisation en structure lamellaire des lipides du SC.

5. Conclusion

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux constructions de modèles de peau saine et psoriasique et à leurs perturbations en présence de vaseline et d'acide oléique. Les résultats obtenus confirment la validité de ces modèles. En effet, la peau psoriasique est plus rigide que la peau saine. D'autre part, la vaseline entraine peu de modifications membranaires à 30°C. Au-delà de 30°C, on observe l'apparition d'un pic isotrope prouvent qu'il y a une désorganisation du système lipidique. Les résultats confirment également que l'acide oléique engendre des modifications membranaires importantes à savoir, l'apparition d'un pic isotrope dès 10°C, qui coexiste avec la phase lamellaire cristalline et qui génère donc

des défauts dans l'agencement quasi cristallin du SC à température ambiante. Cette hétérogénéité expliquerait pourquoi l'acide oléique est un promoteur d'absorption cutanée efficace. Nous allons à présent tester l'efficacité d'absorption cutanée d'un lipoamino acide, la cocoyl valine. Ce lipoamino acide sera associé à de la cyclosporine pour accroître le passage de cette molécule à travers le *stratum corneum* et ainsi traiter les patients atteints de psoriasis.

Chapitre 5

Étude par RMN ^2H du système colloïdal
lipoamino acide – cyclosporine A sur des
modèles lipidiques de *stratum corneum* sain et
psoriasique

CHAPITRE 5

ÉTUDE PAR RMN ^2H DU SYSTEME COLLOÏDAL LIPOAMINO ACIDE – CYCLOSPORINE A SUR DES MODELES LIPIDIQUES DE *STRATUM CORNEUM* SAIN ET PSORIASIQUE

1. Introduction

1.1. La cyclosporine A

La structure de la cyclosporine A (CsA) a déjà été décrite dans le chapitre 2. La cyclosporine que nous avons déjà évoquée, induit une inhibition sélective des fonctions lymphocytaires T, empêchant leur expansion clonale. Elle agit en bloquant la production d'interleukine 2 par la cellule T auxiliaire : elle bloque l'activation du gène de l'interleukine 2 (IL2), de telle façon que la production d'ARN-messager de l'IL2 est supprimée. En l'absence d'IL2, les lymphocytes T cytolytiques ne prolifèrent pas. Ils ne sécrètent donc plus de cytokines et la prolifération anarchique des kératinocytes, responsable de l'apparition du psoriasis est stoppée.

À l'heure actuelle, la cyclosporine est administrée par voie orale, sa toxicité sur l'organisme par ce mode d'administration est donc maximale^{154, 155}. Afin de bénéficier des bienfaits de la molécule sur le psoriasis tout en diminuant sa toxicité de nombreuses études effectuées par différentes équipes de recherche ont été menées afin de développer des formes pharmaceutiques permettant l'administration de la cyclosporine par voie topique, directement sur les lésions. À l'heure actuelle, aucune formule développée n'a donné de résultats concluants.

1.2. Travaux antérieurs sur l'administration de CsA par voie topique

L'administration topique de CsA est une stratégie prometteuse pour traiter les maladies cutanées, étant donné que les effets secondaires associés aux traitements par voie systémique sont grandement diminués^{155, 156}. Cependant, cette stratégie s'est révélée inefficace dans la plupart des cas^{157, 158}, et son inefficacité est due à une mauvaise pénétration du principe actif dans la peau¹⁵⁵. La pénétration de la CsA à travers la peau est très mauvaise du fait de sa grande lipophilicité et de son poids moléculaire élevé^{159, 160}. Le rôle principal de la peau est de protéger l'organisme des agents pathogènes et de la perte d'eau. La principale

barrière de protection réside dans la partie la plus externe de la peau : le *stratum corneum* (SC). Les lipides intercellulaires présentent un degré d'organisation élevé et forment des lamelles orientées de manière parallèle à la surface des cornéocytes¹⁶¹.

Afin d'augmenter la pénétration de la CsA à travers la peau il est nécessaire d'utiliser des techniques qui sont capables de réduire la résistance diffusionnelle du SC. De nombreuses méthodes physiques et chimiques telles que l'iontophorèse ou des formulations contenant du n-decylmethyl sulfoxide, du cholate de sodium ou même des liposomes, ont été utilisées afin d'augmenter la pénétration de la CsA à travers le SC^{29, 141, 155, 156, 160} mais la majorité des formulations testées se sont révélées non concluantes.

Au cours de cette étude, nous avons testé des formulations contenant un LAA afin d'accroître le passage de la CsA à travers la peau. L'association entre un LAA et un principe actif peut faciliter la pénétration à travers les membranes biologiques¹²². À notre connaissance, il n'existe aucune donnée dans la littérature faisant référence à l'utilisation de LAA pour améliorer le passage à travers le SC de la CsA. Le LAA utilisé pour cette étude est la cocoyl valine (CV) qui est un mélange de lauroyl valine et de myristoyl valine dans les proportions molaires 3,3 :1. Nous discuterons plus loin du choix de ce LAA. La CV est constituée par l'association covalente entre un acide laurique et une valine pour la lauroyl valine et par l'association entre l'acide myristique et la valine pour la myristoyl valine.

Pour quelles raisons la CsA n'est pas capable de traverser le SC ? La CV est-elle capable de modifier la structure cristalline des lipides du SC et permettre à la CsA de traverser le SC ?

Pour répondre à ces questions, nous avons évalué l'interaction de la CV avec ou sans CsA sur des modèles lipidiques de SC sain et psoriasique. Les compositions de ces 2 types de modèles lipidiques sont résumées dans le tableau 4-4. Pour cette étude nous avons utilisé la RMN ^2H , une méthode non invasive qui permet de connaître l'état d'organisation de lipides (phases lamellaire, hexagonale, cylindrique, cubique, etc.). Lors de cette étude, nous avons utilisé de la lauroyl valine marquée au deutérium sur sa chaîne grasse $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}$ pour fabriquer des systèmes colloïdaux CV-CsA. De l'acide palmitique deutéré a également été utilisé pour la fabrication des modèles lipidiques de SC sain et psoriasique.

Afin d'évaluer les effets sur les modèles de SC de la CV et du complexe colloïdal CV-CsA nous avons choisi de les ajouter sans modifier le pH final tel qu'on le ferait *in vivo*.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Matériaux

La CV (pureté: 96%) nous a gracieusement été fournie par la société Seppic (Paris, France). Le cholestérol (pureté: 98%) provient de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Le céramide de type 2 (pureté 98%) provient des laboratoires Christian Dior (Nanterre, France). L'acide palmitique perdeutééré (PA- d_{31}) (pureté 97%) provient de la société Eurisotop (Saint-Aubin, France). La lauroyl valine perdeutérée ($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}$) a été fabriquée par une méthode modifiée de Y.Lapido et al. (1967)⁸² et qui est décrite au chapitre 2. La cyclosporine A (pureté 98%) provient de chez Poli Industria Chimica (Milan, Italie), l'urée, la soude 40% et la glycérine proviennent de chez Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Méthodes

2.2.1. Réalisation d'une formulation aqueuse de CsA en présence de CV

a. Description de la formule

Afin de réaliser une formulation topique à base de cyclosporine A qui présente le moins d'effets secondaires possible au niveau cutané, il est nécessaire que cette formulation contienne le moins de solvant organique possible. Nous avons donc décidé de réaliser une formulation aqueuse de CsA. La principale difficulté est que la solubilité de la CsA dans l'eau est extrêmement faible (30 $\mu\text{g/ml}$). L'ajout de 30mg de CsA à 1ml d'eau forme une suspension de CsA inhomogène (figure 5-1) qui n'aurait aucun effet thérapeutique si elle est appliquée sous cette forme sur la peau.



Figure 5-1 : Répartition inhomogène de 30mg de CsA dans 1ml d'eau. En l'absence de solubilisant, la CsA a une très faible solubilité dans l'eau ($30\mu\text{g/ml}$)

Les lipoamino acides ont des propriétés solubilisantes sur certaines molécules. Des tests de solubilité de la CsA en présence de LAA ont été entrepris. Les résultats sont résumés dans le tableau 5-1.

LAA (Sels de sodium)	Solubilisation CsA	Ratio molaire CsA/LAA
C8V	Non	-
C ₁₂ V	oui	$\leq 1/20$
C ₁₂ P	Non	-
C ₁₄ V	oui	$\leq 1/18$
CV (C ₁₂ V + C ₁₄ V)	oui	$\leq 1/19$
C ₁₆ V	Oui à 50°C Non à 25°C	-
C ₁₈ V	Oui à 50°C Non à 25°C	-

Tableau 5-1 : Résultats des tests de solubilisation de la CsA par différents LAA à 25°C et 50°C.

Seules la C₁₂V, la C₁₄V et la CV permettent une solubilisation de la CsA à température ambiante. Pour des raisons de commercialisation future, nous avons décidé d'utiliser la CV pour développer la formulation aqueuse de CsA. En effet, la production de CV est maîtrisée par la société SEPPIC et est déjà commercialisée dans certains produits cosmétiques. Suite à

de nombreux essais, nous avons réussi à solubiliser 30mg de CsA dans 1ml d'eau (soit 3% massique) en présence de CV (figure 5-2).



Figure 5-2 : Solubilisation de la CsA dans l'eau à température ambiante grâce à la formation d'un complexe colloïdal CV/CsA. La solubilisation de la CsA dans l'eau à température ambiante a été augmentée d'un facteur 1000. Elle est passée de 30 $\mu\text{g/ml}$ à 30mg/ml (3% massique) en présence de CV.

Le pourcentage massique des composants de la formulation permettant de solubiliser 3% de CsA dans l'eau est détaillé dans le tableau 5-2.

Composants	Pourcentage massique (%)	Pourcentage molaire (%)
CsA	3,00	0,05
CV	15,00	1,05
NaOH	1,70	0,92
Eau	80,30	97,98

Tableau 5-2 : Pourcentage massique et molaire et nature des composants permettant de solubiliser 3% massique de CsA dans l'eau.

Des excipients supplémentaires n'intervenant pas dans la solubilisation de la CsA ont par la suite été rajoutés. Le rôle de ces excipients va être détaillé. La composition de la formule finale est décrite dans le tableau 5-3.

Composants	Pourcentage massique (%)	Pourcentage molaire (%)
CsA	3,00	0,06
CV	15,00	1,20
NaOH	1,70	1,05
Urée	4,00	1,67
Glycérine	5,00	1,35
Natrosol HHX	1,00	Négligeable
Imidurée	0,50	0,03
Eau	69,80	94,64

Tableau 5-3 : Pourcentage massique et molaire et nature des composants formant la formulation aqueuse finale de CsA.

L'urée est une substance active d'origine naturelle, qui se retrouve dans tous les organes, tissus et liquides du corps humain. C'est un agent hydratant important de la couche cornée. C'est le produit final du métabolisme des protéines, ce qui signifie qu'il ne subit plus aucune modification chimique dans le corps. Il ne peut ainsi provoquer aucune allergie et son potentiel toxique est également très faible, de par son caractère endogène¹⁶².

Dans le cas du psoriasis, la quantité d'urée dans la peau est réduite. Dans l'épiderme de peaux normales il ya approximativement 28µg d'urée pour 2,5cm². Pour les peaux psoriasiques, l'urée est réduite de 40%. L'urée ayant une capacité à fixer l'eau, la capacité des peaux psoriasiques à retenir l'eau est altérée, ce qui se traduit par des rougeurs, des irritations...

Une étude a été menée sur la comparaison des effets de la glycérine et de l'urée sur des peaux atteintes d'exéma¹⁶³. 197 patients en double aveugle ont reçu soit une crème à 20% en glycérine, soit une crème placebo ne contenant pas de glycérine, soit une crème contenant 4% d'urée et 4% de NaCl. Les crèmes ont été appliquées au moins une fois par jour pendant 30 jours. Des réactions locales superficielles ont été observées en plus grand nombre chez les patients traités avec la solution saline d'urée (24%) que les patients traités avec la glycérine (10%). Cependant, les 2 traitements ont le même effet sur l'hydratation de la peau sèche.

L'utilisation d'agents antibactériens et antifongiques tel que l'imidurée est nécessaire du point de vue réglementaire et afin de garantir la stabilité microbiologique du produit.

Un agent gélifiant est nécessaire afin que la formulation puisse être appliquée sur la peau sans perte de dose. Notre choix s'est porté sur un agent gélifiant non ionique qui est un polymère d'hydroxyéthyl cellulose et qui est commercialisé sous le nom de Natrosol HHX. Nous obtenons ainsi une formulation semi-solide apte à l'administration cutanée (figure 5-3)



Figure 5-3 : Formulation aqueuse de CsA optimisée. L'ajout d'un agent gélifiant (Natrosol HHX) est nécessaire afin d'appliquer le produit sur la peau sans perte de dose par écoulement.

b. Mode opératoire général

La formulation est préparée en respectant les proportions de chacun des excipients décrits plus haut. Dans un premier temps, on réalise une suspension de CV sous agitation. Une solution de soude 40% est ajoutée. Le pH est alors compris entre 7,4 et 7,6. L'agitation est maintenue jusqu'à l'obtention d'une solution limpide de CV. La cyclosporine est ajoutée à la solution de CV et l'agitation est maintenue à température ambiante jusqu'à solubilisation totale. Par la suite sont rajoutés dans l'ordre, l'urée, la glycérine, l'imidurée. L'agitation est maintenue jusqu'à solubilisation totale. Enfin, le natrosol HHX est ajouté et l'agitation est maintenue jusqu'à l'obtention d'un gel homogène.

2.2.2. Résonnance magnétique nucléaire

a. Préparation des échantillons de formulation aqueuse de CsA à analyser en DOSY

La réalisation d'une expérience de DOSY va nous permettre de déterminer le coefficient de diffusion des composés d'intérêts dans la formulation. Ces coefficients de diffusion sont reliés au rayon hydrodynamique de la molécule grâce à la relation de Stokes-Einstein. Avant d'effectuer l'expérience de DOSY il est nécessaire de réaliser une expérience de RMN ^1H préalable permettant l'attribution spectrale des différents composés présents dans la formulation de CsA.

Les expériences de RMN ^1H et de DOSY sont effectuées sur un DPX Avance Bruker 400 MHz muni d'une sonde BBI. L'échantillon est alors placé dans des tubes de 5 mm, nécessitant des volumes de 400 μl . La séquence utilisée est zg (Bruker) pour l'expérience RMN ^1H et stebppg1s19 (Bruker) pour la DOSY. L'impulsion $\pi/2$ proton est de 13 μs à 0dB. La valeur effective du gradient pour l'expérience DOSY est incrémentée par pas de 5% (2, 5, 10,...,95%) pour un total de 16 expériences. La composition de la formulation (tableau 5-4) qui sera testée en DOSY est la même que celle décrite dans le tableau 5-3 mais ne contient pas l'agent gélifiant, le Natrosol HHX afin de ne pas obtenir des valeurs de viscosité différentes en fonction du lot fabriqué. En effet, une précision de l'ordre du milligramme est nécessaire lors de l'ajout du Natrosol HHX afin de garantir la même viscosité pour différents lots de formulation

Composants	Pourcentage massique (%)	Pourcentage molaire (%)
CsA	3,00	0,06
CV	15,00	1,20
NaOH	1,70	1,05
Urée	4,00	1,67
Glycérine	5,00	1,35
Natrosol HHX	ABSENT	ABSENT
Imidurée	0,50	0,03
Eau	70,8	94,64

Tableau 5-4 : Composition de la formulation aqueuse de cyclosporine testée en RMN DOSY.

La viscosité de la formulation est un paramètre qu'il est important de maîtriser lors d'une expérience de DOSY. La viscosité, suite à l'ajout d'un agent gélifiant tel que le natrosol HHX peut varier d'un échantillon à l'autre, nous avons donc choisi de nous en passer pour l'expérience de DOSY. La viscosité de l'échantillon a été déterminée à l'aide d'un viscosimètre rotatif (figure 5-4). La contrainte de cisaillement est imposée par un cylindre (A) tournant à vitesse constante dans la solution à mesurer contenue dans un récipient cylindrique (B).

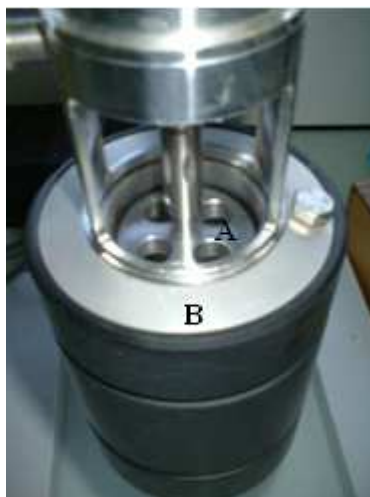


Figure 5-4 : Viscosimètre rotatif

b. Préparation des échantillons à analyser en RMN ^2H

La préparation des vésicules multilamellaires (MLVs) suit le même protocole que celui décrit au chapitre 4.

Un premier échantillon est fabriqué par addition de Cyclosporine A (CsA) lyophilisée sur les MLVs. Trois cycles chaud-froid (70°C et -196°C) sont réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon.

La solution de CV a été préparée par addition de 150 mg (0.47 mmol) de CV dans 0.82 ml d'eau. La solution de CV composée du mélange lauroyl valine perdeutérée et myristoyl valine ($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$) a été préparée par addition de 116 mg (0.36 mmol) de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}$ et de 34 mg (0.11 mmol) de C14v dans 0.82 ml d'eau. Le pH de la suspension résultante a été ajusté à 7 par une solution de soude 40% et on obtient une solution limpide de CV et de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$ après agitation à température ambiante.

Un deuxième échantillon est fabriqué par addition d'une solution de CV aux MLVs de manière à former un système Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}/\text{CV}$. Un troisième échantillon est fabriqué par addition de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$ aux MLVs de manière à former un système Cer/Chol/PA/ $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$. Trois cycles chaud-froid (70°C et -196°C) sont réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon. 30 mg (0.025 mmol) de CsA ont été ajoutés à une solution de CV et également à une solution de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$. Le mélange est agité à température ambiante jusqu'à solubilisation totale de la CsA. Une solution limpide de CsA est ainsi obtenue.

Un quatrième échantillon a été fabriqué par addition d'une solution de complexe colloïdal CV/CsA sur les MLVs de manière à former un système Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV/CsA. Le cinquième et dernier échantillon a été réalisé par addition de la solution de complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA aux MLVs de manière à former un système Cer/Chol/PA/ $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA. Trois cycles chaud-froid (70°C et -196°C) sont réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon.

La composition des solutions de CV et de $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v est résumée dans le tableau 5-5. Les expériences de RMN ^2H , résumées dans le tableau 5-6 ont été réalisées à des températures variant de 25°C à 60°C sur plusieurs échantillons de lipides formant le SC sain et psoriasique.

	Quantité			
	CV ($\text{C}_{12}\text{V-C14v}$)	$\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$	C14v	eau
Solution de CV	150mg (0,36mmol)	-	-	0,82ml (0,05mmol)
Solution de $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v	-	116mg (0,36mmol)	34mg (0,11mmol)	0,82ml (0,05mmol)

Tableau 5-5 : Composition des solutions de CV et de $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$

	Ratio molaire							% (massique) eau	% (molaire) eau
	Cer	Chol	PA- $^2\text{H}_{31}$	CsA	Solution CV	Solution $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v	Solution $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA		
SC sain + CsA	1	1,1	2,2	0,1	-	-	-	69	98
SC sain + CV	1	1,1	2,2	-	2,2	-	-	72	98
SC sain + CV/CsA	1	1,1	2,2	0,1	2,2	-	-	72	98
SC sain + $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v	1	1,1	2,2	-	-	2,2	-	72	98
SC sain + $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA	1	1,1	2,2	0,1	-	-	2,2	72	98
SC psoriasique + CsA	1	1,2	1,15	0,08	-	-	-	68	98
SC psoriasique + CV/CsA	1	1,2	1,15	0,08	1,7	-	-	72	98
SC psoriasique + CV	1	1,2	1,15	-	1,7	-	-	72	98
SC psoriasique + $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v	1	1,2	1,15	-	-	1,7	-	72	98
SC psoriasique + $\text{C}_{12}\text{V-}^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA	1	1,2	1,15	0,08	-	-	1,7	72	98

Tableau 5-6 : Composition lipidique des modèles stratum corneum sain et psoriasique, fabriqués et analysés en RMN ^2H

c. Analyse par RMN du deutérium ^2H

La méthode d'analyse utilisée est identique à celle décrite au chapitre 3.

3. Résultats

3.1. Expérience de DOSY sur la formulation aqueuse de CsA

L'expérience de DOSY a été précédée d'une expérience de RMN ^1H permettant l'attribution spectrale des différents composés présents dans la formulation de CsA. Le spectre de RMN ^1H est représenté figure 5-5

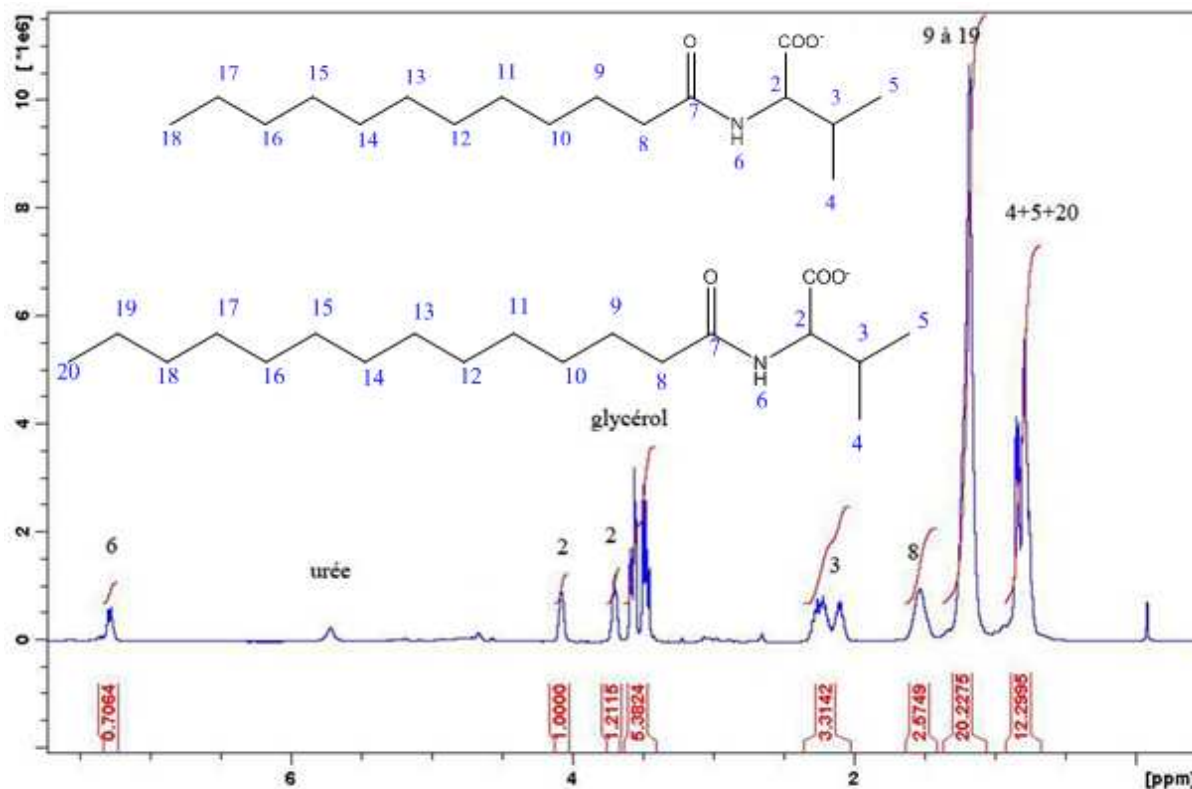


Figure 5-5 : Spectre RMN ^1H de la formulation aqueuse de CsA réalisée sur un DPX Avance Bruker 400 MHz muni d'une sonde BBI. L'échantillon est placé dans des tubes de 5 mm, nécessitant des volumes de 400 μl . La séquence utilisée est zg (Bruker). L'impulsion $\pi/2$ proton est de 13 μs à 0dB.

Les atomes de carbones de la C₁₂V et de la C14v constituant la CV ont été numérotés afin de faciliter l'attribution des groupements de la CV sur le spectre de RMN ^1H . L'expérience de DOSY a été conduite après optimisation des paramètres en RMN ^1H et attribution des signaux du spectre.

Le spectre DOSY de la formule aqueuse de CsA est représenté figure 5-6.

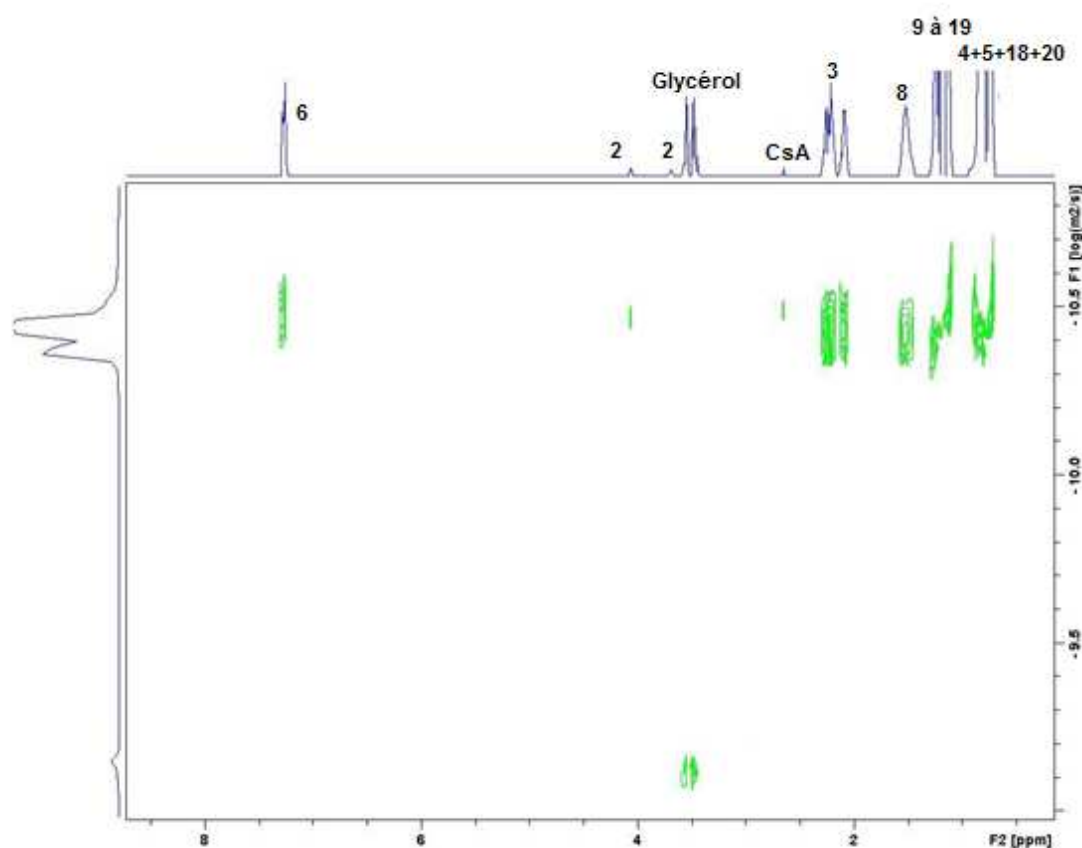


Figure 5-6 : Spectre RMN DOSY de la formulation aqueuse de CsA réalisé sur un DPX Avance Bruker 400 MHz muni d'une sonde BBI. L'échantillon est placé dans des tubes de 5 mm, nécessitant des volumes de 400 μl . La séquence utilisée est *stebpgp1s19* (Bruker) pour la DOSY. L'impulsion $\pi/2$ proton est de 13 μs à 0dB. La valeur effective du gradient pour l'expérience DOSY est incrémentée par pas de 5% (2, 5, 10,...,95%) pour un total de 16 expériences.

Il s'agit d'un spectre à deux dimensions. Dans la première, (axe horizontal) est représenté le spectre de la formulation obtenu en RMN ^1H . Dans la deuxième (axe vertical) se trouvent les coefficients de diffusion. Les tâches de corrélation obtenues permettent d'associer un coefficient de diffusion à chaque molécule présente dans la formulation. Ainsi, on

remarque que les molécules de C₁₂V, C14v et de CsA possèdent le même coefficient de diffusion ce qui peut laisser supposer que la CsA et la CV forment un système colloïdal. À l'inverse, on voit que la molécule de glycérol a un coefficient de diffusion plus élevé, ce qui signifie qu'elle n'entre pas dans la composition du système colloïdal CsA/CV.

Le coefficient de diffusion calculé sur 3 pics représentatifs de la cocoyl valine est de $1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Le rayon de particules sphériques peut être déterminé grâce à l'équation de Stokes-Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (\text{II.6})$$

Avec D, le coefficient de diffusion (en m^2/s), R, le Rayon de la particule (en m), T, la température (en Kelvin), η la viscosité (en kg/ms), k_B , la constante de Boltzmann égale à $1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$.

Le coefficient de diffusion dépend de la viscosité de la formulation, elle a donc été déterminée. On obtient le profil rhéologique représenté figure 5-7.

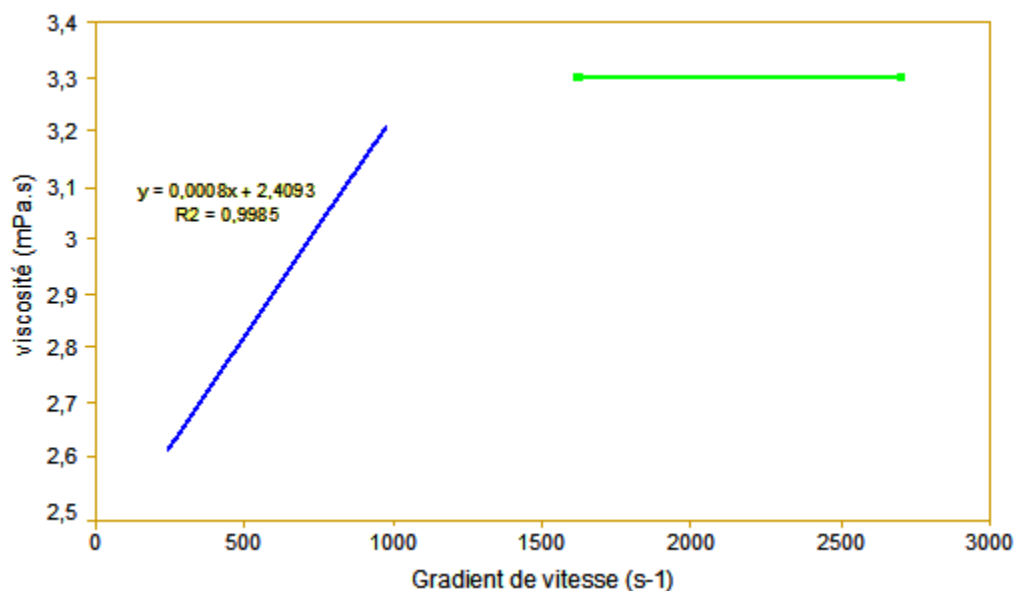


Figure 5-7 : Profil rhéologique de la formulation aqueuse de CsA. Aux faibles valeurs de cisaillement (jusqu'à 1100 s^{-1}) la solution a un comportement rhéoépaississant. Aux fortes valeurs de cisaillement, la solution a un comportement Newtonien

On voit que pour les faibles valeurs de cisaillement la viscosité augmente lorsque le gradient de vitesse augmente. On dit alors que le produit a un comportement rhéoépaississant¹⁶⁴. Aux fortes valeurs de cisaillement, on observe un comportement newtonien du produit. En effet, lorsque le gradient de vitesse augmente la viscosité du produit reste constante.

Dans la cuve RMN l'échantillon est immobile. En déterminant l'ordonnée à l'origine du graphique figure 5-7 on obtient la valeur de la viscosité de la formulation au repos. On obtient donc une viscosité au repos $\eta = 2,4\text{mPa.s} = 0,0024\text{N/m}^2$, ce qui est 2,4 fois supérieur à la viscosité de l'eau qui est de 1mPa.s .

La température était réglée à 298K (25°C) durant toute l'expérience de RMN. Connaissant le coefficient de diffusion de la CV et la constante de Boltzman, on trouve grâce à la relation de Stokes-Einstein un rayon hydrodynamique $R_h = 5,1 \pm 0,4\text{nm}$. Cette taille pourrait correspondre à une grosse micelle de CV d'environ 10nm de diamètre (figure 5-8).

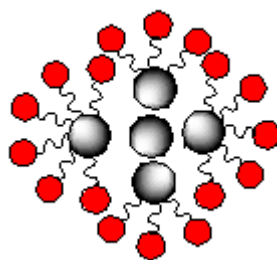


Figure 5-8 : Représentation d'une micelle de 10nm de diamètre

Des essais en diffusion dynamique de la lumière ont été réalisés afin de confirmer les résultats obtenus en RMN pour la détermination du rayon hydrodynamique. La courbe de corrélation obtenue est bimodale, c'est-à-dire qu'elle est composée de deux exponentielles décroissantes au lieu d'une seule, ce qui ne rend pas cohérent les valeurs obtenues par cette technique pour notre échantillon.

Étude des pics de la cyclosporine

Le coefficient de diffusion du pic 'CsA' à 2,65 ppm représentatif de la cyclosporine est de $1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-11}\text{m}^2/\text{s}$. Cette valeur est très proche de celle obtenue pour les micelles de cocoyl valine ($1,8 \cdot 10^{-11}\text{m}^2/\text{s}$). On a donc la preuve que la cyclosporine est bien encapsulée dans les micelles de cocoyl valine.

Coefficient de diffusion de la cyclosporine seule dans le chloroforme

Nous avons également analysé en DOSY une solution de 30mg de CsA par ml de CDCl_3 (figure 5-9). Nous avons déterminé le coefficient de diffusion de 6 pics de la CsA.

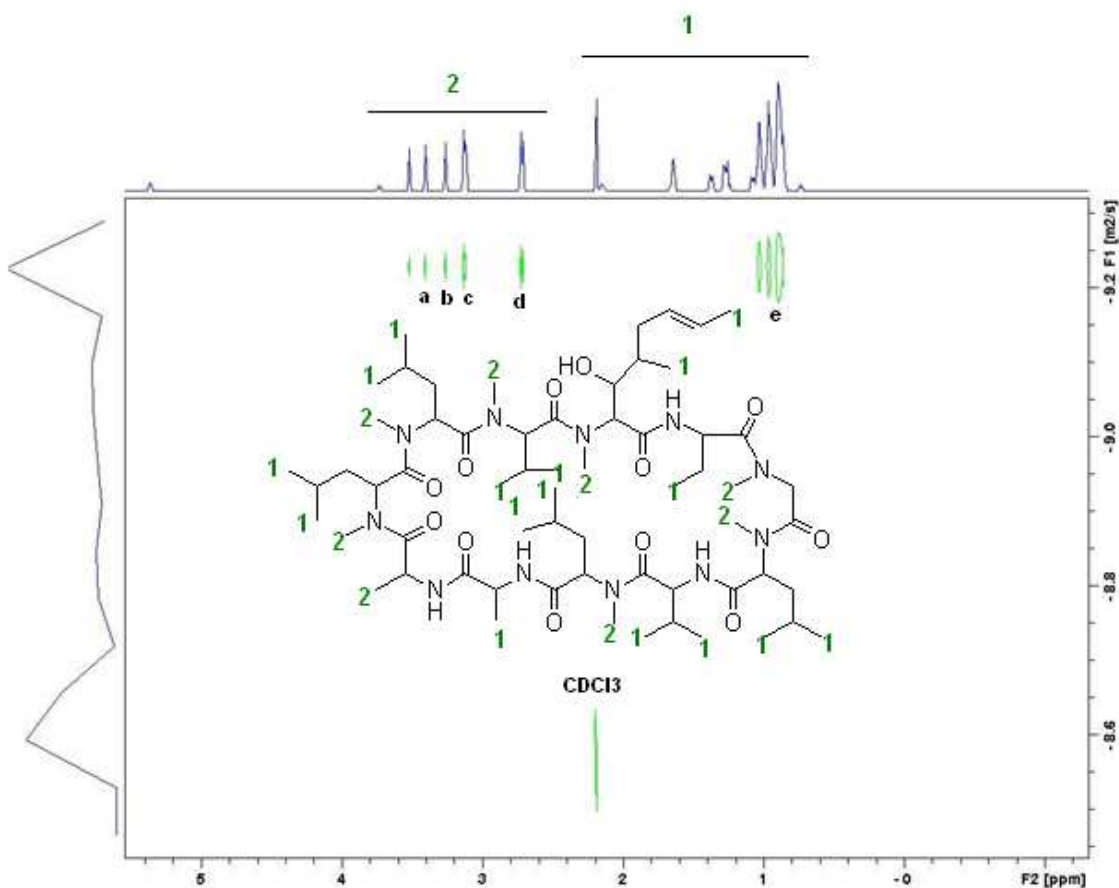


Figure 5-9 : Spectre RMN DOSY de la CsA dans le CDCl_3 , réalisé sur un DPX Avance Bruker 400 MHz muni d'une sonde BBI. L'échantillon est placé dans des tubes de 5 mm, nécessitant des volumes de 400 μl . La séquence utilisée est ledbpgp2s (Bruker) pour la DOSY. L'impulsion $\pi/2$ proton est de 13 μs à 0dB. La valeur effective du gradient pour l'expérience DOSY est incrémentée par pas de 5% (2, 5, 10,...,95%) pour un total de 16 expériences.

Le coefficient de diffusion obtenu pour la CsA a une moyenne de $3,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ dans le CDCl_3 . Ce qui est très loin des $1,7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ trouvé pour la cyclosporine encapsulée dans la CV. La température était réglée à 298K (25°C) durant toute l'expérience de RMN, la viscosité du chloroforme à 25°C est donc de $\eta = 0,54 \text{ mPa.s} = 5,4 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}^2$. Comme $D = 3,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ et que $k_B = 1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ on obtient donc selon la relation de Stokes-Einstein

un rayon hydrodynamique $R_h = 1,1 \pm 0,01 \text{ nm}$ pour la CsA en solution dans le chloroforme, ce qui correspond bien à la taille du monomère en solution.

En conclusion, la cyclosporine est encapsulée dans un système colloïdal de CV dont le rayon hydrodynamique moyen est de $5,1 \pm 0,4 \text{ nm}$. Le rayon hydrodynamique de la micelle est 5 fois supérieur à celui de la cyclosporine. On peut donc supposer que plusieurs molécules de cyclosporine se retrouvent encapsulées dans une micelle de plusieurs dizaines de CV.

3.2. Analyse des échantillons de *stratum corneum* par RMN ^2H

Nous avons étudié d'une part les effets de la CsA seule, de la CV seule et du complexe colloïdal CV/CsA sur les modèles de peau saine et psoriasique. Cela a été possible en suivant par RMN l'organisation de l'acide palmitique perdeutééré incorporé dans nos modèles membranaires. Le devenir de la CV mis en présence de nos deux modèles membranaires a également été étudié grâce à la synthèse de CV deutérée ($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$).

3.2.1. Effet de la CsA sur les modèles de peaux

Sur la figure 5-10 sont représentés le spectre RMN ^2H des modèles peau saine (*gauche*) et peau psoriasique (*droite*), respectivement Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) en présence de CsA à $R_i = 0,2$ à trois températures caractéristiques (30°C, 40°C et 50°C). L'effet de la CsA sur les deux types de modèles est très faible. En effet, Pour la peau saine à 30°C le spectre RMN est caractéristique d'une phase lamellaire cristalline. Pour la peau psoriasique on observe en plus, l'apparition d'une faible proportion de phase isotrope. À 40°C et 50°C, les deux modèles réagissent de la même manière : la phase solide a pratiquement disparu pour laisser place à une phase lamellaire fluide et une phase isotrope.

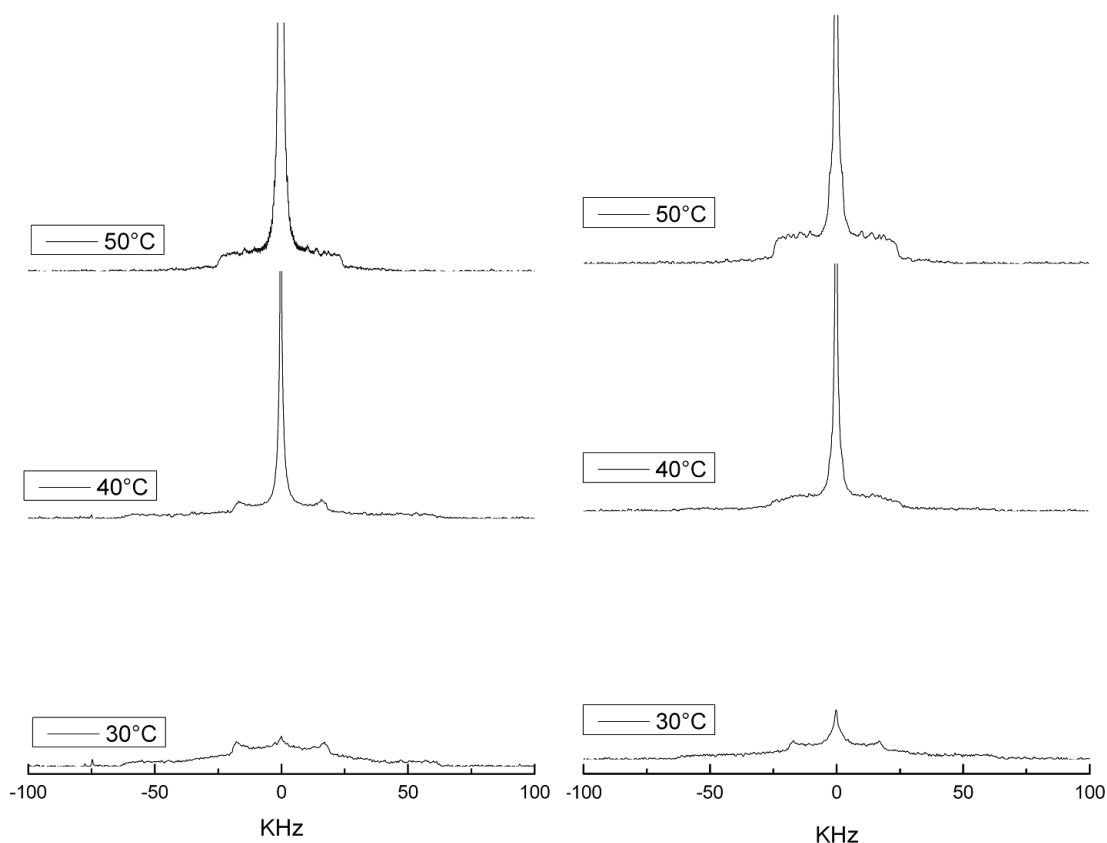


Figure 5-10 : Spectre RMN ^2H des modèles de peau saine et psoriasique en présence de CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.1/2.2/0.1) (gauche) et Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.2/1.15/0.08). Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200.

Les figures 5-11 et 5-12 représentent respectivement l'évolution du M_1 en fonction de la température pour les modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence de CsA. Pour le modèle peau saine en présence de CsA peu de différences sont observées par rapport au modèle peau saine sans CsA. Seul le point à 40°C présente une grande différence, due à une proportion de phase isotrope plus importante dans le cas de la peau saine en présence de CsA. En effet, le paramètre d'ordre à 40°C pour le modèle peau saine est de 0,9 alors qu'il n'est que de 0,6 pour le même modèle en présence de CsA. Pour le modèle peau psoriasique la diminution du M_1 provoquée par la présence de la CsA est plus marquée comparé au modèle peau saine mais reste néanmoins faible.

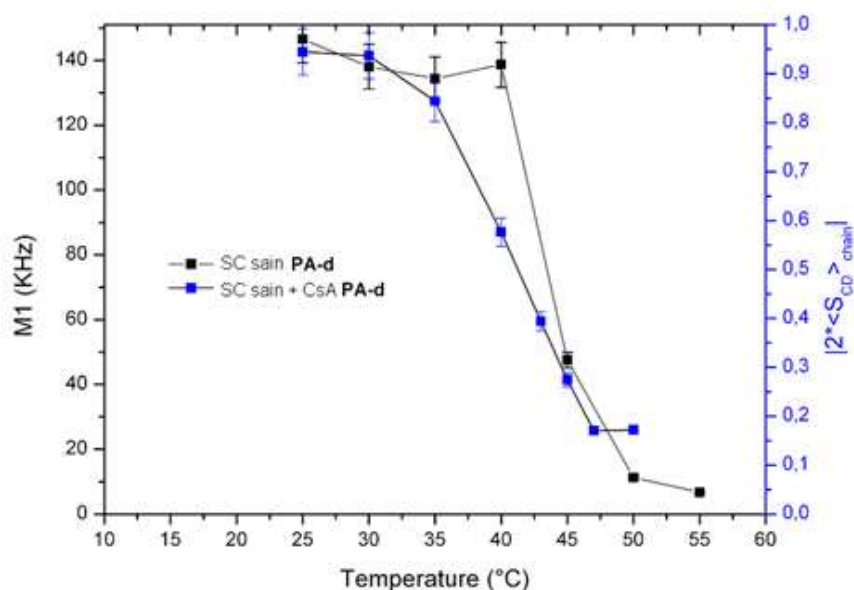


Figure 5-11 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence de CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.1/2.2/0.1)

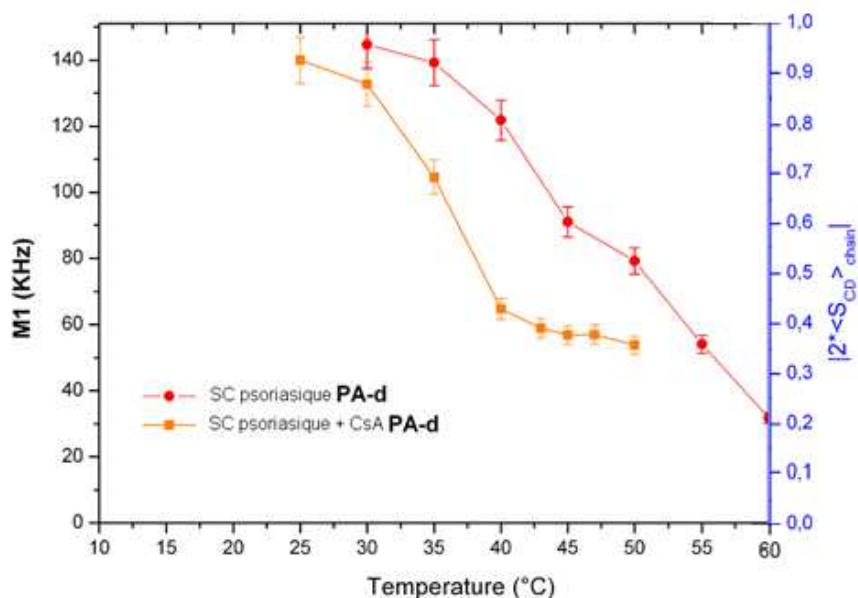


Figure 5-12 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV(1/1.2/1.15/1.7) et peau psoriasique en présence de CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.2/1.15/0.08)

Les figures 5-13 et 5-14 représentent respectivement l'évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température pour les modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence de CsA. Dans le cas de la peau saine l'évolution des courbes d'isotropie est quasiment identique pour les modèles peau saine en l'absence et en présence de CsA. Ce résultat confirme de nouveau que la CsA a eu d'influence sur le modèle peau saine. Dans le cas de la peau psoriasique en présence de CsA on observe une augmentation du pourcentage d'isotropie dès 30°C et celui-ci se maintient à un plateau entre 30% et 40% dans l'intervalle de température 40°C-50°C. Dans le cas de la peau psoriasique seul le pourcentage d'isotropie reste pratiquement nul jusqu'à une température de 45°C.

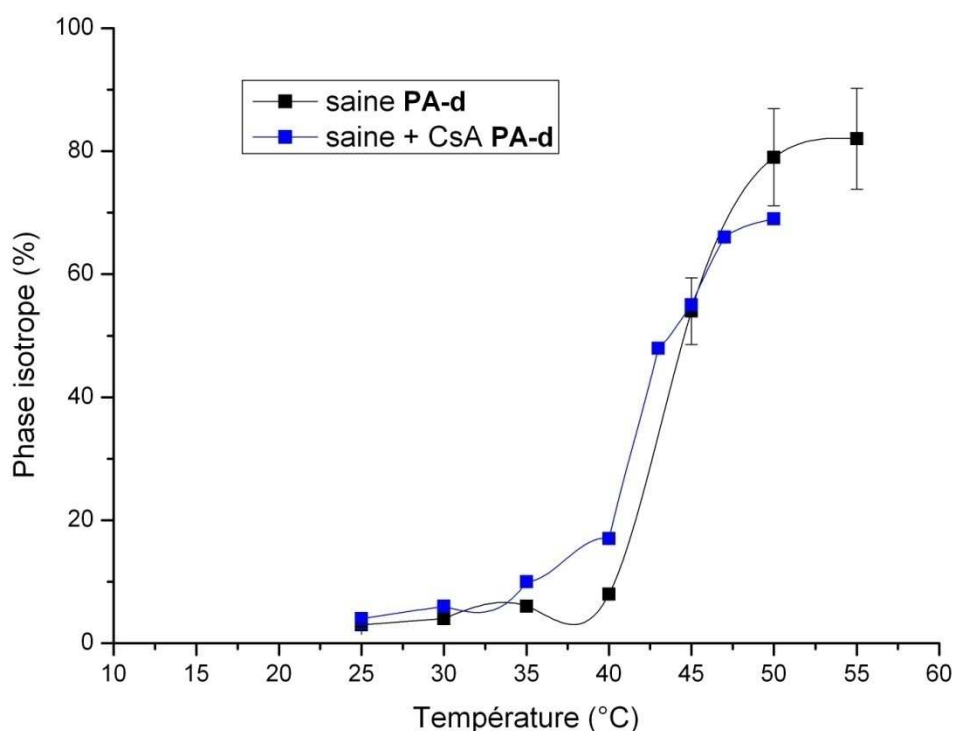


Figure 5-13 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence de CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.1/2.2/0.1)

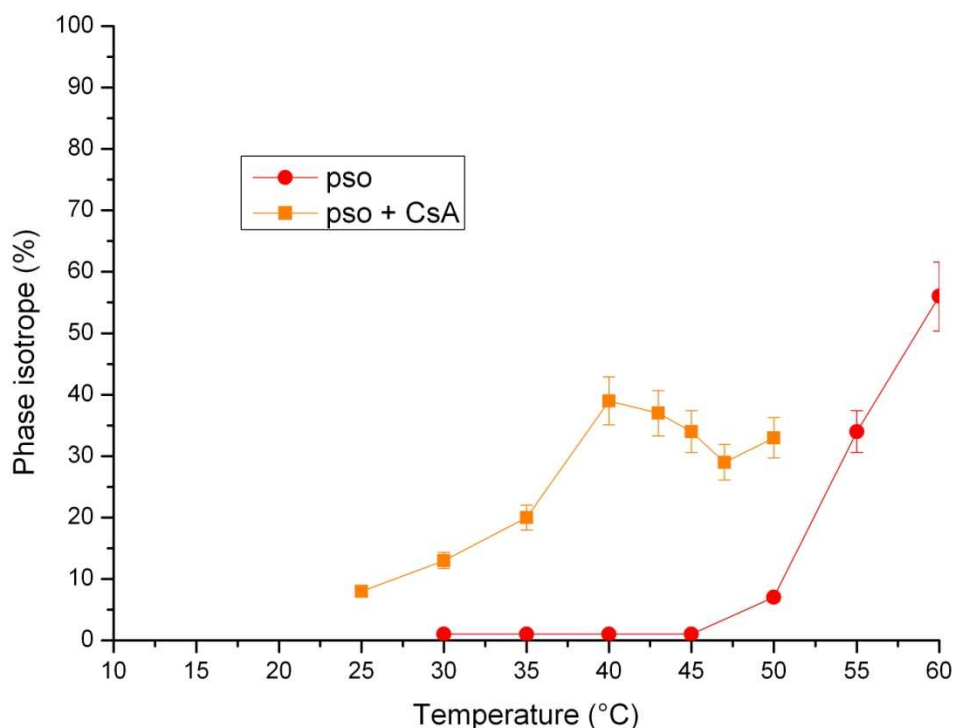


Figure 5-14 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) et peau psoriasique en présence de CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CsA (1/1.2/1.15/0.08)

3.2.2. Effet de la CV sur les modèles de peaux

- ✓ Acide palmitique perdeutééré utilisé comme reporter

Sur la figure 5-15 sont représentés le spectre RMN ^2H des modèles peau saine (*gauche*) et peau psoriasique (*droite*), respectivement Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) en présence de CV à $R_i = 0,5$. L'effet de la CV sur les deux types de modèles se traduit par une déstructuration de la phase cristalline à 30°C et la formation d'une phase lamellaire fluide majoritaire et d'une phase isotrope minoritaire. Ces deux phases restent à peu près dans les mêmes proportions sur toute la gamme des températures étudiées (20°C-50°C). Aucune transition de phase ne peut donc être observée. Il est intéressant de noter qu'à partir de 40°C une baisse de la phase isotrope est observée pour le modèle peau psoriasique pour être pratiquement nulle à 50°C.

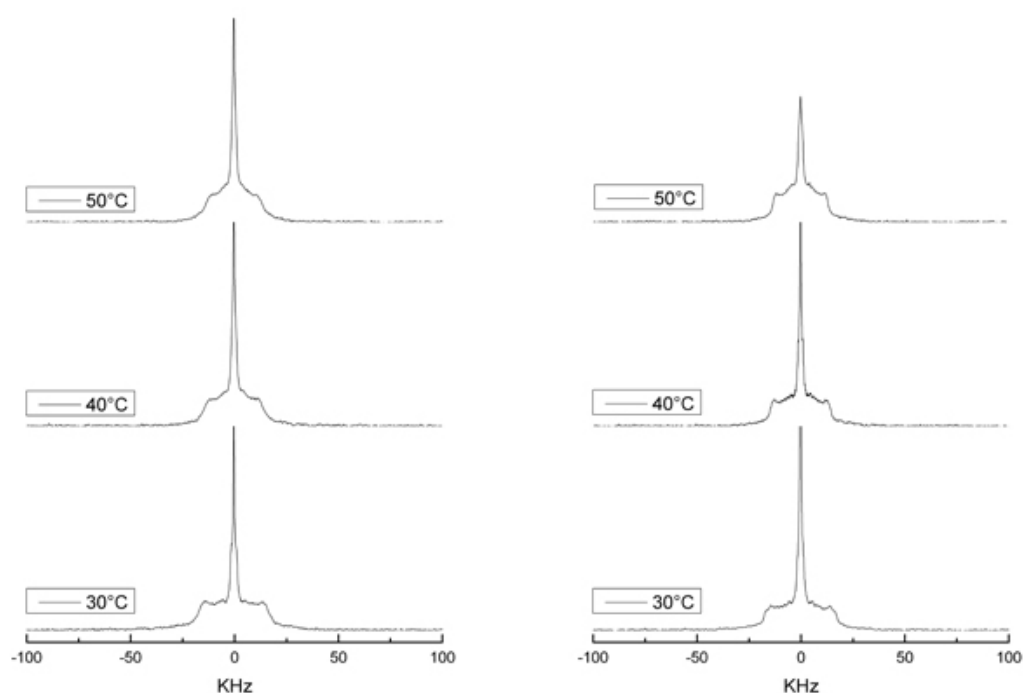


Figure 5-15 : Spectre RMN ^2H des modèles de peau saine et psoriasique en présence de CV : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV (1/1.1/2.2/2.2) (gauche) et Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV(1/1.2/1.15/1.7). Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200Hz.

Les figures 5-16 et 5-17 représentent respectivement le M_1 des modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence de CV. Pour les deux modèles, l'ajout de CV entraîne une importante chute du M_1 comparés aux modèles respectifs sans ajout de CV. Cette chute du M_1 est due à la destruction totale de la phase lamellaire cristalline. La valeur du M_1 est basse même aux températures les plus basses. Par la suite, pour les deux modèles, la valeur du M_1 baisse jusqu'à une température de 35°C et atteint un plateau correspondant à 50% de phase lamellaire fluide.

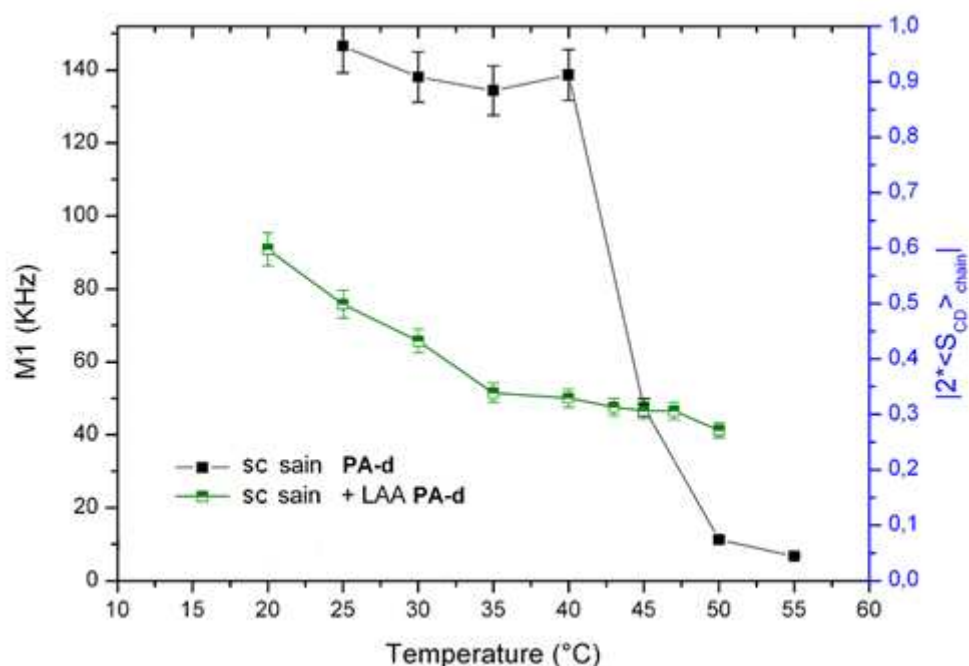


Figure 5-16 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence de CV : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV (1/1.1/2.2/2.2)

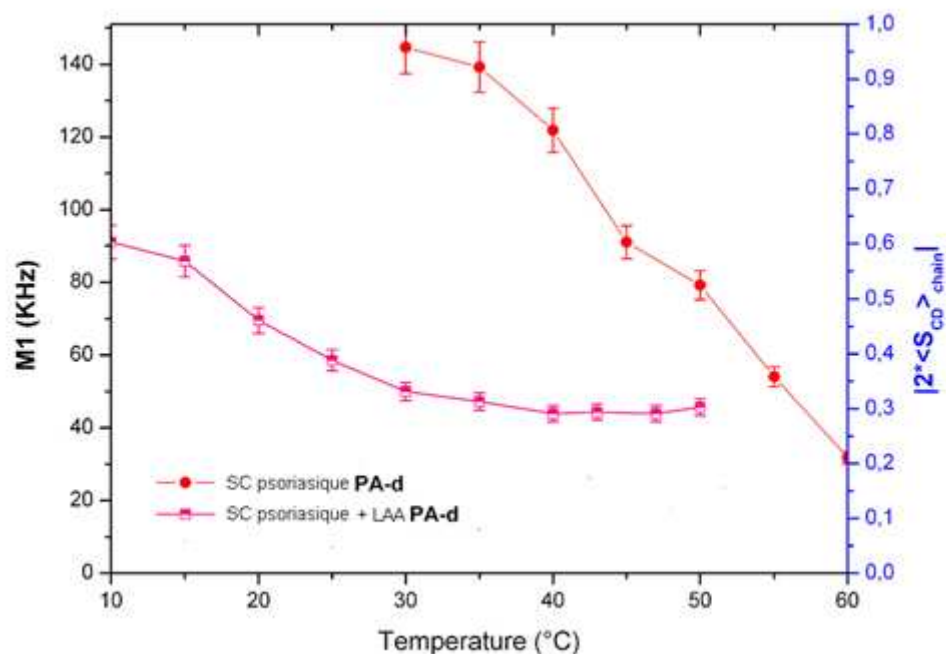


Figure 5-17 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) et peau psoriasique en présence de CV : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV(1/1.2/1.15/1.7)

Les figures 5-18 et 5-19 représentent respectivement l'évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température pour les modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence de CV. Pour les deux modèles de peau en présence de CV la valeur du pourcentage d'isotropie est proche des 10% à toutes les températures étudiées. En l'absence de CV le pourcentage d'isotropie peut atteindre des valeurs très élevées. Pour le modèle peau saine par exemple, à 50°C un pourcentage d'isotropie de 80% est obtenu.

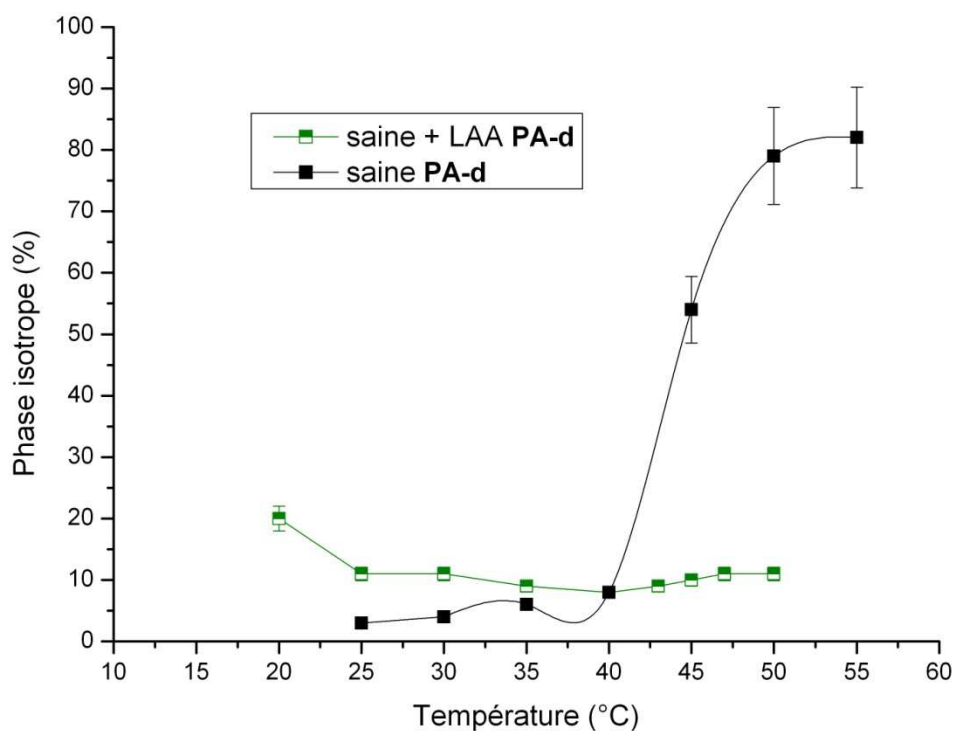


Figure 5-18 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence de CV : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV (1/1.1/2.2/2.2)

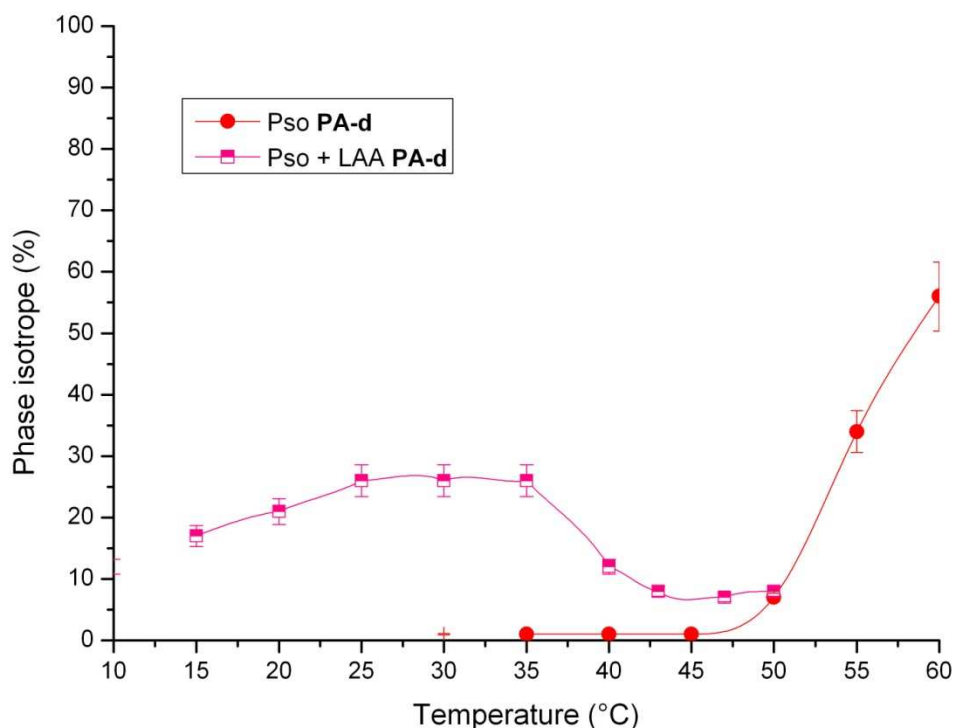


Figure 5-19 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) et peau psoriasique en présence de CV : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV(1/1.2/1.15/1.7)

✓ Cocoyl valine deutérée ($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$) utilisée comme reporter

Le spectre RMN ^2H de la $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$ en solution à trois températures caractéristiques (30°C, 40°C, and 50°C) faisant partie des températures étudiées (20°C-50°C) est représenté figure 5-20. Le complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$ en solution présente une phase isotrope pure à toutes les températures étudiées. Cette solution étant limpide et très fluide suggère très fortement que nous sommes en présence d'un système composé de micelles de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$.

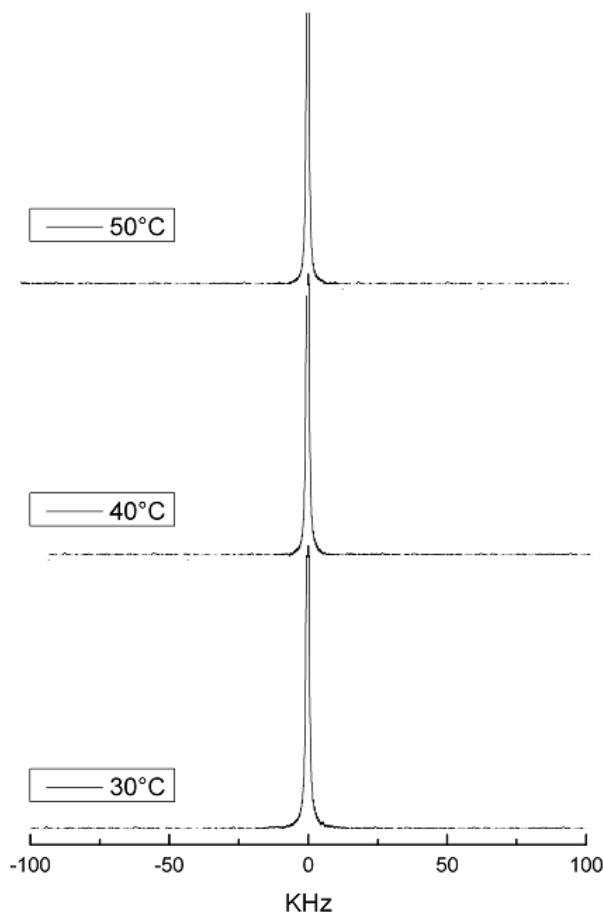


Figure 5-20 : spectre RMN ^2H d'une solution aqueuse de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ à 30°C, 40°C et 50°C. Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200.

On voit sur la figure 5-21 qu'en présence des micelles de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ on observe l'apparition à 30°C d'une phase lamellaire fluide pour les deux types de modèles de peau. À 40°C la proportion de phase lamellaire fluide augmente surtout dans le cas de la peau psoriasique. À 50°C on observe en plus de l'augmentation de la phase lamellaire fluide, une diminution de la phase isotrope très marquée pour la peau psoriasique. Lorsqu'on redescend à la température de 30°C on retrouve le spectre initial ce qui signifie qu'on est en présence d'un système en équilibre.

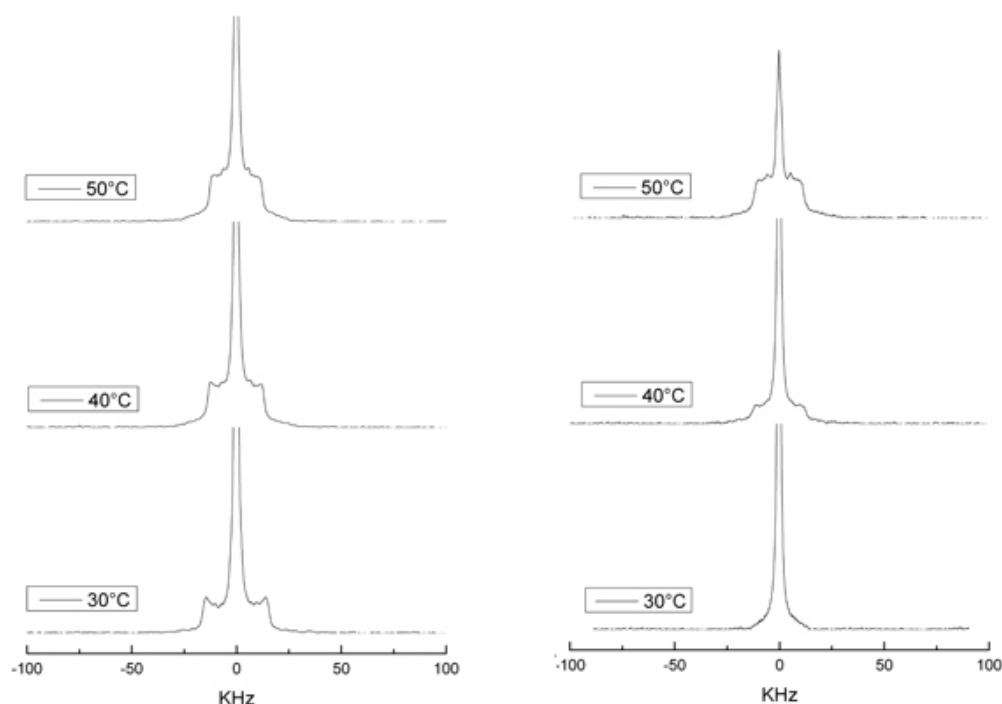


Figure 5-21 : Spectre RMN ^2H des modèles de peau saine et psoriasique en présence de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$: Cer/Chol/PA/($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$) (1/1.1/2.2/(2.2)) (gauche) et Cer/Chol/PA/($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$) (1/1.2/1.15/(1.7)) (droite). Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200

La figure 5-22 représente l'évolution du M_1 en fonction de la température calculée pour la CV en solution, pour la CV en présence du modèle peau saine et pour la CV en présence du modèle peau psoriasique. Les valeurs de M_1 de la CV en solution sont proche de zéro quelle que soit la température imposée au système. Un système micellaire se comporte de cette manière. Après ajout de la CV deutérée aux modèles de peau saine et psoriasique, on observe dès la plus faible température une valeur du M_1 plus élevée que la CV seule en solution. L'évolution du M_1 de la CV est identique pour les deux modèles de peaux. À partir de 35°C, une augmentation du M_1 est observée.

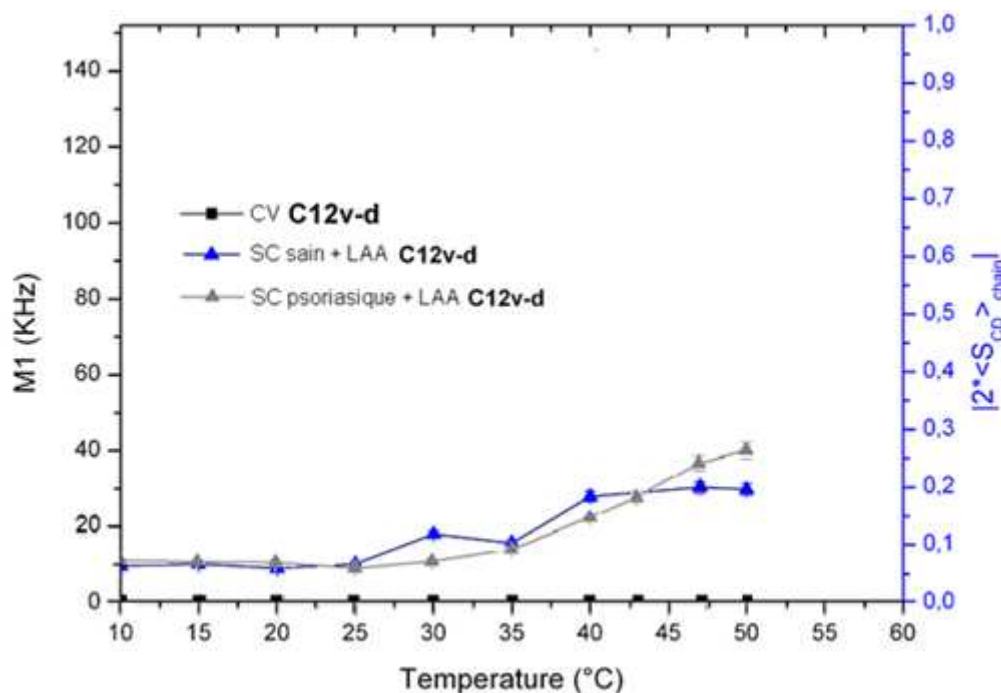


Figure 5-22 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour la CV en solution : $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$, pour la CV en présence du modèle peau saine : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}/(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})$ (1/1.1/2.2/(2.2)) et pour la CV en présence du modèle peau psoriasique : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}/(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})$ (1/1.2/1.15/(1.7))

La figure 5-23 représente l'évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculée pour la CV en solution, pour la CV en présence du modèle peau saine et pour la CV en présence du modèle peau psoriasique. La CV en solution présente un pourcentage d'isotropie de 100%, ce qui signifie que la CV est exclusivement sous forme micellaire. Lorsque la CV est ajoutée à un des deux modèles de peau, le pourcentage d'isotropie est plus faible et diminue fortement lorsque la température augmente, ce qui signifie qu'une partie de la CV n'est plus sous forme micellaire. Cette diminution du pourcentage d'isotropie est quasiment identique dans le cas des deux modèles de peau pour les températures inférieures ou égales à 45°C. Au-delà de cette température le pourcentage d'isotropie de la peau psoriasique baisse de manière plus importante que la peau saine le pourcentage d'isotropie atteint même la valeur de 5% à 50°C dans le cas de la peau psoriasique. Ce comportement traduit l'incorporation de la CV à la membrane.

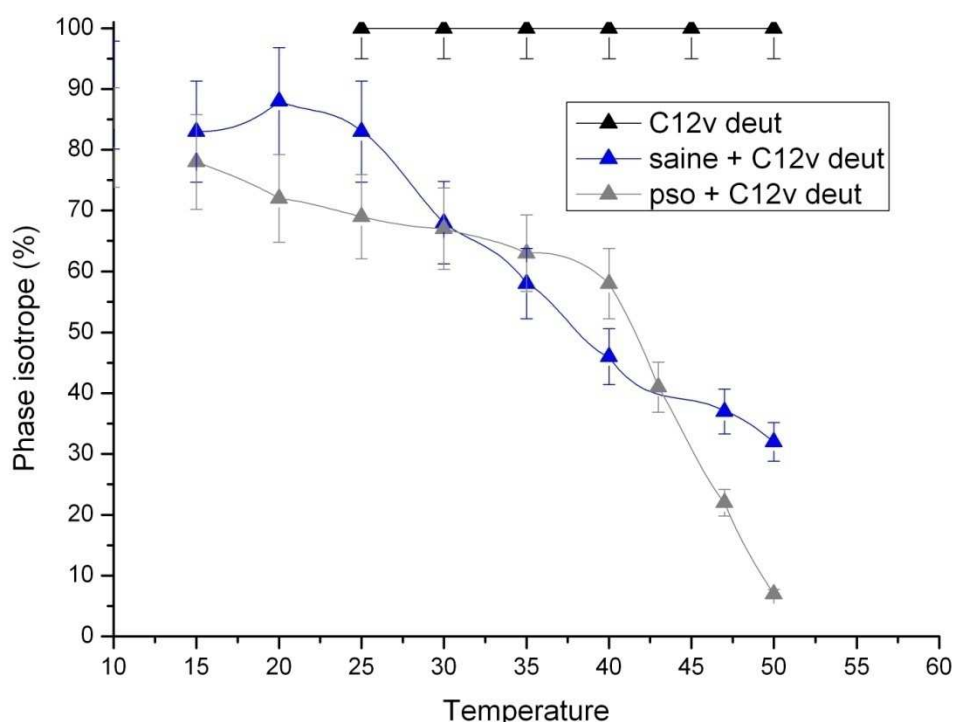


Figure 5-23 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour la CV en solution : $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$, pour la CV en présence du modèle peau saine : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}/(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})$ (1/1.1/2.2/(2.2)) et pour la CV en présence du modèle peau psoriasique : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}/(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})$ (1/1.2/1.15/(1.7))

3.2.3. Effet de la CV/CsA sur les modèles de peaux

- ✓ Acide palmitique perdeutééré utilisé comme reporter

Sur la figure 5-24 sont représentés les spectres RMN ^2H des modèles peau saine (*gauche*) et peau psoriasique (*droite*), respectivement $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}-^2\text{H}_{31}$ (1/1,1/2,2) et $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}-^2\text{H}_{31}$ (1/1,2/1,15) en présence du complexe colloïdal CV-CsA avec un $\text{Ri} = 0,5$ pour la CV et un $\text{Ri} = 0,02$ pour la CsA. L'effet du complexe colloïdal CV/CsA sur les deux types de modèle se traduit par une destruction de la phase cristalline à 30°C et la formation d'une phase lamellaire fluide et isotrope. Dans le cas de la peau saine, cette phase est minoritaire (~25%) alors que la phase isotrope est majoritaire (~75%). Ces deux phases restent dans les mêmes proportions sur toute la gamme des températures étudiées (20°C-50°C). Aucune transition de phase ne peut donc être observée. Dans le cas de la peau

psoriasique c'est la phase lamellaire fluide qui est majoritaire puisqu'elle est de 75% à 10°C et atteint 55% à 40°C.

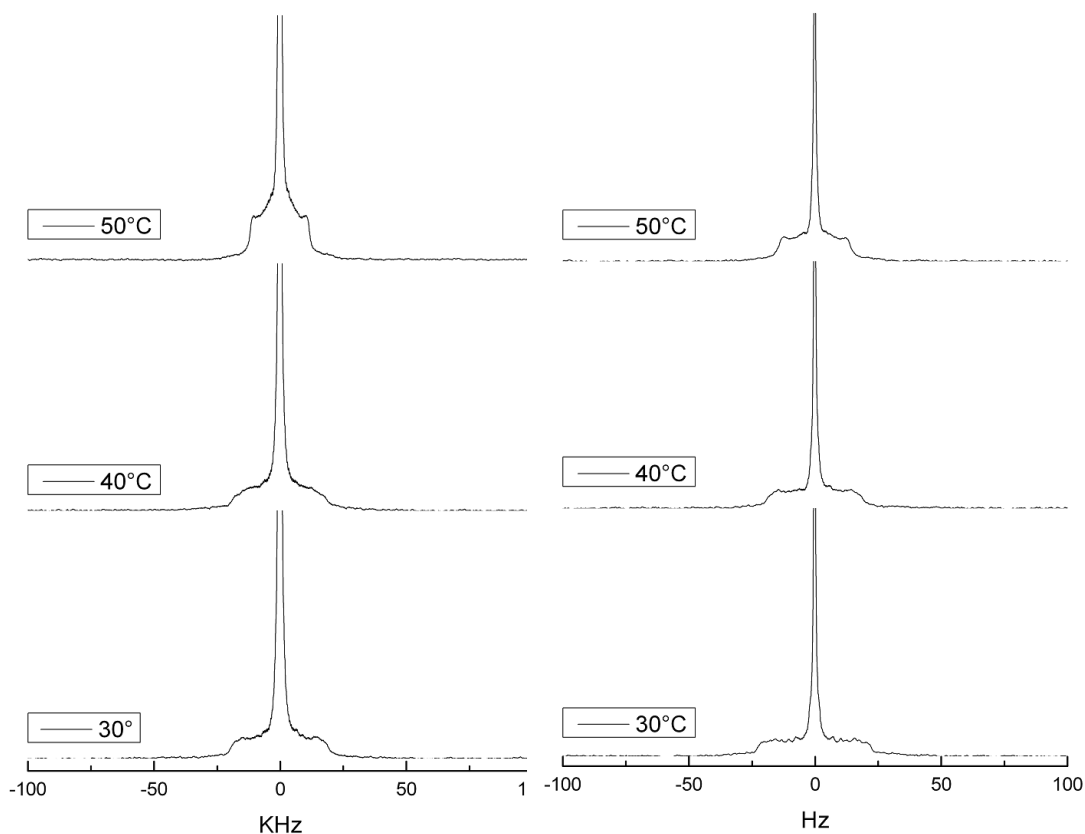


Figure 5-24 : Spectre RMN ^2H des modèles de peau saine et psoriasique en présence du complexe colloïdal CV/CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV/CsA (1/1.1/2.2/2.2/0.1) (gauche) et Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /LAA/CsA (1/1.2/1.15/1.7/0.08). Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200Hz.

Les figures 5-25 et 5-26 représentent respectivement le M_1 des modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence du complexe colloïdal CV-CsA. Après l'ajout du complexe CV-CsA on observe dès la plus faible température une valeur du M_1 plus faible que celle des modèles respectifs pour lesquels il n'y a pas eu d'ajout du complexe CV-CsA. Cette chute du M_1 est due à la destruction totale de la phase lamellaire cristalline. Pour le modèle peau saine la valeur du paramètre d'ordre est de 0,1 de 20°C à 50°C. La température semble donc peu avoir d'influence sur la déstructuration du modèle peau saine. Pour le modèle peau psoriasique une baisse graduelle du paramètre d'ordre est observée. Celui-ci passe de 0,5 à

0,1 lorsque la température passe de 10°C à 40°C. L'augmentation de température semble accentuer la déstructuration du modèle peau psoriasique même si dès 10°C la valeur du paramètre d'ordre n'est que de 0,5.

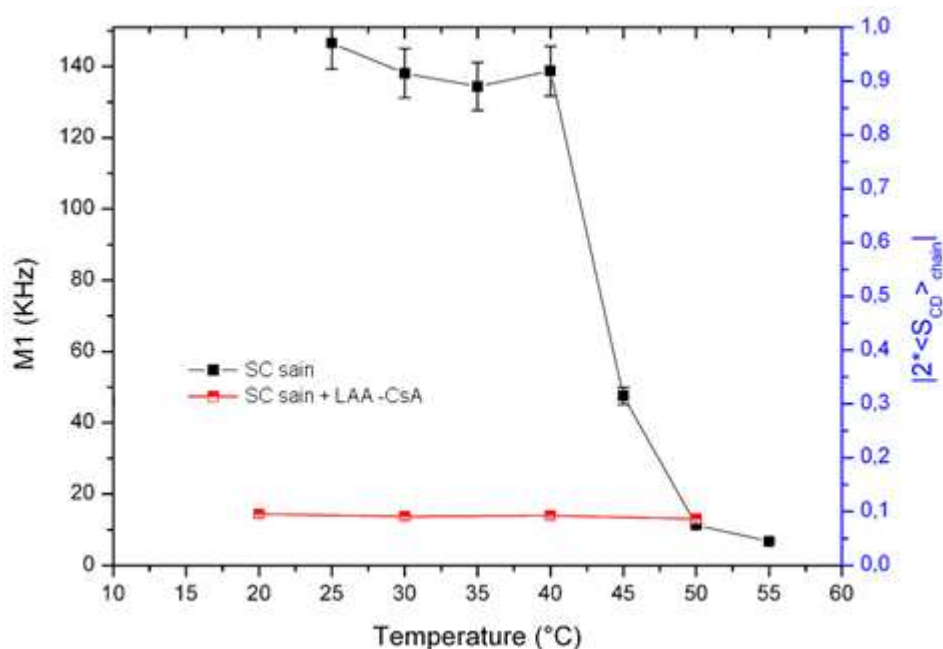


Figure 5-25 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence du complexe colloïdal CV-CsA : Cer/Chol/PA/(C $_{12}$ V- $^2\text{H}_{23}$ /C14v/CsA) (1/1.1/2.2/(2.2)/0.1)

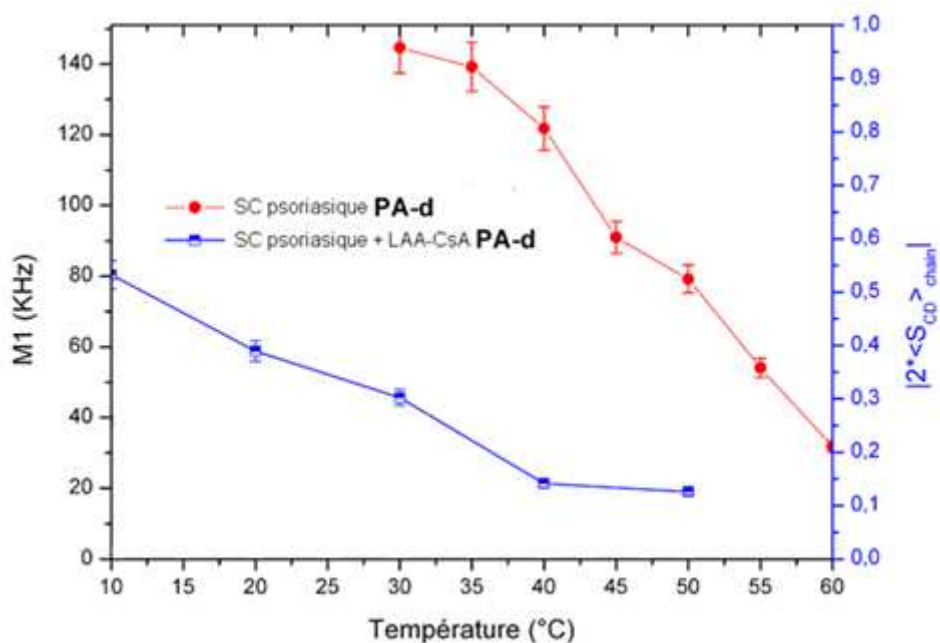


Figure 5-26 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculé pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) et peau psoriasique en présence du complexe colloïdal CV- CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /LAA/CsA (1/1.2/1.15/1.7/0.08)

Les figures 5-27 et 5-28 représentent respectivement le pourcentage d'isotropie des modèles de peau saine et psoriasique en présence et en l'absence du complexe colloïdal CV-CsA. Le pourcentage d'isotropie des modèles peau saine et psoriasique est proche de 0% à 30°C. Lors de l'ajout du complexe CV-CsA aux deux modèles de peau une forte valeur du pourcentage d'isotropie est observée par rapport à la peau saine dénuée du complexe colloïdal. Pour le modèle de peau saine, le pourcentage d'isotropie est d'à peu près 60% sur la plage des températures étudiées. Il varie de 20% à 40% pour le modèle peau psoriasique.

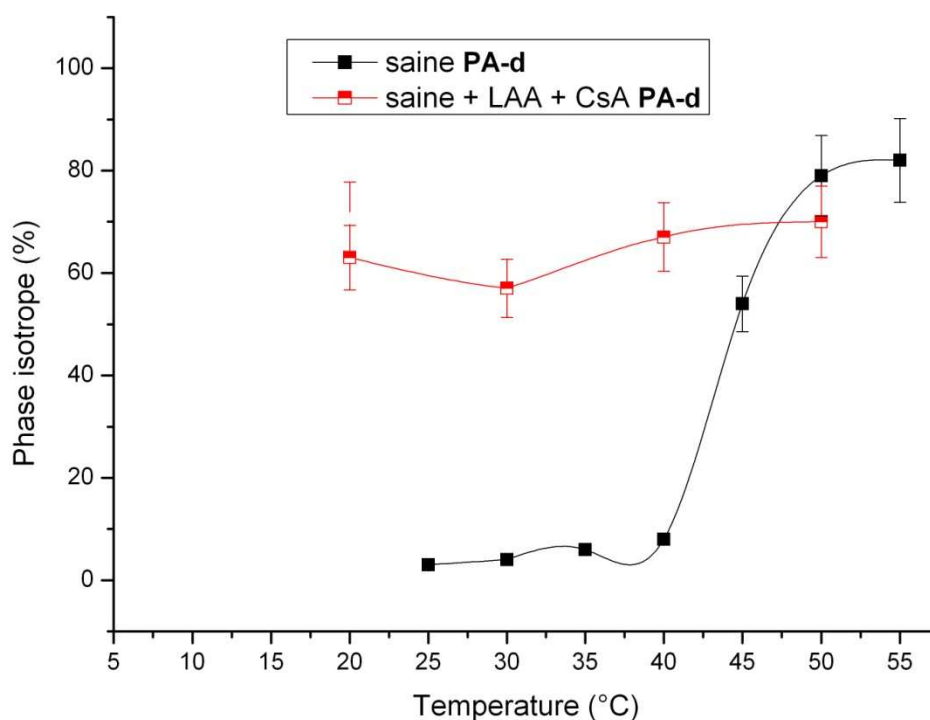


Figure 5-27 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température déterminée pour le modèle peau saine Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.1/2.2) et peau saine en présence du complexe colloïdal CV- CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV/CsA (1/1.1/2.2/2.2/0.1)

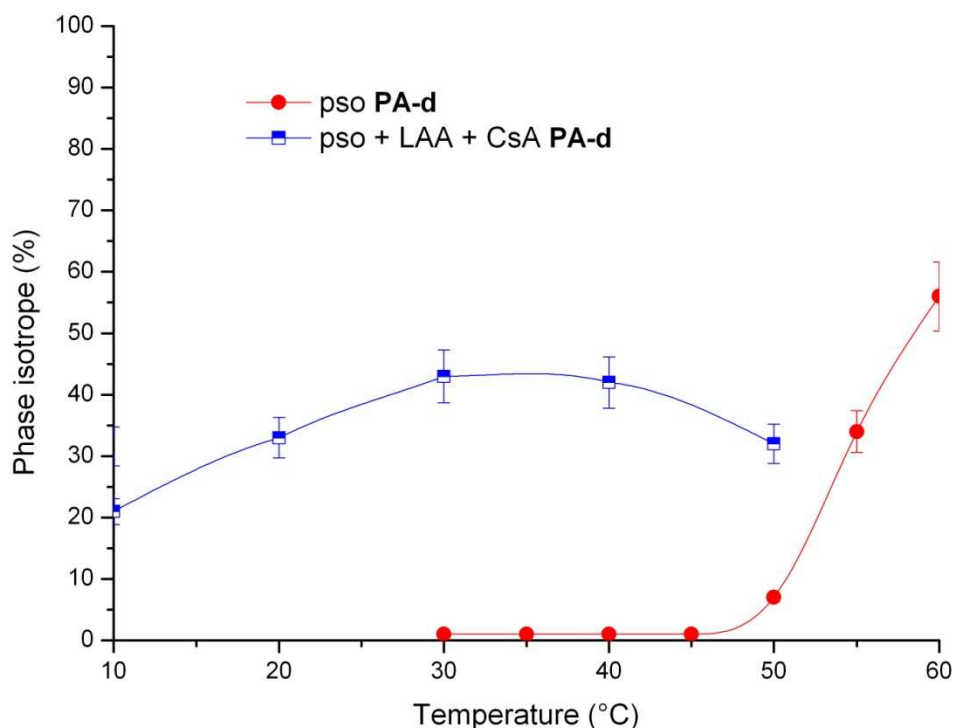


Figure 5-28 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour le modèle peau psoriasique Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ (1/1.2/1.15) et peau psoriasique en présence du complexe colloïdal CV- CsA : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}$ /CV/CsA (1/1.2/1.15/1.7/0.08)

- ✓ $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}$ utilisé comme reporter dans le complexe colloïdal CV deutérée - CsA ($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$)

Le spectre RMN ^2H du complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en solution à trois températures caractéristiques (30°C, 45°C, et 50°C) faisant partie des températures étudiées (20°C-50°C) est représenté figure 5-29. Comme pour le spectre ^2H -NMR de la $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ en solution (figure 5-18), le complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en solution présente une phase isotrope pure à toutes les températures étudiées. Cette solution étant limpide il ne peut s'agir comme dans le cas du système $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ en solution que d'un système composé de micelles de $(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})/\text{CsA}$.

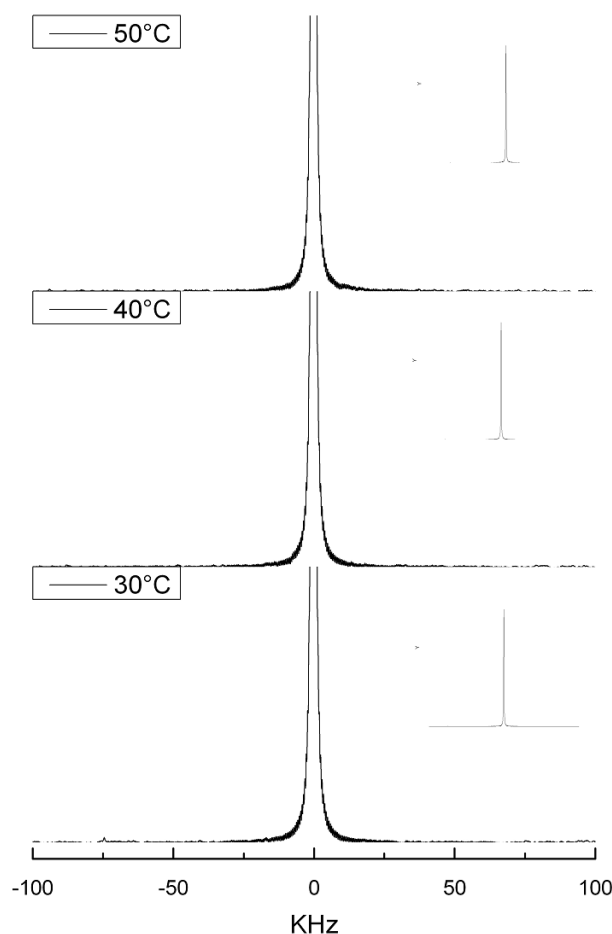


Figure 5-29 : spectre RMN ^2H d'une solution aqueuse de $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ à 30°C, 40°C et 50°C. Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200Hz.

On voit sur la figure 5-30 que lorsque les micelles de $(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v})/\text{CsA}$ sont ajoutées aux deux types de modèles, on observe l'apparition à 30°C d'une phase lamellaire fluide. À 40°C et 50°C la proportion de phase lamellaire fluide augmente et devient très majoritaire.

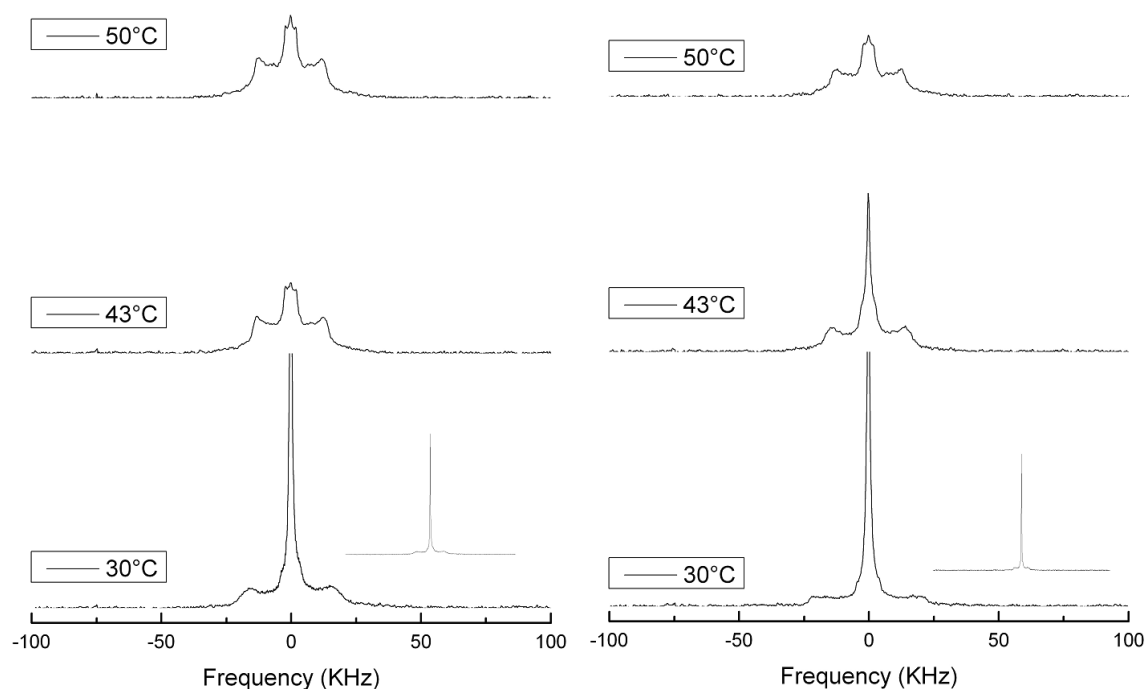


Figure 5-30 : Spectre RMN ^2H des modèles de peau saine et psoriasique en présence du complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$: Cer/Chol/PA/($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$) (1/1.1/2.2/(2.2)/0.1) (gauche) et Cer/Chol/PA/($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}$)/CsA (1/1.2/1.15/(1.7)/0.08). Les spectres sont tracés en intensité absolue, l'aire sous la courbe reste donc constante ce qui explique que certains spectres sont tronqués. Les spectres bruts ont été traités par une Lorentzienne de paramètre LB égal à 200Hz.

La figure 5-31 représente l'évolution du M_1 en fonction de la température calculée pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ en solution, pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ en présence du modèle peau saine et pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ en présence du modèle peau psoriasique. Comme dans le cas du complexe CV en solution, les valeurs de M_1 du complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ en solution sont proche de zéro quel que soit la température imposée au système. Nous sommes également dans ce cas en présence d'un système micellaire. Après ajout du complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ aux modèles de peau saine et psoriasique on observe dès la plus faible température une valeur du M_1 beaucoup plus élevée que dans le cas du complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C14v}/\text{CsA}$ seul en solution. Ceci est certainement dû au fait que le complexe colloïdal rentre dans les modèles de peau.

L'évolution du M_1 de la CV deutérée est quasiment identique pour les deux modèles de peau sauf au point 35°C où une augmentation subite du paramètre d'ordre est observée pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$.

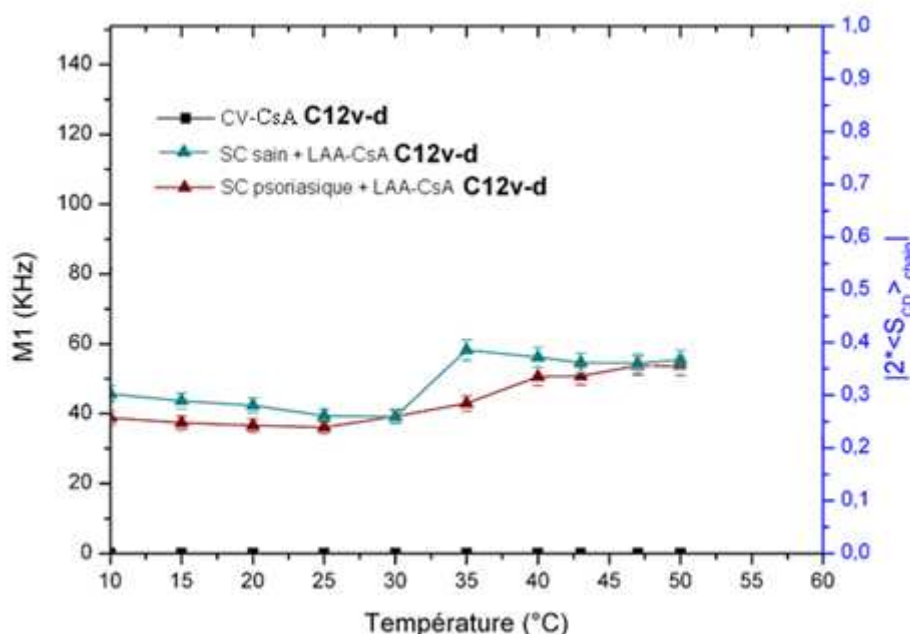


Figure 5-31 : Évolution du moment M_1 en fonction de la température calculée pour le complexe colloïdal CV-CsA en solution : $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$, pour le complexe CV-CsA en présence du modèle peau saine : Cer/Chol/PA/($\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$) (1/1.1/2.2/(2.2)/0.1) et pour le complexe CV-CsA en présence du modèle peau psoriasique : Cer/Chol/PA- $^2\text{H}_{31}/\text{LAA}/\text{CsA}$ (1/1.2/1.15/1.7/0.08)

La figure 5-32 représente l'évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculée pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en solution et pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en présence du modèle peau saine et pour le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en présence du modèle peau psoriasique. Le complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$ en solution présente un pourcentage d'isotropie de 100%, ce qui signifie que le complexe est exclusivement sous forme micellaire. Lorsqu'il est ajouté à un des deux modèles de peau le pourcentage d'isotropie, dès 10°C est plus faible (23% pour le modèle peau saine et 45% pour le modèle peau psoriasique) et diminue fortement lorsque la température augmente, pour être proche de zéro dans le cas de la peau saine à partir de 35°C et dans le cas de la peau psoriasique à 55°C ce qui signifie que la C_{12}V se trouve dans une phase lamellaire.

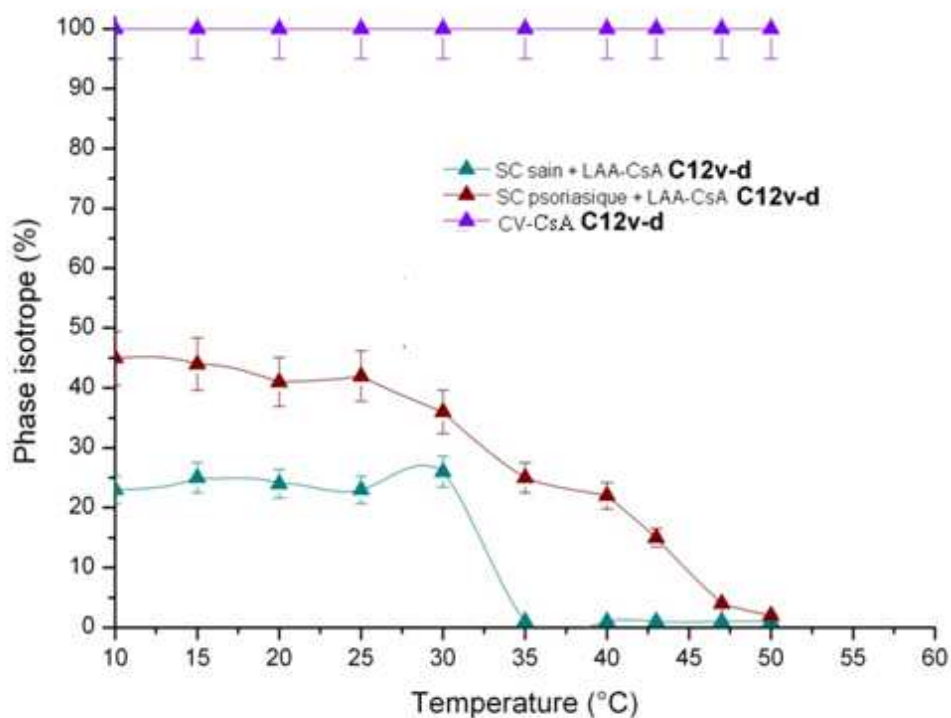


Figure 5-32 : Évolution du pourcentage d'isotropie en fonction de la température calculé pour le complexe colloïdal CV-CsA en solution : $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA}$, pour le complexe CV-CsA en présence du modèle peau saine : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}/(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}/\text{CsA})$ (1/1.1/2.2/(2.2)/0.1) et pour le complexe CV-CsA en présence du modèle peau psoriasique : $\text{Cer}/\text{Chol}/\text{PA}-^2\text{H}_{31}/\text{LAA}/\text{CsA}$ (1/1.2/1.15/1.7/0.08)

4. Discussion

Trois principaux résultats ressortent :

- i) La CsA seule détruit une partie de la phase lamellaire cristalline du modèle peau psoriasique lorsqu'on force son incorporation aux membranes.
- ii) La CV augmente la perméabilité du SC.
- iii) Le complexe colloïdal CV/CsA déstructure fortement l'organisation des lipides des modèles de peau et la majorité de la CV pénètre dans le SC.

La CsA seule détruit une partie de la phase lamellaire cristalline du modèle peau psoriasique lorsqu'on force son incorporation aux membranes.

Quel effet aurait la CsA si elle était administrée sous forme de poudre, directement sur la peau ? Probablement aucun. En effet, si on compare les effets de la CsA seule sur le modèle peau saine par rapport au modèle sans CsA, très peu de modifications structurales de l'organisation des lipides sont observées. À l'inverse, l'ajout de CsA au modèle de peau psoriasique se traduit par la destruction d'une partie de la phase lamellaire cristalline qui se transforme en phase isotrope. Ceci peut s'expliquer de la manière suivante : le modèle peau psoriasique contient une plus forte proportion de céramide et de cholestérol. Les proportions de ces deux lipides étant en excès par rapport à la peau saine ils pourront s'assembler avec de la CsA et modifier l'organisation de départ de la membrane se traduisant par la formation de structures micellaire, cubique ou éponge responsable de l'apparition de la phase isotrope.

La CV augmente la perméabilité du SC.

Le spectre du complexe colloïdal $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ en solution est essentiellement constitué d'un pic isotrope (figure 5-20). Cela signifie que la CV est sous forme micellaire. Après l'ajout de ce système colloïdal aux modèles de peau saine et psoriasique, une partie du complexe $\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v}$ passe d'une phase isotrope à une phase lamellaire fluide. Ceci prouve qu'une partie de la CV pénètre dans le SC (figure 5-21).

Au niveau des modèles de peaux saine et psoriasique, la CV engendre une destruction totale de la phase lamellaire cristalline qui est transformée en grande partie en phase lamellaire fluide.

Le complexe colloïdal CV/CsA déstructure fortement les modèles membranaires de SC et la majorité de la CV pénètre dans la membrane.

Le spectre du complexe colloïdal $(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})/\text{CsA}$ en solution est entièrement composé d'un pic isotrope indiquant que la totalité du complexe colloïdal $(\text{C}_{12}\text{V}-^2\text{H}_{23}/\text{C}_{14}\text{v})/\text{CsA}$ est sous forme micellaire (figure 5-29). Après addition du complexe colloïdal aux modèles lipidiques de peaux saine et psoriasique, une partie du complexe passe d'une phase isotrope à une phase lamellaire fluide. Cependant, la phase isotrope disparaît totalement à 35°C pour le modèle peau saine et à 47°C pour le modèle peau psoriasique. À ces deux températures, toute la CV a pénétré dans la membrane et se retrouve dans la composition lipidique des deux modèles. L'incorporation de la CV se fait à une température plus élevée dans le cas de la peau psoriasique comparé à la peau saine. Ceci est certainement dû au fait

que la peau psoriasique est plus rigide que la peau saine comme nous l'avons déjà démontré dans le chapitre 4. Il est bon de remarquer également que la pénétration de la CV en présence de CsA est beaucoup plus importante que sans CsA. Ceci est une indication sur le fait que la CsA est capable d'accroître la pénétration de la CV dans le SC.

La phase lamellaire cristalline des deux modèles de peau a été totalement transformée en phase lamellaire fluide et en phase isotrope. La proportion de phase isotrope obtenue est plus importante pour le modèle peau saine que pour le modèle peau psoriasique. Ceci est une confirmation sur le fait que la désorganisation de la structure lipidique du modèle peau psoriasique par le complexe colloïdal CV/CsA est plus difficile que celle du modèle peau saine probablement à cause de sa rigidité plus importante.

L'effet désorganisant du complexe colloïdal CV/CsA sur les membranes des modèles lipidiques est beaucoup plus prononcé que dans le cas de la CV seule. En effet, en présence de CV la phase lamellaire cristalline est transformée en grande majorité en phase lamellaire fluide alors qu'en présence du complexe CV/CsA la phase lamellaire cristalline est transformée en phase lamellaire fluide et phase isotrope. Ceci est une indication sur le fait que la CsA est capable d'accroître les effets désorganisant de la CV sur le SC.

5. Conclusion

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux modifications membranaires de modèles de peau saine et psoriasique en présence de CV et du complexe CV-CsA. Nous avons à la fois étudié les modifications membranaires engendrées par le complexe colloïdal, mais également le devenir du complexe une fois ajouté à nos membranes. Nous avons démontré que la CV entraîne une destruction totale de la phase lamellaire cristalline qui est transformée en majorité en une phase lamellaire fluide. Simultanément, la CV est capable de pénétrer dans les membranes lipidiques des modèles de SC et de rentrer dans leur composition. La destruction de la phase lamellaire cristalline et la pénétration de la CV dans les membranes lipidiques est plus difficile dans le cas de la peau psoriasique. Ceci confirme la démonstration faite au chapitre 4 à savoir que la peau psoriasique est un système plus rigide et moins perméable que la peau saine. Lorsque la CsA forme un complexe colloïdal avec la CV et qu'il est appliqué sur les modèles membranaires, on observe comme dans le cas de la CV une destruction de la phase lamellaire cristalline des modèles de SC et

une pénétration de la CV. Cependant, la destruction de la phase cristalline se fait au profit d'une phase lamellaire fluide et d'une phase isotrope. D'autre part, une plus grande quantité de CV pénètre dans la membrane pour entrer dans sa composition. Il est clair que la CsA facilite la pénétration de la CV et la désorganisation des lipides du SC. Réciproquement il paraît raisonnable de penser que la CsA est bien incorporée au SC. On peut penser que cette association permettra de traiter efficacement le psoriasis.

Chapitre 6

Conclusions et Perspectives

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusions

La première partie de cette thèse a été de former des systèmes colloïdaux sprayables à base de lipoamino acides encapsulant des protéines thérapeutiques. Pour les formulations de la rhGH et de la rhEPO avec la C₁₂P aux ratios molaires rhGH (rhEPO)/ C₁₂P : 1/35 et 1/70 nous n'avons pas observé de modifications significatives de la structure secondaire de la protéine. De plus, la taille du complexe colloïdal diffère très peu des protéines natives. Les tests de perméations sur cellules nasales se sont révélés positifs pour le ratio hGH/ C₁₂P : 1/70 et très positifs pour les complexes colloïdaux C₁₂P / rhEPO contenant 3% de NaCl.

Pour les formulations de la calcitonine avec la C₁₂P nous avons observé au ratio molaire calcitonine/ C₁₂P : 1/2 un début de transition de la forme pelote vers la forme hélice α . Pour le ratio calcitonine/ C₁₂P : 1/5 une forte transition de la forme pelote vers la forme hélice α a été observé. Il est bon de noter que cette transition n'a pas de conséquence sur l'activité biologique de la calcitonine de saumon. En effet, c'est sous la forme hélice α que la calcitonine interagit avec son récepteur. On peut donc penser que la transition pelote vers hélice α accroît son affinité pour son récepteur. Nous avons également démontré en diffusion de la lumière que nous avons bien interaction entre la calcitonine et le vecteur. Les tests de perméations *in vitro* se sont révélés très concluants pour le complexe calcitonine/ C₁₂P à pH 4.

Ce travail a permis de démontrer que la technologie BIODIS® basée sur les lipoamino acides comme vecteurs d'absorption est capable d'améliorer *in vitro* le passage nasal de protéines thérapeutiques. Des essais précliniques sur le mouton ont été réalisés et les résultats présentent des difficultés d'interprétation, essentiellement dues au fait que le test standard ELISA actuellement utilisé se révèle inefficace sur ces systèmes.

Lors de la deuxième partie, nous nous sommes intéressés au développement d'une formulation topique de cyclosporine pour le traitement du psoriasis. La cyclosporine a une très faible solubilité dans l'eau, de l'ordre de 30µg/ml (25µM). En association avec la cocoyl valine, on obtient un complexe colloïdal dont la concentration en CsA est de 30mg/ml (25mM). Cette formulation est très prometteuse pour le traitement du psoriasis car elle est essentiellement constituée d'eau. La plupart des formulations à base de cyclosporine testée présentent un ou plusieurs solvants organiques en proportion importante. Ces proportions

élevées entraînent en général des irritations cutanées qui viennent se rajouter à la pathologie elle-même.

Des premières expériences d'incubation de la cocoyl valine avec les modèles membranaires de peau saine et de peau psoriasique ont été réalisées. Il ressort de ces études que :

- la cocoyl valine est capable de fluidifier les lipides membranaires. Cette fluidification permettrait de faciliter le passage de la cyclosporine
- Les perturbations engendrées par la cocoyl valine sur l'organisation des lipides sont plus importantes dans le cas du modèle peau saine que pour celui de la peau psoriasique. Cela prouve encore une fois que les lipides du modèle peau psoriasique forment des structures plus rigides.

L'ajout de cyclosporine sous forme de poudre sans aucune formulation préalable, n'engendre aucune modification de l'organisation des lipides dans le cas du modèle peau saine et une légère fluidification du modèle peau psoriasique. Cela laisse supposer que la cyclosporine appliquée sur la peau sans aucune formulation préalable se révélera inefficace. En effet, la pénétration de la CsA à travers la peau est très mauvaise et nécessite donc d'être formulée^{145, 146}.

L'ajout de cyclosporine formulée avec la cocoyl valine engendre des modifications très importantes au niveau de l'organisation des lipides membranaires. Ces modifications sont plus importantes que celles engendrées par la cocoyl valine seule. De telles modifications permettront, nous l'espérons, de faciliter le passage de la cyclosporine vers l'épiderme et le derme.

Afin de vérifier l'efficacité de la formulation, des tests précliniques sur des chiens préalablement rasés et présentant une dermatite atopique sont en cours. Cette étude permettra d'évaluer l'efficacité des formulations pour traiter ces dermatites ainsi que la toxicité des compositions. Les résultats devraient nous dire très prochainement si la formulation aqueuse de cyclosporine développée est efficace vis-à-vis du psoriasis sans entraîner des effets secondaires importants sur la peau.

2. Perspectives

Nous avons pu démontrer *in vitro*, sur cellules nasales, que les lipoamino acides sont de bons vecteurs d'absorption de protéines thérapeutique. Cette étape étant franchie il faudrait lancer des études *in vivo* avec un moyen de dosage plus abouti que les tests ELISA du commerce et sur un nombre d'animaux suffisant afin de faire une étude statistique correcte. Il serait également intéressant d'étudier l'influence des autres lipoamino acides synthétisés sur le passage nasal des protéines.

Au cours de la deuxième partie de cette thèse, nous avons développé avec succès une formulation aqueuse de cyclosporine. Une étude plus approfondie de l'organisation du système cyclosporine A / Lipoamino acide est nécessaire, notamment en effectuant des études de modélisation moléculaires. Une étude préclinique sur l'animal est nécessaire pour confirmer les résultats positifs obtenus en RMN des solides.

Bibliographie

Bibliographie

1. Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R., The Structure of Proteins - 2 Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, (4), 205-211.
2. Pauling, L.; Corey, R. B., The Pleated Sheet, a New Layer Configuration of Polypeptide Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, (5), 251-256.
3. Pauling, L.; Corey, R. B., Atomic Coordinates and Structure Factors for 2 Helical Configurations of Polypeptide Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, (5), 235-240.
4. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology* **1963**, 7, (1), 95-&.
5. Richardson, J. S., *The Anatomy & Taxonomy of Protein Structure*. Academic press: Durham, 1981; Vol. 34, p 311.
6. Creighton, E., *Proteins : structures and molecular properties*. 6th edition ed.; W H Freeman & Co: New York, 2002; p 512.
7. Vonhippe.Ph; Wong, K. Y., On Conformational Stability of Globular Proteins - Effects of Various Electrolytes and Nonelectrolytes on Thermal Ribonuclease Transition. *Journal of Biological Chemistry* **1965**, 240, (10), 3909-&.
8. Hofmeister, F., *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, 24, 247-260.
9. Bothorel, P.; Lussan, C., Model of Biological Membrane Based on Lipid-Protein Interactions. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **1968**, 266, (26), 2492-&.
10. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes. *Science* **1972**, 175, (4023), 720-&.
11. Vance, D. E.; Vance, J. E., *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th Revised edition ed.; Elsevier Science: Alberta, 2002; p 608.
12. Bretsche.Ms, Phosphatidyl-Ethanolamine - Differential Labeling in Intact Cells and Cell Ghosts of Human Erythrocytes by a Membrane-Impermeable Reagent. *Journal of Molecular Biology* **1972**, 71, (3), 523-&.
13. Rothman, J. E.; Lenard, J., Membrane Asymmetry. *Science* **1977**, 195, (4280), 743-753.
14. Schroit, A. J.; Zwaal, R. F. A., Transbilayer Movement of Phospholipids in Red-Cell and Platelet Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1991**, 1071, (3), 313-329.
15. Zeidler, U., Une nouvelle façon de concenvoir la peau en cosmétique. *Skin care forum* **1991**.
16. Bodde, H. E.; Kruithof, M. A. M.; Brussee, J.; Koerten, H. K., Visualization of Normal and Enhanced Hgcl2 Transport through Human-Skin Invitro. *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, 53, (1), 13-24.
17. Bowser, P. A.; White, R. J., Isolation, Barrier Properties and Lipid Analysis of Stratum Compactum, a Discrete Region of the Stratum-Corneum. *British Journal of Dermatology* **1985**, 112, (1), 1-14.
18. Goates, C. Y.; Knutson, K., Enhanced Permeation of Polar Compounds through Human Epidermis .1. Permeability and Membrane Structural-Changes in the Presence of Short-Chain Alcohols. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1994**, 1195, (1), 169-179.
19. Maoqiang, M.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Fatty-Acids Are Required for Epidermal Permeability Barrier Function. *Journal of Clinical Investigation* **1993**, 92, (2), 791-798.
20. Genentec, Dermatologic and ophthalmic drugs, advisory committee meeting. In 2003.

21. Motta, S.; Sesana, S.; Ghidoni, R.; Monti, M., Content of the Different Lipid Classes in Psoriatic Scale. *Archives of Dermatological Research* **1995**, 287, (7), 691-694.
22. Lampe, M. A.; Burlingame, A. L.; Whitney, J.; Williams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, P. M., Human Stratum-Corneum Lipids - Characterization and Regional Variations. *Journal of Lipid Research* **1983**, 24, (2), 120-130.
23. Hedberg, C. L.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., The Time Course of Lipid Biosynthesis in Pig Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **1988**, 91, (2), 169-174.
24. Downing, D. T., Lipid and Protein Structures in the Permeability Barrier of Mammalian Epidermis. *Journal of Lipid Research* **1992**, 33, (3), 301-313.
25. Williams, M. L.; Elias, P. M., The Extracellular-Matrix of Stratum-Corneum - Role of Lipids in Normal and Pathological Function. *Crc Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1987**, 3, (2), 95-122.
26. Wertz, P. W.; Miethke, M. C.; Long, S. A.; Strauss, J. S.; Downing, D. T., The Composition of the Ceramides from Human Stratum-Corneum and from Comedones. *Journal of Investigative Dermatology* **1985**, 84, (5), 410-412.
27. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide Composition of the Psoriatic Scale. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1993**, 1182, (2), 147-151.
28. Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T., 6-Hydroxy-4-Sphingenine in Human Epidermal Ceramides. *Journal of Lipid Research* **1994**, 35, (11), 2060-2068.
29. Boinpally, R. R.; Zhou, S. L.; Devraj, G.; Anne, P. K.; Poondru, S.; Jasti, B. R., Iontophoresis of lecithin vesicles of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 274, (1-2), 185-190.
30. Chapkin, R. S.; Ziboh, V. A.; Marcelo, C. L.; Voorhees, J. J., Metabolism of Essential Fatty-Acids by Human Epidermal Enzyme Preparations - Evidence of Chain Elongation. *Journal of Lipid Research* **1986**, 27, (9), 945-954.
31. Poncet, M.; Havekes, L.; Kempenaar, J.; Vermeer, B. J., Cultured Human-Skin Fibroblasts and Keratinocytes - Differences in the Regulation of Cholesterol-Synthesis. *Journal of Investigative Dermatology* **1983**, 81, (2), 125-130.
32. Menon, G. K.; Feingold, K. R.; Moser, A. H.; Brown, B. E.; Elias, P. M., Denovo Sterologenesis in the Skin .2. Regulation by Cutaneous Barrier Requirements. *Journal of Lipid Research* **1985**, 26, (4), 418-427.
33. Epstein, E. H.; Williams, M. L.; Elias, P. M., The Epidermal Cholesterol Sulfate Cycle. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1984**, 10, (5), 866-868.
34. Yeagle, P. L., Cholesterol and the Cell-Membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1985**, 822, (3-4), 267-287.
35. Aussenac, F.; Tavares, M.; Dufourc, E. J., Cholesterol dynamics in membranes of raft composition: A molecular point of view from H-2 and P-31 solid-state NMR. *Biochemistry* **2003**, 42, (6), 1383-1390.
36. Feingold, K. R.; Man, M. Q.; Menon, G. K.; Cho, S. S.; Brown, B. E.; Elias, P. M., Cholesterol-Synthesis Is Required for Cutaneous Barrier Function in Mice. *Journal of Clinical Investigation* **1990**, 86, (5), 1738-1745.
37. Yokoyama, M.; Kwon, G. S.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Seto, T.; Kataoka, K., Preparation of Micelle-Forming Polymer Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **1992**, 3, (4), 295-301.
38. Wiedmann, T. S.; Kamel, L., Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 91, (8), 1743-1764.
39. Mall, S.; Buckton, G.; Rawlins, D. A., Dissolution behaviour of sulphonamides into sodium dodecyl sulfate micelles: A thermodynamic approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, 85, (1), 75-78.

40. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S., Characterization and Anticancer Activity of the Micelle-Forming Polymeric Anticancer Drug Adriamycin-Conjugated Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Aspartic Acid) Block Copolymer. *Cancer Research* **1990**, 50, (6), 1693-1700.
41. Torchilin, V. P., Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2001**, 73, (2-3), 137-172.
42. Bjerregaard, S.; Soderberg, I.; Vermehren, C.; Frokjaer, S., Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design. *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, 193, (1), 1-11.
43. Fukushima, S.; Kishimoto, S.; Takeuchi, Y.; Fukushima, M., Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 45, (1), 65-75.
44. Degennes, P. G.; Hervet, H., Statistics of Starburst Polymers. *Journal De Physique Lettres* **1983**, 44, (9), L351-L360.
45. Radowski, M. R.; Shukla, A.; von Berlepsch, H.; Bottcher, C.; Pickaert, G.; Rehage, H.; Haag, R., Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, (8), 1265-1269.
46. Jansen, J.; Meijer, E. W.; Debrabandervandenberg, E. M. M., The Dendritic Box - Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (15), 4417-4418.
47. Liu, M. J.; Kono, K.; Frechet, J. M. J., Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents. *Journal of Controlled Release* **2000**, 65, (1-2), 121-131.
48. Park, H.; Park, K., Hydrogels in bioapplications. *Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications* **1996**, 627, 2-10.
49. Hoffman, S. A., A commentary on the advantages and limitations of synthetic polymer-biomolecule conjugates. In *Biorelated Polymers and Gels* Academic Press: New York, 1998; pp 231-248.
50. Peppas, N. A.; Huang, Y.; Torres-Lugo, M.; Ward, J. H.; Zhang, J., Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2000**, 2, 9-29.
51. Jeong, S. H.; Huh, K. M.; Park, K., *Polymers in drug delivery*. CRC Press: New York, 2006; p 280.
52. Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F., Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles - Current Possibilities and Future-Trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1995**, 41, (1), 2-13.
53. Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J. R.; Schuber, F., *Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques* (Eds. : Elsevier). Lavoisier: 1993; p 266.
54. Daugherty, A. L.; Mersny, R. J., Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharmaceutical Science & Technology Today* **1999**, 2, (7), 281-287.
55. Fanning, A. S.; Mitic, L. L.; Anderson, J. M., Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *Journal of the American Society of Nephrology* **1999**, 10, (6), 1337-1345.
56. Salamat-Miller, N.; Johnston, T. P., Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 294, (1-2), 201-216.
57. McMartin, C.; Hutchinson, L. E. F.; Hyde, R.; Peters, G. E., Analysis of Structural Requirements for the Absorption of Drugs and Macromolecules from the Nasal Cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1987**, 76, (7), 535-540.

58. Shimoda, N.; Maitani, Y.; Machida, Y.; Nagai, T., Effects of Dose, Ph and Osmolarity on Intranasal Absorption of Recombinant-Human-Erythropoietin in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **1995**, 18, (5), 734-739.
59. Dua, R.; Zia, H.; Needham, T., The influence of tonicity and viscosity on the intranasal absorption of salmon calcitonin in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 147, (2), 233-242.
60. Wu, S. J.; Robinson, J. R., Transport of human growth hormone across Caco-2 cells with novel delivery agents: evidence for P-glycoprotein involvement. *Journal of Controlled Release* **1999**, 62, (1-2), 171-177.
61. Bickel, U.; Yoshikawa, T.; Pardridge, W. M., Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, (1-3), 247-279.
62. Franz, T. J., Percutaneous Absorption - Relevance of Invitro Data. *Journal of Investigative Dermatology* **1975**, 64, (3), 190-195.
63. Agache, P., *Epiderme, poil, glandes sébacées et sudoripares*. Masson: Paris, 1981; p 37.
64. Elias, P. M., Epidermal lipids, membrane and keratinisation. *J. invest. Dermatol* **1981**, 20, 1-19.
65. Barry, B. W., Action of Skin Penetration Enhancers - the Lipid Protein Partitioning Theory. *International Journal of Cosmetic Science* **1988**, 10, (6), 281-293.
66. Kligman, A. M., A Biological Brief on Percutaneous-Absorption. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1983**, 9, (4), 521-560.
67. Vankooten, W.J.; Mali, J. W. H., Significance of Sweat-Ducts in Permeation Experiments on Isolated Cadaverous Human Skin. *Dermatologica* **1966**, 132, (2), 141-&.
68. Chien, Y. W.; Siddiqui, O.; Sun, Y.; Shi, W. M.; Liu, J. C., Transdermal Iontophoretic Delivery of Therapeutic Peptides Proteins .1. Insulin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, 507, 32-51.
69. Maibach, H. I.; Feldmann, R. J.; Milby, T. H.; Serat, W. F., Regional Variation in Percutaneous Penetration in Man - Pesticides. *Archives of Environmental Health* **1971**, 23, (3), 208-&.
70. Scheuple, R.J., Mechanism of Percutaneous Adsorption .I. Routes of Penetration and Influence of Solubility. *Journal of Investigative Dermatology* **1965**, 45, (5), 334-&.
71. Scheuple, R.J.; Blank, I. H.; Brauner, G. J.; Macfarla, D.J., Percutaneous Absorption of Steroids. *Journal of Investigative Dermatology* **1969**, 52, (1), 63-&.
72. Kao, J.; Hall, J.; Helman, G., Invitro Percutaneous-Absorption in Mouse Skin - Influence of Skin Appendages. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1988**, 94, (1), 93-103.
73. Taupin, C., *La physico-chimie des surfactants*. Les éditions de physique: Paris, 1995; p 155.
74. Israelachvili, J. N., *Intramolecular and Surface Forces*. 2nd ed.; Academic press: New York, 1992; p 450.
75. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W., Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **1976**, 72, 1525-1568.
76. Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernas, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. A.; Midha, K. K.; Shah, V. P.; Amidon, G. L., Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics* **2004**, 1, (1), 85-96.
77. Linfield, W. M., *Anionic surfactants*. M. Dekker: New York, 1976; Vol. 7, p 582.
78. Paquet, A., Succinimidyl Esters of Fatty-Acids for Amino-Acid Acylations. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1976**, 54, (5), 733-737.

79. Huang, S. M.; Bisogno, T.; Petros, T. J.; Chang, S. Y.; Zavitsanos, P. A.; Zipkin, R. E.; Sivakumar, R.; Coop, A.; Maeda, D. Y.; De Petrocellis, L.; Burstein, S.; Di Marzo, V.; Walker, J. M., Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (46), 42639-42644.
80. Raccurt-Pinard, M. l'hormone de croissance : une cytokine. lyon, Lyon, 2003.
81. Stevenson, J. C.; Evans, I. M. A., Pharmacology and Therapeutic Use of Calcitonin. *Drugs* **1981**, 21, (4), 257-272.
82. Lapidot, Y.; Rappopor.S; Wolman, Y., Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Synthesis of N-Acylamino Acids. *Journal of Lipid Research* **1967**, 8, (2), 142-&.
83. Shiraham.K; Tsujii, K.; Takagi, T., Free-Boundary Electrophoresis of Sodium Dodecyl Sulfate-Protein Polypeptide Complexes with Special Reference to Sds-Polyacrylamide Gel-Electrophoresis. *Journal of Biochemistry* **1974**, 75, (2), 309-319.
84. Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W., *Circular Dichroism principles and applications*. 2000; p 877.
85. Fasman, G. D., The Measurement of Transmembrane Helices by the Deconvolution of Cd Spectra of Membrane-Proteins - a Review. *Biopolymers* **1995**, 37, (5), 339-362.
86. Greenfield, N. J., Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry* **1996**, 235, (1), 1-10.
87. Johnson, W. C., Protein Secondary Structure and Circular-Dichroism - a Practical Guide. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1990**, 7, (3), 205-214.
88. Cascio, M.; Wallace, B. A., Effects of Local Environment on the Circular-Dichroism Spectra of Polypeptides. *Analytical Biochemistry* **1995**, 227, (1), 90-100.
89. Shibata, A.; Yamamoto, M.; Yamashita, T.; Chiou, J. S.; Kamaya, H.; Ueda, I., Biphasic Effects of Alcohols on the Phase-Transition of Poly(L-Lysine) between Alpha-Helix and Beta-Sheet Conformations. *Biochemistry* **1992**, 31, (25), 5728-5733.
90. Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. E., Left-Handed Polyproline-Ii Helices Commonly Occur in Globular-Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1993**, 229, (2), 472-493.
91. Griebenow, K.; Santos, A. M.; Carrasquillo, K. G., Secondary structure of proteins in the amorphous dehydrated state probed by FTIR spectroscopy. *The internet journal of vibrational spectroscopy* **1999**, 3, (1).
92. Siligardi, G.; Samori, B.; Melandri, S.; Visconti, M.; Drake, A. F., Correlations between Biological-Activities and Conformational Properties for Human, Salmon, Eel, Porcine Calcitonins and Elcatonin Elucidated by Cd Spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 221, (3), 1117-1125.
93. Wagner, K.; Van Mau, N.; Boichot, S.; Kajava, A. V.; Krauss, U.; Le Grimmellec, C.; Beck-Sickinger, A.; Heitz, F., Interactions of the human calcitonin fragment 9-32 with phospholipids: A monolayer study. *Biophysical Journal* **2004**, 87, (1), 386-395.
94. Wong, P.-Z., *Methods in the physics of porous media*. Academic Press: London, 1999; Vol. 35.
95. Dautzenberg, H.; Gohlke, U.; Rother, G.; Otto, A.; Hartmann, J., Classical Light-Scattering-Studies on Structure Formation in Polymer-Solutions. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia* **1992**, 58, 81-98.
96. Janmey, P. A., *Dynamic Light Scattering The Method and Some Applications*. Oxford University Press: London, 1993; p 752.
97. Takeda, K.; Sasaoka, H.; Sasa, K.; Hirai, H.; Hachiya, K.; Moriyama, Y., Size and Mobility of Sodium Dodecyl-Sulfate Bovine Serum-Albumin Complex as Studied by Dynamic Light-Scattering and Electrophoretic Light-Scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, 154, (2), 385-392.

98. Tanner, R. E.; Hergigny, B.; Chen, S. H.; Rha, C. K., Conformational Change of Protein Sodium Dodecyl-Sulfate Complexes in Solution - a Study of Dynamic Light-Scattering. *Journal of Chemical Physics* **1982**, 76, (8), 3866-3872.
99. Abragam, A., *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford: London, 1983; p 614.
100. Davis, J. H., The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by H-2-Nmr. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1983**, 737, (1), 117-171.
101. Seelig, J., Deuterium Magnetic-Resonance - Theory and Application to Lipid-Membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1977**, 10, (3), 353-418.
102. Kastler, B., *Comprendre l'IRM : Manuel d'auto-apprentissage*. Broché: Issyl-Les-Moulinaux, 2006; p 370.
103. Ernst, R. R., Nuclear-Magnetic-Resonance Fourier-Transform Spectroscopy. *Bioscience Reports* **1992**, 12, (3), 143-187.
104. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin Diffusion Measurements - Spin Echoes in Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *Journal of Chemical Physics* **1965**, 42, (1), 288-&.
105. Johnson, C. S., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1999**, 34, (3-4), 203-256.
106. Price, W. S., Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion .1. Basic theory. *Concepts in Magnetic Resonance* **1997**, 9, (5), 299-336.
107. Paddy, M. R.; Dahlquist, F. W.; Davis, J. H.; Bloom, M., Dynamical and Temperature-Dependent Effects of Lipid-Protein Interactions - Application of Deuterium Nuclear Magnetic-Resonance and Electron-Paramagnetic Resonance Spectroscopy to the Same Reconstitutions of Cytochrome-C-Oxidase. *Biochemistry* **1981**, 20, (11), 3152-3162.
108. Leach, A. R., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. England, 2001.
109. Grubmuller, H.; Heller, H.; Windemuth, A.; Schulten, K., Generalized Verlet algorithm for efficient molecular dynamics simulations with long range interactions. *Molecular Simulations* **1991**, 121-142.
110. Izaguirre, J. A.; Catarella, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D., Langevin stabilization of molecular dynamics. *Journal of Chemical Physics* **2001**, 114, (5), 2090-2098.
111. Lennard-Jones, J. E., *Proc. Roy. Soc.* **1924**, 463.
112. Werner, U.; Kissel, T., In-vitro cell culture models of the nasal epithelium: A comparative histochemical investigation of their suitability for drug transport studies. *Pharmaceutical Research* **1996**, 13, (7), 978-988.
113. Yang, T. Z.; Hussain, A.; Paulson, J.; Abbruscato, T. J.; Ahsan, F., Cyclodextrins in nasal delivery of low-molecular-weight heparins: In vivo and in vitro studies. *Pharmaceutical Research* **2004**, 21, (7), 1127-1136.
114. Patton, J. S.; Platz, R. M., Penetration Enhancement for Polypeptides through Epithelia .D. Routes of Delivery - Case-Studies .2. Pulmonary Delivery of Peptides and Proteins for Systemic Action. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1992**, 8, (2-3), 179-196.
115. Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N., Models of Stratum-Corneum Intercellular Membranes - H-2 Nmr of Macroscopically Oriented Multilayers. *Biophysical Journal* **1994**, 67, (4), 1562-1573.
116. Nakamura, F.; Ohta, R.; Machida, Y.; Nagai, T., In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, 134, (1-2), 173-181.
117. Baldwin, P. A.; Klingbeil, C. K.; Grimm, C. J.; Longenecker, J. P., The Effect of Sodium Tauro-24,25-Dihydrofusidate on the Nasal Absorption of Human Growth-Hormone in 3 Animal-Models. *Pharmaceutical Research* **1990**, 7, (5), 547-552.

118. Hedin, L.; Olsson, B.; Diczfalusy, M.; Flyg, C.; Petersson, A. S.; Rosberg, S.; Albertssonwikland, K., Intranasal Administration of Human Growth-Hormone (Hgh) in Combination with a Membrane Permeation Enhancer in Patients with Gh Deficiency - a Pharmacokinetic Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1993**, 76, (4), 962-967.
119. Laursen, T.; Grandjean, B.; Jorgensen, J. O. L.; Christiansen, J. S., Bioavailability and bioactivity of three different doses of nasal growth hormone (GH) administered to GH-deficient patients: Comparison with intravenous and subcutaneous administration. *European Journal of Endocrinology* **1996**, 135, (3), 309-315.
120. Calis, S.; Jeyanthi, R.; Tsai, T.; Mehta, R. C.; Deluca, P. P., Adsorption of Salmon-Calcitonin to Plga Microspheres. *Pharmaceutical Research* **1995**, 12, (7), 1072-1076.
121. Martin, E.; Verhoef, J. C.; Romeijn, S. G.; Merkus, F., Effects of Absorption Enhancers on Rat Nasal Epithelium in-Vivo - Release of Marker Compounds in the Nasal Cavity. *Pharmaceutical Research* **1995**, 12, (8), 1151-1157.
122. Toth, I., A Novel Chemical Approach to Drug-Delivery - Lipidic Amino-Acid Conjugates. *Journal of Drug Targeting* **1994**, 2, (3), 217-239.
123. Pignatello, R.; Jansen, G.; Kathmann, I.; Puglisi, G.; Toth, I., Lipoamino acid conjugates of methotrexate with antitumor activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 87, (3), 367-371.
124. Campbell, I. D.; Dwek, R. A., *Biological Spectroscopy*. Benjamin-Cummings Publishing Company: Menlo Park, 1984; Vol. 1, p 404.
125. Castano, S.; Desbat, B.; Laguerre, M.; Dufourcq, J., Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj(i=2j) peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1999**, 1416, (1-2), 176-194.
126. Castano, S.; Desbat, B.; Dufourcq, J., Ideally amphipathic beta-sheeted peptides at interfaces: structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL)(m)K peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2000**, 1463, (1), 65-80.
127. Sreerama, N.; Woody, R. W., Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* **2000**, 287, (2), 252-260.
128. Werner, U.; Kissel, T., Development of a Human Nasal Epithelial-Cell Culture Model and Its Suitability for Transport and Metabolism Studies under in-Vitro Conditions. *Pharmaceutical Research* **1995**, 12, (4), 565-571.
129. Ribela, M.; Murata, Y.; Morganti, L.; Toniolo, D.; Bartolini, P., The Use of Recombinant Human Growth-Hormone for Radioiodination and Standard Preparation in Radioimmunoassay. *Journal of Immunological Methods* **1993**, 159, (1-2), 269-274.
130. Pujara, C. P.; Shao, Z. Z.; Duncan, M. R.; Mitra, A. K., Effects of Formulation Variables on Nasal Epithelial-Cell Integrity - Biochemical Evaluations. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, 114, (2), 197-203.
131. Gerova, M.; Rodrigues, F.; Lamere, J. F.; Dobrev, A.; Fery-Forgues, S., Self-assembly properties of some chiral N-palmitoyl amino acid surfactants in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 319, (2), 526-533.
132. Roy, S.; Dey, J., Effect of hydrogen-bonding interactions on the self-assembly formation of sodium N-(11-acrylamidoundecanoyl)-L-serinate, L-asparaginate, and L-glutamate in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 307, (1), 229-234.
133. Andersen, K. K.; Oliveira, C. L.; Larsen, K. L.; Poulsen, F. M.; Callisen, T. H.; Westh, P.; Pedersen, J. S.; Otzen, D., The Role of Decorated SDS Micelles in Sub-CMC Protein Denaturation and Association. *Journal of Molecular Biology* **2009**, 391, (1), 207-226.

134. Motta, A.; Pastore, A.; Goud, N. A.; Morelli, M. A. C., Solution Conformation of Salmon-Calcitonin in Sodium Dodecyl-Sulfate Micelles as Determined by 2-Dimensional Nmr and Distance Geometry Calculations. *Biochemistry* **1991**, 30, (43), 10444-10450.
135. Sexton, P. M.; Findlay, D. M.; Martin, T. J., Calcitonin. *Current Medicinal Chemistry* **1999**, 6, (11), 1067-1093.
136. Epand, R. M.; Epand, R. F.; Orłowski, R. C.; Schlueter, R. J.; Boni, L. T.; Hui, S. W., Amphipathic Helix and Its Relationship to the Interaction of Calcitonin with Phospholipids. *Biochemistry* **1983**, 22, (22), 5074-5084.
137. Keller, R. C. A.; Killian, J. A.; Dekruiff, B., Anionic Phospholipids Are Essential for Alpha-Helix Formation of the Signal Peptide of Prephoe Upon Interaction with Phospholipid-Vesicles. *Biochemistry* **1992**, 31, (6), 1672-1677.
138. Montserret, R.; McLeish, M. J.; Bockmann, A.; Geourjon, C.; Penin, F., Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding. *Biochemistry* **2000**, 39, (29), 8362-8373.
139. Yonath, A.; Sielecki, A.; Moul, J.; Podjarny, A.; Traub, W., Crystallographic Studies of Protein Denaturation and Renaturation .1. Effects of Denaturants on Volume and X-Ray Pattern of Cross-Linked Triclinic Lysozyme Crystals. *Biochemistry* **1977**, 16, (7), 1413-1417.
140. Chien, Y. W., *Novel Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker: New York, 1992; Vol. 50, p 779.
141. Choi, M. J.; Maibach, H. I., Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *American Journal of Clinical Dermatology* **2005**, 6, (4), 215-223.
142. Lampe, M. A.; Williams, M. L.; Elias, P. M., Human Epidermal Lipids - Characterization and Modulations During Differentiation. *Journal of Lipid Research* **1983**, 24, (2), 131-140.
143. Weerheim, A.; Ponc, M., Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of Dermatological Research* **2001**, 293, (4), 191-199.
144. Rowat, A. C.; Kitson, N.; Thewalt, J. L., Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by H-2 NMR. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 307, (2), 225-231.
145. Touitou, E.; Godin, B.; Karl, Y.; Bujanover, S.; Becker, Y., Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. *Journal of Controlled Release* **2002**, 80, (1-3), 1-7.
146. Ghadially, R.; Halkiersorensen, L.; Elias, P. M., Effects of Petrolatum on Stratum-Corneum Structure and Function. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1992**, 26, (3), 387-396.
147. Davis, J. H.; Jeffrey, K. R.; Bloom, M.; Valic, M. I.; Higgs, T. P., Quadrupolar Echo Deuteron Magnetic-Resonance Spectroscopy in Ordered Hydrocarbon Chains. *Chemical Physics Letters* **1976**, 42, (2), 390-394.
148. Bloom, M.; Burnell, E. E.; Mackay, A. L.; Nichol, C. P.; Valic, M. I.; Weeks, G., Fatty Acyl Chain Order in Lecithin Model Membranes Determined from Proton Magnetic-Resonance. *Biochemistry* **1978**, 17, (26), 5750-5762.
149. Jarrell, H. C.; Byrd, R. A.; Smith, I. C. P., Analysis of the Composition of Mixed Lipid Phases by the Moments of H-2 Nmr-Spectra. *Biophysical Journal* **1981**, 34, (3), 451-463.
150. Bouwstra, J. A.; Thewalt, J.; Gooris, G. S.; Kitson, N., A model membrane approach to the epidermal permeability barrier: An X-ray diffraction study. *Biochemistry* **1997**, 36, (25), 7717-7725.

151. Ruocco, M. J.; Shipley, G. G., Interaction of Cholesterol with Galactocerebroside and Galactocerebroside-Phosphatidylcholine Bilayer-Membranes. *Biophysical Journal* **1984**, 46, (6), 695-707.
152. Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponc, M., New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **2001**, 14, 52-62.
153. Lindblom, G.; Rilfors, L., Cubic Phases and Isotropic Structures Formed by Membrane-Lipids - Possible Biological Relevance. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1989**, 988, (2), 221-256.
154. Christians, U.; Jacobsen, W.; Serkova, N.; Benet, L. Z.; Vidal, C.; Sewing, K. F.; Manns, M. P.; Kirchner, G. I., Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2000**, 748, (1), 41-53.
155. Duncan, J. I.; Payne, S. N. L.; Winfield, A. J.; Ormerod, A. D.; Thomson, A. W., Enhanced Percutaneous-Absorption of a Novel Topical Cyclosporine-a Formulation and Assessment of Its Immunosuppressive Activity. *British Journal of Dermatology* **1990**, 123, (5), 631-640.
156. Choi, H. K.; Flynn, G. L.; Amidon, G. L., Percutaneous-Absorption and Dermal Delivery of Cyclosporine-A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, 84, (5), 581-583.
157. Gilhar, A.; Winterstein, G.; Golan, D. T., Topical Cyclosporine in Psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1988**, 18, (2), 378-379.
158. Griffiths, C. E. M.; Powles, A. V.; Baker, B. S.; Fry, L.; Valdimarsson, H., Topical Cyclosporine and Psoriasis. *Lancet* **1987**, 1, (8536), 806-806.
159. Eltayar, N.; Mark, A. E.; Vallat, P.; Brunne, R. M.; Testa, B.; Vangunsteren, W. F., Solvent-Dependent Conformation and Hydrogen-Bonding Capacity of Cyclosporine-a - Evidence from Partition-Coefficients and Molecular-Dynamics Simulations. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, 36, (24), 3757-3764.
160. Guo, J. X.; Ping, Q. N.; Sun, G. Q.; Jiao, C. H., Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 194, (2), 201-207.
161. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum-Corneum. *Journal of Investigative Dermatology* **1987**, 88, (6), 714-718.
162. Andersen, F. A., Final report of the safety assessment of urea. *International Journal of Toxicology* **2005**, 24, 1-56.
163. Loden, M.; Andersson, A. C.; Anderson, C.; Bergbrant, I. M.; Frodin, T.; Ohman, H.; Sandstrom, M. H.; Sarnhult, T.; Voog, E.; Stenberg, B.; Pawlik, E.; Preisler-Haggqvist, A.; Svensson, A.; Lindberg, M., A double-blind study comparing the effect of glycerin and urea on dry, eczematous skin in atopic patients. *Acta Dermato-Venereologica* **2002**, 82, (1), 45-47.
164. Guyon, E.; Hulin, J.-P.; Petit, L., *Hydrodynamique physique* Broché: Paris, 2001; p 680.