THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre (ED 388)

Présentée par

Anjali SETH

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

EFFET DE LA RÉTENTION MAGNÉTIQUE SUR LE PASSAGE D'UN PRINCIPE ACTIF PEU PERMÉABLE À TRAVERS LA MEMBRANE INTESTINALE

Soutenue le 5 Décembre 2014

Devant un jury composé de :

Mr. Jean-Christophe Leroux	*Rapporteur*
Mr. Jean-Marie Devoisselle	*Rapporteur*
Mme. Florence Gazeau	*Examinatrice*
Mr. Philippe Karoyan	*Examinateur*
Mme. Christine Ménager	*Directrice de thèse*
Mr. David Lafargue	*Encadrant Servier*

Liste des abréviations

Al : alginate

AUC : Area Under Curve, aire sous la courbe extrapolée à l'infini de la concentration en PA dans le plasma en fonction du temps t = 0 à t = ∞ (en ng*h/mL)

AUC_t : Area Under Curve, aire sous la courbe de la concentration en PA dans le plasma en fonction du temps t = 0 à t où C = la limite de quantification (en ng*h/mL)

C_{max} : concentration maximale après administration (en ng/mL)

CS : chitosan

EC : ethylcellulose

f : la biodisponibilité absolue (en %)

FA : la fraction absorbée chez l'Homme (en %)

FeSSIF : Fed State Simulated Intestinal Fluid

FF : ferrofluide

HPLC : High-performance liquid chromatography = chromatographie en phase liquide à haute performance

IR : Infra-rouge

IRM : Imagerie par resonance magnétique

IV : intraveineuse

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MET : Microscopie Électronique à Transmission

Mw : molecular weight, le poids moléculaire (en g/mol)

NPM : nanoparticule magnétique

PA : principe actif

P_{app} : la perméabilité apparente

PLGA : Poly acide lactique co-glycolique

PK : pharmacocinétique

$t_{1/2, z}$: temps de demi-vie (en h)

t_{max} : temps correspondant à la concentration maximale après administration (en h)

TGI : tractus gastro-intestinal

TPP : tripolyphosphate

SQUID : Superconducting QUantum Interference Device

% w/v : % masse/volume (1% w/v = 1 g dans 100 mL)

Sommaire

Introduction générale 1-3

Chapitre I. L'état de l'art 5-61
Partie A. La voie orale 5
1. Anatomie et physiologie digestive chez l'homme 6
1. 1. La membrane intestinale 7
1. 2. Les mécanismes de transports membranaires 8
1. 3. Phase biopharmaceutique 10
1. 4. Phase pharmacocinétique 11
2. Biodisponibilité 11
3. La classification BCS 13
3. 1. Les différentes classes 13
3. 2. Les méthodes de mesure de la perméabilité 14
3. 2. 1. *In vitro* 14
3. 2. 2. *Ex vivo* 15
3. 2. 3. *In situ* 16
4. Les principes actifs faiblement absorbés 17
4. 1. Les stratégies d'amélioration 17
4. 2. Les systèmes gastro-rétentifs 18
4. 2. 1. Les systèmes mucoadhésifs 19
4. 2. 2. Les systèmes flottants ou à haute densité 20
4. 2. 3. Les systèmes gonflants 20
4. 2. 3. Les systèmes gonflants 20
4. 2. 4. Les systèmes magnétiques 20
Partie B. Les nanoparticules magnétiques 23
1. Synthèse et dispersion des nanoparticules d'oxyde de fer 24
1. 1. Synthèse 24
1. 2. Dispersion 25
2. Propriétés magnétiques des ferrofluides 26
3. Applications des NPMs en imagerie et vectorisation 29
3. 1. Vectorisation magnétique 29
3. 2. Contraste en imagerie 30
Partie C. Formulations magnétiques pour la voie orale 33
1. Imagerie du tractus gastro-intestinal 34
1. 1. « Magnetic Marker Monitoring » 34
1. 2. Capteurs à effet Hall 39
1. 3. Résonance magnétique 43
2. Rétention magnétique pour la voie orale 46
2. 1. Rétention magnétique dans l'œsophage 46
2. 2. Rétention magnétique dans l'estomac 48
2. 1. Rétention magnétique dans l'intestin 50
Bibliographie **..... 54**

Chapitre II. Mise au point de formes magnétiques pour la voie orale 63-118

1. Choix des formulations 64
1. 1. Le principe actif modèle.....64
1. 2. Les nanoparticules magnétiques de maghémite 65
1. 3. Contraintes expérimentales 67
1. 4. Caractérisations des formes galéniques.....68
1. 4. 1. Caractérisations physico-chimiques 68
1. 4. 2. Caractérisations magnétiques 68
2. Billes millimétriques magnétiques de biopolymère 69
2. 1. Utilisations courantes 69
2. 2. Billes d'alginate magnétiques 70
2. 2. 1. Mise au point des billes AL 2,5-2,5-10 70
2. 2. 2. Caractérisation des billes AL 2,5-2,5-10.....71
2. 3. Billes de chitosan magnétiques 73
2. 3. 1. Mise au point des billes CS 5-5-10 74
2. 3. 2. Caractérisation des billes CS 5-5-10 74
2. 4. Billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques.....77
2. 4. 1. Mise au point des billes CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0.....77
2. 4. 2. Caractérisation des billes CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0.....78
2. 4. 3. Mise au point des billes CS@Al 5-10-50.....83
2. 4. 4. Caractérisation des billes CS@Al 5-10-50.....84
2. 4. 5. Mise au point des billes CS@Al 5-10-50 fluo 86
2. 4. 6. Caractérisation des billes CS@Al 5-10-50 fluo 86
3. Mini-granules magnétique à l'échelle pilote 88
3. 1. Montage en lit d'air fluidisé 89
3. 1. 1. Mini-granules magnétiques à deux couches, ASP5 91
3. 1. 1. 1. Mise au point des mini-granules ASP5 91
3. 1. 1. 2. Caractérisation des mini-granules ASP5.....91
3. 1. 2. Mini-granules magnétiques à quatre couches, ASP6 94
3. 1. 2. 1. Mise au point des mini-granules ASP6 94
3. 1. 2. 2. Caractérisation des mini-granules ASP6.....95
3. 1. 3. Comparaison.....98
3. 2. Extrusion-sphéronisation.....100
3. 2. 1. Granules magnétiques à deux couches, ASP10.....101
3. 2. 1. 1. Mise au point des mini-granules ASP10 102
3. 2. 1. 2. Caractérisation des mini-granules ASP10.....103
3. 2. 2. Mini-granules magnétiques à une couche, ASP7 et ASP8.....106
3. 2. 2. 1. Mise au point des mini-granules ASP7 107
3. 2. 2. 2. Caractérisation des mini-granules ASP7.....107
3. 2. 2. 3. Mise au point des mini-granules ASP8 110
3. 2. 2. 4. Caractérisation des mini-granules ASP8.....110
3. 2. 3. Comparaison.....112
4. Conclusion.....114
***Bibliographie* 116**

Chapitre III. Études *ex vivo*.....119-144
1. Mise en place des études *ex vivo* 120
1. 1. Essais en Cellules de Ussing 120
1. 2. Limitations expérimentales 121

1. 3. Design expérimental....122
2. Cellules de Ussing sur membrane buccale de porc....124
2. 1. Conception de l'essai....124
2. 2. Force magnétique de l'aimant....125
2. 3. Limitations de l'essai....126
3. Cellules de Ussing sur membrane intestinale de rat....127
3. 1. Conception de l'essai....127
3. 2. Manipulation....127
3. 3. Jéjunum de rat « stripé »....129
3. 4. Surconcentration du PA....131
3. 5. Viabilité membranaire....132
3. 6. Corrélation Perméabilité apparente-Fraction absorbée....134
3. 7. Jéjunum de rat « non stripé »....136
4. Essais *ex vivo* sur mini-granules pelliculées....137
5. Force magnétique....140
6. Conclusion....142
***Bibliographie*....143**

Chapitre IV. Études *in vivo*....145-206
1. Mise en place des études *in vivo*....146
1. 1. Positionnement de l'aimant....146
1. 2. Administration des billes....147
2. Suivi par imagerie de l'efficacité de la rétention magnétique....148
2. 1. IRM....148
2. 2. Fluorescence dans le proche infra-rouge....150
3. Étude pharmacocinétique et études de toxicité chez le rat....151
3. 1. Prélèvements sanguins....151
3. 2. Accumulation de fer dans les organes....152
3. 3. Coupes histologiques....152
4. Les études *in vivo*....153
4. 1. Étude n° 1 : PA libre *vs* Billes CS@Al 5-5-10....154
4. 2. Étude n° 2 : Billes CS@Al 5-10-50 humides....156
4. 3. Étude n° 3 : Billes CS@Al 5-10-50 sèches, Avec *vs* Sans Aimant....161
4. 4. Étude n° 4 : Billes CS 5-10-50 sèches, Avec *vs* Sans Aimant....169
4. 5. Étude n° 5 : Billes CS@Al 5-10-50 sèches, Mise à jeun totale....179
4. 6. Étude n°6 : Mini-granules magnétiques....182
4. 6. 1. ASP7 25%....183
4. 6. 2. ASP8 100%....185
4. 6. 3. ASP10 25%....187
5. Étude de toxicité....190
5. 1. Accumulation des NPMs dans les organes....191
5. 2. Coupes histologiques....192
6. Comparaison générale des essais *in vivo*....194
6. 1. Efficacité de la rétention magnétique....195
6. 2. Cinétique de libération du PA....201
***Bibliographie*....205**

Conclusions générales et perspectives....207-210

ANNEXES 211-252
Annexe 1 : Synthèse des nanoparticules de maghémite 211
Annexe 2 : Préparation des billes de biopolymères 215
Annexe 3 : Caractérisations physico-chimiques des formes magnétiques 219
Annexe 4 : Caractérisations magnétiques des formes magnétiques 225
Annexe 5 : Fabrication de billes magnétiques en process 230
Annexe 6 : Cellules de Ussing 236
Annexe 7 : Hébergement, Soins et Manipulations sur les rats Wistar 243
Annexe 8 : Imagerie 247

Introduction générale

Introduction Générale

La voie orale est le mode d'administration le plus utilisé pour les médicaments. Ce mode d'administration présente de nombreux avantages tels que la facilité d'administration et une grande observance par les patients. En revanche, cette voie présente le désavantage d'utiliser le tractus gastro-intestinal (TGI) pour faire circuler les médicaments. Les molécules actives (ou principes actifs, PAs) contenues dans les formulations doivent donc d'abord être libérées dans le TGI avant de traverser les membranes biologiques pour rejoindre la circulation sanguine. Une fois dans la circulation sanguine, les molécules actives vont pouvoir atteindre leur site d'action. Lors d'une administration par voie intraveineuse (IV), la première étape de mise à disposition du PA dans le sang à partir d'une forme galénique circulant dans le TGI est évitée. En effet, les formulations sont administrées directement dans la circulation sanguine. Une des principales limitations de l'utilisation de la voie orale pour l'administration de molécules actives est donc le passage des membranes biologiques. C'est cette étape de passage transmembranaire qui détermine la biodisponibilité de la molécule active. La biodisponibilité représente la fraction de la dose de PA administrée capable d'atteindre son site d'action. La biodisponibilité est de 100 % dans le cas d'une administration par voie IV, mais peut être très faible pour une administration par voie orale. Avoir une biodisponibilité élevée est la condition nécessaire pour pouvoir développer une formulation utilisée par voie orale. Cela évite, en effet, des pertes en matières premières trop importantes entraînant un coût élevé et des administrations répétées. De nombreuses molécules présentent une activité thérapeutique intéressante mais leur développement galénique n'est pas envisageable du fait de leur biodisponibilité trop faible.

De nombreux PAs sont faiblement absorbés en raison de leurs propriétés physico-chimiques, de l'existence d'une zone de passage transmembranaire préférentielle dans le TGI (fenêtre d'absorption) ou de leur dégradation potentielle dans l'estomac. C'est le cas du PA modèle choisi pour ce travail de thèse, dont la perméabilité membranaire est faible. Cette molécule passe dans la circulation sanguine uniquement au niveau du début de l'intestin grêle. Dans les formulations classiques, le PA est libéré au niveau de l'estomac puis circule dans l'intestin sous l'effet des forces de digestion. Par conséquent une grande partie du PA est perdue à

partir du moment où la zone de passage transmembranaire est dépassée. Travailler sur des formes galéniques capables de s'adresser à ce type de molécules peu perméables afin d'en améliorer la biodisponibilité reste donc un défi.

Différentes stratégies peuvent être envisagées. On s'intéressera plus particulièrement aux stratégies « physiques » de rétention des formulations contenant le PA et permettant d'augmenter le temps de résidence des médicaments dans le TGI. Ces formes sont le plus souvent gastro-rétentives, c'est-à-dire qu'elles sont retenues au niveau de l'estomac, permettant ainsi au PA d'être libéré progressivement au début de l'intestin et ce, sur des durées prolongées, permettant à une plus grande partie du PA d'être absorbée. Différentes formulations gastro-rétentives existent, par exemple, les formes muco-adhésives, les formes flottantes ou les formes gonflantes.

Dans ce travail, l'effet de la rétention magnétique a été étudié sur le passage d'un PA peu perméable à travers la membrane intestinale. Nous avons cherché à prouver que le fait de retenir, à l'aide d'un aimant, une formulation magnétique contenant un PA peu perméable, à proximité de son site d'absorption dans la circulation sanguine, permettrait d'en augmenter le passage à travers la membrane biologique et ainsi d'en améliorer la biodisponibilité (Figure Introduction).

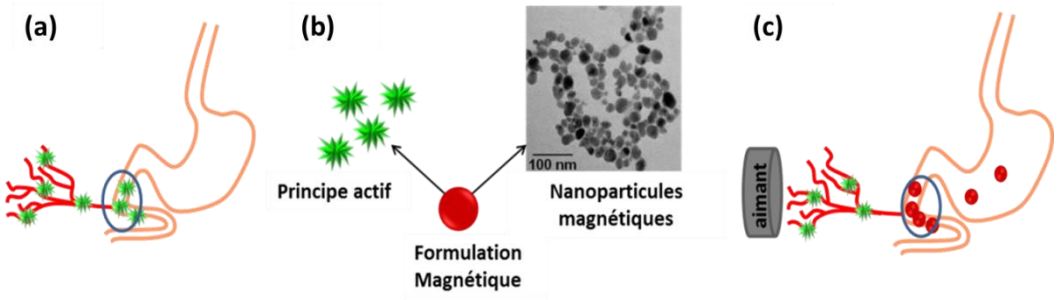


Figure Introduction : Principe de la rétention magnétique, (a) augmentation du passage du principe actif (✸) lors de la rétention de celui-ci à proximité de son site d'absorption○, (b) formulation magnétique contenant un principe actif (✸) et des nanoparticules magnétiques (●) et (c) augmentation du passage du principe actif (✸) lors de l'utilisation de la rétention magnétique.

Le chapitre I présentera un état de l'art reprenant les problématiques de la délivrance de médicaments par voie orale, les différentes propriétés des nanoparticules magnétiques ainsi que les systèmes magnétiques développés pour l'imagerie des forces de digestion et l'amélioration de la biodisponibilité par vectorisation magnétique. Le chapitre II résumera les différentes formulations magnétiques mises au point au laboratoire et à l'échelle pilote ainsi que leurs caractérisations physico-chimiques et magnétiques. Puis dans le chapitre III, leur utilisation comme modèles de la rétention magnétique lors d'expériences *ex vivo* en cellule de Ussing seront décrites et leur capacité d'amélioration du passage du PA à travers les membranes sera évalué. Dans le chapitre IV, l'amélioration de la biodisponibilité du PA grâce à l'utilisation de la rétention magnétique sera étudiée *in vivo* chez le rat, grâce à des techniques pharmacocinétiques. Au cours de cette thèse, une méthodologie d'imagerie a été développée afin de suivre l'effet de la rétention magnétique sur la circulation des formulations dans le TGI.

Chapitre I.

État de l’art

Chapitre I.
L'ÉTAT DE L'ART

Partie A. La voie orale

La voie orale est la voie d'administration de choix des médicaments. Elle présente de nombreux avantages car elle permet une bonne observance et l'acceptabilité par le patient du fait de sa possibilité d'auto-administration sans douleur. La voie orale utilise le tractus gastro-intestinal (TGI) pour introduire les molécules actives, généralement formulées dans une forme solide (comprimé, gélule…) dans l'organisme. Après l'administration orale, la molécule active ou principe actif (PA) doit dans un premier temps se solubiliser, puis être absorbé à travers la membrane intestinale, le plus souvent au niveau de l'intestin grêle, pour atteindre la circulation générale afin de promouvoir son effet pharmacologique. Une fois dans le sang, la substance active est d'abord transportée par la veine porte vers le foie avant d'atteindre la circulation générale et de rejoindre son site d'action [1]. Pour présenter un potentiel thérapeutique intéressant, une molécule active doit donc être capable d'être solubilisée en milieu aqueux puis de traverser une muqueuse (stomacale, intestinale) afin de rejoindre la circulation sanguine générale pour atteindre son lieu d'action. Ces membranes, principaux lieux d'absorption lors de l'administration par voie orale, constituent donc les barrières qu'il est nécessaire de franchir pour obtenir une bonne efficacité des molécules, c'est-à-dire une biodisponibilité élevée du PA. Le potentiel thérapeutique des principes actifs est limité leurs propriétés physicochimiques qui déterminent leur solubilité et leur perméabilité, c'est-à-dire leur capacité à traverser ces membranes. Dans le cadre des PAs administrés par voie orale, il existe une classification BCS (Biopharmaceutical Classification System) introduite en 1995 par G. L. Amidon qui classe chaque substance active selon sa solubilité dans l'eau et ses caractéristiques de perméabilité membranaire [2]. Différents modèles permettent de caractériser la perméabilité membranaire des PAs. Ces méthodes, *in vitro*, *ex vivo* ou *in situ* font partie des premières étapes d'évaluation de l'efficacité potentielle des médicaments [3,4]. En théorie, la physiologie du tractus gastro-intestinale (TGI), de par sa très grande surface

d'échange, sa vascularité et sa flore riche, favorise l'absorption des PAs et donc leur bonne biodisponibilité. Cependant, cette biodisponibilité par voie orale reste souvent faible et variable en raison de la complexité du processus d'absorption à travers le TGI influencé par le pH, la motilité intestinale et l'activité enzymatique et bien sûr les propriétés physico-chimiques de l'actif. Différentes stratégies galéniques existent afin d'améliorer la biodisponibilité des PAs administrés par voie orale, notamment des stratégies de rétention des formes dans l'estomac, dites gastro-rétentives, qui, combinées à une cinétique de libération du PA retardée, sont destinées à augmenter le temps de contact de ces PAs avec la membrane digestive où ils sont absorbés et donc à améliorer leur biodisponibilité.

1. Anatomie et physiologie digestive chez l'homme

La majorité des substances actives sont absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal et plus particulièrement dans la partie haute de l'intestin. En effet, la grande surface d'échange, due aux villosités qui le recouvre, ainsi que la vascularité importante, font de la partie haute du TGI la zone préférentielle de passage des PAs dans la circulation systémique. L'intestin est constitué de l'intestin grêle, du côlon (gros intestin) et se termine par le rectum. L'intestin grêle s'étend du pylore jusqu'à la valvule iléocæcale et mesure, chez l'Homme, 8m de long et 3cm de diamètre en moyenne. Sa composition enzymatique, son pH et les structures spécifiques de sa muqueuse, paramètres intervenant dans la capacité d'absorption des molécules actives, varient tout au long du TGI. Trois parties, le duodénum, le jéjunum et l'iléon constituent l'intestin grêle. L'absorption des PAs est plus importante au niveau du jéjunum et de l'iléon grâce à la présence de plis circulaires, de nombreuses villosités et microvillosités, augmentant la surface d'échange. Les villosités sont très vascularisées par les systèmes sanguins et lymphatiques (Figure I-1). Le pH du jéjunum est compris entre 6,1 et 7,1 tandis que celui de l'iléon est compris entre 7 et 8 [5,6].

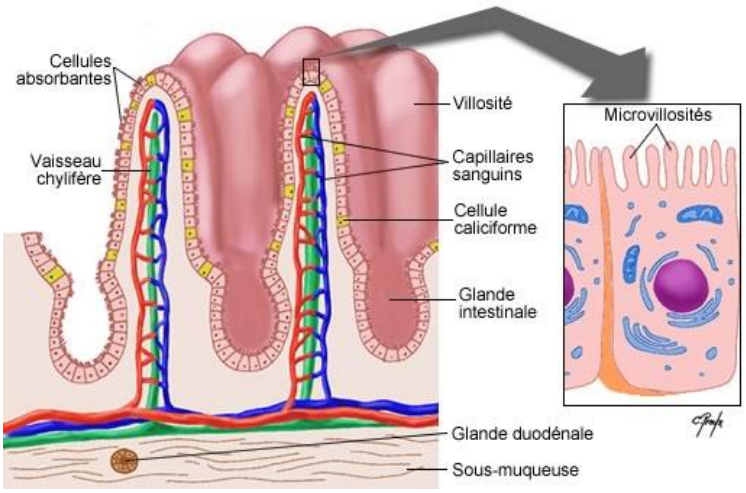


Figure I-1 : Physiologie de la muqueuse intestinale, extrait de [6].

1. 1. La membrane intestinale

La membrane intestinale se divise en quatre couches cellulaires distinctes, la muqueuse, la sous-muqueuse, la couche musculaire et la couche séreuse (Figure I-2).

La muqueuse, en contact direct avec la lumière intestinale, est bordée par des cellules épithéliales de différentes natures. On y trouve les entérocytes, responsables de l'absorption par voie sanguine et de la sécrétion d'enzymes spécifiques ; les cellules calciformes ou « goblet cells » qui sont les cellules exocrines sécrétrices de mucus ; les cellules entéro-endocrines, sécrétrices d'hormones ; les cellules de Paneth, qui sont des cellules exocrines productrices d'enzymes qui protègent l'intestin contre les bactéries et les cellules M localisées au niveau des plaques de Peyer, responsables de l'absorption par voie lymphatique. Le mucus sécrété protège l'intestin contre les agents pathogènes, les toxines ainsi que les particules se trouvant dans l'environnement. Il joue également le rôle de lubrifiant permettant le transport du chyme de l'intestin grêle jusqu'au colon. La sous-muqueuse intestinale est un tissu conjonctif dense qui soutient la muqueuse. Elle est composée de vaisseaux sanguins et lymphatiques et du plexus sous-muqueux de Meissner riche en fibres nerveuses et élastiques jouant un rôle dans la régulation de la contraction des muscles lisses de la muqueuse. La musculeuse ou *muscularis externa* est composée de deux couches musculaires de fibres lisses, une couche interne, épaisse avec des muscles circulaires qui influent sur le diamètre du tube digestif et une couche externe, mince, avec des muscles longitudinaux qui influent sur la longueur du tube digestif. Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux myentérique

d'Auerbach coordonnant la segmentation et le péristaltisme, autrement dit le mélange et de la propulsion du chyme dans le tube digestif. La séreuse, recouvrant la musculeuse, est constituée de tissu conjonctif lâche et forme le péritoine viscéral. Elle constitue une couche protectrice.

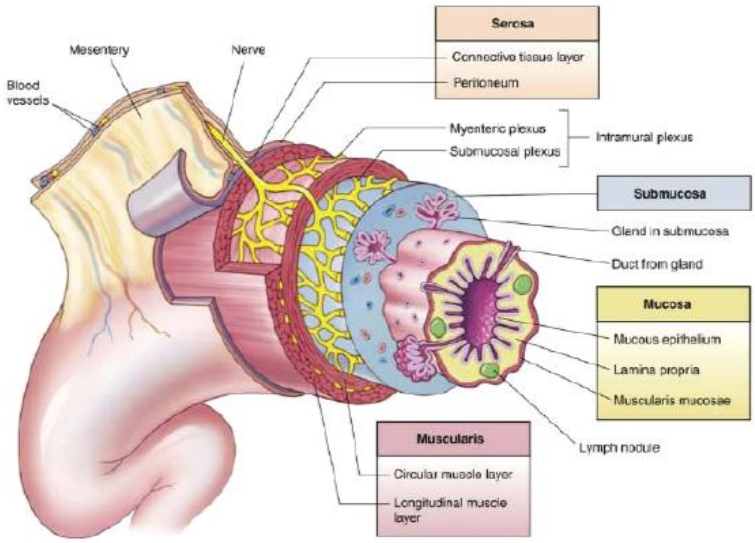


Figure I-2 : Anatomie du tractus gastro-intestinale, extrait de [6].

Les membranes que le médicament doit franchir pour rejoindre la circulation générale sont l'épithélium digestif (la muqueuse) et l'endothélium vasculaire (la sous-muqueuse).

1. 2. Les mécanismes de transport membranaire

La membrane intestinale constitue une barrière sélective pour le passage des molécules actives. Ce sont les entérocytes qui sont responsables de l'absorption selon deux voies, la voie sanguine et la voie lymphatique [7]. Parmi ces voies, trois grands types de transport transmembranaire coexistent, le transport paracellulaire, le transport transcellulaire et le passage par voie lymphatique (Figure I-3). Le transport paracellulaire est le transport passif des molécules entre deux cellules intestinales adjacentes au niveau des jonctions serrées. Ces jonctions entre les entérocytes empêchent la diffusion des solutés et des microorganismes. Le passage par voie paracellulaire est restreint à des molécules de petites tailles hydrophiles. Le transport transcellulaire correspond au passage des molécules à travers les cellules intestinales. Il existe trois types de transport transmembranaires, la diffusion passive, le transport actif et le transport cytotique par endocytose. La diffusion passive désigne le

passage d'une substance du milieu où elle est la plus concentrée vers celui où elle l'est moins. Cette voie de transport permet le passage de petites molécules, peu chargées, lipophiles ou amphiphiles, autrement dit qui possèdent une affinité aussi bien avec la membrane plasmique lipidique qu'avec le cytosol aqueux. Le transport actif est, à l'inverse du précédent, un mécanisme qui maintient des concentrations loin de leur état d'équilibre. Ce transport fait intervenir des transporteurs présents au niveau de la membrane plasmique des cellules. La spécificité des transports membranaires impliquent que les molécules actives capables d'emprunter ce passage sont celles présentant des similitudes avec les substrats réels de ces protéines et pompes de transport. Il s'agit majoritairement de molécules hydrophiles et encore une fois de faible poids moléculaire. Le transport cytotique par endocytose désigne une invagination de la membrane plasmique formant une poche dans laquelle une fraction de milieu extracellulaire se trouve emprisonnée avant libération de son contenu dans le milieu intracellulaire. Ce phénomène permet aux macromolécules (protéines, polynucléotides, polysaccharides…) de franchir la membrane. Le transport par voie lymphatique se fait par endocytose via les cellules M recouvrant les plaques de Peyer. Ces entérocytes particuliers ont la capacité de transporter toutes sortes de systèmes particulaires présents au niveau de la lumière intestinale, tels que les micro-organismes et les antigènes puis de les délivrer au niveau du follicule lymphoïde sous-jacent riche en cellules immunocompétentes. Les plaques de Peyer sont effectivement des zones privilégiées de l'immunité intestinale où l'adhérence des pathogènes est facilitée par l'absence de microvillosités et de glycocalix sur les cellules M. Tous les mécanismes détaillés ci-dessus interviennent dans l'absorption de médicaments au cours d'une administration par voie orale. Le transport membranaire se mesure en termes de flux ou de perméabilité apparente (P_{app}).

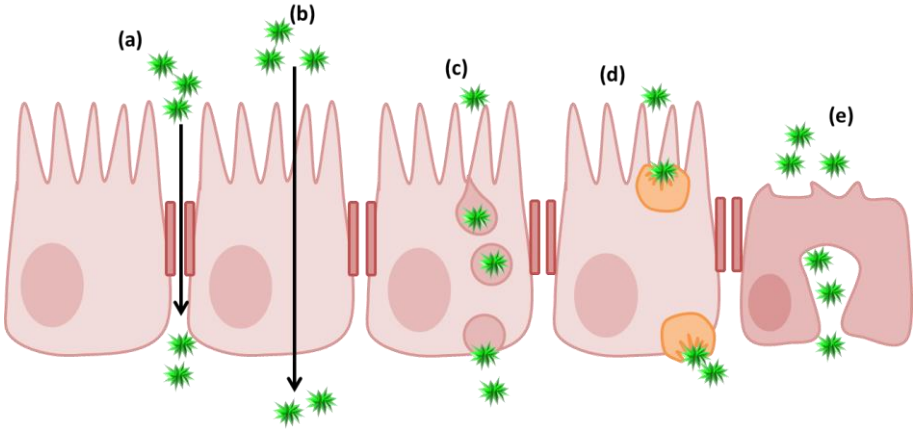


Figure I-3 : Voies de transport intestinal, (a) transport passif paracellulaire, (b) transport passif transcellulaire, (c) transport actif cytotique par endocytose, (d) transport actif membranaire et (d) transport lymphatique par les cellules M, adapté de [7] **et** [8]**.**

1. 3. Phase biopharmaceutique

La phase biopharmaceutique est la phase de mise à disposition du PA contenu dans une forme galénique dans l'organisme. Dans le cas de l'administration par voie orale, elle se compose de deux phases successives, la libération et la dissolution. Lors de la phase de libération, le PA doit être mis à disposition dans l'organisme depuis la forme galénique. Puis, lors de la phase de dissolution, le PA doit être dispersé à l'état de molécules, en milieu aqueux, au niveau du site d'absorption pour pouvoir traverser les membranes biologiques et être absorbé. La forme pharmaceutique (comprimé, gélule, solution, suspension…) choisie lors de l'étape de formulation contrôle la cinétique de libération du PA. Ce profil de libération est un paramètre important devant être adapté au cas de chaque PA et de son site préférentiel d'absorption. La cinétique de libération du PA dans l'organisme peut être choisie dans le but de libérer le PA à un niveau déterminé du tube digestif. C'est le cas des formes gastro-résistantes destinées à résister au suc gastrique et à libérer le PA dès l'arrivée de la formulation dans le suc intestinal ou des formes retard libérant progressivement le PA tout au long de son parcours dans le tube digestif. L'étape de dissolution est déterminée par les caractéristiques de solubilité du PA. La concentration à saturation (ou solubilité) du PA joue alors un rôle important dans la vitesse de dissolution. En effet, plus la différence entre la concentration à saturation et celle du milieu environnant est importante plus la vitesse de dissolution est grande. Ainsi, meilleure est la solubilité, meilleure sera la dissolution dans le fluide environnant et plus la concentration en

PA aux environs de la membrane sera importante, favorisant ainsi le passage du PA dans la circulation sanguine [9–12].

1. 4. Phase pharmacocinétique

La phase pharmacocinétique est la phase se produisant une fois le PA libéré et dissout, c'est-à-dire à la fin de la phase biopharmaceutique. Le PA doit alors atteindre la circulation sanguine systémique de façon à pouvoir atteindre son site d'action. Cette phase pharmacocinétique peut être décrite selon un modèle appelé « ADME », se déroulant en quatre phases, absorption, distribution, métabolisation et élimination. La phase d'absorption est la phase de pénétration du médicament dans la circulation sanguine après avoir traversé les membranes biologiques. La phase de distribution est le moment où le médicament parvient dans le plasma. La phase de métabolisme est l'étape de transformation des médicaments au niveau du foie mais aussi au niveau des poumons et des reins. La phase d'élimination se fait la plupart du temps par les reins afin de provoquer l'excrétion finale du plasma vers l'urine.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons aux stratégies d'amélioration de passage du PA dans l'organisme au niveau de la phase d'absorption. L'augmentation de la dose de PA passée dans la circulation sanguine peut être impactée par une rétention prolongée de la forme. En effet, si le profil de libération du PA est bien contrôlé, le fait de retenir les formes en amont de leur lieu d'absorption permettra d'augmenter le temps de contact entre le PA et la membrane qu'il doit traverser afin de rejoindre la circulation sanguine [9–12].

2. Biodisponibilité

La biodisponibilité se définit comme étant la vitesse et la cinétique de mise à disposition d'une substance active à partir de sa formulation pharmaceutique, c'est-à-dire la fraction capable de rejoindre son site d'action [13,14]. Ce site d'action n'étant généralement pas identifié, la biodisponibilité est alors considérée comme la fraction de la molécule active absorbée rejoignant la circulation générale, c'est-à-dire parvenant jusqu'à la circulation artérielle. On peut parler de biodisponibilité absolue ou relative. La biodisponibilité d'une molécule est donc un critère essentiel pour son développement. En effet, pour des molécules

présentant de trop faibles biodisponibilités, la majorité de la dose administrée ne sera pas capable d'être active sur l'organisme. De nouvelles molécules prometteuses ne sont pas développées en raison d'une trop faible biodisponibilité. Dans le cas d'une administration par voie orale, le passage du PA dans la circulation sanguine peut être limité par différents facteurs, comme la capacité de la formulation à libérer le PA et la capacité de ce PA à se dissoudre dans les liquides du TGI et à traverser la muqueuse intestinale afin de rejoindre la circulation sanguine. Différentes situations peuvent être envisagées. Si le PA est peu soluble mais très perméable, il sera nécessaire d'améliorer sa capacité à se dissoudre mais ensuite, il sera absorbé dès sa dissolution, la vitesse de dissolution sera alors le facteur essentiel et limitant de son absorption. Si le PA est soluble mais faiblement perméable, c'est sa capacité à traverser les membranes qui sera le paramètre critique contrôlant sa biodisponibilité.

On cherche toujours à avoir une biodisponibilité élevée pour avoir une meilleure activité et par conséquent ne pas gaspiller la substance active, pour ne pas augmenter inutilement les doses, pour avoir des expositions systémiques reproductibles entre les sujets (la variabilité inter-sujet étant plus importante quand la biodisponibilité est faible). Il est donc essentiel de pouvoir évaluer toutes les possibilités d'amélioration de la biodisponibilité des PAs afin de pouvoir développer des techniques de formulation appropriées.

Définitions

-La biodisponibilité absolue peut être calculée comme un pourcentage (*f*) de l'aire sous la courbe représentant la quantité passée dans la circulation sanguine en fonction de la dose par voie orale en comparaison de la voie intraveineuse (IV), où la biodisponibilité est de 100 %.

$$f(\%) = \frac{AUC_{voie\ orale}}{AUC_{voie\ IV}} \times \frac{Dose_{voie\ IV}}{Dose_{voie\ orale}} \times 100$$

-La biodisponibilité relative implique la comparaison de deux formulations sans faire référence à la voie IV. Le but d'une biodisponibilité relative est de comparer, relativement, deux biodisponibilités afin de choisir la meilleure modalité d'administration (à jeun ou dans la nourriture par exemple).

3. Classification BCS

On a vu précédemment que pour un PA destiné à être administré par voie orale, une faible solubilité et/ou une faible perméabilité membranaire peuvent entraîner une biodisponibilité réduite. Le système de classification biopharmaceutique (Biopharmaceutical Classifiction System, BCS) classe les molécules actives selon leur solubilité et de leur perméabilité [2,15]. Cette classification est un outil prédictif de l'efficacité d'absorption d'un PA en fonction des deux paramètres fondamentaux, sa solubilité dans les fluides digestifs et de sa perméabilité gastro-intestinale contrôlant à la fois la vitesse et la quantité de PA absorbée. Cette classification permet de prévoir le comportement des molécules *in vivo* et ainsi d'orienter le travail de formulation nécessaire à chaque molécule [16,17].

3. 1. Les différentes classes

Un PA possède une solubilité élevée lorsque la plus forte dose administrée est soluble dans un volume ≤ 250 mL de milieu aqueux (à 37°C sur une gamme de pH de 1 à 7,5). Il présente une perméabilité élevée si le passage transmembranaire évalué *in vitro* est supérieur ou égal à 85% de la dose administrée. Les principes actifs sont classés selon quatre catégories (Figure I-5):

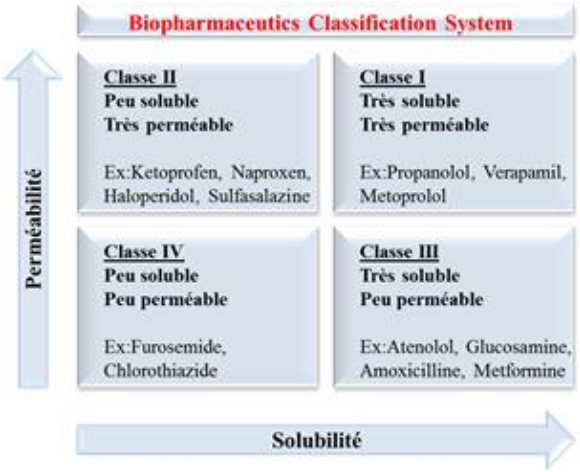


Figure I-5 : Classification BCS

- Classe I : PA très soluble, très perméable. Le PA sera dans ce cas facilement absorbé, et c'est le temps de transit gastro-intestinal qui devient le facteur limitant de la vitesse d'absorption.

- Classe II : PA peu soluble, très perméable. La solubilité du PA sera le facteur limitant de sa vitesse d'absorption.
- Classe III : PA très soluble, peu perméable. La perméabilité intestinale sera le facteur limitant la vitesse d'absorption du PA.
- Classe IV : PA peu soluble, peu perméable. L'administration orale de ces PA est limitée par des problèmes de solubilisation ainsi que d'absorption.

3. 2. Les méthodes de mesure de la perméabilité

Différentes techniques permettent d'étudier la capacité des PA à passer à travers les membranes afin de rejoindre la circulation sanguine, c'est-à-dire de prévoir la biodisponibilité de ces molécules. Certaines de ces techniques permettant de faire le screening des molécules en termes de perméabilité ou de mieux comprendre certains mécanismes intervenant dans l'absorption seront présentées :

3. 2. 1. *In vitro*

Des modèles de culture cellulaire ont été développés pour étudier l'absorption de molécules actives. Il existe différents modèles de cellules visant à mimer la barrière intestinale. Le modèle le plus utilisé est celui des cellules Caco-2 [18]. Les cellules Caco-2 proviennent d'un adénocarcinome de côlon humain. Elles sont cultivées en monocouche sur un support semi-perméable sur lequel elles adhèrent et se différencient spontanément (Figure I-5). Après un certain nombre de jours de culture, ces cellules présentent des microvillosités et des jonctions serrées. Elles sont alors capables de reformer un épithélium comparable aux cellules de l'intestin grêle *in vivo* [19]. L'importance de la différenciation cellulaire peut être évaluée en réalisant des tests de résistance électrique trans-épithéliale, c'est-à-dire en mesurant le courant qui peut passer entre les deux compartiments apical et basal séparés par un épithélium de cellules Caco-2. Plus l'épithélium est différencié, plus il possède des jonctions serrées et donc plus la résistance au passage du courant est grande. Les cellules de la lignée sont bien différenciées en trois semaines. Pour les molécules qui sont bien absorbées par l'intestin, la corrélation entre les tests cellulaires sur Caco-2 et les tests *in vivo* est bonne, en revanche dans le cas contraire la corrélation est moins fiable [20]. En effet, les jonctions serrées entre les

cellules intestinales *in vivo* sont beaucoup plus lâches que celles établies sur le modèle cellulaire Caco-2.

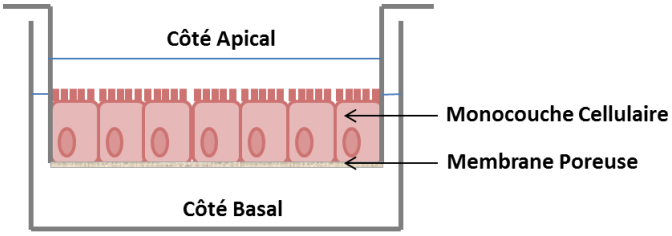


Figure I-5 : Représentation d'un puits de culture cellulaire de cellules Caco-2.

Lors de l'utilisation de ce modèle, la substance à tester est introduite dans le compartiment situé sur le pôle apical de la cellule et l'apparition de cette molécule du côté basal est dosée. La capacité de la substance à traverser la membrane peut ainsi être évaluée. Ces cultures de lignées cellulaires ont l'avantage d'être automatisables. Malgré certaines imperfections des Caco-2, il constitue le modèle le plus utilisé *in vitro* [8]. Afin d'améliorer la représentativité de la membrane, des co-cultures de lignées cellulaires Caco-2 et de HT29-MTX, cellules sécrétrices de mucus, peuvent être réalisées [21].

3. 2. 2. *Ex vivo*

Les méthodes *ex vivo* utilisent des tissus membranaires, représentatifs du passage que l'on cherche à étudier, fraîchement prélevés sur animal, afin d'y mesurer le passage trans-muqueux. Les modèles nécessitent cependant de travailler en un temps limité du fait de la perte rapide de viabilité du tissu qui n'est plus ni innervé, ni relié au circuit sanguin.

Une des méthodes servant à mesurer le passage de molécules *ex vivo* communément utilisée est la chambre ou cellules de Ussing [22]. Les cellules de Ussing sont composées de deux compartiments, un donneur et un accepteur, séparés par une membrane biologique préalablement prélevée sur animal. La muqueuse doit être oxygénée au cours de l'expérience afin d'assurer la viabilité membranaire (Figure I-6).

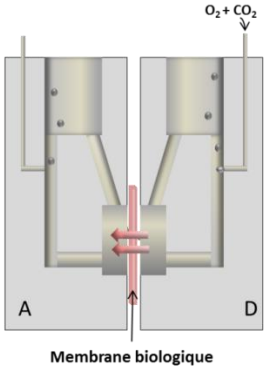


Figure I-6: Représentation d'une chambre de Ussing.

Lors de l'utilisation de ce modèle, une solution biomimétique est introduite dans les deux compartiments de part et d'autre de la membrane. La substance active à tester est déposée dans le compartiment donneur et la quantité de PA passée à travers la membrane est dosée dans le compartiment accepteur par prélèvement dans ce compartiment au cours du temps. La capacité de la substance à traverser la membrane peut ainsi être évaluée [23]. D'après la littérature, les tissus animaux, notamment l'intestin de rat, sont couramment utilisés pour les études de transport moléculaire ou de variabilité d'absorption entre les différentes régions intestinales [24]. La perméabilité de différents composés utilisant l'intestin de rat comme modèle pour les cellules de Ussing a été corrélée avec la perméabilité *in vivo* sur l'Humain [25,26].

3. 2. 3. *In situ*

Les méthodes *in situ* de passage transmembranaire sont des manipulations ayant lieu sur l'animal vivant maintenu sous anesthésie [27,28]. L'avantage, contrairement aux techniques *in vitro* et *ex vivo*, est que le flux sanguin est maintenu intact. Ces techniques permettent d'obtenir des informations relativement précises sur l'absorption de la molécule. Les similarités anatomiques entre l'intestin humain et celui des animaux modèles ainsi que la présence du mucus facilitent l'extrapolation à l'Homme. De plus, l'étude peut être réalisée sur l'ensemble de l'intestin permettant ainsi d'évaluer les différences d'absorption entre les différents segments.

Cependant, ces méthodes nécessitent d'utiliser un grand nombre d'animaux et ne sont donc pas adaptées au screening précoce de molécules ou aux preuves de concepts expérimentaux nécessitant un grand nombre de manipulations. De plus l'anesthésie peut biaiser l'expérience.

Ces évaluations *in vitro* ne prenant pas en compte les réels effets du métabolisme sur la substance active, elles ne permettent donc pas de refléter totalement la biodisponibilité des molécules *in vivo.*

4. Les principes actifs faiblement absorbés

Les nouveaux candidats à usage thérapeutique sont, pour la plupart, des molécules qui offrent une faible perméabilité mais une bonne solubilité, c'est-à-dire des principes actifs appartenant à la classe III. L'amélioration de la biodisponibilité orale de ces PAs (BCS classe III) représente donc un défi majeur lors des phases de développement [17,29].
Certains PAs ont, en fonction de leurs caractéristiques (solubilité et stabilité), des zones de passage préférentielles à travers la membrane intestinale. Ces zones sont appelées fenêtres d'absorption (FA) [30]. On a pu voir que la plupart des molécules passent la membrane intestinale dans la partie haute de l'intestin grêle, c'est-à-dire que leur fenêtre d'absorption est située au niveau du jéjunum.

4. 1. Les stratégies d'amélioration

Comme énoncé précédemment, la voie orale est souvent limitée par la faible pénétration des molécules à travers la membrane intestinale. L'une des missions de l'innovation galénique est d'améliorer la biodisponibilité du PA et donc d'optimiser son action pharmacologique. Dans ce but, des stratégies galéniques sont mises en place. La connaissance de la classification des PA permet donc d'orienter le travail de formulation afin d'optimiser leur biodisponibilité en travaillant sur la solubilité, la vitesse de dissolution, la perméabilité intestinale ou le temps de transit. Ces améliorations peuvent se faire en travaillant directement sur le PA ou en travaillant sur la formulation. Le PA peut être modifié chimiquement (synthèse de pro-drogues ou utilisation d'un sel plus hydrosoluble…) ou physiquement (utilisation d'une forme amorphe plus soluble qu'une forme cristalline, utilisation d'une forme anhydre plus soluble qu'une forme hydratée, réduction de la taille des particules…). Le choix de la formulation utilisée pour le PA peut également permettre d'améliorer sa biodisponibilité, notamment en jouant sur les différents excipients (utilisation d'un pourcentage élevé en excipients

hydrophiles, ajout d'agents tensio-actifs pour augmenter la mouillabilité ou solubiliser le PA, utilisation d'agents promoteurs d'absorption). Ces stratégies jouent alors sur une modification de la perméabilité membranaire afin d'aider au passage du PA à travers celle-ci [31].

Les performances des formes orales sont souvent limitées par le temps de transit. Un temps de transit contrôlé permettrait donc d'améliorer ces performances en prolongeant le temps de séjour des formulations dans le tube digestif (Figure I-7). Différentes formes galéniques gastro-rétentives ont été développées dans ce but. Ces formes, plus complexes que les formes conventionnelles dont elles sont issues, offrent de nouvelles possibilités permettant d'améliorer les performances de la forme, en termes d'absorption et d'efficacité.

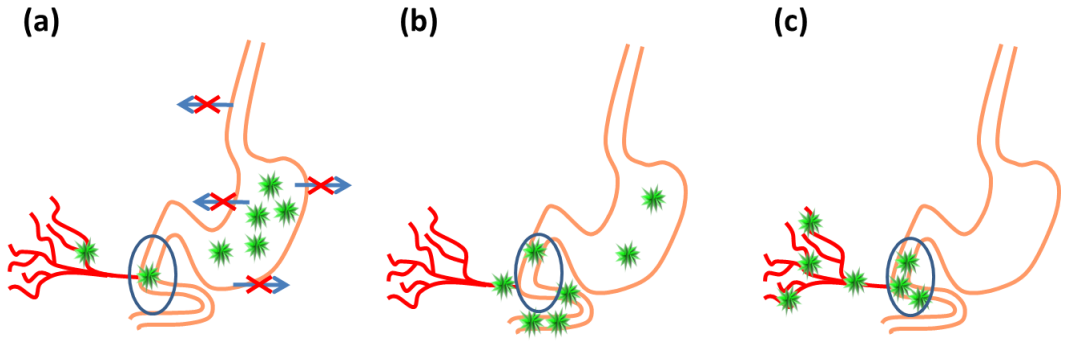


Figure I-7 : Schéma de principe de la rétention d'un PA au niveau de sa zone de passage transmembranaire ○, (a) passage du PA ✸ dans la circulation sanguine au début de l'intestin ○, (b) pertes en PA ✸ lors de la digestion (c) augmentation du passage du principe actif ✸ lors de la rétention celui-ci à proximité de son site d'absorption ○.

4. 2. Les systèmes gastro-rétentifs

Les systèmes gastro-rétentifs permettent d'augmenter le temps de résidence d'une formulation dans l'estomac et ainsi de contourner une circulation trop rapide des formes dans le TGI [32]. En effet, les formes conventionnelles orales sont rapidement éliminées de l'estomac en raison des phénomènes de vidange gastrique et de péristaltisme. L'avantage des formes gastro-rétentives est de pouvoir retenir les formulations plus longtemps dans l'estomac. Si la cinétique de libération du PA dans ces formes est bien contrôlée, il est alors possible d'augmenter l'absorption du PA et sa biodisponibilité, de minimiser l'irritation de la muqueuse intestinale et de diminuer la fréquence d'administration. En effet, le fait de retenir des formes retard, c'est-à-dire libérant le PA sur des temps prolongés, permet un temps de contact plus long entre le PA et les membranes qu'il doit traverser afin de rejoindre la

circulation sanguine. En l'absence de rétention, le passage membranaire est limité par le temps de passage de la formulation au niveau de la zone d'absorption du PA, contrôlé par la vitesse du processus de digestion dû au péristaltisme qui fait circuler le contenu stomacal au cours du temps. On a pu voir qu'un temps de contact prolongé permettrait une absorption augmentée [33]. Différents stratégies galéniques ont été développées afin d'augmenter le temps de résidence des formes galéniques dans l'estomac (Figure I-8) [34–38].

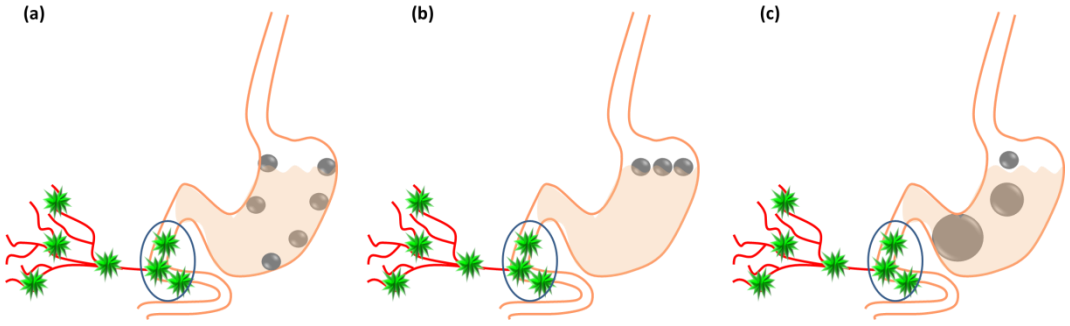


Figure I-8 : Schéma de principe de l'utilisation des formulations gastro-rétentives, (a) formulation mucoadhésive, (b) formulation flottante et (c) formulation gonflante.

Les systèmes mucoadhésifs peuvent adhérer à la muqueuse gastrique et rester dans cette région un certain temps. Les systèmes flottants restent à la surface des fluides gastriques en raison de leur faible densité. A l'inverse, les systèmes à haute densité vont se déposer dans la partie inférieure de l'estomac, proche de la région du pylore et ne subiront pas les contractions péristaltiques. Les systèmes gonflants vont subir une expansion lors de leur arrivée dans l'estomac, ce qui va empêcher leur vidange gastrique. Ces différentes stratégies provoquent une augmentation du temps de résidence des vecteurs dans l'estomac, c'est-à-dire une rétention du PA à ce niveau du TGI.

4. 2. 1. Les systèmes mucoadhésifs

La bioadhésion permet de prolonger le temps de séjour dans le TGI. Les excipients doivent alors être capable d'adhérer efficacement sur les membranes biologiques ainsi que de provoquer une libération contrôlée du PA. De plus cette adhésion ne doit pas être à l'origine d'une réponse immunologique, toxique ou inflammatoire. Les formes galéniques bioadhésives se fondent sur les propriétés de bioadhésion que présentent certains excipients (par exemple : l'acide polyacrylique, le carraghénane, le chitosan). La capacité de ces matériaux à adhérer

naturellement sur les surfaces biologiques, comme des muqueuses, a permis d'imaginer des formes capables, soit de prolonger l'activité locale, soit de moduler l'absorption systémique du PA. Ces formes galéniques innovantes permettent de ralentir l'élimination des PAs. Dans le cas d'une action locale, une immobilisation prolongée d'une forme galénique sur le site d'action permet d'augmenter et de maintenir des concentrations locales efficaces du PA. Par rapport à des formes conventionnelles, il y a un accroissement de l'efficacité du PA [39–46].

4. 2. 2. Les systèmes flottants ou à haute densité

Ces systèmes permettent d'augmenter le temps de séjour intra-gastrique. Ces formes demeurent respectivement à la surface de la masse liquide contenue dans l'estomac, pour les flottants à faible densité, ou coulent pour se déposer au fond de l'estomac, pour les systèmes à haute densité. Pour cela, on peut jouer sur la densité de la forme ou encore incorporer un réservoir de gaz permettant de maintenir la flottabilité [36,47–54].

4. 2. 3. Les systèmes gonflants

Ces formes contiennent des excipients permettant l'augmentation du volume du comprimé lors de son arrivée dans l'estomac. Il ne peut alors plus quitter ce dernier étant d'un volume trop important pour passer l'anneau pylorique. Après un certain temps, ces formes doivent être capables de se désintégrer afin de ne pas créer d'obstruction intestinale [36,50,55].

4. 2. 4. Les systèmes magnétiques

Enfin, des systèmes magnétiques permettant de maintenir des formes sensibles à un champ magnétique externe ont été développés. Ces systèmes nécessitent l'incorporation d'un petit aimant ou de particules magnétiques au sein de la matrice du médicament, ainsi que l'application en externe d'un aimant. Cependant, les résultats ne sont pas toujours satisfaisants à cause de la difficulté à placer l'aimant externe avec précision pour permettre une libération ciblée du PA [1,34,56,57]. Ces systèmes seront détaillés dans la partie C. de ce chapitre.

Ces stratégies de rétention de formes galéniques dans l'estomac s'avèrent efficaces pour en augmenter le temps de résidence dans l'estomac. Cette stratégie peut provoquer des augmentations significatives de la biodisponibilité de certaines molécules (1,5 à 3 fois en fonction des formes et des molécules actives étudiées) [58]. Cependant, ces stratégies ont des limitations importantes. L'augmentation du temps de résidence dans l'estomac ne peut être effectuée que dans certaines conditions de remplissage gastrique. Cette stratégie s'est avérée inefficace pour les molécules ne possédant pas de zone d'absorption préférentielle, ayant des problèmes de solubilité ou de stabilité dans les fluides stomacaux ou encore ayant un premier passage hépatique réduisant significativement la dose atteignant la circulation systémique [32,34]. Les systèmes gastro-rétentifs doivent donc être étudiés avec précaution, selon une approche galénique pour l'efficacité de la rétention mais aussi pharmacodynamique et pharmacocinétique pour s'assurer de l'efficacité potentielle de cette rétention *in vivo* [33,50].

Partie B. Les nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques (NPMs) sont de plus en plus étudiées et utilisées à des fins de diagnostic et de thérapie. En effet, leurs différentes propriétés physiques et chimiques en font des objets d'intérêt pour les applications biomédicales. Les propriétés magnétiques des nanoparticules permettent leur utilisation pour la vectorisation par guidage magnétique, pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) grâce aux propriétés d'agent de contraste des particules d'oxyde de fer [59–61] et pour la thermothérapie grâce à l'hyperthermie magnétique [62–66] (Figure I-9). Ces applications reposent sur différentes modalités de champ magnétique. En effet, un gradient de champ magnétique est nécessaire à la vectorisation magnétique, un champ magnétique permanent et d'intensité élevée (3 à 7 Tesla) est nécessaire pour l'acquisition d'images en IRM et un champ magnétique alternatif permet une dissipation de chaleur.

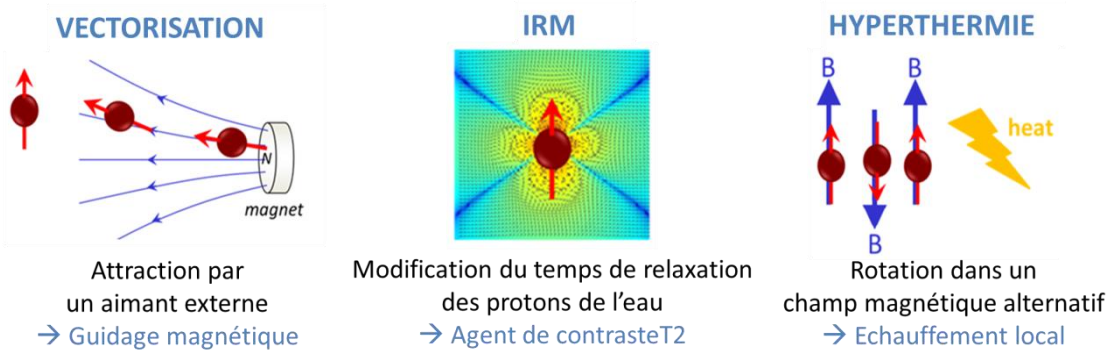


Figure I-9 : Les applications biomédicales des NPMs.

Les particules magnétiques peuvent être des particules métalliques (nickel, cobalt ou fer) ou des particules d'oxydes métalliques, principalement des oxydes de fer. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des matériaux de choix de par leur biocompatibilité. En effet ces particules ne possèdent pas d'élément intrinsèquement toxique ; après dégradation, le fer contenu dans les particules est relargué et intégré au pool du fer endogène [67–69]. Les deux oxydes de fer les plus utilisés dans la littérature sont la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite (γ-Fe_2O_3). La magnétite est constituée d'un mélange de Fer^{III} et de Fer^{II} qui peut s'oxyder avec le temps tandis que les nanoparticules de

maghémite (γ-Fe_2O_3) présentent l'avantage d'être plus stables chimiquement. En revanche, leurs propriétés magnétiques sont assez similaires.

1. Synthèse et dispersion des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être synthétisées par différentes méthodes : procédés polyols, décomposition des métaux carbonyles, synthèses hydrothermales, co-précipitation. La synthèse par co-précipitation fait appel à la chimie douce, elle se fait dans l'eau et sans tensioactif. Avec cette synthèse, on peut produire de grandes quantités, un litre de ferrofluide acide à [Fe] = 1 mol/L. D'autre part l'utilisation des ferrofluides permet de travailler en phase aqueuse, homogène, et ainsi de contrôler la charge et le pH, c'est à dire de contrôler la stabilité des dispersions.

1. 1. Synthèse

La synthèse des NPMs a lieu en deux étapes, la synthèse des nanoparticules de magnétite puis leur oxydation en maghémite. La co-précipitation d'ions Fer^{II} et Fer^{III} par l'introduction de chlorures ferriques ($FeCl_3$) et ferreux ($FeCl_2$) dans des proportions stœchiométriques en milieu alcalin permet d'obtenir des nanoparticules de magnétite :

$$2Fe^{3+} + Fe^{2+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$$

Cette étape de synthèse fixe la taille et la polydispersité des particules selon des paramètres tels que l'agitation et la vitesse d'ajout. Avec le procédé mis au point au laboratoire Phenix, après cette étape de co-précipiation, les particules de magnétite ont un diamètre moyen de l'ordre de 7 nm avec une polydisersité de 0,35.

Les particules de magnétite sont ensuite oxydées en maghémite par ajout de nitrate ferrique à chaud. Cette étape est caractérisée par un changement de couleur des particules qui virent du noir au rouge-brun (Voir Annexe 1) (Figure I-10).

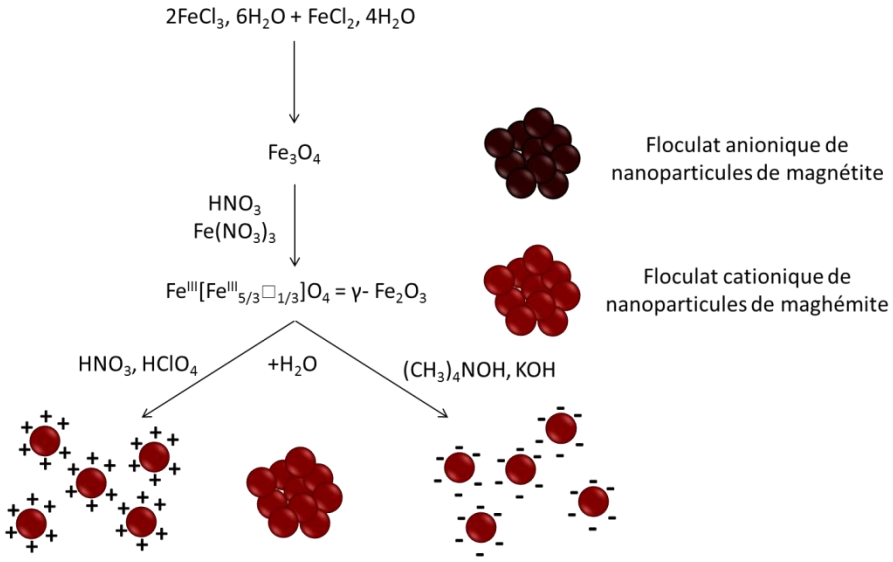


Figure I-10 : Synthèse de nanoparticules de maghémite en milieu aqueux.

1. 2. Dispersion

Les nanoparticules ainsi synthétisées vont être dispersées dans l'eau à différents pH pour former un ferrofluide. Un ferrofluide est par définition un liquide magnétique constitué de nanoparticules magnétiques dispersées dans un solvant porteur. Les ferrofluides sont stables sous champ magnétique et dans le temps.

Les nanoparticules sont dispersées dans l'eau grâce à des répulsions électrostatiques. Ces forces vont contrebalancer les forces attractives qui tendent à déstabiliser la suspension. Les forces attractives sont les forces de Van der Walls présentes à courte distance entre les NPMs et les interactions dipôle-dipôle magnétiques. Les répulsions électrostatiques sont créées par les charges de surface des nanoparticules [70]. Les nanoparticules de maghémite préparées par le procédé Massart possèdent un point de charge nulle à pH 7,4. En jouant sur le pH, il va donc être possible de créer des charges positives à pH acide par protonation des groupements hydroxyles de surface ou négatives à pH basiques par déprotonation de ces mêmes groupements. Pour stabiliser les particules à pH 7, il est nécessaire de complexer aux atomes de fer superficiels une molécule qui va conférer une charge négative aux particules (Figure I-11). Parmi les complexants les plus efficaces on trouve des molécules possédant des groupes carboxylates (citrate de sodium), des thiols (acide di-mercaptosuccinique) ou des phosphonates.

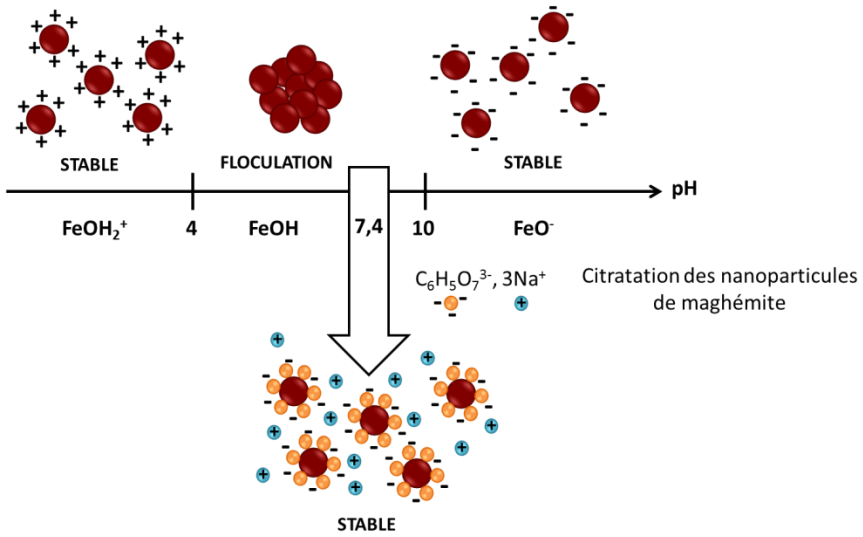


Figure I-11 : Stabilité d'une suspension colloïdale de maghémite dans l'eau en fonction du pH.

Au cours de ce travail, les ferrofluides utilisés lors des différentes formulations magnétiques ont été choisis en fonction de la stabilité désirée permettant de travailler en solution : un ferrofluide acide pour travailler à pH acide ou un ferrofluide citraté pour travailler à pH neutre.

2. Propriétés magnétiques des ferrofluides

Le comportement d'un ferrofluide résulte de l'association de propriétés liquides et magnétiques, les propriétés liquides venant du solvant et les propriétés magnétiques venant des nanoparticules qui y sont dispersées.

La magnétite comme la maghémite sont des matériaux ferrimagnétiques dont la structure cristallographique est celle d'une ferrite spinelle [71]. L'ordre magnétique résulte des interactions d'échange entre les spins électroniques des atomes de fer via les atomes d'oxygène de la structure et se développe dans des régions limitées de la structure cristallographique appelées monodomaines magnétiques. La taille de ces monodomaines est de l'ordre de 20 nm pour les particules de maghémite [72]. Chaque monodomaine magnétique est porteur d'un moment magnétique permanent m_{eff} dont l'intensité est proportionnelle au volume V de la particule par l'intermédiaire de l'aimantation spécifique du matériau m_s ($m_s = 3{,}1*10^5$ A.m^{-1} pour la maghémite) :

$$m_{eff} = m_s \times V$$

Le moment magnétique est bloqué dans des directions cristallographiques appelées axes de facile aimantation [73]. Cependant, il suffit de lui fournir une énergie supérieure à

l'énergie d'anisotropie magnétique E_a pour le faire basculer d'une direction de facile aimantation à l'autre. L'énergie d'anisotropie est due à la forme (légèrement ellipsoïdale), à la structure cristalline (anisotropie magnétocristalline) et à l'état de surface (anisotropie de surface) des nanoparticules :

$$E_a = K \times V$$

avec V le volume du matériau et K sa constante effective d'anisotropie.

La relaxation des nanoparticules est induite par deux phénomènes de fluctuation de leurs moments magnétiques de nature différente, les relaxations de Brown et de Néel.

La relaxation brownienne traduit la rotation de la nanoparticule au sein d'un fluide. Le temps caractéristique τ_B dépend de la viscosité du milieu η, du volume hydrodynamique de la particule V_H et de la température T :

$$\tau_B = \frac{3 \times \eta \times V_H}{k_B \times T}$$

avec k_B la constante de Boltzman. Pour des nanoparticules de 10 nm dans l'eau, $\tau_B \approx 1$ ms.

La relaxation de Néel traduit la rotation du moment magnétique par rapport au réseau cristallin. Le temps caractéristique τ_N dépend exponentiellement du volume magnétique V_p de la particule et de la température T :

$$\tau_N = \tau_0 \times e^{\frac{KV_p}{k_B T}} = \tau_0 \times e^{\frac{E_a}{k_B T}}, \text{ avec } \tau_0 \approx 10^{-9} \text{ s}$$

La valeur de l'énergie d'anisotropie magnétique (E_a) par rapport à l'énergie thermique k_BT détermine le comportement magnétique des nanoparticules. Si $E_a >> k_BT$, les particules auront un comportement ferromagnétique et si $E_a << k_BT$, les particules auront un comportement superparamagnétique.

En pratique, le temps de relaxation global τ résulte de la compétition entre les temps de relaxation de Brown et de Néel :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N}$$

Selon les valeurs des temps de relaxation de Brown et Néel, l'un des mécanismes de dissipation d'énergie est privilégié. τ_B est proportionnel au volume de la particule alors que τ_N en dépend de manière exponentielle. L'un des deux phénomènes devient donc rapidement négligeable devant l'autre, avec la variation du volume V_p. Dans le cas de la maghémite à température ambiante, τ_N est court, de l'ordre de la nano à la milliseconde

donc τ est petit et les nanoparticules ont alors un comportement superparamagnétique avec un processus d'aimantation réversible. Les nanoparticules répondent comme un matériau paramagnétique mais avec une susceptibilité magnétique beaucoup plus importante.
La courbe d'aimantation d'un ferrofluide ne présente pas de rémanence et est décrite par le formalisme de Langevin [74] :

$$M(H) = M_s \times (\coth \zeta - \frac{1}{\zeta})$$

$$\text{Avec} \quad \zeta = \frac{m_{eff} \times H}{k_B \times T} \quad \text{et} \quad M_s = m_s \times \phi$$

où ζ est le paramètre de Langevin — m_s l'aimantation spécifique du matériau
m_{eff} est le moment dipolaire magnétique — M_s est l'aimantation à saturation
H est le champ magnétique appliqué — k_B est la constante de Boltzmann
T est la température — ϕ est la fraction volumique en particule

A partir de la valeur de l'aimantation à saturation M_s (Figure I-12), il est donc possible de remonter à la fraction volumique en particule Φ, selon la relation :

$$M_s = m_s \times \Phi$$

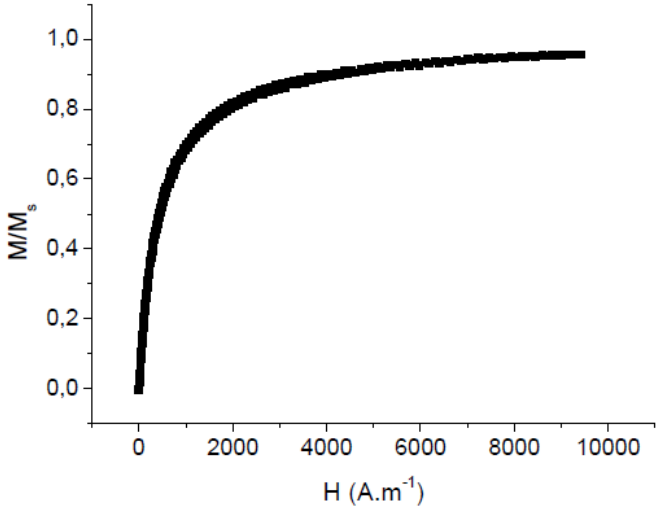


Figure I-12 : Courbe d'aimantation d'un ferrofluide.

3. Applications des NPMs en imagerie et vectorisation

3. 1. Vectorisation magnétique

Un objet contenant des NPMs d'oxyde de fer peut être mis en mouvement lorsqu'on lui applique un champ magnétique externe. Cet objet suit alors les lignes de champ pour se concentrer au niveau des zones de champ fort. La force magnétique $\overrightarrow{F_m}$ d'un objet contenant des NPMs et possédant un moment magnétique $\vec{\mu}$ dans un gradient de champ exercé par un aimant externe s'écrit :

$$\overrightarrow{F_m} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$

$$\vec{\mu} = N \times \overrightarrow{m_{eff}}$$

$$\overrightarrow{m_{eff}} = \alpha \times m_s \times \frac{\pi}{6} \times {d_0}^3$$

avec N le nombre de particules de maghémite par objet

$\overrightarrow{m_{eff}}$ le moment magnétique d'une particule

α le pourcentage de sa valeur d'aimantation à saturation dans un champ donné

m_s l'aimantation spécifique du matériau

d_0 le diamètre moyen d'une particule

Lorsqu'une force magnétique est appliquée sur un objet contenant des NPMs, il va s'exercer une compétition entre les forces exercées par le milieu sur l'objet et la force magnétique exercée par l'aimant sur l'objet. Les forces exercées par le milieu sont toujours assimilées à des forces de frottement fluide cherchant à entraîner l'objet F_f :

$$F_f = 6 \times \pi \times \eta \times R \times v$$

avec η la viscosité du fluide biologique, R le rayon hydrodynamique de l'objet et v la vitesse de l'objet dans le fluide biologique.

La force magnétique est une force d'attraction fixe qui vient alors s'opposer au frottement. Pour que le guidage magnétique soit efficace, il est donc nécessaire que la force magnétique domine sur les forces de frottement afin d'être capable d'amener et de retenir l'objet magnétique à la position souhaitée. La force magnétique varie avec le nombre de NPMs contenues dans l'objet. Plus le nombre N de NPMs est grand, plus la force magnétique d'attraction que l'objet va subir sera importante (pour une même valeur du gradient de champ externe). Les forces de frottement varient avec la taille de l'objet : plus

l'objet sera volumineux, plus il subira des forces de frottement importantes. Le succès du guidage magnétique, c'est-à-dire lorsque la force magnétique domine sur les forces de frottement, dépend donc de la charge magnétique de l'objet (plus il contient de NPMs plus la force magnétique est importante), de la taille de l'objet (plus il est petit et moins les forces de frottements seront importantes) et du gradient de champ magnétique. En termes de formulation, il est donc nécessaire de trouver un compromis entre charge et taille. Plus l'objet sera gros, plus il pourra contenir de NPMs mais plus il sera entraîné par les force *in vivo*.

3. 2. Contraste en imagerie

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non-invasive utilisée pour le diagnostic médical. Cette technique est basée sur l'étude de la résonance des protons de l'eau et permet d'obtenir des images avec une résolution en contraste élevée des tissus biologiques en fonction de l'environnement moléculaire de ces protons (teneur en graisse ou en eau). Un signal de résonance est obtenu en fonction des différences de relaxation des protons dans les tissus. Cependant, ces différences ne permettent pas toujours de créer un contraste suffisant. Des agents de contraste sont alors utilisés afin de modifier le temps de relaxation des tissus pour permettre une augmentation ou une diminution du signal et l'obtention d'images plus contrastées. Ces substances agissent en créant un champ magnétique local, ce qui perturbe l'aimantation des protons environnants [75,76].

Le noyau de l'atome d'hydrogène possède un moment magnétique de spin, aligné dans l'axe *z* lorsqu'il est soumis à un champ magnétique constant B_0. Lorsqu'un champ magnétique oscillant B_1 est appliqué, les moments magnétiques vont basculer pour venir se placer perpendiculairement à l'axe *z*. Quand B_1 est interrompu, les moments vont revenir dans la direction *z* en tournant. C'est le signal oscillant émis par leur retour à l'équilibre qui est mesuré en IRM.
Le temps de retour à l'équilibre dans la direction *z* est le temps de relaxation longitudinale (spin-réseau) T_1 :

$$M_z(t) = M_0 \times (1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$$

En pratique, le phénomène de relaxation est infini (loi exponentielle), c'est pourquoi on définit T_1 comme le temps mis par M_z pour retrouver 63% de la valeur M_0 de l'aimantation à l'équilibre.

La diminution du signal, due au déphasage du retour à l'équilibre des moments (à cause de l'environnement), est le temps de relaxation transversale (spin-spin) T2 :

$$M_{xy}(t) = M_0 \times e^{-\frac{t}{T_2}}$$

T_2 est défini comme le temps mis par M_{xy} pour passer de 100% à 37% de la valeur initiale M_0.

Les agents de contraste ont pour effet de créer localement un champ magnétique, qui va perturber l'aimantation des protons environnants en interagissant avec leurs spins nucléaires [77]. Cela va provoquer une accélération des vitesses de relaxation ($1/T_1$ et $1/T_2$) et donc une diminution des temps de relaxation T_1 et T_2. Les vitesses de relaxation $1/T_1$ et $1/T_2$ ont un rapport proportionnel à la concentration des agents de contraste ($c_{contraste}$). Le coefficient de proportionnalité définit la relaxivité de l'agent de contraste dans un milieu spécifique (r_1 et r_2) :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1\,tissu}} \times r_1 \times c_{contraste}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2\,tissu}} \times r_2 \times c_{contraste}$$

Les agents de contraste peuvent être de deux types, les substances paramagnétiques ou superparamagnétiques. Les agents de contraste T_1 sont des molécules paramagnétiques possédant un moment magnétique très important qui ont pour effet de créer un champ magnétique local important (complexes du gadolinium). Cela va avoir pour effet d'accélérer les vitesses de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transversale $1/T_2$ et de diminuer les temps de relaxation T_1 et T_2. L'effet sera plus prononcé sur T_1. L'utilisation de ces agents de contraste, dits positifs, crée des zones blanches hyper-intenses (Figure I-13 (a) et (b)).

Les agents de contraste T_2 sont des particules d'oxydes de fer superparamagnétiques formant des monodomaines magnétiques qui ont pour effet de créer des inhomogénéités de champ [59,61,78,79]. Cela va avoir pour effet de déphaser les protons environnants, diminuant ainsi les temps de relaxation T_1 et T_2. L'effet sera plus prononcé sur T_2.

L'utilisation de ces agents de contraste, dits négatifs, crée des zones noires hypo-intenses (Figure I-13 (c) et (d)).

Lors des observations en IRM avec utilisation d'agents de contraste, les vitesses de relaxation observées ($1/T_{observé}$) seront donc les vitesses de relaxation des tissus auxquelles s'ajoutent les vitesses de relaxations de l'agent de contraste :

$$\frac{1}{T_{observé}} = \frac{1}{T_{tissu}} + \frac{1}{T_{contraste}} \text{, avec } \frac{1}{T_{contraste}} = r \times c_{contraste}$$

Avec r la relaxivité et $c_{contraste}$ la concentration de l'agent de contraste.

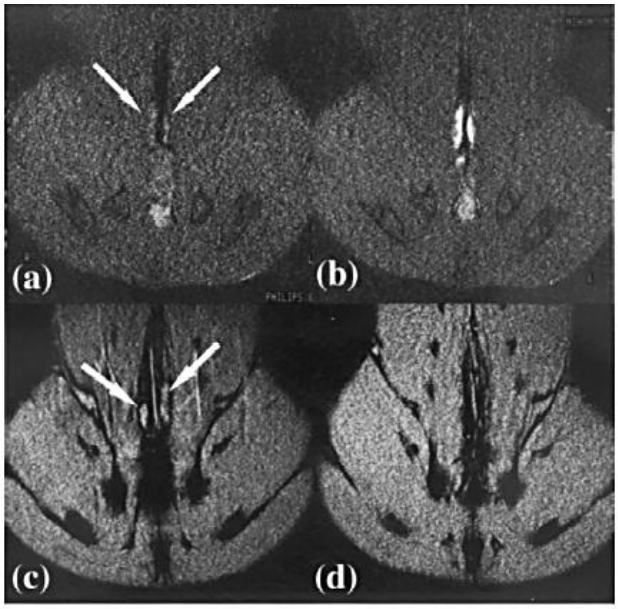


Figure I-13 : Clichés de ganglions lymphatiques obtenus par IRM en séquence T_1 (a) sans et (b) avec agents de contraste T_1 positifs et en séquence T_2 (c) sans et (d) avec agent de contraste T_2 négatif.

Partie C. Formulations magnétiques pour la voie orale

On a pu voir dans la première partie de ce chapitre que dans le domaine de la délivrance par voie orale de nombreux problèmes restent à résoudre afin d'optimiser l'utilisation de cette voie pour un grand nombre de molécules et d'améliorer leur biodisponibilité. Pour les principes actifs présentant un faible passage à travers la membrane intestinale, des systèmes capables de retenir les formulations pendant une durée prolongée dans le système digestif ont été mis au point mais restent peu utilisés. En effet, la rétention de ces formes libérant le PA de façon progressive permet un temps de contact prolongé entre le PA et les membranes qu'il doit traverser afin de rejoindre la circulation sanguine. En l'absence de rétention, le passage membranaire est limité par le temps de passage de la formulation qui est contrôlé par la vitesse du processus de digestion due au péristaltisme. Dans la littérature, on a pu voir qu'un temps de contact prolongé permettrait une absorption augmentée [32,33]. Dans ces articles, l'utilisation de formes gastro-rétentives pour contrôler le profil d'absorption d'un principe actif est étudiée. Cette stratégie peut permettre d'augmenter le temps de résidence d'un vecteur dans l'estomac et donc le passage du PA qu'elle contient dans la circulation sanguine. La capacité du PA à traverser la membrane est alors inchangée, mais le temps de contact augmente permettant ainsi à une quantité de molécules plus importante de traverser cette membrane. Il existe une relation complexe entre le temps de rétention des formulations et leur cinétique de libération du PA afin d'obtenir l'effet désiré.

Nous venons de voir que les NPMs présentent de nombreuses propriétés intéressantes pour la vectorisation de molécules actives et l'imagerie. De très nombreuses études rapportent l'utilisation de NPMs ou de systèmes complexes magnétiques pour la thérapie anti-cancéreuse. Les particules sont injectées par voie intraveineuse (IV) ou directement dans la tumeur [62,65,66,80]. Après injection IV, les objets magnétiques peuvent être accumulés au sein d'une tumeur sous champ magnétique [81]. Cependant, peu d'études concernent l'utilisation de la rétention magnétique pour la voie orale. Deux approches sont rapportées dans la littérature. Tout d'abord, l'utilisation de formes magnétiques pour étudier les phénomènes de digestion puis l'utilisation la force magnétique comme technique de rétention dans différents endroits du TGI.

1. Imagerie du tractus gastro-intestinal

Cette approche s'appuie sur les propriétés magnétiques des particules magnétiques d'oxyde de fer et permet une étude très poussée au niveau de la physique régissant les forces de digestion. Plusieurs approches peuvent être utilisées, reposant sur la détection des forces magnétiques pour la reconstruction d'images ou la visualisation directe en imagerie.

1. 1. « Magnetic Marker Monitoring »

Dès 1997, W. Weitschies et *al.* rapporte l'utilisation d'une technique appelée Magnetic Marker Monitoring (MMM). Cette technique utilise une capsule magnétique pour le suivi en continu du transit gastro-intestinal [82]. La capsule magnétique (environ 1 mm de diamètre) utilisée dans cette étude est une granule de sucrose recouverte de magnétite (Fe_3O_4) en poudre dans du PMMA (poly(methyl methacrylate)) puis encapsulée dans une gélule de silicone et magnétisée dans une bobine. Le suivi est effectué par mesure de la distribution du champ magnétique au-dessus de l'abdomen à différents intervalles de temps en utilisant une détection de l'aimantation grâce à un magnétomètre SQUID (Superconducting QUantum Interference Device).

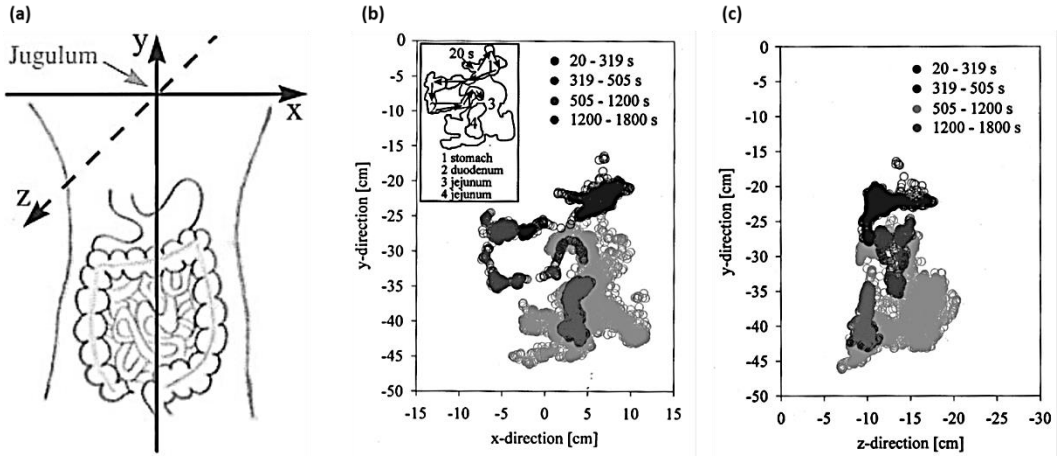


Figure I-14: Extrait de [82]**: (a) Schéma de la position des organes du TGI, présentant les origines des axes, (b) positon de la gélule magnétique pour des intervalles de 100 ms pendant 30 min après ingestion, en plan x-y et (c) positon de la gélule magnétique pour des intervalles de 100 ms pendant 30 min après ingestion, en plan z-y.**

La position de la gélule peut ensuite être calculée à partir des mesures de champ magnétique (Figure I-14). Cette méthode non-invasive permet donc de suivre le transit

dans le TGI d'une forme solide magnétique avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde et une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Le même groupe a ensuite étudié l'utilisation de cette technique afin d'étudier *in vivo* le devenir et la désintégration de formes magnétiques [83]. Les formes utilisées sont cette fois des gélules de gélatine remplies d'un mélange de lactose, d'acide ascorbique, d'hydrogénocarbonate de sodium et de magnétite. Des mesures *in vitro* ont montré que la désintégration de ces gélules pouvait être reliée à la valeur de leur moment magnétique mesuré. Le suivi *in vivo* a ensuite été effectué chez des volontaires sains et a pu être corrélé avec la désintégration observée dans l'eau à 37°C (Figure I-15).

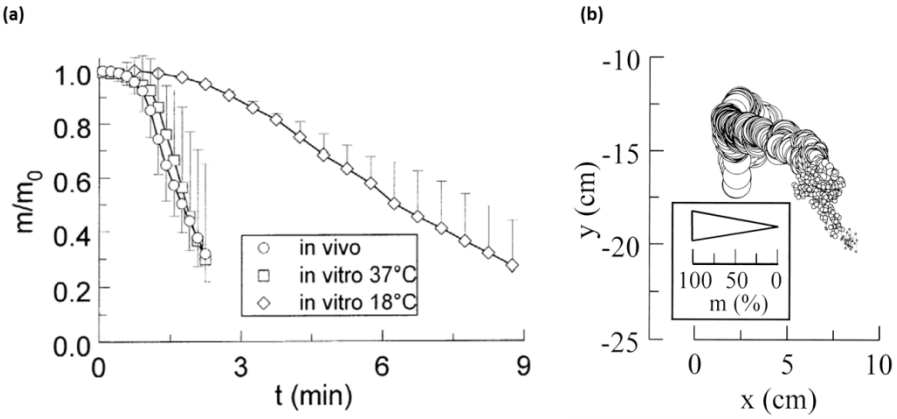


Figure I-15: Extrait de [83]**: (a) Mesures des moments magnétiques normalisés pendant la désintégration des gélules magnétiques *in vivo* et *in vitro* à 19 ± 1 °C et 35 ± 1 °C respectivement et (b) localisation de la gélule dans l'estomac dans un plan x-y, les cercles représentent la position de la gélule par intervalle de 100 ms et la taille des cercles représente le moment magnétique relatif à l'échelle dans le cadre.**

Cette étude a été suivie par un article rapportant l'utilisation de ces mesures comme moyen de détermination du mécanisme de désintégration de gélules magnétiques [84]. Un nouvel appareillage a cette fois été utilisé pour le suivi du champ magnétique généré par un dipôle magnétique et mesuré grâce à un magnétomètre. La décroissance est alors utilisée comme méthode quantitative de la désintégration des formes (Figure I-16). De plus, ces mesures permettent d'identifier le mécanisme entrant en jeu dans cette désintégration.

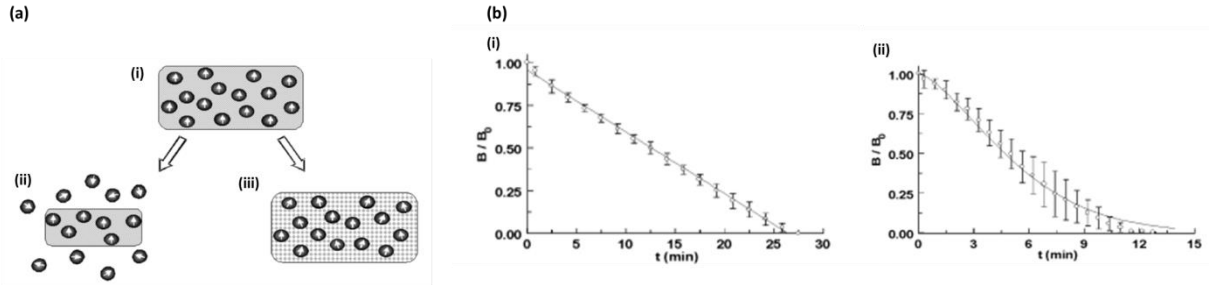


Figure I-16: Extrait de [84]**: (a) Représentation schématique de l'orientation des moments magnétiques par particules : (i) comprimé après magnétisation, tous les moments magnétiques sont alignés; (ii) comprimé après érosion de sa surface, les particules libérées bougent librement dans les fluides et (iii) comprimé après gonflement, l'alignement des moments magnétique est perturbé et (b) Champ magnétique normalisé pour les comprimés pendant leur désintégration : (i) comprimé dégradé par érosion de sa surface et (ii) comprimé dégradé par gonflement.**

Pour des formes se dégradant sans gonflement préalable, une décroissance linéaire est observée tandis que pour les formes ayant un mécanisme de dégradation passant par une étape de gonflement, la décroissance peut être corrélée par une fonction exponentielle. En 2005, la circulation de formes non dégradées est étudiée plus en détail grâce à la technique de MMM [85]. Dans cet article, le transit dans l'œsophage et dans l'intestin grêle a pu être imagé chez des volontaires sains (Figure I-17).

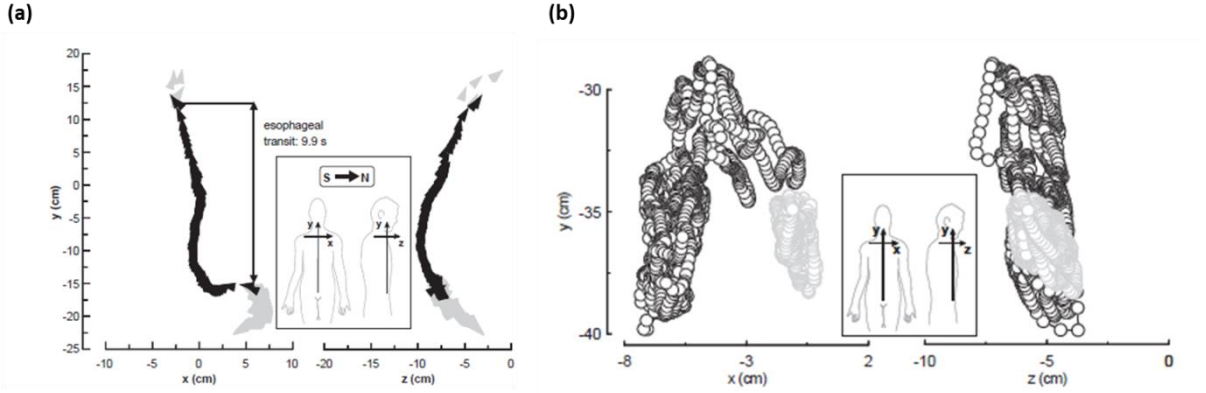


Figure I-17: Extrait de [85]**: (a) transit œsophagien d'une capsule avec une résolution temporelle de 40 ms et (b) Localisation d'une capsule dans l'intestin grêle avec une résolution temporelle de 100 ms entre deux mesures, ○ 46-52 min après vidange gastrique et ○ 76-82 min après vidange gastrique.**

Le temps de résidence de la capsule dans les différentes sections du TGI a ensuite pu être déterminé (Figure I-18).

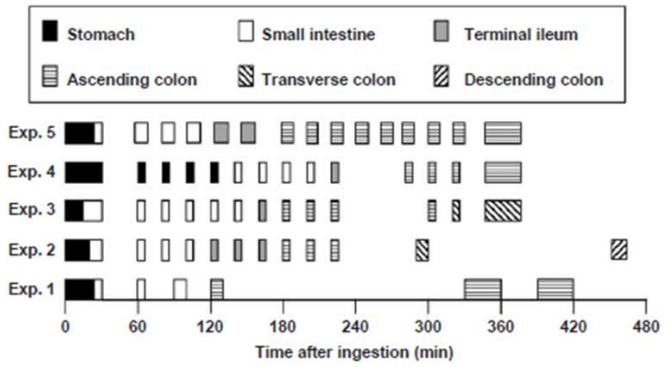


Figure I-18: Extrait de [85]**: Transit gastro-intestinal d'une capsule magnétique après ingestion avec 150 mL d'eau (administration à jeun après 8h, repas servi 240 min après ingestion de la capsule dans les expériences 1 à 4).**

Ces différentes études basées sur le suivi du marquage magnétique (MMM) offrent une alternative pour le suivi des formes solides dans le tractus gastro-intestinal. Cette technique ne nécessite pas l'utilisation de radiations. Le marquage est réalisé par incorporation de faibles quantités de magnétite (Fe_3O_4), suivi par la magnétisation de la forme. Ce marquage est alors non-toxique et biocompatible. Le suivi par MMM a une très bonne résolution temporelle et spatiale et offre la possibilité d'un suivi de l'ingestion et la circulation des formes dans le TGI. De plus, cette technique permet également de suivre et d'étudier les mécanismes de la désintégration de comprimés *in vivo*.

Dans deux études plus récentes, Weitschies et *al.* rapportent l'utilisation d'un suivi par MMM de la circulation d'un comprimé marqué magnétiquement et contenant de l'amoxicilline (Figure I-19). Ce suivi de la position du comprimé mesuré par MMM est corrélé avec les mesures pharmacocinétiques du passage de l'amoxicilline dans la circulation sanguine mesuré par dosage du PA dans le plasma [86,87] (Figure I-20).

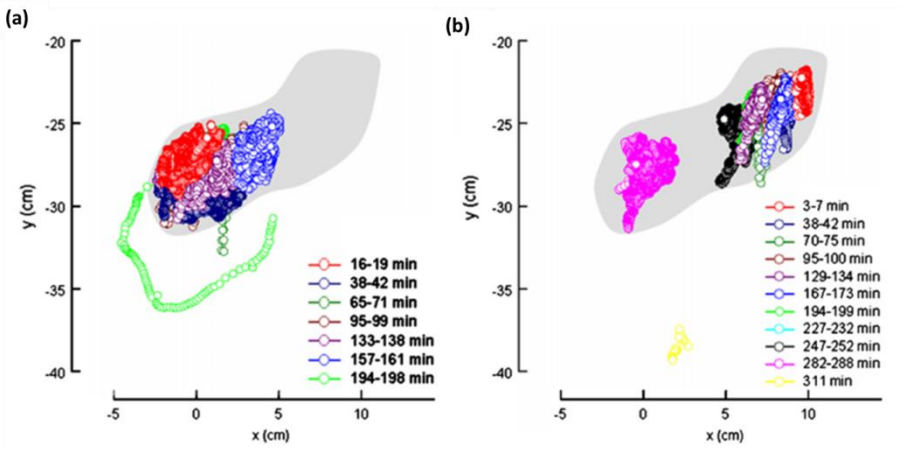


Figure I-19: Extrait de [85] **: Localisation du comprimé (résolution temporelle de 40 ms), (a) administration en début de repas et (b) administration 30 min après le début du repas.**

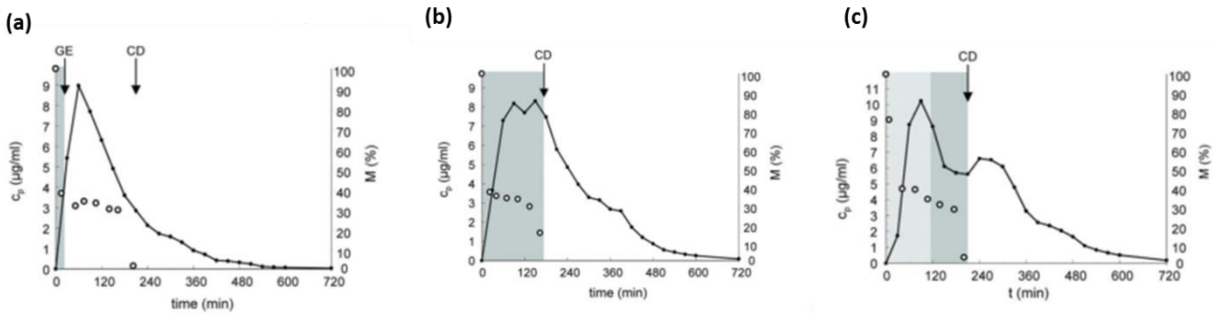


Figure I-20: Extrait de [87]**: Concentrations plasmatiques en amoxicilline (Cp), Moment magnétique (○), localisation intra-gastrique (gris clair: partie proximale de l'estomac, gris foncé: partie distale de l'estomac), GE la vidange gastrique, et CD le point de désintégration complète après administration d'un comprimé d'amoxicilline. (a) à jeun, (b) en début de repas et (c) 30 min après le repas.**

Pour étudier l'effet de la mise à jeun sur la biodisponibilité d'un comprimé d'amoxicilline les résultats pharmacocinétiques d'un comprimé à libération prolongée sont comparés aux résultats d'imagerie obtenus par MMM. Lors d'une mise à jeun totale l'AUC (Area Under Curve, représentant la biodisponibilité du PA) (1854 ± 280 µg*min/mL) est beaucoup plus faible que dans une situation d'administration en début de repas (2452 ± 354 µg*min/mL) ou après le repas (2605 ± 446 µg*min/mL). La localisation du comprimé permet de mettre en évidence le fait que la diminution de la biodisponibilité de l'amoxicilline lors de son administration à jeun était due à une vidange gastrique très rapide. En effet, l'amoxicilline passe dans la circulation sanguine dans la partie haute de l'intestin.

La connaissance du comportement des formes dans le tractus gastro-intestinal est un paramètre clé pour le développement de nouveaux vecteurs pour la voie orale. La technique d'imagerie par MMM permet d'étudier le comportement de ces formes dans le TGI et la combinaison avec les mesures pharmacocinétiques permet l'identification des lieux d'absorption des PAs dans le TGI. Ces expériences appelées par les auteurs « pharmaco-magnétographie » permettent notamment de choisir la situation de mise à jeun la plus adaptée pour avoir une biodisponibilité du PA améliorée. D'autres articles rapportent également l'utilisation de la détection utilisant un magnétomètre SQUID pour des problématiques très similaires de détection permettant de visualiser les forces digestives [88,89].

1. 2. Capteurs à effet Hall

Une sonde à effet Hall est un capteur qui permet la mesure d'un champ magnétique. La partie active de la sonde à effet Hall est une plaquette parallélépipédique constituée d'un matériau homogène conducteur. Les électrons sont déviés par le champ magnétique créant une différence de potentiel appelée tension de Hall. Lorsqu'un courant traverse un barreau composé d'un matériau conducteur et qu'un champ magnétique d'induction B est appliqué perpendiculairement au sens de passage du courant, une tension, appelée tension Hall, proportionnelle au champ magnétique et au courant apparaît sur les faces latérales du barreau. Un capteur à effet Hall donne un signal lorsqu' il détecte un champ magnétique.

Le groupe de P. Kucera, à Lausanne (Swiss Federal Institut of Technology), s'est intéressé à la détection magnétique grâce à des capteurs à effet Hall pour l'imagerie des forces digestives. Tel que rapporté dans un premier article, le dispositif a été mis au point et testé [90]. Le système de détection est une matrice 4x4 de 16 capteurs Hall cylindriques (Figure I-21). Le marqueur est un aimant cylindrique (6 x 7 mm) ayant un moment magnétique $\mu = 0{,}2$ A.m². L'utilisation de ce détecteur permet d'augmenter le rapport signal/bruit. Le système a été testé et s'est avéré fonctionnel sur une distance $z = 140$ mm. La précision de la position calculée est de quelques millimètres.

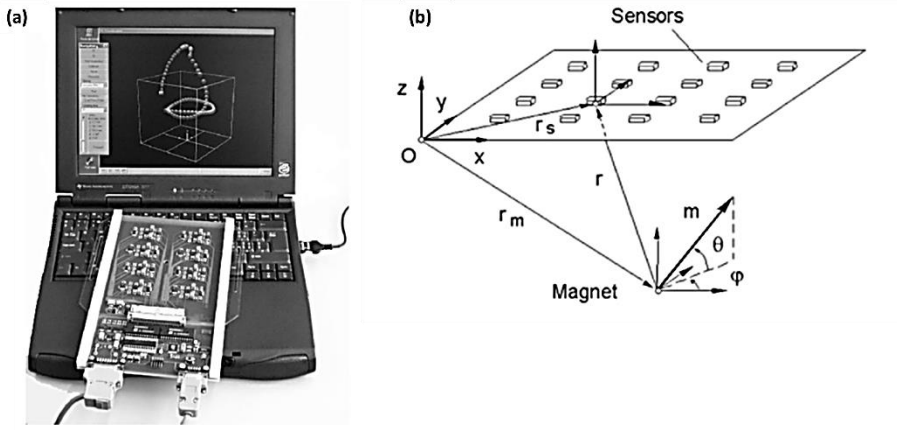


Figure I-21: Extrait de [90] **: (a) Photographie du système de détection et (b) coordonnées utilisées pour la détection, la position de l'aimant est donc définie selon 5 coordonnées *x*, *y*, *z*, *Θ* et *φ*.**

Dans un deuxième article, publié en 1997 [91], ce dispositif est testé sur dix volontaires sains afin d'évaluer la motilité digestive. Les dix volontaires sont allongés sur le dos avec la matrice 4x4 de détection posée sur l'abdomen. L'aimant est avalé, puis sa position dans le TGI est suivie pendant 2 jours. Le mouvement de l'aimant a été visualisé selon 3

rythmes différents: les battements du cœur (60/min), la respiration (16/min) et les contractions stomacales (3/min). Cette technique permet également de visualiser la dynamique de propulsion du contenu intestinal (Figure I-22).

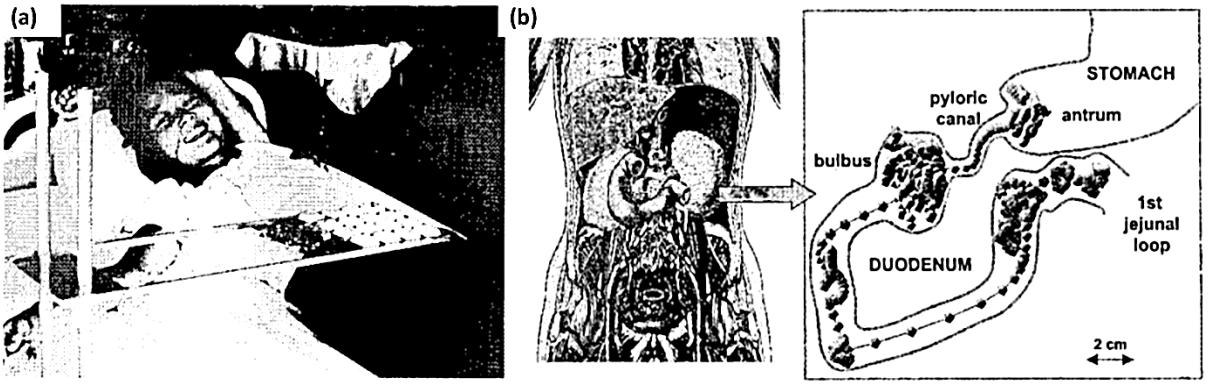


Figure I-22: Extrait de [91] **: (a) Photographie d'une volontaire portant une matrice 4x4 de détection sur l'abdomen et (b) Trajectoire de l'aimant dans le région estomac-duodénum.**

Le suivi d'un petit aimant à travers le tube digestif sert non seulement à déterminer la configuration anatomique mais aussi à évaluer la dynamique de la motilité gastro-intestinale. Cette approche nécessite l'ingestion d'un aimant permanent dans le TGI.

Cet essai a été suivi, en 2005, d'une étude plus complète, permettant de mieux identifier la vidange gastrique et les mouvements intra-intestinaux [92]. De plus, les observations sont couplées à de l'imagerie par rayon X ou par tomodensitométrie (Figure I-23). La gélule contenant l'aimant peut être suivie depuis l'œsophage jusqu'au rectum et pour six sujets, les passages, gastroduodénal et iléo-caecal, ont pu être identifiés. Les informations collectées sur la motilité ont montré des oscillations augmentant avec l'approche du pylore. Le temps de résidence dans l'estomac est variable (111 ± 98 min), le passage dans le duodénum est rapide (4 ± 3 min) et se fait grâce à de grands mouvements de propulsion (30 ± 19 cm/min) séparé par des moments de faible amplitude. La progression dans l'intestin grêle se fait en 315 ± 55 min.

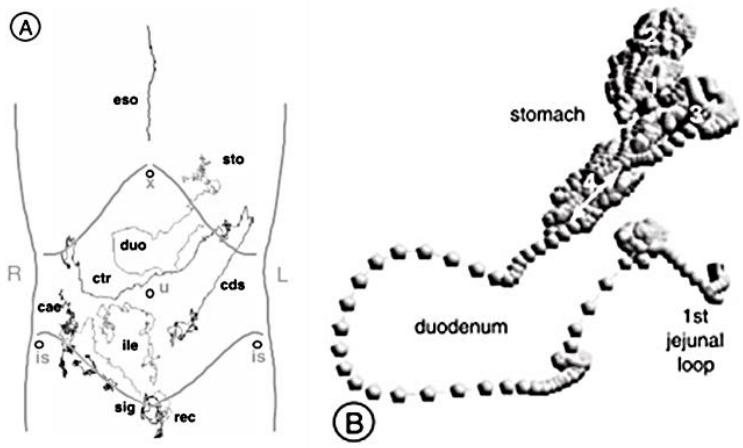


Figure I-23: Extrait de [92] **: Trajectoire de l'aimant dans le TGI avec (A) projection dans les différents segments, (B) configuration de l'estomac et du duodénum.**

Cette méthode de suivi d'un aimant ne requiert pas un contrôle strict de l'environnement de manipulation (contrairement à la technique MMM) et peut être maîtrisée rapidement par l'expérimentateur. Cette technique s'avère donc être un outil utile pour effectuer des études répétées de motilité gastro-intestinale. Les essais ont donc été poursuivis en 2006 afin de visualiser la motilité gastro-intestinale chez le rat [93]. Le dispositif, basé sur le même principe, a été miniaturisé pour être adapté aux rats. L'aimant reste environ 1 heure dans l'estomac avant de commencer à circuler dans l'intestin grêle. Le transit dans l'intestin grêle est évalué à 83 ± 14 minutes. Le temps de transit peut donc être évalué chez différentes espèces grâce à cette technique.

En 2010, l'équipe d'Edith Mathiowitz de l'université de Brown (USA), a repris cette technique d'observation d'un comprimé magnétique afin de calculer les forces digestives chez différentes espèces (humain, chien et rat) en fonction de l'état de mise à jeun. Cette étude s'intéresse aux forces de digestion, notamment les forces de pression, qui sont ici calculées en temps réel à partir des mesures effectuées *in vivo* du mouvement d'un comprimé magnétique dans l'estomac (Figure I-24).

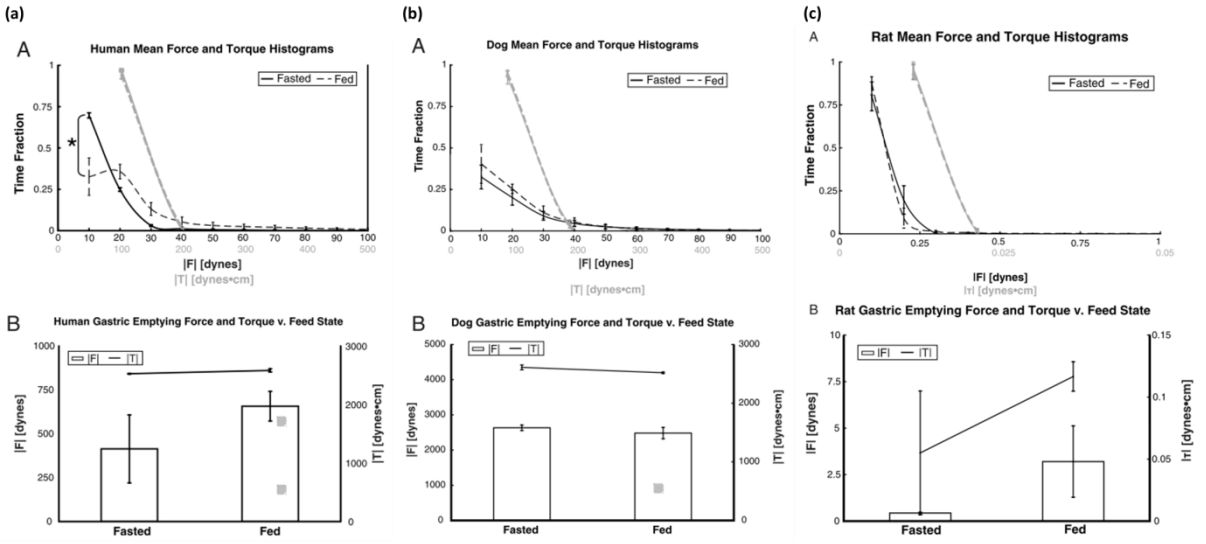


Figure I-24: Extrait de [94] **: A : histogramme de fréquence de l'amplitude de la force subie par le comprimé magnétique dans l'estomac et B : moyenne de la force de vidange gastrique ; (a) chez l'Homme, (b) chez le chien et (c) chez le rat.**

Ces mesures peuvent être corrélées avec les phases physiologiques de la digestion. Il a pu être observé que la force maximale s'exerçait sur le comprimé lors de la phase de contraction musculaire provoquant la vidange gastrique. Les résultats sur l'Homme ont été comparés à deux autres espèces utilisées comme modèles animaux (chiens beagle et rats) permettant une approche quantitative sur la transposabilité des résultats inter-espèces et donc un outil d'interprétation des résultats sur les formulations gastro-rétentives. Les observations ont montré que la pression ainsi que la force de vidange gastrique augmentent significativement pour un sujet non à jeun. De plus, les résultats obtenus chez l'Humain ont une importance clinique, car ils permettent de servir de point de comparaison entre sujet sain ou malade et permettant de remonter à l'identification des muscles impliqués dans des pathologies de dysmotilité gastro-intestinale.

D'autres techniques d'imagerie basées sur la détection de champ magnétique dans le TGI ont été mises au point pour le suivi des divers phénomènes liés à la digestion, comme par exemple des mesures de décroissance de champ ou de biosusceptométrie utilisant des appareillages contenant des bobines [95–99] ou des goniomètres [100].

1. 3. Résonance magnétique

On a vu dans la partie B de ce chapitre que les particules magnétiques possédaient des propriétés d'agents de contraste T2 en IRM. Cette technique peut donc également être utilisée pour l'imagerie du TGI. En 1990 [101], une étude préclinique a été menée sur les oxydes de fer superparamagnétiques comme agents de contraste pour l'IRM du tractus gastro-intestinal. Les acquisitions se font à 0,6 et 1,5 Tesla sur 15 volontaires. Des clichés du haut de l'abdomen ainsi que du pelvis ont été obtenus avant et après ingestion de l'agent de contraste à des doses de 22,5 à 225,0 mg de fer. L'agent de contraste atteint facilement les parties proximale et distale de l'intestin grêle provoquant une perte de l'intensité du signal (augmentation du T2) chez l'ensemble des sujets. L'utilisation de ces particules superparamagnétiques n'a pas généré d'artefact et a été bien tolérée. L'utilisation de cet agent de contraste a permis de distinguer les structures intestinales en améliorant la qualité des clichés de l'abdomen.

L'utilisation des oxydes de fer comme agents de contraste a été comparé aux techniques existantes, notamment à la tomographie [102]. Pour cela, 30 patients présentant des pathologies gastro-intestinales ont été étudiés. Ces patients ont d'abord subi un examen par tomographie abdominale (OECT), puis un examen par IRM. Les différences dans les observations sont dues aux différences entre les deux techniques, l'IRM avec les particules magnétiques comme agents de contraste utilise un contraste négatif (noir) tandis que l'OECT utilise un agent de contraste positif (blanc). La tomographie s'est avérée être une technique plus sensible que l'IRM pour la détection des pathologies abdominales. Au contraire, l'IRM utilisant des SPIO comme agents de contraste s'est révélée avoir une meilleure résolution que l'OECT. La conclusion de cette étude est que l'IRM est une bonne technique alternative à l'OECT pour l'imagerie du TGI.

Une autre étude rapporte la comparaison entre deux agents de contraste pour l'IRM du TGI [103]. Dans cet article, un agent de contraste positif, le gadolinium (Gd-DTPA) à une dose de 1 mmol/L, est comparé à un agent de contraste négatif, des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques de maghémite (OMP, γ-Fe_2O_3) à une dose de 0,5 mg/mL lors d'étude IRM dans la zone abdominale. 60 patients ont été examinés après une nuit de mise à jeun. Les deux se sont avérés être de bons agents de contraste pour l'imagerie du tube digestif. Le contraste entre la lumière intestinale et l'extérieur est meilleur lors de

l'utilisation de OMP de plus, cet agent de contraste ne présente pas d'artéfact dus aux mouvements intestinaux. En revanche, la résolution dans le tube digestif est meilleure lors de l'utilisation de Gd-DTPA permettant un meilleur diagnostic (Figure I-25). Enfin les deux agents de contraste se révèlent être équivalents à une imagerie par tomographie mais bien supérieurs à une IRM sans agent de contraste. En conclusion, ces deux agents de contraste peuvent être utilisés pour l'imagerie de l'abdomen.

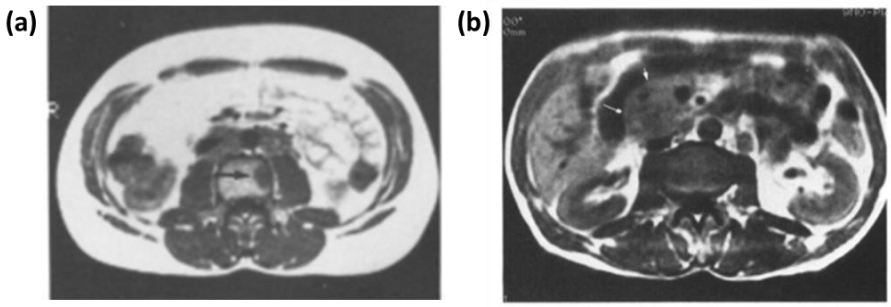


Figure I-25: Extrait de [103] **: (a) Clichés en contraste T1 avec Gd-DTPA et (b) clichés en contraste T2 avec OMP.**

Plus récemment, Schwizer et *al.*, à Zurich (Département de Gastroentérologie, University Hospital), se sont intéressés à l'utilisation de l'IRM comme technique d'observation des propriétés *in vivo* de formulations gastro-rétentives ingérées par voie orale [104]. Dans cette étude, des comprimés sont préparés pour pouvoir être imagés par IRM. Ces formes sont constituées de particules de magnétite Fe_3O_4 incluses dans la matrice d'un comprimé flottant à libération prolongée. Des molécules de Gd-DOTA sont encapsulées dans cette matrice comme modèle d'une drogue hydrophile. Il est possible de visualiser par IRM la position de ces comprimés dans un estomac contenant de la nourriture chez des volontaires ainsi que la libération et la distribution de la drogue modèle (Gd-DOTA) d'un comprimé flottant à libération prolongée (Figure I-26).

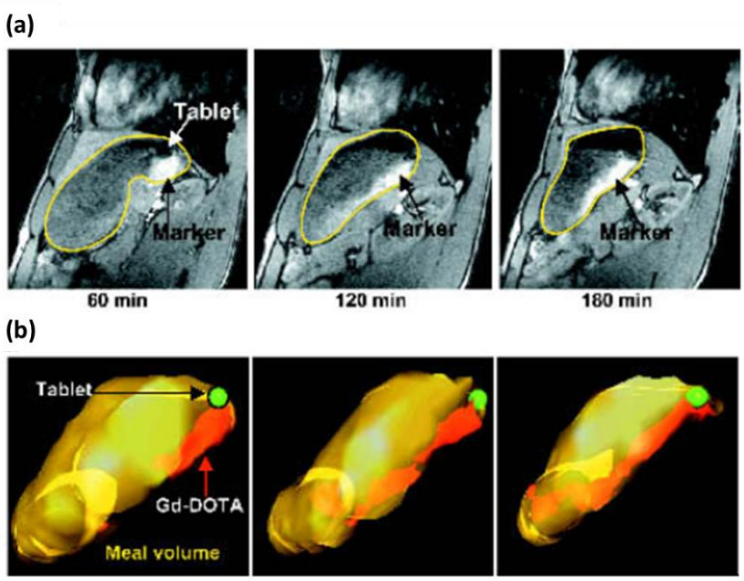


Figure I-26: Extrait de [104] **: Visualisation de la position du comprimé dans l'estomac, (a) clichés IRM en coupes sagittales avec acquisition T1 de l'estomac à t = 60 ; 120 et 180 minutes et (b) reconstruction 3D de la dynamique intra-gastrique du Gd-DOTA.**

Cette technique d'imagerie peut donc être utilisée pour visualiser le comportement *in vivo* de comprimés gastro-rétentifs ingérés par voie orale. Leur flottabilité et leur propriétés de relargage de drogues peuvent être étudiées en combinant l'utilisation de contraste T2 (particules magnétiques) pour visualiser la formulation et de contraste T1 (Gd) représentant la molécule active.

Tous ces outils d'imagerie ont servi à affiner la connaissance des forces régissant la circulation dans le TGI. Ces nouvelles données peuvent être prises en compte dans les expériences essayant d'améliorer le passage des PA le long du TGI.

L'utilisation de formulations retenues dans le TGI devrait permettre d'augmenter leur temps de résidence à un endroit désiré et ainsi d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs. La rétention peut être induite par des formes magnétiques grâce à l'utilisation d'un aimant externe.

2. Rétention magnétique pour la voie orale

La seconde approche est basée sur l'utilisation de NPMs afin de fabriquer des vecteurs magnétiques encapsulant des PAs pour mettre au point une stratégie « physique » d'amélioration du passage membranaire. Ces vecteurs magnétiques sont utilisés comme des systèmes rétentifs afin d'augmenter leur temps de résidence dans une zone particulière du tractus gastro-intestinal. La formulation est retenue plus longtemps dans la zone désirée grâce à une force magnétique exercée par un aimant externe.

2. 1. Rétention magnétique dans l'œsophage

En 1990, une équipe japonaise rapporte l'utilisation de granules magnétiques pour le ciblage de l'œsophage [105]. Selon cette étude, des granules sont fabriquées grâce à un mélange de polymère bioadhésif (carragénan), de particules de maghémite (aiguilles de γ-Fe_2O_3, 10 à 5 nm) et d'un colorant (le bleu brillant FCF, BB) comme drogue modèle, dans des proportions 9:10:1 (w/w). Le modèle animal choisi pour ces études *in vivo* est le lapin. Chaque animal a reçu 5 mg de granules contenant 50% de poudre magnétique. Les animaux sont immobilisés grâce à l'appareillage en Figure I-27 (a). Le champ magnétique exercé par un montage constitué de deux aimants permanent (4,6 x 2 x 1,2 cm) est de 1900 Gauss.

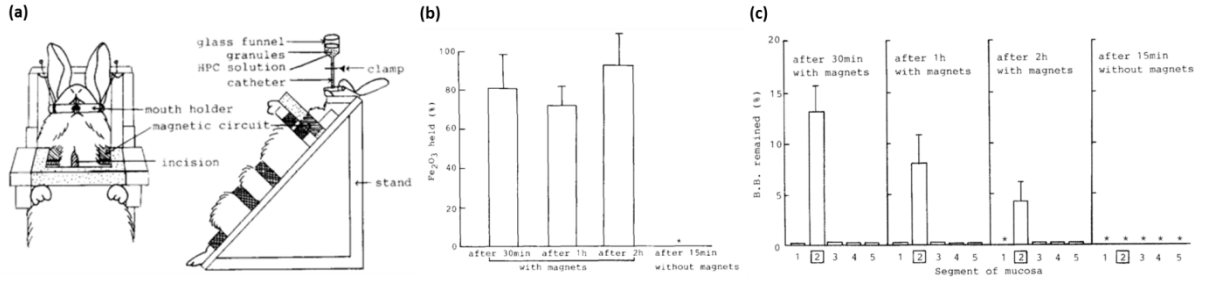
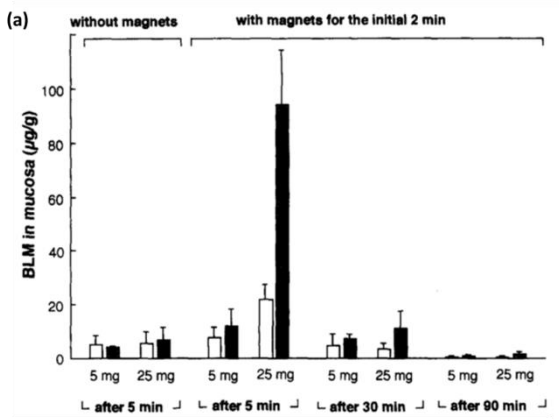


Figure I-27: Extrait de [105] **: (a) Schéma du montage expérimental de rétention magnétique, (b) Effet du champ magnétique sur la proportion de ferrite restant dans la zone de l'œsophage et (c) Effet du champ magnétique sur la proportion de BB restant dans la zone de l'œsophage (segment n°2).**

Après sacrifice, la quantité en ferrite et en BB est quantifiée afin d'évaluer l'efficacité de la rétention magnétique dans l'œsophage. Il a pu être observé que la rétention des granules magnétiques est très efficace, la ferrite est retrouvée dans l'œsophage après 2 heures (Figure I-27 (b)) et cela permet au BB d'être présent dans ce segment (n°2) de l'œsophage

pour des temps très supérieurs à une situation témoin sans rétention magnétique (Figure I-x (c)). Ces résultats sont très encourageants quant à l'utilisation de la rétention magnétique comme technique de ciblage de l'œsophage pour des problématiques de traitement localisé, par exemple la chimiothérapie des cancers œsophagiens.

Suite à cet article, une deuxième publication rapporte un essai de ciblage magnétique de l'œsophage [106] utilisant un montage similaire. Cette fois, le test se fait sur un modèle tumoral de cancer de l'œsophage greffé sur lapin. Les formulations magnétiques contiennent de la bléomycine (BLM), un anticancéreux. La rétention magnétique est ici efficace uniquement sur des temps très courts. Les examens sur les tumeurs ne montrent pas d'effet sur la croissance tumorale malgré l'augmentation de la concentration en BLM provoquée par la rétention magnétique (Figure I-28).



(b)

	Cancer volume (mm^3)	*n*
Control		
Non-anesthetized	404.3 ± 203.1	11
Anesthetized	246.8 ± 108.7	3
Administered		
Without magnets	200.9 ± 73.4	5
With magnets		
Non-magnetized granules[a]	180.6 ± 123.0	10
Magnetized granules[a]	116.9 ± 47.2	5
Magnetized granules[b]	293.5 ± 149.0	4

Figure I-28: Extrait de [106]**: Effet du champ magnétique (a) sur la concentration en BLM dans la muqueuse œsophagienne ☐ sans entrave buccale et ■ avec entrave buccale (*n = 3*) et (b) sur le volume tumoral.**

L'étude n'était pas concluante car les cinétiques de libération de la molécule active n'étaient pas adaptées.

La technique décrite ici est difficilement envisageable pour un transfert chez l'Homme, en effet, l'utilisation d'une entrave buccale empêchant la déglutition ainsi qu'un dispositif magnétique encombrant en plus d'une immobilisation du sujet, en font un traitement lourd.

2. 2. Rétention magnétique dans l'estomac

Le même groupe (Nagai T. *et al.*) a introduit, en 1995, l'idée de formulations magnétiques gastro-rétentives. L'idée est la même que pour les formulations décrites dans la partie A de ce chapitre. Grâce à la rétention magnétique, le but est cette fois de maintenir dans l'estomac des formulations à libération prolongée afin de permettre à une plus grande partie du PA contenu dans ces objets d'être libérée au début du tube digestif, c'est-à-dire près de sa zone de passage membranaire dans la circulation sanguine.

Une première étude a montré que des comprimés magnétiques à libération prolongée ont été mis au point pour maîtriser le temps de vidange gastrique des formes pharmaceutiques chez un modèle animal de chien (beagles) [107]. Les comprimés magnétiques ont été préparés avec de la ferrite ultrafine, de l'hydroxypropylcellulose et de la cinnarizine (BCS classe II) comme principe actif. Les comprimés magnétiques renfermant 50% en masse de ferrite ont présenté une bonne sensibilité au champ magnétique permettant une libération prolongée du principe actif.

Dans une seconde étude, l'acétaminophène (paracétamol), une molécule BCS classe III, c'est-à-dire très soluble et peu perméable a ensuite été utilisée [108]. Ces essais chez le chien ont étudié l'influence du temps de résidence de deux comprimés magnétiques à libération prolongée (S et F) dans l'estomac grâce à leur rétention magnétique permettant de contrôler la vitesse de la vidange gastrique. Les résultats pharmacocinétiques ont montré que l'AUC (Area Under Curve, représentant la biodisponibilité relative du PA) était multiplié par deux lors de l'utilisation de la rétention magnétique. En revanche, la biodisponibilité absolue n'est pas améliorée en comparaison d'une administration du PA libre en solution (Figure I-29).

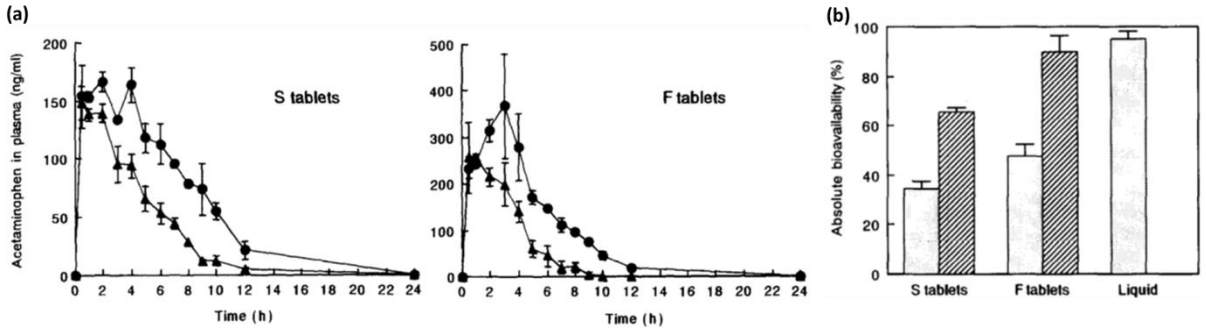


Figure I-29: Extrait de [108] **: (a) Concentration plasmatique en acétaminophène (ng/mL) en fonction du temps (h) après administration par voie orale de ● comprimé magnétique avec aimant, ▲ comprimé magnétique sans aimant et (b) biodisponibilité absolue de l'acétaminophène, grisé : sans aimant, hachuré : avec aimant (*n = 3*).**

Ces résultats sont encourageants quant à l'efficacité de la rétention magnétique dans l'estomac qui permet bien une augmentation du passage PA. En revanche, un paramètre crucial est également de bien contrôler la cinétique de libération du PA dans les formes à libération prolongée afin d'avoir un effet vraiment significatif sur la biodisponibilité.

L'équipe de R. Gröning, de l'université de Münster en Allemagne, s'est également intéressée à la rétention magnétique dans l'estomac d'un comprimé magnétique encapsulant un principe actif BCS classe III, l'acyclovir. Les sujets (*n=5*) sont mis à jeun pendant 10 heures avant administration des comprimés magnétiques à libération prolongée avec ou sans aimant ou d'un comprimé à libération immédiate. L'aimant externe en néodyme-fer-bore (6,3 × 3,6 × 3,0 cm) est fixé au niveau de l'estomac. Il a été montré que l'utilisation d'un système magnétique permettait d'influencer le profil d'absorption de l'acyclovir (BCS classe III) pour des formes à libération prolongée (Figure I-30).

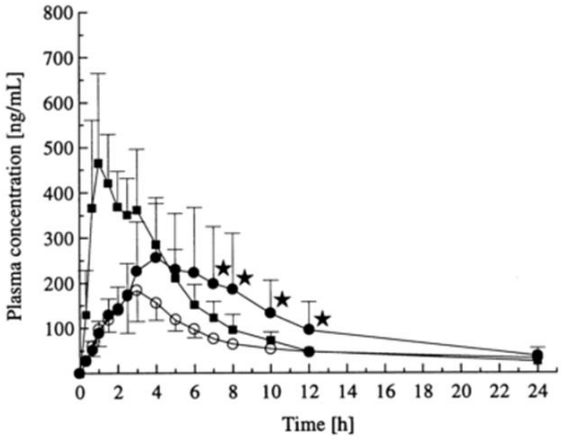


Figure I-30: Extrait de [109] **: Concentration plasmatique en acyclovir (ng/mL) en fonction du temps (h) après administration par voie orale (dose = 200 mg/sujet) de ● comprimé magnétique avec aimant, ○ comprimé magnétique sans aimant et ▲ comprimé à libération immédiate (*n = 5*).**

Quand un aimant externe est utilisé, les comprimés magnétiques demeurent dans l'estomac pendant plus longtemps, c'est-à-dire que le transit gastro-intestinal est retardé. Pour les PA absorbés uniquement dans la partie haute du TGI, cette stratégie est intéressante. On peut en effet obtenir des AUC comparables pour des formes à libération immédiate ou des formes à libération prolongée retenues dans l'estomac (2755,2 ± 609,8 *vs* 2802,7 ± 1525,0 ng*h/mL). Ces valeurs sont supérieures à celles d'une forme à libération prolongée non retenue dans l'estomac (1598,8 ± 270,0 ng*h/mL). Cette stratégie magnétique permet donc d'obtenir le passage dans la circulation sanguine d'une quantité de PA semblable mais sur des temps plus longs et avec des concentrations maximales dans le plasma plus faibles (263,2 ± 120,6 *vs*

532,6 ± 168,4 ng/mL). La technique de rétention magnétique dans l'estomac a permis de changer le profil d'absorption de l'acyclovir tout en en maintenant la quantité totale absorbée.

2. 3. Rétention magnétique dans l'intestin

La dernière approche concernant la rétention magnétique pour la délivrance par voie orale consiste à cibler directement la zone de passage du PA à travers la membrane digestive. Dans un premier article, en 1997, Langer *et al.* proposent de cibler directement une zone de l'intestin en plaçant un aimant (2 x 2 x 0,5 cm) sur l'abdomen de souris [110]. Pour cela, les souris sont placées en cage à contention et gavées avec une solution de liposomes magnétiques (environ 250 nm) contenant de la magnétite Fe_3O_4 (2 % en masse) et un radio-marqueur. Deux heures après gavage, les souris ont été sacrifiées et la quantité de liposomes contenue dans les organes a été comparée pour les animaux avec aimant sur l'abdomen, c'est-à-dire avec rétention magnétique et des animaux témoins sans aimant. Pour cela, la radioactivité contenue dans chaque organe a été dosée.

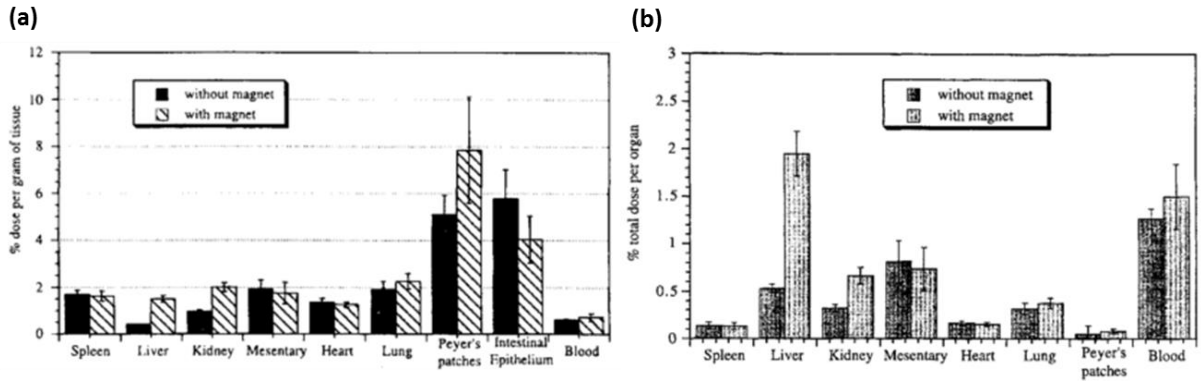


Figure I-31: Extrait de [110] **: Distribution *in vivo* des Fe_3O_4-liposomes dans les tissus après administration d'une dose (*n = 4*) (a) en % de la dose administrée, par gramme de tissu et (b) en % de la dose administrée, par organe.**

On peut voir que la quantité de liposomes présente dans différents les organes est plus importante avec aimant que sans aimant (Figure I-31) passant de 3,5 ± 0,6 % à 5,6 ± 1,0 % de la dose administrée. Lorsque cette quantité est exprimée comme le pourcentage de la dose administrée retenue par organe (Figure I-31 (b)), on peut voir que l'amélioration est surtout due à une rétention des vecteurs magnétiques très augmentée (≈ 1,9 *vs* ≈ 0,5 %) dans le foie lors de l'utilisation d'un aimant en comparaison de la zone d'intérêt, c'est-à-dire le sang où le vecteur doit pénétrer afin de libérer son principe actif (≈ 1,5 *vs* ≈ 1,3 %).

Dans une seconde étude [111], la même technique expérimentale est utilisée, mais cette fois, les vecteurs magnétiques sont des microparticules de polymère PLGA (poly (acide lactique co-glycolique)) contenant de la magnétite et un principe actif, l'insuline. Ces microparticules (diamètre d'environ 7 µm) sont obtenues grâce à une technique de double émulsion (W/O/W) et contiennent un pourcentage en magnétite plus élevé (8 %). Les aimants utilisés sont un peu plus gros (2,6 x 2,6 x 1,3 cm). Une journée après administration des microparticules magnétiques, les organes sont observés en coupes histologiques afin d'étudier leur toxicité potentielle (Figure I-32).

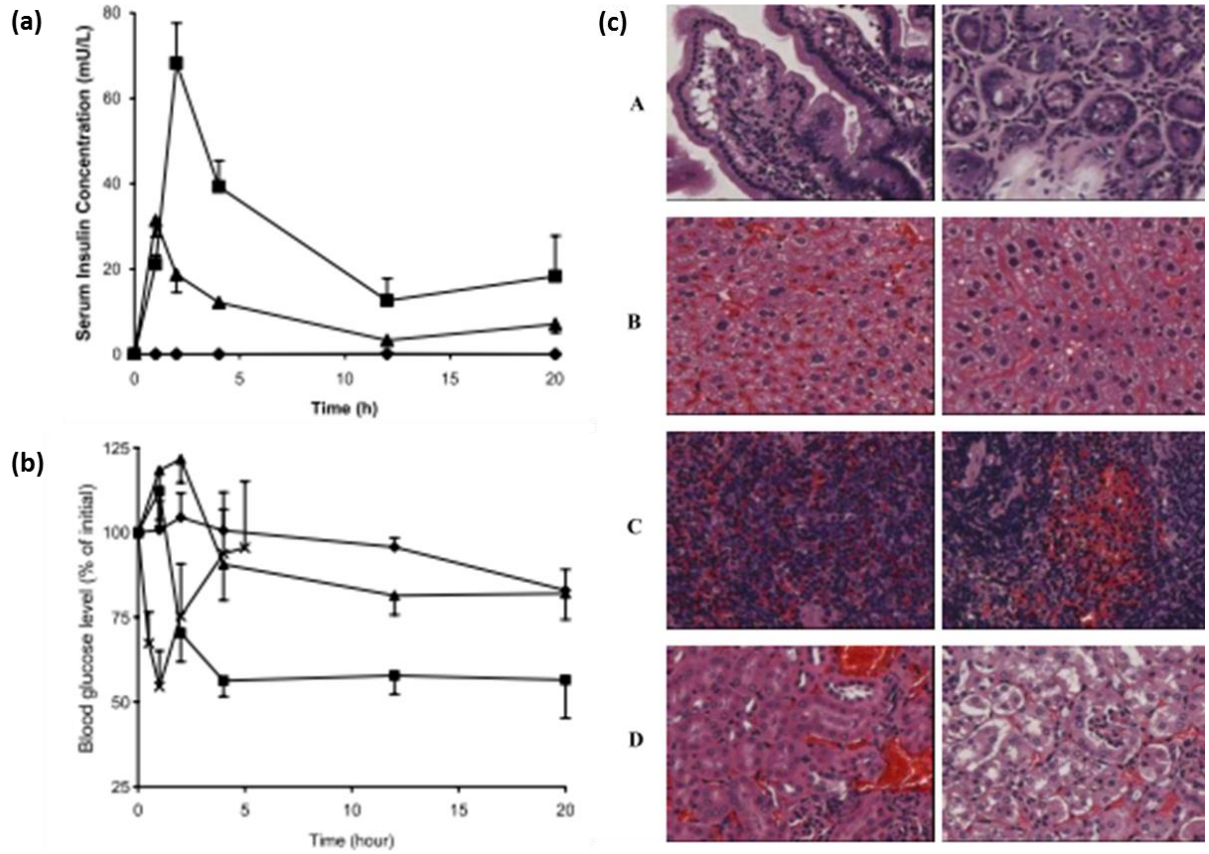


Figure I-x: Extrait de [111] **: (a) concentration en insuline dans le sérum (en mU/L) en fonction du temps (en h) et (b) réduction du taux de glucose (en % d'insuline) en fonction du temps (en h) pour ◆les contrôles, ▲ les microparticules insuline-magnétite-PLGA sans aimant, ■ les microparticules insuline-magnétite-PLGA avec aimant et ▲ 0,5 U/kg par voie IV (*n = 5*) et (c) coupes histologiques des organes grossis 50x (A) intestine grêle, (B) foie, (C) rate, (D) rein. Sur la gauche les contrôles et sur la droite après administration de MP encapsulant de la magnétite.**

Les résultats montrent une nette amélioration du passage de l'insuline dans le sang, ainsi qu'une diminution du taux de glucose (Figure I-32 (a) et (b)) lors de l'utilisation de la rétention magnétique. La biodisponibilité de l'insuline passe alors de 0,87 ± 0,29 *vs* 0,30 ±

0,06%, respectivement avec et sans aimant. De plus, les analyses histologiques ne révèlent pas de signes d'inflammation aigüe, d'infiltration de leucocytes, de nécrose ou de migration de macrophages (Figure I-32 (c)). Cet article présente donc des résultats encourageants pour l'utilisation de la rétention magnétique comme technique d'amélioration de la biodisponibilité de principes actifs. Malgré cela, la biodisponibilité reste trop faible, moins de 1 %, pour pouvoir être applicable *in vivo*.

Les mêmes auteurs se sont intéressés en 2008, à la même problématique mais en utilisant un vecteur magnétique différent [112]. Des complexes sont formés par interactions électrostatiques entre des microparticules de polymère (PLGA) (3 à 5 µm), contenant l'insuline, chargé positivement et des microparticules d'oxyde de fer superparamagétiques, chargées négativement (ratio 15:1) (Figure I-33 (a)). Six heures après administration, des coupes de l'intestin grêle sont observées et montrent bien la présence des microparticules marquées dans les groupes avec aimant (Figure I-33 (b)). Le pourcentage d'insuline marquée est six fois plus important pour les souris avec aimant que sans aimant (32,5 ± 3,13 *vs* 5,4 ± 4,41 %) (Figure I-33 (c)).

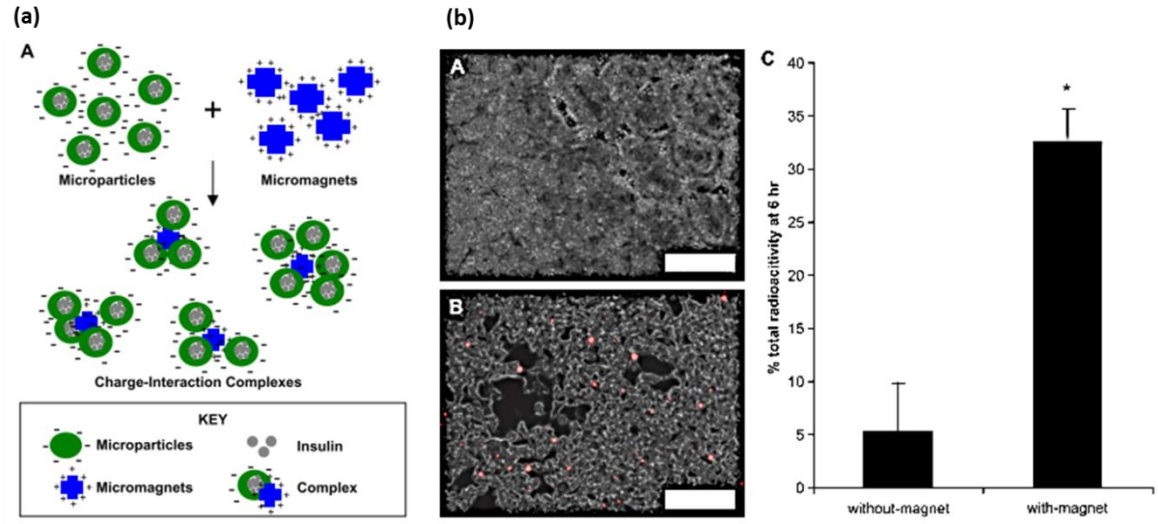


Figure I-33: Extrait de [112]**: (a) Schéma du complexe formé par interaction électrostatique entre les microparticules de polymère contenant la protéine chargé négativement et les micro-aimants chargés positivement; (b) Coupes histologiques de l'intestin grêle de souris ayant reçu par voie orale des composés microparticules-micro-aimants encapsulant de la rhodamine-dextran (A) sans et (B) avec aimant placé sur l'abdomen après 8 h (barres d'échelle = 200 µm) (C) Quantité de radioactivité détectée dans l'intestin grêle 6 h après dosage des souris ayant reçu des composés microparticules-micro-aimants contenant 1 µCi d'insuline marquée ^{125}I-Insuline.**

Cette étude a montré que l'augmentation de la taille des vecteurs utilisés pour la rétention magnétique, passant de l'échelle nanométrique à millimétrique, était une stratégie intéressante

permettant d'éviter les problèmes d'absorption systémique. En revanche, on peut constater que pour être efficaces, ces microparticules doivent rester en contact avec la muqueuse intestinale pendant des temps très longs. Cela implique un risque de toxicité ainsi que des difficultés quant à la mise en œuvre *in vivo*.

Après s'être intéressée aux problématiques d'étude des forces dans le TGI, l'équipe d'E. Mathiowitz a publié en 2011 un article sur une technique permettant de retenir avec précision une gélule contenant un petit aimant dans un endroit ciblé du TGI [113]. Cette étude repose sur l'utilisation de l'imagerie afin d'observer la position de cette gélule. Cependant, malgré de bons résultats, le dispositif de rétention magnétique reste très complexe et peu transposable chez l'Homme. De plus, un aimant permanent millimétrique doit être ingéré, ce qui peut poser des problèmes de toxicité.

Dans ce travail de thèse, une nouvelle approche est proposée. L'étude portera sur des formes magnétiques divisées de taille millimétrique. L'accumulation de ces vecteurs au niveau du site de passage du PA dans le sang et l'effet de cette accumulation sur la biodisponibilité du PA sera étudiée. Comme il a été expliqué dans la partie décrivant les différents phénomènes se produisant lors de la phase biopharmaceutique, plus la concentration en PA aux environs de la membrane sera importante, plus le passage du PA dans la circulation sanguine sera favorisé. Nous chercherons donc à voir si la rétention magnétique peut provoquer une surconcentration du PA menant à une augmentation du passage membranaire. La cinétique de libération du PA dans différentes formes magnétiques (Chapitre II) et son rôle sur le passage membranaire seront étudié (Chapitre III et IV).

Bibliographie

[1] Chen H, Langer R. *Oral particulate delivery: Status and future trends*. Adv Drug Deliv Rev **1998**;34:339–50.

[2] Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison G. *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res **1995**;12:413–20.

[3] Balimane P V, Chong S, Morrison RA. *Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption*. J Pharmacol Toxicol Methods **2000**;44:301–12.

[4] Boisset M, Botham RP, Haegele KD, Lenfant B, Pachot JI. *Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and in vivo: importance of drug ionisation in the in vitro prediction of in vivo absorption*. Eur J Pharm Sci **2000**;10:215–24.

[5] Forest M. *La participation de l'intestin grêle dans la digestion*. <http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f:bio903/Digestif/intestingrele.htm>.

[6] Reed KK, Wickham R. *Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro*. Semin Oncol Nurs **2009**;25:3–14.

[7] Wawrezinieck A, Péan J, Wüthrich P, Benoit J. *Biodisponibilité et vecteurs particulaires pour la voie orale*. Medecine/Sciences **2008**;24:659–64.

[8] Balimane P V, Chong S. *Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique*. Drug Discov Today **2005**;10:335–43.

[9] BANKER GS, RHODES CT. *Modern pharmaceutics*. Marcel Dek. **2006**.

[10] AMIJI MM, SANDMANN BJ. *Applied physical pharmacy*. McGraw-Hil. **2003**.

[11] VAUBOURDOLLE M. *Médicaments*. Le Moniteu. **2007**.

[12] Mathieu C. *Le CO_2 supercritique : un fluide prometteur dans la formulation pharmaceutique*. UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1, **2012**.

[13] Toutain PL, Bousquet-Melou A. L*a biodisponibilité et son évaluation* **2001**:1–38. <http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/La_biodisponibilite_et_son_evaluation.pdf>.

[14] Agency. EEM. *Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. **2001**.<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50>.

[15] Lindenberg M, Kopp S, Dressman JJB. *Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system*. Eur J Pharm Biopharm **2004**;58:265–78.

[16] *Biopharmaceutical Classification System and Formulation Development*. vol. 9. **2011**.

[17] Zur M, Hanson AS, Dahan A. *The complexity of intestinal permeability: Assigning the correct BCS classification through careful data interpretation*. Eur J Pharm Sci **2014**;61:11–7.

[18] Sambuy Y, Angelis I De, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier : influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics* **2005**:1–26.

[19] Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. *Good Caco-2 cell culture practices*. Toxicol In Vitro **2012**;26:1243–6.

[20] Artursson P, Karlsson J. *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Biochem Biophys Res Commun **1991**;175:880–5.

[21] Artursson P, Palm K, Luthman K. *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Adv Drug Deliv Rev **2001**;46:27–43.

[22] Larsen EH. *Hans H. Ussing—scientific work: contemporary significance and perspectives*. Biochim Biophys Acta - Biomembr **2002**;1566:2–15.

[23] Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. *Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs*. Eur J Pharm Sci **2012**;46:367–73.

[24] Sjöberg Å, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell A-L. *Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique*. Eur J Pharm Sci **2013**;48:166–80.

[25] Lennernäs H, Nylander S, Ungell A-L. *Jejunal permeability : a comparaison between the ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans*. Pharm Res **1997**;14:667–71.

[26] Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. *Comparaison between permeability coefficients in rat and human jejunum*. Pharm Res **1996**;13:1336–42.

[27] Takano M, Koyama Y, Nishikawa H, Murakami T, Yumoto R. *Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine*. Eur J Pharmacol **2004**;502:149–55.

[28] Tamai I, Saheki A, Saitoh R, Sai Y, Yamade I, Akira T. *Nonlinear Intestinal Absorption of 5-Hydroxytryptamine Receptor Antagonist Caused by Absorptive and Secretory*. J Pharmacol Exp Ther **1997**;283:108–15.

[29] Blume HH, Schug BS. *The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs — better candidates for BA/BE waiver?* Eur J Pharm Sci **1999**;9:117–21.

[30] Davis SS. *Formulation strategies for absorption windows*. Drug Discov Today **2005**;10:249–57.

[31] Choonara BF, Choonara YE, Kumar P, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. *A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules*. Biotechnol Adv **2014**.(in press)

[32] Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. *Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies*. Curr Opin Pharmacol **2006**;6:501–8.

[33] Hoffman A, Stepensky D, Lavy E, Eyal S, Klausner E, Friedman M. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms*. Int J Pharm **2004**;277:141–53.

[34] Bardonnet PL, Faivre V, Pugh WJ, Piffaretti JC, Falson F. *Gastroretentive dosage forms: overview and special case of Helicobacter pylori.* J Control Release **2006**;111:1–18.

[35] Nayak AK, Maji R, Das B. *Gastroretentive drug delivery systems : a review* Asian J of Pharm and Clin Res **2010**;3:1-10.

[36] Chen Y-C, Ho H-O, Lee T-Y, Sheu M-T. *Physical characterizations and sustained release profiling of gastroretentive drug delivery systems with improved floating and swelling capabilities.* Int J Pharm **2013**;441:162–9.

[37] Klausner E a, Lavy E, Stepensky D, Friedman M, Hoffman A. *Novel gastroretentive dosage forms: evaluation of gastroretentivity and its effect on riboflavin absorption in dogs.* Pharm Res **2002**;19:1516–23.

[38] Kumar S, Jamil F, Rajput M, Sharma S. *Gastro Retentive Drug Delivery System : Features and Facts*. IJRPBS **2012**;3:125–36.

[39] Andrews GP, Laverty TP, Jones DS. *Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery*. Eur J Pharm Biopharm **2009**;71:505–18.

[40] Bernkop-Schnürch A. *Mucoadhesive polymers: strategies, achievements and future challenges*. Adv Drug Deliv Rev **2005**;57:1553–5.

[41] Eiamtrakarn S, Itoh Y, Kishimoto J, Yoshikawa Y, Shibata N, Murakami M, et al. *Gastrointestinal mucoadhesive patch system (GI-MAPS) for oral administration of G-CSF, a model protein*. Biomaterials **2002**;23:145–52.

[42] Grabovac V, Guggi D, Bernkop-Schnürch A. *Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers*. Adv Drug Deliv Rev **2005**;57:1713–23.

[43] Helliwell M. *The use of bioadhesives in targeted delivery within the gastrointestinal tract*. Adv Drug Deliv Rev **1993**;11:221–51.

[44] Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. *The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev **2005**;57:1666–91.

[45] Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. *Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system*. Int J Pharm **2003**;255:13–32.

[46] Whitehead K, Shen Z, Mitragotri S. *Oral delivery of macromolecules using intestinal patches: Applications for insulin delivery*. J Control Release **2004**;98:37–45.

[47] Bhardwaj L, Sharma PK, Malviya R. *A Short Review on Gastro Retentive Formulations for Stomach Specific Drug Delivery : Special Emphasis on Floating In situ Gel Systems*. African J Basic Appl Sci **2011**;3:300–12.

[48] Eberle VA, Schoelkopf J, Gane PAC, Alles R, Huwyler J, Puchkov M. *Floating gastroretentive drug delivery systems: Comparison of experimental and simulated dissolution profiles and floatation behavior*. Eur J Pharm Sci **2014**;58:34–43.

[49] El-Kamel A., Sokar M., Al Gamal S., Naggar V. *Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system*. Int J Pharm **2001**;220:13–21.

[50] Rouge N, Allémann E, Gex-Fabry M, Balant L, Cole ET, Buri P, et al. *Comparative pharmacokinetic study of a floating multiple-unit capsule, a high-density multiple-unit capsule and an immediate-release tablet containing 25 mg atenolol*. Pharm Acta Helv **1998**;73:81–7.

[51] Sato Y, Kawashima Y, Takeuchi H, Yamamoto H. *In vitro and in vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans*. Int J Pharm **2004**;275:97–107.

[52] Shakya R, Thapa P, Saha RN. *In vitro and in vivo evaluation of gastroretentive floating drug delivery system of ofloxacin*. Asian J Pharm Sci **2013**;8:191–8.

[53] Singh B. *Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention*. J Control Release **2000**;63:235–59.

[54] Singh BN, Kim KH. *Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention*. J Control Release **2000**;63:235–59.

[55] Klausner E a, Lavy E, Friedman M, Hoffman A. *Expandable gastroretentive dosage forms*. J Control Release **2003**;90:143–62.

[56] Häfeli UO. **Magnetically modulated therapeutic systems**. Int J Pharm **2004**;277:19–24..

[57] Silva ÉL, Carvalho JF, Pontes TRF, Oliveira EE, Francelino BL, Medeiros AC, et al. *Development of a magnetic system for the treatment of Helicobacter pylori infections.* J Magn Magn Mater **2009**;321:1566–70.

[58] Waghmode SS, Abhang DR, Patil MB, Gangarde NA, Patil DP, Ahire SN. *Stomach specific drug delivery system and its in vitro-in vivo evaluation: a review*. IJPSR **2012**;3:1593–602.

[59] Olsson MBE, Persson BRB, Salford LG, Schröder U. *Ferromagnetic particles as contrast agent in T2 NMR imaging*. Magn Reson Imaging **1986**;4:437–40.

[60] Hahn PF, Stark DD, Saini S, Lewis J, Wittenberg J, Ferrucci JT. *Ferrite particles for bowel contrast in MR imaging: design and feasibility Studies*. Radiology **1987**;164:37–41.

[61] Jung CW, Jacobs P. *Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: Ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil*. Magn Reson Imaging **1995**;13:661–74.

[62] Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. *Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy*. J Mater Chem **2004**;14:2161.

[63] Pankhurst Q a, Connolly J, Jones SK, Dobson J. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. J Phys D Appl Phys **2003**;36:R167–R181.

[64] Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. *Magnetic nanoparticles for theragnostics*. Adv Drug Deliv Rev **2009**;61:467–77.

[65] Sun C, Lee JSH, Zhang M. *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev **2008**;60:1252–65.

[66] Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. *Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging*. Adv Drug Deliv Rev **2010**;62:284–304.

[67] Prodan AM, Iconaru SL, Ciobanu CS, Chifiriuc MC, Stoicea M, Predoi D. *Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Characterization and Toxicity Evaluation by In Vitro and In Vivo Assays*. J Nanomater **2013**;2013:1–10.

[68] Levy M, Luciani N, Alloyeau D, Elgrabli D, Deveaux V, Pechoux C, et al. *Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles*. Biomaterials **2011**;32:3988–99.

[69] Lartigue L, Alloyeau D, Kolosnjaj-Tabi J, Javed Y, Guardia P, Riedinger A, et al. *Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes : High-Resolution In Situ*. ACS Nano **2013**;7:3939–52.

[70] Odenbach S. *Colloidal Magnetic Fluids*. Lecture. **2009**.

[71] West AR. S*olid State Chemistry and its Application*. John Wiley. **1984**.

[72] Bacri J-C, Perzynski R, Salin D, Cabuil V, Massart R. *Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids.* J Magn Magn Mater **1986**;62:36–46.

[73] Cullity BD. *Introduction to Magnetic Materials*. Addison We. **1972**.

[74] Chantrell RW, Popplewell J, Charles SW. *Measurements of particle size distribution parameters in ferrofluids*. IEEE Trans Magn **1978**;14:975–7.

[75] Mitchell DG, Cohen M. *MRI Principles*. Saunders; **2003**.

[76] Brown, M.; Semelka R. *MRI: basic principles and applications*. Wiley-Liss; **2003**.

[77] Rümenapp C, Gleich B, Haase A. *Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics*. Pharm Res **2012**;29:1165–79.

[78] Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito C, Bengele H, Josephson L. *Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging*. Radiology **1990**;175:489–93.

[79] Josephson L, Lewis J, Jacobs P, Hahn PF, Stark DD. *The effects of iron oxides on proton relaxivity*. Magn Reson Imaging **1988**;6:647–53.

[80] Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications*. Chem Rev **2008**;108:2064–110.

[81] Corato R Di, Kolosnjaj-tabi J, Dupuis V, Cle O, Gazeau F, Wilhelm C, et al. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia 2012.

[82] Weitschies W, Kötitz R, Cordini D, Trahms L. *High-resolution monitoring of the gastrointestinal transit of a magnetically marked capsule*. J Pharm Sci **1997**;86:1218–22.

[83] Weitschies W, Karaus M, Cordini D, Trahms L, Breitkreutz J, Semmler W. *Magnetic marker monitoring of disintegrating capsules*. Eur J Pharm Sci **2001**;13:411–6.

[84] Weitschies W. *Determination of the disintegration behavior of magnetically marked tablets*. Eur J Pharm Biopharm **2001**;52:221–6.

[85] Weitschies W, Kosch O, Mönnikes H, Trahms L. *Magnetic Marker Monitoring: An application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms*. Adv Drug Deliv Rev **2005**;57:1210–22.

[86] Weitschies W, Friedrich C, Wedemeyer RS, Schmidtmann M, Kosch O, Kinzig M, et al. *Bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid from extended release tablets depends on intragastric tablet deposition and gastric emptying*. Eur J Pharm Biopharm **2008**;70:641–8.

[87] Weitschies W, Blume H, Mönnikes H. *Magnetic Marker Monitoring: High resolution real-time tracking of oral solid dosage forms in the gastrointestinal tract*. Eur J Pharm Biopharm **2010**;74:93–101.

[88] Forsman M. *Intragastric movement assessment by measuring magnetic field decay of magnetised tracer particles in a solid meal*. Med Biol Eng Comput **2000**;38:169–74.

[89] Andra W, Danan H, Kirmße W, Kramer H, Saupe P, Schmieg R, et al. *A novel method for real-time magnetic marker monitoring in the gastrointestinal tract*. Phys Med Biol **2000**;45:3081-3093.

[90] Schlageter V, Besse P-A, Popovic RS, Kucera P. *Tracking system with five degrees of freedom using a 2D-array of Hall sensors and a permanent magnet*. Sensors Actuators A Phys **2001**;92:37–42.

[91] Schlageter V, Drljaca P, Popovic R, Kucera P. *A magnetic tracking system based on highly sensitive integrated hall sensor*. JSME Int J **2002**;45:967–73.

[92] Stathopoulos E, Schlageter V, Meyrat B, Ribaupierre Y, Kucera P. *Magnetic pill tracking: a novel non-invasive tool for investigation of human digestive motility*. Neurogastroenterol Motil **2005**;17:148–54.

[93] Guignet R, Bergonzelli G, Schlageter V, Turini M, Kucera P. *Magnet Tracking: A new tool for in vivo studies of the rat gastrointestinal motility*. Neurogastroenterol Motil **2006**;18:472–8.

[94] Laulicht B, Tripathi A, Schlageter V, Kucera P, Mathiowitz E. *Understanding gastric forces calculated from high-resolution pill tracking*. PNAS **2010**;107:8201–6.

[95] Cordova-Fraga T, Bernal-Alvarado JJ, Gutierrez-Juarez G, Sosa M, Vargas-Luna M. *Gastric activity studies using a magnetic tracer*. Physiol Meas **2004**;25:1261–70.

[96] Corá L a., Américo MF, Oliveira RB, Baffa O, Moraes R, Romeiro FG, et al. *Disintegration of magnetic tablets in human stomach evaluated by alternate current Biosusceptometry*. Eur J Pharm Biopharm **2003**;56:413–20.

[97] Corá L a., Romeiro FG, Américo MF, Oliveira RB, Baffa O, Stelzer M, et al. *Gastrointestinal transit and disintegration of enteric coated magnetic tablets assessed by ac biosusceptometry.* Eur J Pharm Sci **2006**;27:1–8.

[98] Daghastani NA, Braga FJ, Oliveira RB, Baffa O. *Oesophageal transit time evaluated by a biomagnetic method*. Physiol Meas **1998**;19:413–20.

[99] Miranda JR, Oliveira RB, Sousa PL, Braga FJ, Baffa O. *A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions*. Phys Med Biol **1997**;42:1791–9.

[100] Prakash NM, Brown MC, Spelman F a, Nelson J a, Read P, Heitkemper MM, et al. *Magnetic field goniometry: a new method to measure the frequency of stomach contractions.* Dig Dis Sci **1999**;44:1735–40.

[101] Hahn P, Stark D, Lewis J, Saini S, Elizondo G, Weissleder R, et al. *First clinical trial of a new superparamagnetic iron oxide for use as an oral gastrointestinal contrast agent in MR imaging.* Radiology **1990**;175:695–700.

[102] Johnson WK, Stoupis C, Torres GM, Rosenberg EB, Ros PR. *Superparamagnetic iron oxide (SPIO) as an oral contrast agent in gastrointestinal (GI) magnetic resonance imaging (MRI): comparison with state-of-the-art computed tomography (CT)*. Magn Reson Imaging **1996**;14:43–9.

[103] Vlahos L, Gouliamos A, Athanasopoulou A, Kotoulas G, Claus W, Hatziioannou A, et al. *A Comparative study between Gd-DTPA and oral magnetic particles (OMP) as gastrointestinal 5GI) contrast agent for MRI of the abdomen*. Magn Reson Imaging **2000**;12:719–26.

[104] Steingoetter a., Weishaupt D, Kunz P, Mäder K, Lengsfeld H, Thumshirn M, et al. *Magnetic Resonance Imaging for the in Vivo Evaluation of Gastric-Retentive Tablets*. Pharm Res **2003**;20:2001–7.

[105] Ito R, Machida Y, Sannan T, Nagai T. *Magnetic granules: A novel system for specific drug delivery to esophageal mucosa in oral administration.* Int J Pharm **1990**;61:109–17.

[106] Nagano H, Machida Y, Iwata M, Imada T, Noguchi Y, Matsumoto A, et al. *Preparation of magnetic granules containing bleomycin and its evaluation using model esophageal cancer*. Int J Pharm **1997**;147:119–25.

[107] Fujimori J, Machida Y, Nagai T. *Preparation of a magnetically-responsive tablet and confirmation of its gastric residence in beagle dogs*. STP Pharma Sci **1994**;4:425–30.

[108] Fujimori J, Machida Y, Tanaka S, Nagai T. *Effect of magnetically controlled gastric residence of sustained release tablets on bioavailability of acetaminophen*. Int J Pharm **1995**;119:47–55.

[109] Gröning R, Berntgen M, Georgarakis M. *Acyclovir serum concentrations following peroral administration of magnetic depot tablets and the influence of extracorporal magnets to control gastrointestinal transit*. Eur J Pharm Biopharm **1998**;46:285–91.

[110] Chen H, Langer R. *Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles*. Pharm Res **1997**;14:537–40.

[111] Cheng J, Teply B a., Jeong SY, Yim CH, Ho D, Sherifi I, et al. *Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs*. Pharm Res **2006**;23:557–64.

[112] Teply B a., Tong R, Jeong SY, Luther G, Sherifi I, Yim CH, et al. *The use of charge-coupled polymeric microparticles and micromagnets for modulating the bioavailability of orally delivered macromolecules*. Biomaterials **2008**;29:1216–23.

[113] Laulicht B, Gidmark NJ, Tripathi A, Mathiowitz E. *Localization of magnetic pills*. PNAS **2011**;108:2252–7.

Chapitre II.

Formes magnétiques pour la voie orale

Chapitre II.

Mise au point de formes magnétiques pour la voie orale

La formulation galénique est la science de mise en forme des médicaments. Les médicaments sont constitués d'un principe actif (PA), molécule active ayant un rôle thérapeutique et d'excipients, substances associées au principe actif et dont la fonction est de faciliter l'administration, la conservation et le transport de ce principe actif jusqu'à son site d'absorption, permettant ainsi l'obtention d'une forme galénique. La formulation est une étape essentielle dans la fabrication d'une forme administrable au patient. En effet, de nombreuses molécules présentent une activité thérapeutique intéressante, mais la principale limitation dans leur utilisation est de trouver une méthode efficace pour les faire parvenir à leur site d'action.
Dans notre étude, le principe de la rétention magnétique a été étudié, il a donc été nécessaire de mettre au point des formulations magnétiques. Les contraintes imposées à la fois par les caractéristiques physico-chimiques du principe actif modèle choisi et par les nanoparticules magnétiques (NPMs) devant être contenues dans les formulations et par les expériences *in vitro* et *in vivo* devant être réalisées seront décrites. Dans un premier temps, des billes millimétriques de biopolymères magnétiques ont été mises au point au laboratoire PHENIX afin d'effectuer les essais préliminaires de preuve de concept des effets de la rétention magnétique. Puis, des mini-granules magnétiques ont été fabriquées à l'échelle pilote dans les laboratoires de formulation galénique du groupe Servier afin de vérifier la transposabilité des résultats. Toutes les formulations mises au point seront décrites et caractérisées selon différents critères physico-chimiques (efficacité d'encapsulation, cinétique de libération, taux d'encapsulation du PA) et magnétiques (charge magnétique et taux d'encapsulation des NPMs). Pour les formulations utilisées dans les études *in vivo*, leurs cinétiques de libération à différents pH (milieux stomacal, intestinal et biorelevant) ainsi que leurs propriétés superparamagnétiques seront évaluées.

1. Choix des formulations

Au-delà des propriétés pharmacologiques du principe actif, qui confèrent au médicament son action thérapeutique, il est tout aussi important de s'intéresser aux propriétés physico-chimiques de la formulation. En effet, c'est l'association du principe actif et des excipients utilisés qui confère à la forme finale ses différentes propriétés biopharmaceutiques.

1. 1. Le principe actif modèle

Le principe actif modèle choisi (S0-44497-02) appartient à la classe III de la classification BCS [1], ce qui signifie qu'il présente une très bonne solubilité dans l'eau (solubilité à pH 6,8 = 12 mg/mL) mais une très faible perméabilité. Sa fraction absorbée obtenue sur modèle Caco-2 est inférieure à 30%. C'est une molécule hydrophile de haut poids moléculaire, dont les propriétés physico-chimiques sont : Mw = 769 g/mol (= 597 g/mol pour la base) ; pKa = 7,4 et 3,5 ; et coefficient de partage octanol/eau : Log P = -1,11, log D à pH 7,4 = -1,4 (Figure II-1). Cette molécule présente une activité antidiabétique prometteuse mais son développement a été arrêté en phase clinique en raison de sa faible biodisponibilité par voie orale. Des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques préalables à l'étude de la rétention magnétique, réalisées par Servier SRD UK, ont permis de déterminer que le passage de ce PA dans le sang se faisait par voie passive paracellulaire, au niveau du début de l'intestin (duodénum, partie haute du jéjunum). La dose active chez l'Homme est de 25 mg/kg pour une biodisponibilité très faible (*f* = 5 à 10 %).

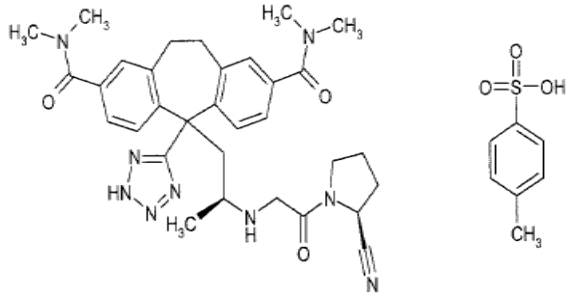


Figure II-1 : Formule chimique du PA 44497-02.

Il a donc été nécessaire de trouver une formulation adaptée à ce PA. En effet, la dose active étant élevée, les formulations doivent être capables de contenir une quantité de PA importante et de permettre une encapsulation efficace de cette molécule hydrophile très soluble.

Le principe de la rétention magnétique implique l'utilisation de vecteurs magnétiques capables de co-encapsuler le principe actif à étudier et les particules magnétiques conférant ainsi ses propriétés physiques à l'objet.

1. 2. Les nanoparticules magnétiques de maghémite

Les oxydes de fer utilisés lors de la formulation doivent avoir des propriétés magnétiques bien connues et conservées lors de la formulation de l'objet final afin d'en faire un objet superparamagnétique, c'est-à-dire capable d'être attiré et retenu sous l'action d'un champ magnétique externe exercé sur lui par un aimant permanent.

Dans cette étude, il a été choisi de travailler avec des nanoparticules de maghémite (γ- Fe_2O_3) présentant une grande stabilité chimique. Ces nanoparticules magnétiques (NPMs) ont des propriétés superparamagnétiques, qui seront transférées à l'objet les contenant. Elles sont bien caractérisées et sont connues pour avoir de très bonnes propriétés *in vivo*, notamment être non toxiques et biodégradables. De plus, ces NPMs sont utilisées sous forme d'une dispersion colloïdale stable en milieu aqueux, appelée ferrofluide (FF). Cela permet de travailler en conditions contrôlées, en fonction du pH ; un FF acide ou citraté est choisi pour la formulation, le but étant d'obtenir une phase homogène, c'est-à-dire d'éviter la précipitation des NPMs lors de la préparation (Figure II-2).

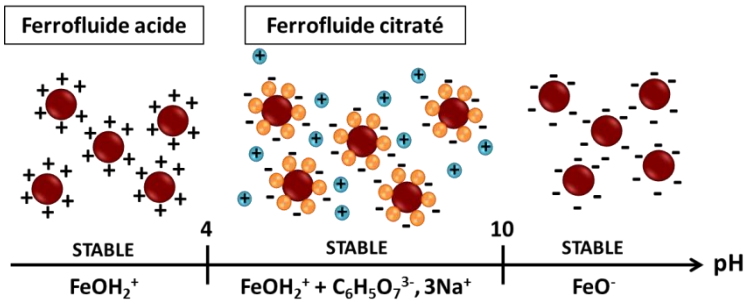


Figure II-2 : Stabilité des ferrofluides dans l'eau, en fonction du pH.

Lors de cette thèse, trois différents ferrofluides ont été utilisés pour la fabrication des billes, sous forme d'une suspension colloïdale stable, c'est-à-dire comme une solution aqueuse, (Voir Annexe 1) :

- Un ferrofluide acide FFAS1 ayant une concentration en fer de [Fe] = 1,3 mol/L.
- Un ferrofluide citraté $FFAS1_{citraté}$ ayant une concentration en fer de [Fe] = 1,2 mol/L.
- Un ferrofluide acide concentré FFAS2 ayant une concentration en fer de [Fe] = 2,1 mol/L.

Une synthèse permet d'obtenir une grande quantité de ferrofluide (environ 1L) contenant des nanoparticules de maghémite de diamètre moyen d_0 = 7 nm, présentant une polydipersité σ = 0,3 et occupant une fraction volumique Φ = 2% pour FFAS1 et $FFAS1_{citraté}$ et Φ = 3,4% pour FFAS2. Les NPMs présentent un comportement superparamagnétique (Figure II-3(a)) et sont utilisées non triées en taille (Figure II-3(b)).

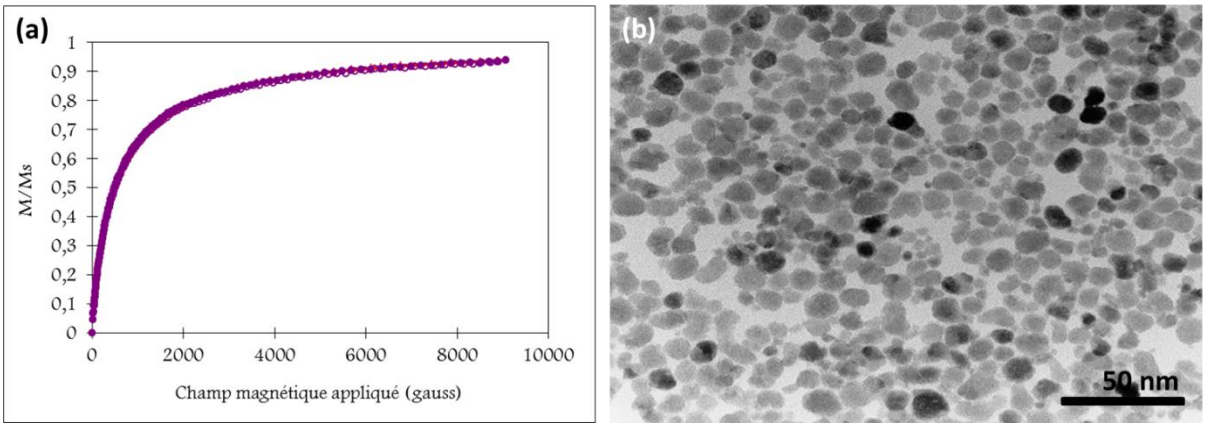


Figure II-3 : (a) Courbe d'aimantation du ferrofluide FFAS1 et (b) Image de MET du FFAS1.

Les formulations magnétiques mises au point devront contenir une quantité de nanoparticules de maghémite importante, leur conférant ainsi des propriétés superparamagnétiques. Elles devront pouvoir être sensibles à l'attraction exercée par un aimant externe et ce, tout au long des expériences, ce qui signifie que les nanoparticules ne devront pas être relarguées au cours des manipulations.

1. 3. Contraintes expérimentales

La première étape de cette étude a été de mettre au point une forme galénique administrable par voie orale et présentant des caractéristiques pharmacocinétiques en accord avec les futurs tests *ex vivo* et *in vivo*. Les tests *ex vivo* seront réalisés sur des cellules de Ussing utilisant des membranes biologiques prélevées sur animal, où le PA est connu pour avoir un très faible passage. Cela impose d'encapsuler une quantité de PA importante par objet, afin de pouvoir détecter son passage à travers les membranes[*]. De plus, les essais en chambre de Ussing s'effectuent sur des temps courts (2 heures) afin de préserver la viabilité des membranes biologiques. La seconde contrainte est donc que les objets doivent être capables de relarguer progressivement le PA sur des temps courts d'environ 2 heures. Il faut également que ces formulations puissent répondre aux critères imposés par les expériences *in vivo*. En effet, il est nécessaire de travailler sur le même type d'objets *ex vivo* et *in vivo* afin de vérifier la transposabilité et la corrélation entre les expériences. Les formulations doivent donc pouvoir être administrées facilement aux animaux (par gavage) et présenter cette fois une activité sur des temps de manipulation d'environ 6-8 heures (temps de résidence des formules dans l'intestin grêle des animaux).

Le choix s'est porté dans un premier temps sur des billes millimétriques formulées à base de biopolymères et de nanoparticules d'oxydes de fer, permettant ainsi l'obtention de formulations biocompatibles et magnétiques. Ces billes ont été choisies afin de se rapprocher d'une forme divisée industrialisable, tout en restant dans l'ordre de grandeur de tailles d'objets pouvant être administré par voie orale chez le petit animal. Dans un second temps, la fabrication de formes magnétiques de taille millimétrique à plus grande échelle a été testée, en utilisant des procédés galéniques pour la production de mini-granules.

[*] *Lors des caractérisations physico-chimiques, la masse du PA sera calculée en fonction du poids moléculaire du sel (Mw = 769 g/mol).*

1. 4. Caractérisations des formes galéniques

Après la préparation des différentes formulations magnétiques, différents tests de caractérisation sont effectués (Voir Annexe 3) afin de s'assurer que leurs caractéristiques physico-chimiques et magnétiques sont adaptées aux futurs tests *ex vivo* et *in vivo* devant être réalisés.

1. 4. 1. Caractérisations physico-chimiques

L'efficacité d'encapsulation (EE%) désigne la quantité de PA ayant été encapsulée efficacement dans l'objet en comparaison de la quantité initiale de PA introduite lors de la synthèse et permet l'évaluation des pertes en PA lors de la formulation.

$$EE\% = \frac{masse\ de\ PA\ totale - masse\ de\ PA\ non\ encapsulée}{masse\ de\ PA\ totale} \times 100$$

Le taux d'encapsulation désigne la charge d'un des composés constituant l'objet, c'est un rapport massique entre la masse de ce composé rapporté à la masse totale de l'objet.

$$TE\% = \frac{masse_{composé}\ dans\ la\ bille}{masse\ de\ la\ bille} \times 100$$

La cinétique de dissolution du PA représente la quantité de PA libérée de la bille en fonction du temps. Elle peut être déterminée grâce à une méthode en continu ou par prélèvements manuels.

1. 4. 2. Caractérisations magnétiques

Les billes sont aussi caractérisées grâce à des techniques permettant de tester leur pouvoir magnétique (Voir Annexe 4).

La spectrométrie d'absorption atomique est utilisée afin de connaître la concentration en fer des différents ferrofluides et la quantité de fer contenue dans une bille, permettant ainsi de remonter à la charge en NPMs de l'objet.

Outre les caractérisations classiques utilisées pour analyser les propriétés superparamagnétiques des ferrofluides, les propriétés d'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué, des formes ayant été choisies pour être utilisées lors des tests *ex vivo* et *in vivo* ont été mesurées par magnétométrie SQUID (Superconducting QUantum Interference Device).

2. Billes millimétriques magnétiques de biopolymère

Le choix s'est porté dans un premier temps sur les billes de biopolymères matricielles. Ces billes millimétriques, d'alginate ou de chitosan, présentent les caractéristiques requises pour la formulation du PA modèle utilisé dans cette étude. En effet, ces billes permettent une très bonne encapsulation des molécules hydrophiles, peuvent présenter des cinétiques de relargage en accord avec les temps d'expérience et de plus, des nanoparticules magnétiques peuvent être facilement incluses dans la matrice. Leur fabrication est simple, biocompatible et se fait selon un procédé d'extrusion-réticulation. Le biopolymère est dissout dans l'eau formant un mélange aqueux visqueux dans lequel peuvent être dispersé le PA et les NPMs. Ce mélange est ensuite extrudé au travers d'une seringue. Lors du passage de ce mélange à travers l'aiguille, il se forme des gouttes sphériques que l'on fait tomber dans une solution réticulante contenant le contre-ion du polymère. Le mélange aqueux de départ contenant le biopolymère, le PA et les NPMs, réticule alors sous forme de billes par action de ces contres-ions, piégeant ainsi les composants (PA, NPMs, etc.) dans un réseau matriciel ionique.

2. 1. Utilisations courantes

Les billes matricielles de biopolymères, en général, d'alginate ou de chitosan, sont des objets étudiés et décrits depuis de nombreuses années dans la littérature. Il existe également des exemples de formulations de billes millimétriques de biopolymères contenant des nanoparticules magnétiques [2].

Ces objets peuvent être utilisés à différentes fins, telles que la dépollution des eaux pour des problématiques environnementales [3–5] ou l'encapsulation de molécules actives pour la santé [6–8]. En effet, le réseau matriciel poreux permet l'absorption d'ions polluants ou l'encapsulation de molécules actives. Ces objets présentent de très bons taux d'encapsulation pour les molécules hydrophiles et les protègent de la dégradation dans le milieu extérieur. De

plus, ils sont biocompatibles et non polluants car aucun solvant n'est utilisé lors de la synthèse. Malgré des propriétés d'encapsulation et de relargage intéressantes de ces objets [7,9,10], ils sont peu utilisés *in vivo*.

Lors de nos essais, des billes magnétiques à base d'alginate ou de chitosan ont été préparées, contenant différents pourcentages de ferrofluide (FF) et de PA.

2. 2. Billes d'alginate magnétiques

La plupart des billes de biopolymères magnétiques sont formulées à base d'alginate [2,11,12] ; il a donc été choisi de travailler, dans un premier temps, avec ce biopolymère (Figure II-4).

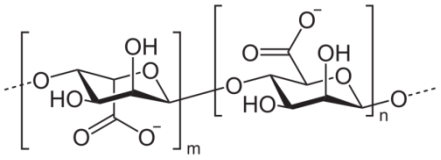


Figure II-4 : Structure chimique de l'alginate [13].

L'encapsulation de NPMs à l'intérieur de ces matrices d'alginate a déjà été étudiée et peut être effectuée de façon simple et efficace. Dans cette étude, il a été nécessaire de s'intéresser à la co-encapsulation des NPMs et du PA au sein de la matrice polymère, d'en étudier la faisabilité ainsi que le rendement, l'objectif étant d'éviter des pertes en PA importante lors de la fabrication de ces billes.

2. 2. 1. Mise au point des billes Al 2,5-2,5-10

Lors de ces essais (Voir Annexe 2-1), de l'alginate de sodium (Al), est dissout à 2,5% w/v (% masse/volume : 1% w/v = 1 g dans 100 mL) dans un mélange d'eau déminéralisée à 90% v/v (ou 100% pour les billes témoins non magnétiques) et de ferrofluide citraté ($FFAS1_{citraté}$), [Fe] = 1,2 mol/L, à 10% v/v (ou 0% pour les billes témoins non magnétiques). En effet, l'alginate est dissout dans l'eau à pH neutre, c'est pour cela que la formulation des billes d'alginate se fait avec un FF citraté stabilisé à pH neutre. Le PA est ensuite dissout dans ce mélange à différents pourcentages (0,25%, 1,25% et 2,5% w/v). Ce mélange est ensuite extrudé à travers une aiguille de seringue de diamètre 0,45 mm, afin de former des gouttes, que l'on fait tomber

dans un bain réticulant contenant le contre-ion de l'alginate (ion calcium : Ca^{2+}) sous forme de chlorure de calcium ($CaCl_2$) à 2% w/v dans l'eau (Figure II-5).

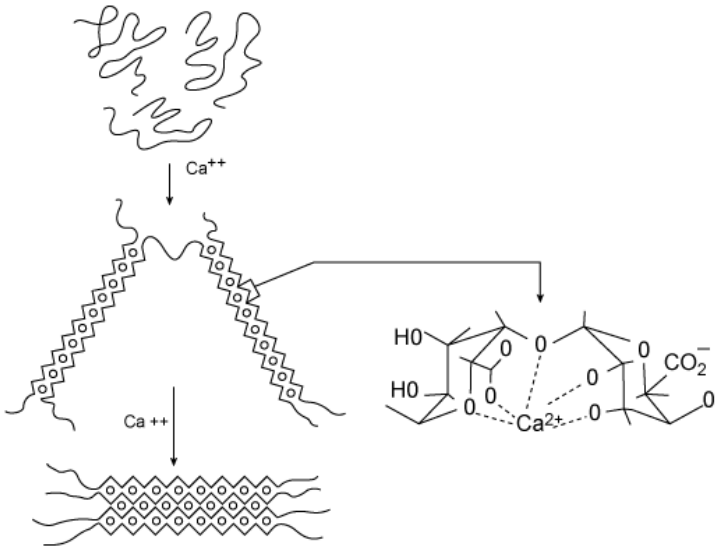


Figure II-5 : Réticulation d'une matrice d'alginate en présence d'ions calcium (Ca^{2+}) [14].

2. 2. 2. Caractérisation des billes Al 2,5-2,5-10

Les billes ainsi formées sont ensuite caractérisées par une série de tests. Tout d'abord, l'efficacité d'encapsulation (EE%), représentant la perte en PA lors de la formulation est évaluée grâce à un dosage indirect. Le PA perdu lors de la préparation des billes dans le bain de réticulation est dosé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Voir Annexe 3-2). Puis pour les formulations ayant le rapport Polymère-PA avec l'efficacité d'encapsulation la plus élevée, on poursuivra avec des tests de cinétique de relargage du PA (Voir Annexe 3-4), de dosage du fer (Voir Annexe 4-1) et de dosage du PA (Voir Annexe 3-1).

Les billes formulées avec un rapport Al-PA : 1-1 (Al à 2,5 % w/v et PA à 2,5 % w/v) ont la meilleure efficacité d'encapsulation, de 52% pour les billes magnétiques (FF à 10% v/v) et 49% pour les billes témoins (sans FF) (Figure II-6).

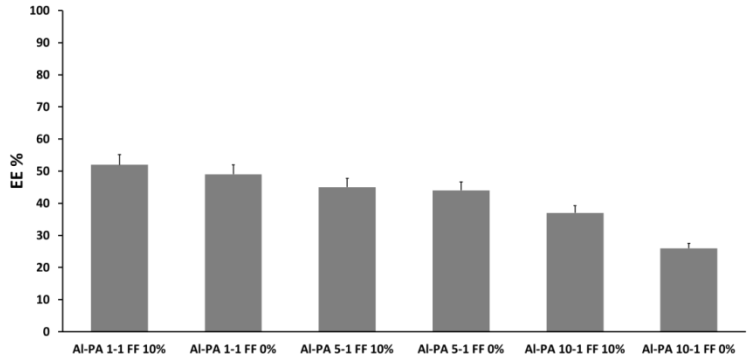


Figure II-6 : Efficacité d'encapsulation (EE %) du PA dans les billes d'alginate en fonction du rapport Polymère-PA et de la charge en FF.

La cinétique de libération du PA est testée sur les billes magnétiques Al-PA 1-1 FF 10% (Al 2,5-2,5-10) ayant la meilleure efficacité d'encapsulation (Figure II-7). Le relargage du PA à partir de ces billes est très rapide, la totalité du PA (100%) est libéré des billes très rapidement, à t + 20 minutes.

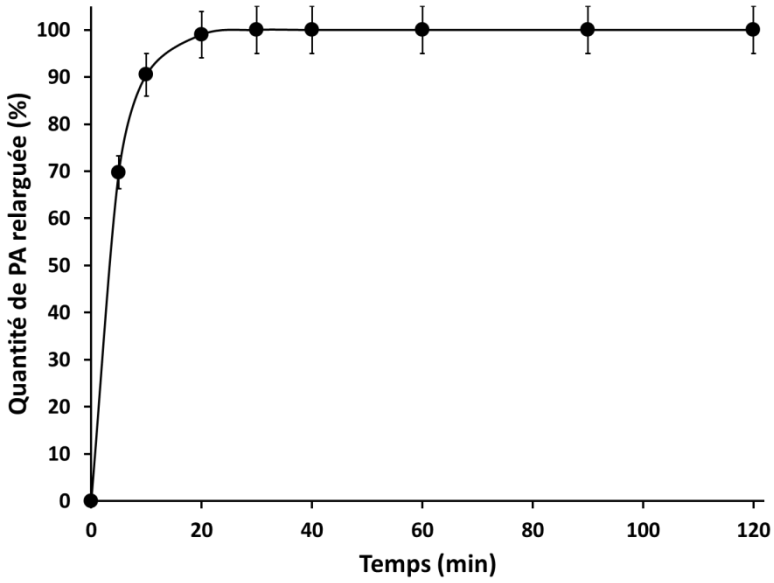


Figure II-7 : Quantité de PA libérée (%) en fonction du temps (min) pour les billes d'alginate magnétiques, Al 2,5-2,5-10 (●).

Pour l'ensemble des formulations magnétiques, l'efficacité d'incorporation des NPMs dans la matrice est de 100%. Lors de la fabrication des billes, il ne semble pas y avoir de fuite de FF dans le bain de réticulation, qui reste transparent. Cette observation est corroborée par le dosage du fer dans le bain de réticulation. La quantité de fer est nulle dans ce bain, ce qui confirme que l'intégralité des NPMs contenues dans le FF utilisé pour la fabrication des billes a bien été encapsulée dans les billes.

Le fer contenu dans une bille est dosé par spectrométrie d'absorption atomique (m(Fe) = 57,6 µg) et le PA est dosé par HPLC (m(PA) = 78 µg) après relargage total afin de déterminer le contenu d'une bille.
Une bille Al 2,5-2,5-10 contient donc 57,6 µg de fer, c'est-à-dire environ 10^{13} nanoparticules de maghémite, 78 µg de PA et présente une cinétique de libération de 100% à t = 20 minutes.

Afin de réaliser les tests *ex vivo*, l'objectif est d'avoir un relargage sur environ deux heures, les billes d'alginate ne semblent donc pas adaptées à nos futures expériences.
Dans la littérature, des billes de biopolymère formulées à base de chitosan ont des cinétiques de relargage sur des temps plus longs, des essais sont donc effectués avec ce nouveau polymère.

2. 3. Billes de chitosan magnétiques

L'utilisation des billes de chitosan à des fins d'encapsulation et de relargage de molécules hydrophiles est également bien décrite dans la littérature [8,15–17].

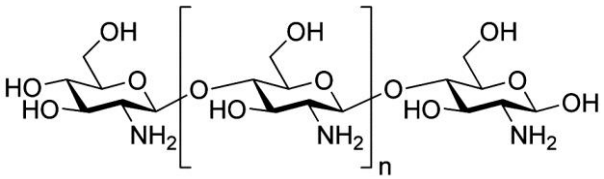


Figure II-8 : Structure chimique du chitosan (CS) [18].

Le chitosan est décrit comme un polymère ayant des propriétés mucoadhésives [8,19–22], ce qui pourra s'avérer utile lors de nos expériences. De nouveaux essais de formulation de billes magnétiques à base de chitosan sont donc réalisés.

2. 3. 1. Mise au point des billes CS 5-5-10

Pour cela (Voir Annexe 2-2), du chitosan est dissout à 5% w/v dans un mélange d'eau déminéralisée à 90% v/v (ou 100% pour les billes témoins non magnétiques) et de ferrofluide acide (FFAS1), [Fe] = 1,3 mol/L, à 10% v/v (ou 0% pour les billes témoins non magnétiques). En effet, le chitosan est dissout dans l'eau en présence d'acide acétique. Afin de s'assurer de la stabilité des NPMs au sein de la matrice, des nanoparticules stables à ce pH doivent être utilisées. Le PA est dissout dans ce mélange à différents pourcentages (0,5%, 1% et 5% w/v) puis le mélange est extrudé à travers une aiguille de seringue de diamètre 0,45 mm afin de former des gouttes que l'on fait tomber dans un bain réticulant contenant le contre-ion du chitosan, le tripolyphosphate (TPP) à 2% w/v dans l'eau (Figure II-9).

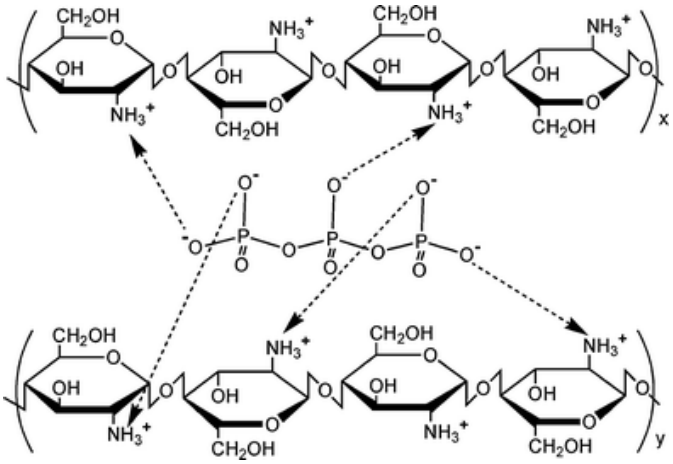


Figure II-9 : Réticulation d'une matrice de chitosan en présence d'ions TPP ($P_3O_{10}^{5-}$) [23].

2. 3. 2. Caractérisation des billes CS 5-5-10

Les billes formulées avec un rapport CS-PA : 1-1 (CS à 5 % w/v et PA à 5 % w/v) ont la meilleure efficacité d'encapsulation du PA, 63% pour les billes magnétiques et 59% pour les billes témoins (Figure II-10). C'est donc sur ces billes magnétiques, CS 5-5-10, qu'ont été effectués les tests de cinétique de libération du PA.

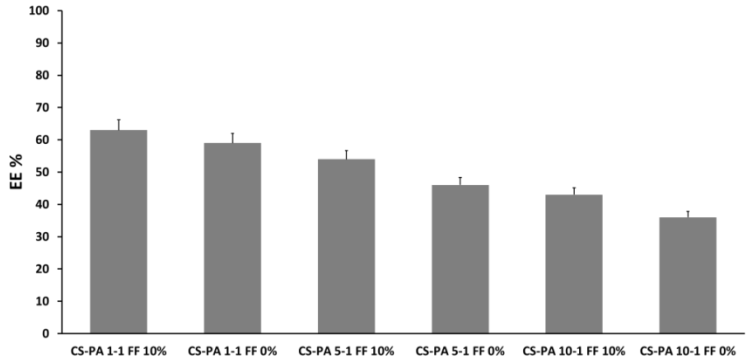


Figure II-10 : Efficacité d'encapsulation (EE %) du PA dans les billes de chitosan en fonction du rapport Polymère-PA et de la charge en FF.

Le relargage du PA à partir de ces billes est ralentit en comparaison des billes d'alginate mais reste assez rapide, la totalité du PA est relarguée après 60 minutes (Figure II-11).

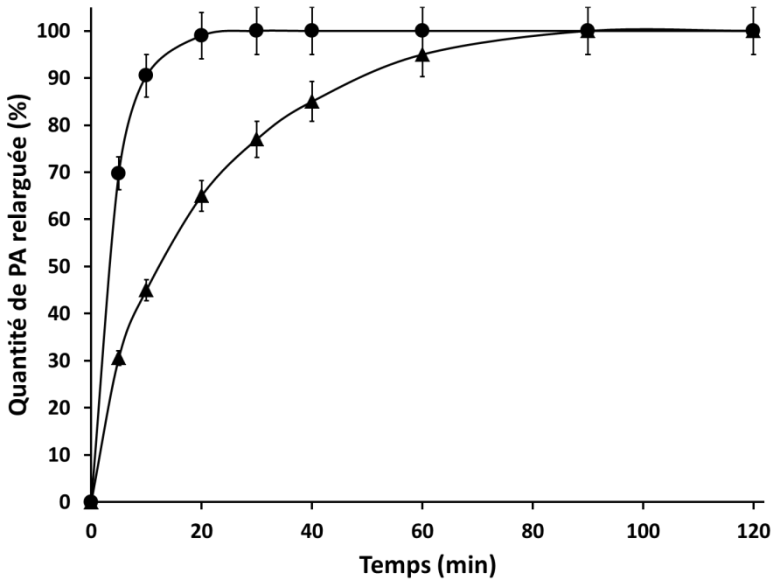


Figure II-11 : Quantité de PA libérée (%) en fonction du temps (min) pour les billes de chitosan magnétiques, CS 5-5-10 (▲) et les billes d'alginate magnétiques, Al 2,5-2,5-10 (●).

Comme pour les billes d'alginate magnétiques, l'efficacité d'incorporation des NPMs dans la matrice est de 100%. Le bain de réticulation est dosé afin de détecter la présence éventuelle de fer et confirme que l'intégralité des NPMs a bien été encapsulée dans la matrice. Ces objets permettent donc une encapsulation des NPMs de 100% ainsi qu'une bonne encapsulation du PA (63%).

Le fer est dosé par spectrométrie d'absorption atomique (m(Fe) = 78 µg) dans une bille et le PA est dosé par HPLC (m(PA) = 0,23 mg), après relargage total afin de déterminer le contenu en PA d'une bille.

Une bille CS 5-5-10 contient 78 µg de fer c'est-à-dire environ 10^{14} nanoparticules de maghémite et 0,23 mg de PA.

Une bille CS 5-5-10 est observée en MEB (Figure II-12) après congélation au CO_2 supercritique et fracturation (Voir Annexe 8-1). Cette technique permet d'éliminer l'eau contenue dans la matrice des billes tout en préservant leur structure initiale. Ces billes présentent une structure sphérique d'environ 2 mm de diamètre, ayant une matrice intérieure poreuse.

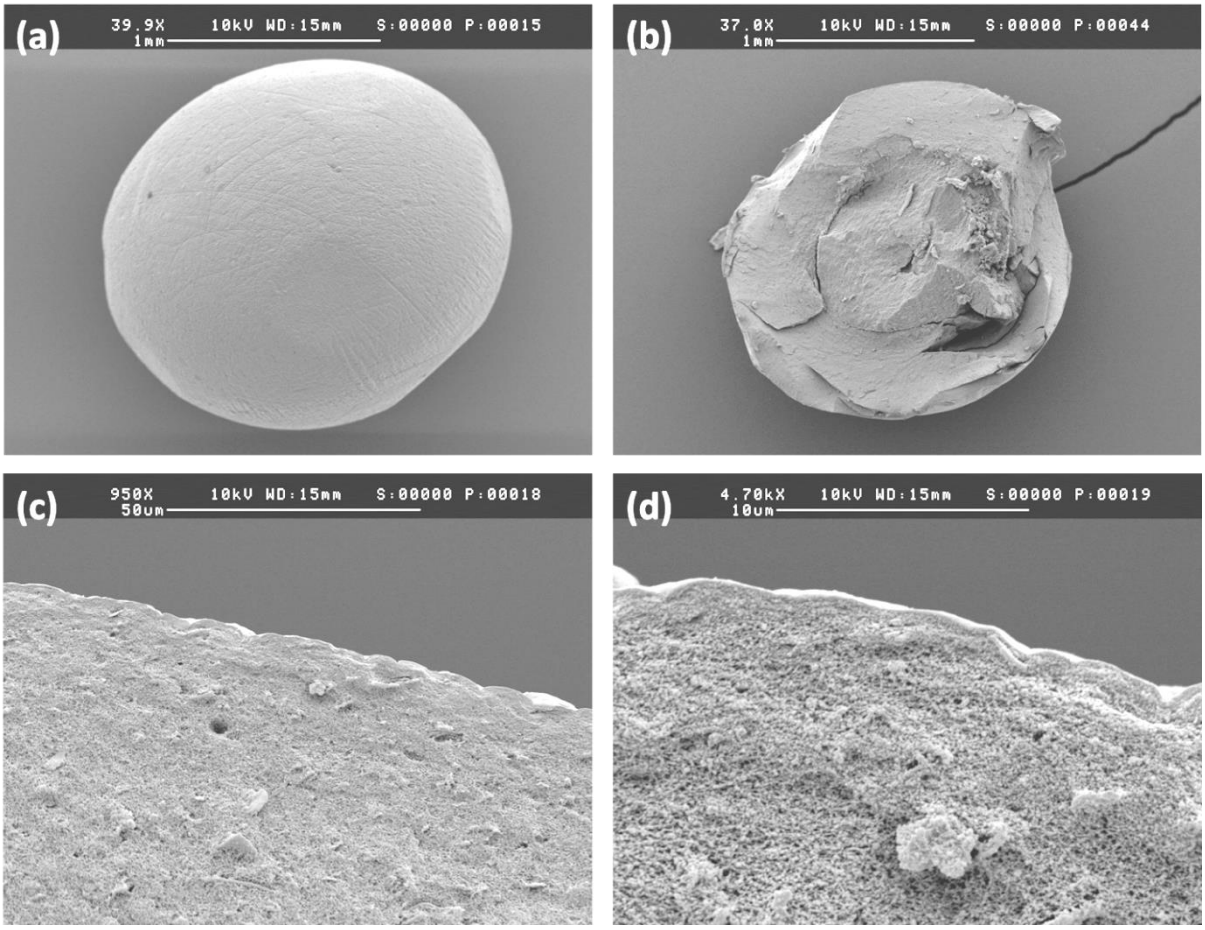


Figure II-12 : Clichés de MEB d'une bille CS 5-5-10 sans couronne d'alginate (a) entière, (b) coupée en deux, (c) et (d) zoom ; grossies respectivement (a) et(b) 40, (c) 950 et (d) 4700 fois.

Les cinétiques de libération du PA de ces billes de chitosan (CS 5-5-10) montrent une nette amélioration en comparaison des billes d'alginate (Al 2,5-2,5-10), 100% après 60 minutes au lieu de 20 minutes. Ces résultats sont prometteurs mais doivent encore être améliorés afin de répondre aux contraintes des expériences *ex vivo*.

2. 4. Billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques

Plusieurs publications rapportent qu'une structure de type cœur-coquille permet d'améliorer les propriétés d'encapsulation et de relargage des billes d'alginate. Le cœur est alors une matrice d'alginate et la coquille est alors constituée d'un second type de biopolymère, le chitosan [6,7,10].

Dans notre cas les billes de chitosan présentent des propriétés d'encapsulation et de libération du PA bien meilleures que les billes d'alginate ; on a donc essayé à l'inverse de faire une couronne d'alginate sur des billes de chitosan. Les propriétés conférées à cet objet par la présence de cette couronne en font un bon candidat pour le relargage de PA dans la partie haute de l'intestin grêle. La couronne d'alginate, totalement insoluble à pH acide, à la surface de la bille permet de la protéger lors de son passage dans l'estomac. Lors du passage dans l'intestin, le pH du milieu devient basique ; la couronne d'alginate commence à se dissoudre et laisse apparaitre le cœur de la bille de chitosan, mucoadhésif, qui pourra alors permettre une meilleure adhésion sur les parois de l'intestin.

2. 4. 1. Mise au point des billes CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0

Pour la préparation de ces billes cœur-couronne (Voir Annexe 2-2), le chitosan est dissout à 5% w/v dans un mélange d'eau déminéralisée à 90% v/v (ou 100% pour les billes témoins non magnétiques) et de ferrofluide acide (FFAS1), [Fe] = 1,3 mol/L, à 10% v/v (ou 0% pour les billes témoins non magnétiques). Le PA est ensuite dissout à 5% w/v, afin d'avoir un rapport polymère-PA 1-1 (w/w), qui s'est avéré avoir la meilleure efficacité d'encapsulation. Ce mélange est extrudé à travers une seringue et les gouttes ainsi formées tombent dans une solution réticulante contenant le contre-ion du chitosan, le tripolyphosphate (TPP) à 2% w/v et l'alginate (Al) à 1% w/v dans l'eau. Lors de l'extrusion de ces gouttes, le mélange est acidifié avec de l'acide acétique afin de pouvoir dissoudre le chitosan (pH acide). Lors de l'entrée en contact de ces gouttes avec le bain de réticulation ; l'alginate contenu dans celui-ci viendra précipiter à la surface des billes (Figure II-13). En effet l'alginate est totalement insoluble à pH acide, il va précipiter lors de son entrée en contact avec la surface des gouttes acides.

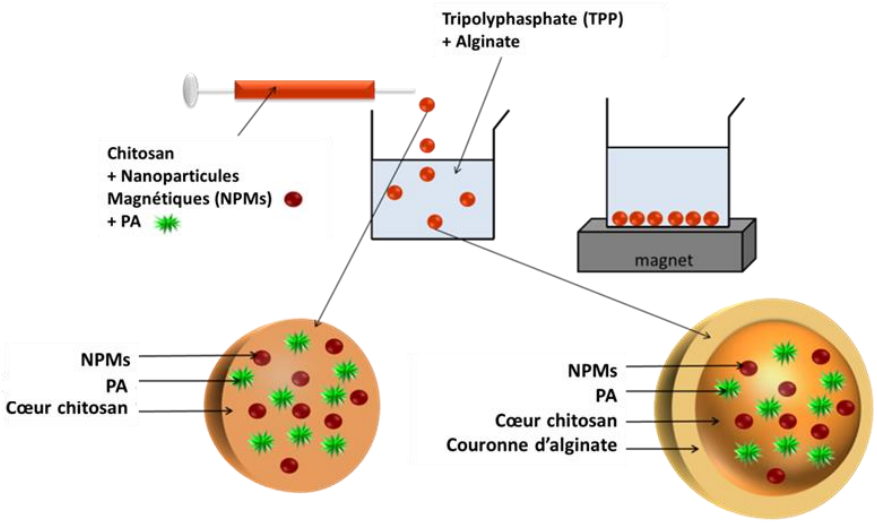


Figure II-13 : Fabrication des billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques.

2. 4. 2. Caractérisation des billes CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0

Les billes core-shell chitosan-alginate, formulées avec un rapport Chitosan-PA 1-1 (CS à 5 % w/v et PA à 5 % w/v) ont une très bonne efficacité d'encapsulation du PA, de 75% pour les billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) et 72% pour les billes témoins (CS@Al 5-5-0) (Figure II-14). Cette valeur est nettement meilleure que pour les billes simples de chitosan ou d'alginate au même rapport polymère-PA 1-1. Cela signifie que l'ajout d'une couronne permet d'améliorer le taux de PA encapsulé lors de la formation des billes.

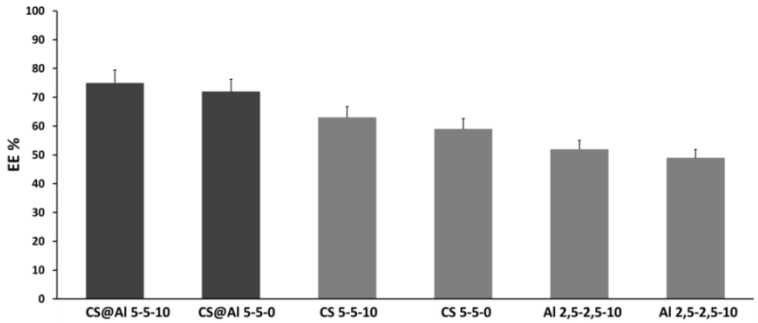


Figure II-14 : Efficacité d'encapsulation (EE %) du PA dans les billes en fonction de la composition de celles-ci (rapport Polymère-PA et charge en NPMs).

Les tests de cinétique de libération du PA effectués sur ces billes core-shell magnétiques (CS@Al 5-5-10) montrent une amélioration de la cinétique de relargage du PA en comparaison des billes simples de chitosan CS 5-5-10 ou d'alginate Al 2,5-2,5-10. Le 100%

est atteint après 120 minutes au lieu de 60 minutes et 20 minutes pour CS 5-5-10 et Al 2,5-2,5-10 respectivement (Figure II-15).

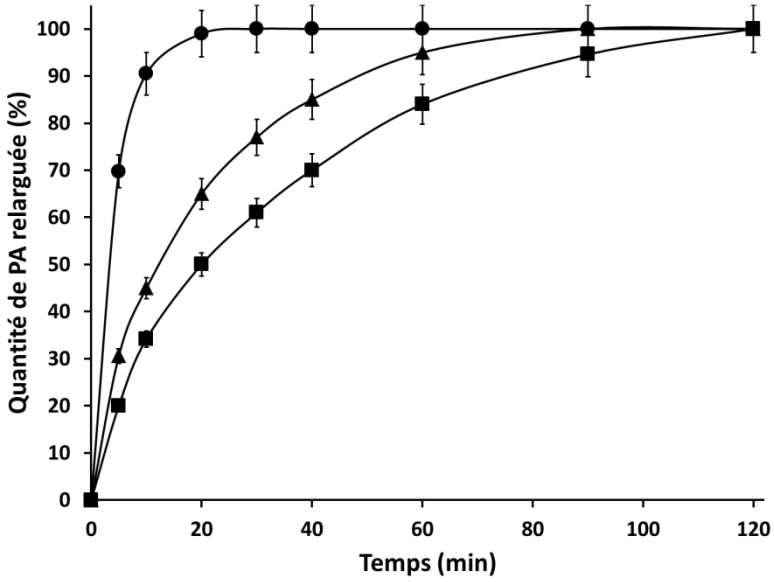


Figure II-15 : Quantité de PA libérée (%) en fonction du temps (min) pour les billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques, CS@Al 5-5-10 (■), les billes de chitosan magnétiques, CS 5-5-10 (▲) et les billes d'alginate magnétiques, Al 2,5-2,5-10 (●).

Les billes core-shell chitosan-alginate magnétiques (CS@Al 5-5-10) et témoins (CS@Al 5-5-0) ont été choisies pour mener les expériences *ex vivo* et ont donc été caractérisées plus finement. Ces billes présentent une distribution en taille homogène centrée sur 2 mm de diamètre (Figure II-16 (a)), elles sont ronde et régulières ; les billes magnétiques ont une couleur brune caractéristique de la maghémite (Figure II-16 (b)) et les billes témoins sont blanches (Figure II-16 (c)).

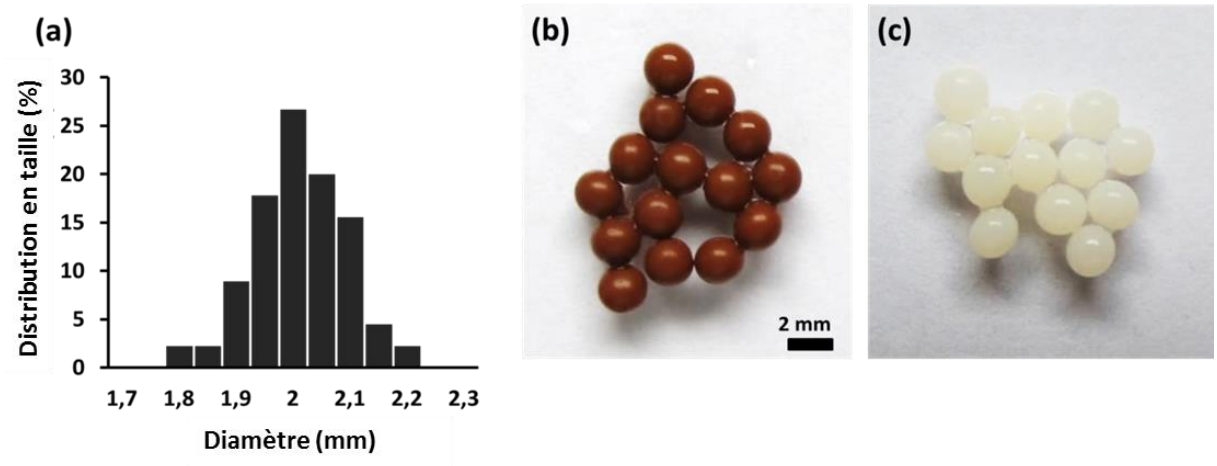


Figure II-16 : Distribution en taille des billes CS@Al 5-5-10 (a) et photographies des billes (b) CS@Al 5-5-10 et (c) CS@Al 5-5-0.

Les billes magnétiques CS@Al 5-5-10 et témoins CS@Al 5-5-0 ont une cinétique de relargage équivalente convenant parfaitement aux expériences *ex vivo* (Figure II-17), quasi linéaire, de 100% à t = 120 minutes. L'absence de NPMs dans la matrice ne modifie pas significativement la cinétique de relargage, ce qui permet de les utiliser comme témoins lors des expériences *ex vivo*. Ces résultats laissent supposer qu'il n'existe pas d'interactions spécifiques entre les nanoparticules magnétiques et le principe actif contenus dans la matrice. En effet, la présence ou l'absence de ces NPMs n'a pas d'influence significative sur la cinétique de libération du PA.

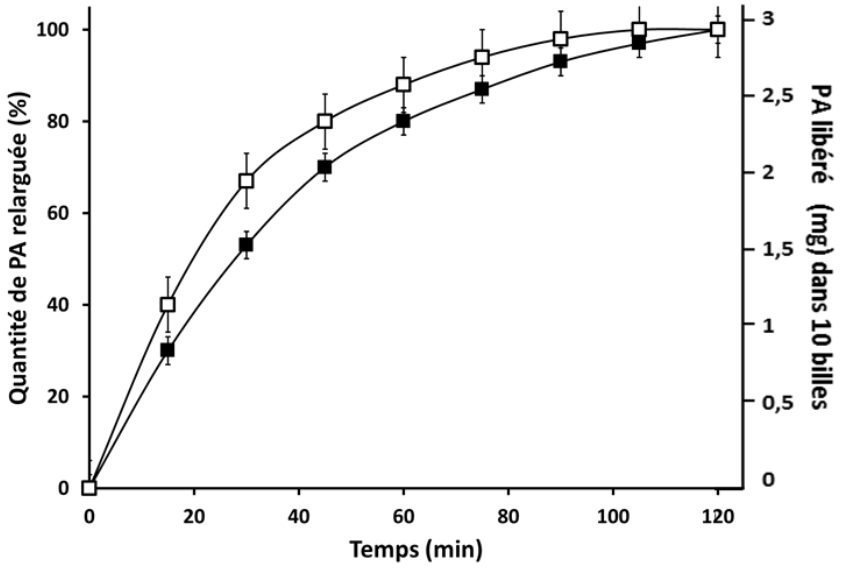


Figure II-17 : Quantité de PA libérée (%) en fonction du temps (min) pour les billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques, CS@Al 5-5-10 (■) et les billes core-shell de chitosan-alginate non magnétiques, CS@Al 5-5-0 (□).

Une bille CS@Al 5-5-10 contient 83,2 µg de fer c'est-à-dire environ 10^{14} nanoparticules γ-Fe_2O_3 et 0,3 mg de PA. Les rapports masse/volume (1% w/v = 1 g dans 100 mL) théoriques et réels, l'efficacité d'encapsulation (EE%) représentant les pertes lors de la préparation et le taux d'encapsulation (TE%) représentant la masse des composés par rapport à la masse totale d'une bille peuvent être calculés (Tableau II-1).

CS@Al 5-5-10	Chitosan	PA	NPMs
Masse théorique (mg)	250 mg	250 mg	52 mg
% w/v théorique	5	5	1,04
1 synthèse = 625 billes de 8 mg			
EE %	100	75	100
Masse réelle (mg)	250	187,5	52
% w/v réel	5	3,75	1,04
1 bille de 8 mg			
Masse réelle (mg)	0,4	0,3	0,0832
Taux d'encapsulation (%)	5	3,5	1

Tableau II-1 : Valeurs de la masse, du taux d'encapsulation, du pourcentage en masse/volume théorique et réel des composants et de l'efficacité d'encapsulation pour les billes CS@Al 5-5-10.

Les billes CS@Al 5-5-10 sont observées en microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure II-18) après congélation et fracture afin d'observer la présence de la couronne d'alginate à la surface de ces billes (d'épaisseur environ 30 µm) (Figure II-18 (c)); en comparaison avec les billes sans couronne (Figure II-12).

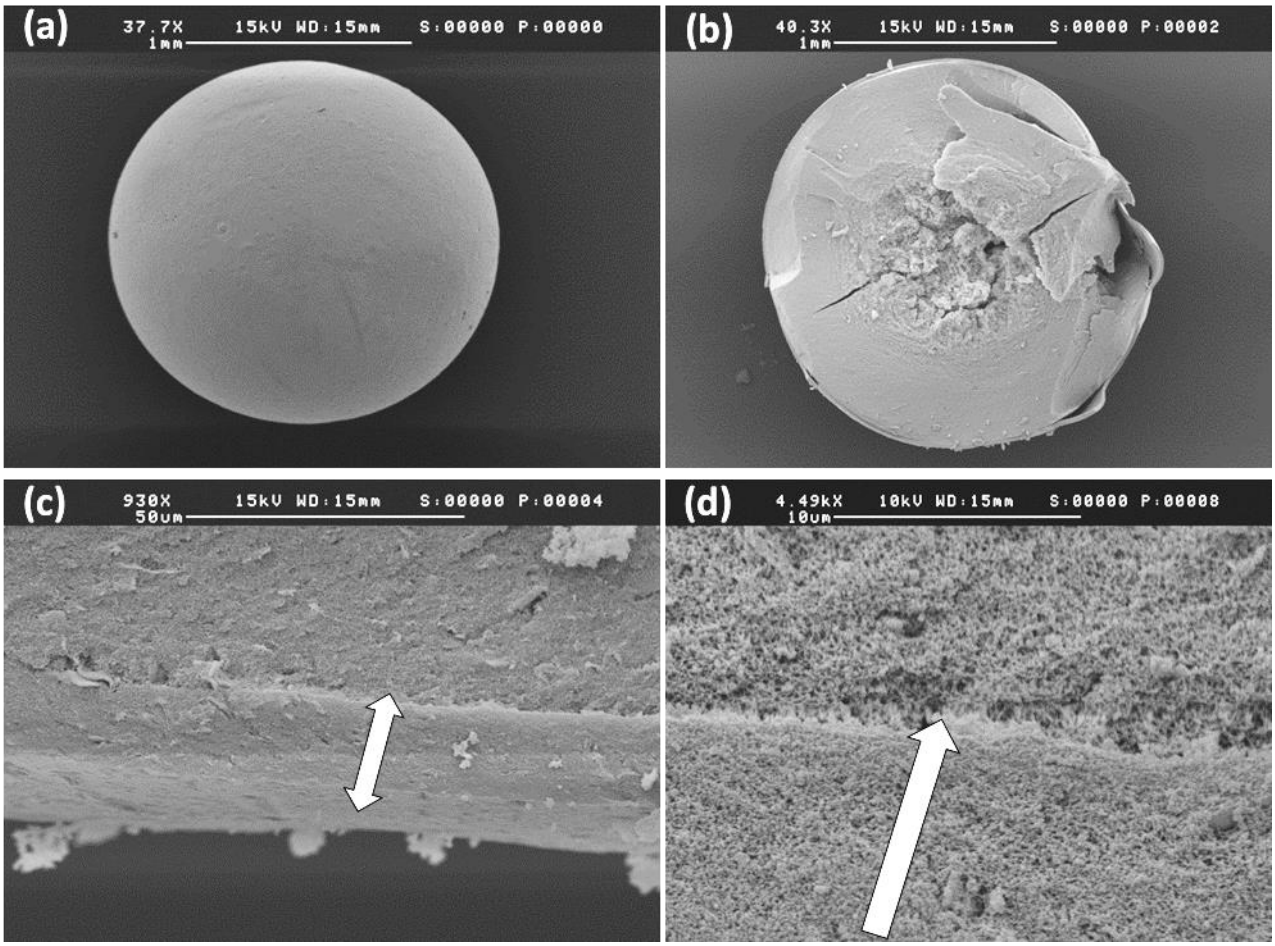


Figure II-18 : Clichés de MEB d'une billes CS@Al 5-5-10 (a) entière, (b) coupée en deux, (c) et (d) zoom sur la couronne d'alginate (⇔) ; grossis respectivement (a) et (b) 40, (c) 930 et (d) 4500 fois.

L'aimantation d'une bille CS@Al 5-5-10 en emu (1 emu = $1*10^{-3}$ A.m²) a été mesurée par magnétométrie SQUID (Voir Annexe 4-2) en fonction du champ magnétique appliqué en Gauss (1 Gauss = 1.10^{3} A/m). La valeur de son moment magnétique à saturation μ_s= 0,00632 emu (= $0,632*10^{-5}$ A.m²) représentée par le plateau est atteinte à 30000 Gauss (Figure II-19).

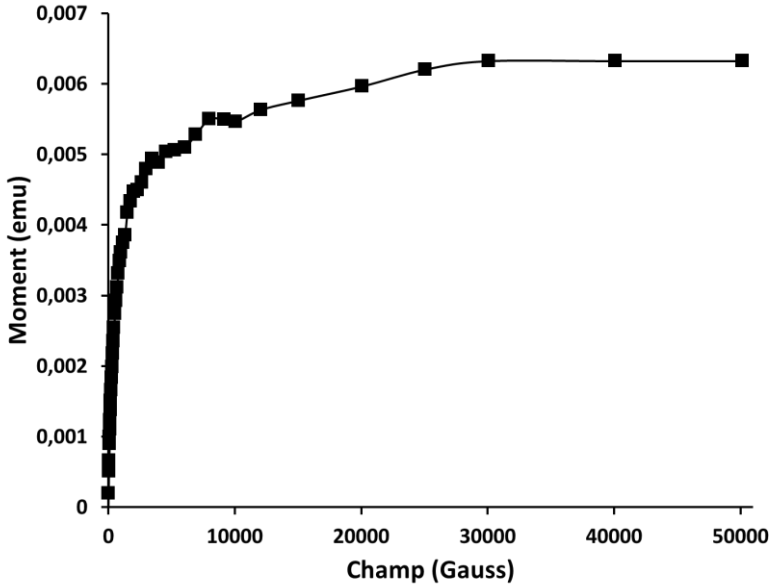


Figure II-19 : Courbe d'aimantation (en emu) d'une bille CS@Al 5-5-10 en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

Dans le chapitre III, les billes CS@Al 5-5-10 magnétiques et CS@Al 5-5-0 témoins ont été utilisées lors des expériences *ex vivo* en chambre de Ussing afin d'étudier la faisabilité et l'influence de la rétention magnétique de ces billes millimétriques de biopolymère sur le passage du PA 44497-02 à travers une membrane intestinale.

Dans le chapitre IV, lors des études *in vivo* chez le rat, les billes core-shell chitosan-alginate magnétiques ont été utilisées. Les premières études *in vivo* ont été menées sur les mêmes billes (CS@Al 5-5-10) que pour les études *ex vivo*. Puis, aux vues des résultats pharmacocinétiques obtenus, de nouvelles billes ayant une charge en NPMs plus importante, leur permettant d'être plus sensibles à la rétention magnétique dans les conditions gastro-intestinales (digestion, péristaltisme, etc.), ont été utilisées.

2. 4. 3. Mise au point des billes CS@Al 5-10-50

Il a donc été nécessaire d'augmenter le pourcentage de ferrofluide utilisé lors de la synthèse des objets. Afin de répondre aux contraintes d'administration chez l'animal (ne pas utiliser un trop grand nombre de billes par administration), le pourcentage de PA utilisé lors de la fabrication des billes a donc également été augmenté.

Des billes Chitosan 5% w/v, PA 10% w/v et FF 50% v/v (CS@Al 5-10-50) réticulées dans TPP 2% w/v + Al 1% w/v, ont été préparées et utilisées *in vivo* juste après fabrication (CS@Al 5-10-50 humides) ou après séchage à l'air pendant 24h (CS@Al 5-10-50 sèches).

2. 4. 4. Caractérisation des billes CS@Al 5-10-50

Le séchage des billes CS@Al 5-10-50 permet de ralentir la cinétique de relargage de ces objets, le 100% est alors atteint au bout de 6 heures au lieu de 2 heures (Figure II-20). Ces billes plus chargées en PA ont une bonne efficacité d'encapsulation (EE% = 75%), similaire à celle des billes précédentes CS@Al 5-5-10.

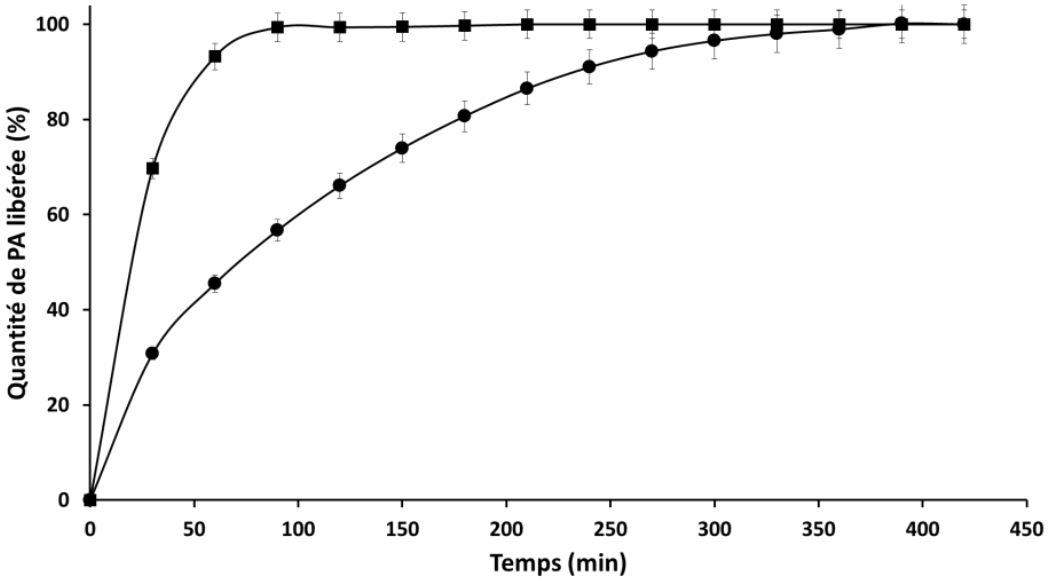


Figure II-20 : Quantité de PA libérée (%) en fonction du temps (min) pour les billes CS@Al 5-10-50, ■ humides et ● sèches.

Une bille CS@Al 5-10-50 contient 368 µg de fer c'est-à-dire environ 10^{15} nanoparticules de maghémite et 0,53 mg de PA. Les rapports masse/volume (1% w/v = 1 g dans 100 mL) théoriques et réels ; l'efficacité d'encapsulation (EE%) représentant les pertes lors de la préparation et le taux d'encapsulation (TE%) représentant la masse des composés par rapport à la masse totale d'une bille peuvent être calculés (Tableau II-2).

CS@Al 5-10-50	Chitosan	PA	NPMs
Quantité théorique	250 mg	500 mg	260 mg
% w/v théorique	4,42	8,85	4,60
1 synthèse = 706 billes de 8 mg			
EE %	100	75	100
Masse réelle (mg)	250	375	260
% w/v réel	5	6,63	4,60
1 bille humide de 8 mg			
Masse réelle (mg)	0,4	0,531	0,368
Taux d'encapsulation (%)	5	6,6	4,6
1 bille sèche de 1,3 mg			
Taux d'encapsulation (%)	30,7	40,8	28,3

Tableau II-2 : Valeurs de la masse, du taux d'encapsulation, du pourcentage en masse/volume théorique et réel des composants et de l'efficacité d'encapsulation pour les billes CS@Al 5-10-50.

Les billes CS@Al 5-10-50 sont observées en MEB (Figure II-21) après congélation pour les billes humides et directement pour les billes sèches. On peut observer la différence de structure entre ces billes. Après séchage à l'air, les billes présentent une structure irrégulière due à l'effondrement de la matrice lors de l'évaporation de l'eau.

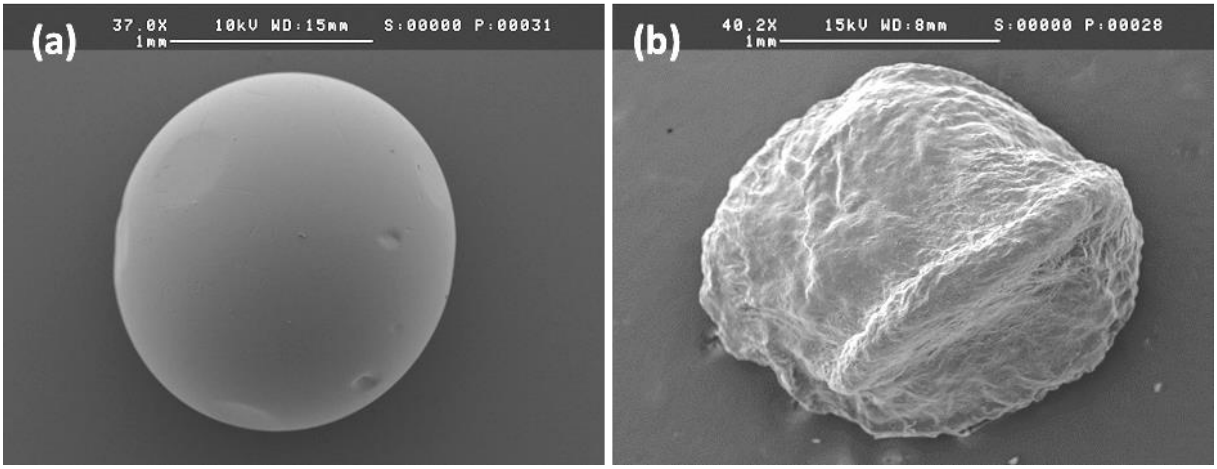


Figure II-21 : Clichés MEB d'une bille CS@Al 5-10-50 (a) humide et (b) sèche.

L'aimantation des billes CS@Al 5-10-50 humide et sèche a été mesurée par magnétométrie SQUID (Voir Annexe 4-3). La valeur de leur moment magnétique à saturation, μ_s= 0,0339 emu (= $0{,}339.10^{-4}$ A.m²) pour une bille humide et μ_s = 0,0347 emu (=$0{,}347.10^{-4}$ A.m²) pour une bille sèche, représentée par le plateau est atteinte à 15000 Gauss (Figure II-22). Les valeurs de μ_s pour ces deux billes sont similaires. En effet, le moment magnétique à saturation

est déterminé par la quantité de NPMs contenue dans un objet. Le fait que la bille soit humide ou sèche n'a donc pas d'influence sur cette valeur de μ_s.

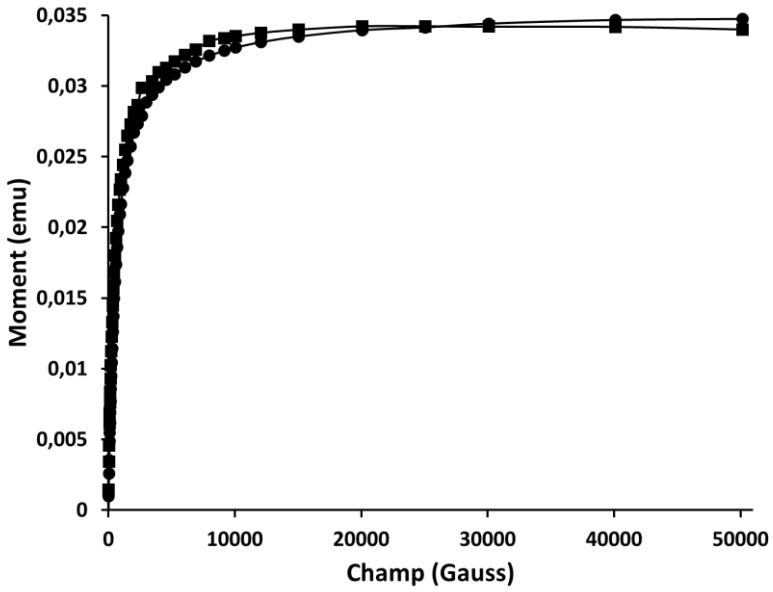


Figure II-22 : Courbe d'aimantation (en emu) des billes, CS@Al 5-10-50 humides (■) et CS@Al 5-10-50 sèches (●) en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

2. 4. 5. Mise au point des billes CS@Al 5-10-50 FLUO

Pour certaines des études *in vivo*, les billes de chitosan magnétiques sont formulées avec un fluorophore, l'Alexa-750, afin d'observer leur localisation dans le tractus gastro-intestinal lors de la digestion. La formulation de ces billes se fait de façon similaire aux billes CS@Al 5-10-50 avec ajout d'une étape de couplage de l'Alexa-750 (λ_{ex} = 750 nm et λ_{em} = 810 nm) avec la matrice de chitosan (Voir Annexe 2-2), ce qui rend ces billes fluorescentes.

2. 4. 6. Caractérisation des billes CS@Al 5-10-50 FLUO

Il a été vérifié que les billes magnétiques fluorescentes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches, présentent les mêmes caractéristiques que leurs homologues non fluorescentes CS@Al 5-10-50 sèches. Le profil de cinétique de libération (100% à t = 6 heures), les caractéristiques d'efficacité d'encapsulation du PA et de taux d'encapsulation du PA et des NPMs sont comparables dans le cas des billes fluorescentes et non fluorescentes. Les cinétiques de libération du PA dans 15 billes (dose administrée *in vivo* à l'animal) sont étudiées à différents

pH (Voir Annexe 3-4). Pour cela, la cinétique de libération est étudiée à pH = 6,8 représentatif du milieu intestinal, à pH = 2 représentatif du milieu stomacal et dans le Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF), milieu biorelevant à pH = 5. Dans le cas de ces billes, les profils de relargage du PA sont proches quel que soit le pH ; 15 billes libèrent 100% du PA, c'est-à-dire 8 mg de PA, à t = 6 heures (Figure II-23).

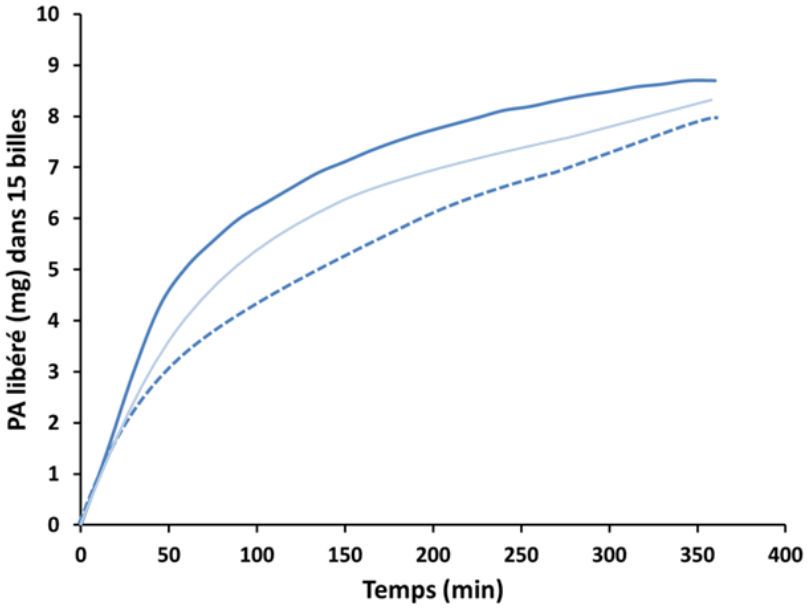


Figure II-23 : Courbes de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches magnétiques dans différents milieux de dissolutions, —pH=6,8, —pH=2 et --- FeSSIF.

Les différentes billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques ayant été mises au point au laboratoire PHENIX ont été utilisées *ex vivo* et *in vivo* afin d'effectuer les expériences de preuve de concept de la rétention magnétique. Ces billes se sont avérées être des formulations efficaces permettant d'augmenter le passage du PA à travers la membrane intestinale. Des mini-granules magnétiques ont ensuite été fabriquées à l'échelle pilote grâce à des procédés de formulation galénique classiques.

3. Mini-granules magnétique à l'échelle pilote

La seconde étape du travail de formulation a été le transfert de la préparation des billes magnétiques millimétriques à l'échelle pilote sur un procédé pharmaceutique. En effet, si les premiers essais *ex vivo* et *in vivo* ont été réalisés sur les billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques au laboratoire, il a été nécessaire de s'intéresser à la faisabilité à plus grande échelle.

La synthèse de ferrofluide par procédé « Massart » permettant une production en quantité relativement importante (1L à [Fe] ≈ 1 mol/L par synthèse) le montage a été transféré sans modification sur le site de fabrication de Technologie Servier (TES).

Pour la fabrication des mini-granules magnétiques, deux procédés classiques de production galénique ont été utilisés. Dans un premier temps, le montage en lit d'air fluidisé a été testé. Des billes de sucre millimétriques commerciales sont utilisées comme support et différentes couches (FF, PA, polymères fonctionnels, etc.) sont pulvérisées à leur surface. Ces objets seront donc constitués d'un cœur neutre recouvert de différentes couronnes contenant les éléments d'intérêt. Dans un second temps, le procédé d'extrusion-sphéronisation a été mis au point afin de fabriquer des mini-granules matricielles de polymère contenant les NPMs et le PA, puis le montage en lit d'air fluidisé a été utilisé pour ajouter les couches fonctionnelles à la surface de ces mini-granules, celles-ci permettant de contrôler précisément leur cinétique de relargage du PA.

Pour tous ces essais, on a cherché à produire des formes magnétiques de taille millimétrique en utilisant des procédés galéniques à plus grande échelle, de façon rapide et reproductible. On cherchera d'une part à atteindre des teneurs en PA et en NPMs similaires à celles des billes de biopolymère magnétiques et d'autre part à contrôler la cinétique de libération du PA dans ces formes. Pour les deux types de billes cœur-couronne chitosan-alginate magnétiques obtenues par extrusion-réticulation, CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-10-50, les masses de PA et de NPMs par bille sont respectivement 0,3 et 0,53 mg de PA/bille et 0,0832 et 0,368 mg de fer/bille. Ces valeurs seront les valeurs références que l'on cherchera à atteindre lors des essais en process galénique.

3. 1. Montage en lit d'air fluidisé

Les équipements de lit d'air fluidisé, développés au départ comme sécheurs pour l'industrie agroalimentaire, sont très répandus dans l'industrie pharmaceutique pour le séchage de particules solides mais aussi pour le pelliculage, c'est-à-dire l'enrobage de mini-granules. Le pelliculage est la technique d'enrobage la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique et consiste à déposer une fine pellicule de polymère (20 µm - 200 µm) à la surface d'une forme solide. La composition de l'enrobage est formulée afin d'obtenir un dépôt continu, d'épaisseur régulière, adhérent, flexible, résistant à l'abrasion et de solubilité ou de perméabilité maîtrisable selon l'objectif recherché. L'enrobage peut avoir plusieurs objectifs, tels que la protection de la substance active vis-à-vis d'agents extérieurs (humidité, oxygène, lumière…), la protection des muqueuses contre l'irritation provoquée par un principe actif, une administration plus facile et plus agréable grâce à l'amélioration de l'aspect visuel ou gustatif des formes ou encore la modification de la cinétique de libération du principe actif dans le tube digestif. Dans ce dernier cas, l'enrobage est alors dit fonctionnel et a une influence majeure sur la libération du principe actif et sur les propriétés de la forme enrobée finale. Généralement, la mise au point de mini-granules à libération modifiée s'opère en plusieurs étapes distinctes. Une première étape appelée montage consiste à déposer le PA en présence d'un agent filmogène. Ensuite, une seconde couche constituée généralement de polymères fonctionnels est appliquée. Cette seconde couche va contrôler la cinétique de libération de l'actif.

Les billes support utilisées dans cette étude sont des mini-granules saccharose/amidon de 750-810 µm de diamètre. Lors du pelliculage en lit d'air fluidisé, les mini-granules sont mises en suspension dans l'air pendant qu'une suspension est pulvérisée à travers une buse d'injection. Dans cette technique dite du « Bottom Spray », la buse de pulvérisation est fixée à la base de la cuve, les particules sont aspirées à l'intérieur d'une colonne verticale appelée Wurster et sont donc forcées de traverser le cône de pulvérisation. En continuant leur ascension, les particules sèchent et retombent à l'extérieur du Wurster pour être de nouveau aspirées à sa base. Cette technique permet d'obtenir des films très homogènes (Figure II-24).

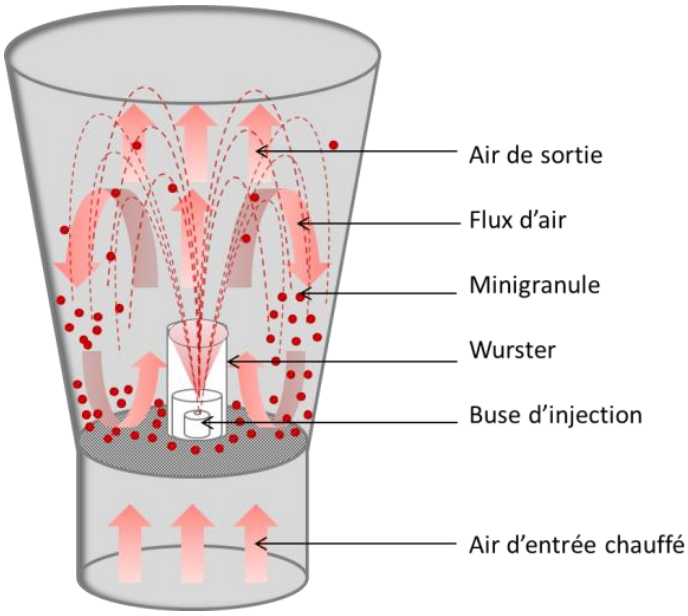


Figure II-24 : Schéma du montage en lit d'air fluidisé.

Les suspensions de pelliculage sont préparées en milieu aqueux ou alcoolique puis pulvérisées sur les billes support à travers la buse. Pour permettre une adhésion efficace des couches à la surface des billes, il est nécessaire d'ajouter un plastifiant aux différentes suspensions. Pour les suspensions aqueuses, on utilise l'hydroxypropylcellulose (Pharmacoat 606®) et pour les suspensions alcooliques le triéthylcitrate (Citroflex A4®). Le ferrofluide citraté ($FFAS1_{citraté}$) et le PA sont dispersés en suspension aqueuse, avec du Pharmacoat 606 ®, celui-ci jouant un double rôle d'agent liant, filmogène et porogène. La couche fonctionnelle permettant le contrôle de la cinétique de relargage du PA est constituée d'un mélange d'Ethylcellulose (Ethocel 10 CG®), polymère hydrophobe imperméable, de Pharmacoat 606®, agent porogène et de Citroflex A4®, plastifiant dispersé dans l'alcool (Voir Annexe 5-2).

Après quatre essais préliminaires de pulvérisation, ASP1 à ASP4 (*Anjali Seth Pelliculage n°1 à 4*), deux configurations ont été testées avec pulvérisation de deux (ASP5) ou quatre couches (ASP6). L'objectif de ces essais a été de tester l'utilisation d'un procédé d'enrobage en lit d'air fluidisé pour l'obtention de formes magnétiques, présentant des caractéristiques proches de celles des billes core-shell magnétiques de chitosan-alginate. On cherchera d'une part à atteindre des teneurs en PA et en NPMs similaires à celles des billes de biopolymère magnétiques et d'autre part à contrôler la cinétique de libération du PA dans ces formes.

3. 1. 1. Mini-granules magnétiques à deux couches, ASP5

Pour cette première forme, les NPMs (dispersées au sein du ferrofluide citraté) et le PA ont été mélangés ensemble dans l'eau avec un agent filmogène (Pharmacoat) puis pulvérisés afin de former la première couche. Ensuite une couche fonctionnelle d'un mélange Ethylcellulose-Pharmacoat : 1-1 permettant le contrôle de la cinétique de libération du PA a été pulvérisée.

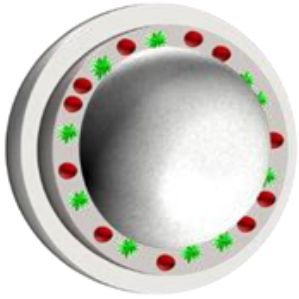


Figure II-25 : Schéma d'une bille ASP5 à deux couches avec ● NPMs et ✷ PA.

3. 1. 1. 1. Mise au point des mini-granules ASP5

Pour la formulation des mini-granules ASP5, on pellicule 500 g de billes de sucre support. Les compositions des suspensions de pelliculage sont, en matière sèche :

- Couche 1: 250 g PA + 34 g Pharmacoat + 500 mL $FFAS1_{citraté}$ dans 500mL d'eau
- Couche 2: 20 g EC + 20 g Pharmacoat + 10 g Citroflex dans 500mL d'alcool

On récupère après pelliculage 800 g de mini-granules pesant chacune environ 1 mg.

3. 1. 1. 2. Caractérisation des mini-granules ASP5

Après formulation, on dose le fer par spectrométrie d'absorption atomique et le PA par dissolution en continu (Voir Annexes 3-4 et 4-1) contenu dans 100 mg de mini-granules, afin de déterminer la composition, c'est-à-dire le ratio de chacun des constituants et l'efficacité d'encapsulation de ces billes.

100 mg de mini-granules ASP5 contiennent 3,86 mg de fer c'est-à-dire 10^{15} nanoparticules de maghémite et 27,5 mg de PA. Une mini-granule ASP5 contient donc environ 0,0386 mg de fer (10^{13} nanoparticules de maghémite) et 0,275 mg de PA.

L'efficacité d'encapsulation de ces mini-granules pelliculées est très bonne EE% (PA) = 88%, EE% (NPMs) = 61,4% (Tableau II-3) et elles ont une cinétique de libération de 100% libérés à t = 4 heures (Figure II-26).

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
Cœur	Billes sucre support	500	56,8	500	62,5	
Couche 1	PA 44497	250	28,4	220	27,5	**88**
	NPMs	48	5,45	29,5	3,68	**61,4**
	Pharmacoat	34	3,86			
Couche 2	EC	20	2,27			
	Pharmacoat	20	2,27			
	Citroflex	8	0,909			
Mini-granules	ASP5	880		800		

Tableau II-3 : Composition des mini-granules ASP5.

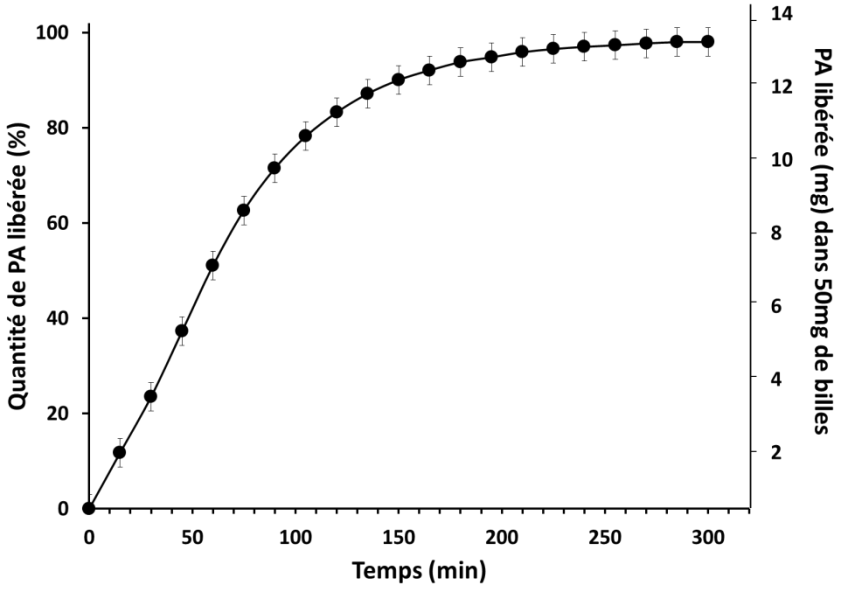


Figure II-26 : Quantité de PA libérée des mini-granules (%) et (mg) pour 50 mg de mini-granules ASP5 en fonction du temps (min).

Sur les clichés de MEB, la présence des différentes couches peut être observée sur une mini-granule coupée en deux : la couche 1, contenant le PA et les NPMs, d'épaisseur environ 20 µm et la couche 2 fonctionnelle, d'épaisseur environ 10 µm (Figure II-27).

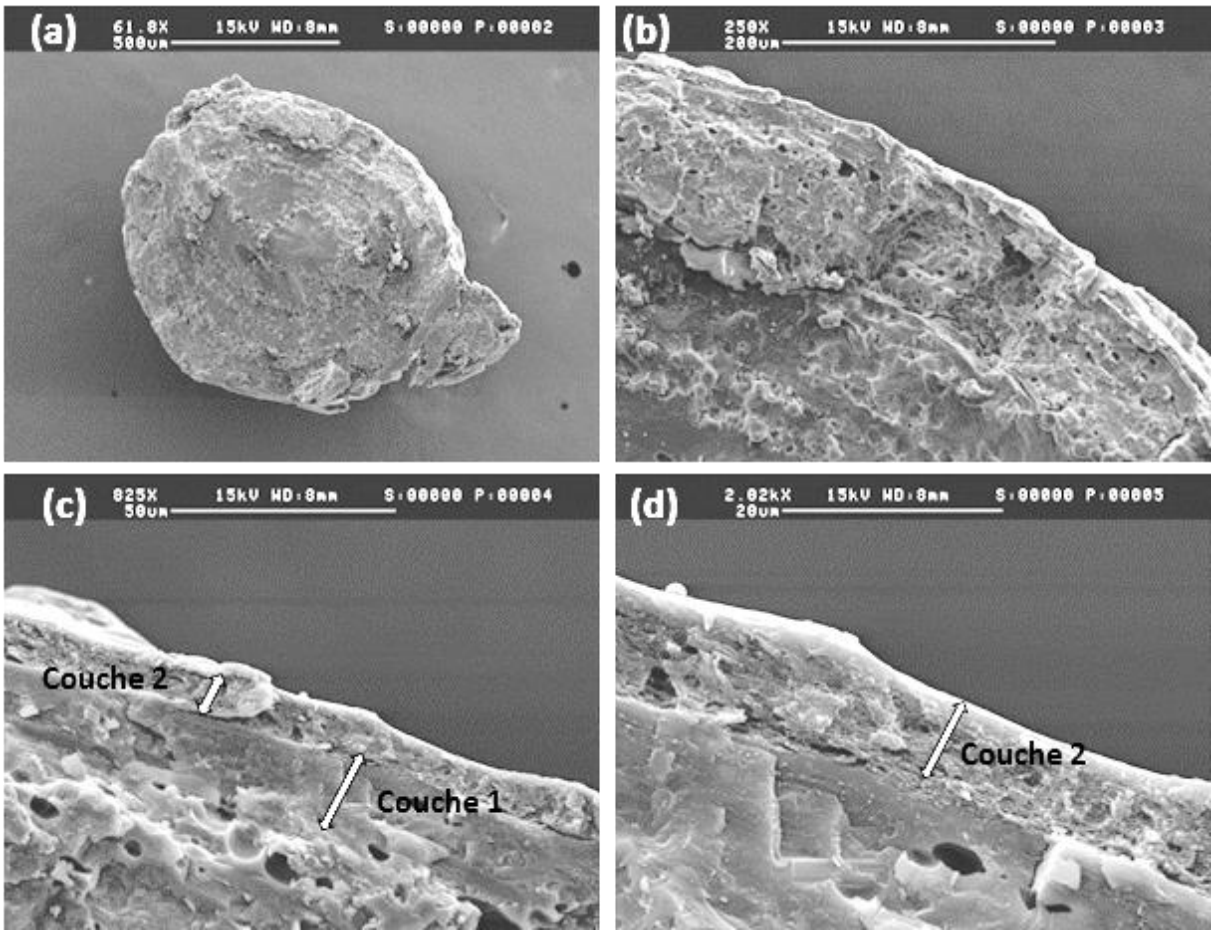


Figure II-27 : Clichés MEB d'une mini-granule ASP5 (a) coupée en deux, (b), (c) et (d) zoom sur les couches fonctionnelles (⇔) grossies respectivement (a) 60, (b) 250, (c) 825 et (d) 2000 fois.

Dans cette formulation, les NPMs sont incluses dans la couche 1 avec le PA. Cette première couche est isolée du milieu par la couche 2 composée d'un mélange de polymère hydrophobe imperméable, l'EC et de polymère hydrophile perméable, l'hydropropylmethylcellulose (Pharmacoat). En raison de la présence du Pharmacoat porogène permettant la création de pores dans la couche fonctionnelle, les molécules de PA contenues dans la couche 1 peuvent diffuser au travers de la couche 2 et rejoindre le milieu ; c'est ce phénomène de diffusion qui contrôle la cinétique de libération du PA. Le problème de cette formulation est que les NPMs fuient en même temps que le PA à travers la couche de polymère fonctionnelle. En effet, les particules contenues dans la couche 1 passent au travers des pores formés dans la couche 2 en même temps que les molécules de PA, diminuant ainsi progressivement le pouvoir magnétique des mini-granules. La libération des NPMs n'est pas souhaitée, cela pourrait entraîner des problèmes de toxicité et de pénétration *in vivo* de ces NPMs dans la circulation sanguine et l'accumulation de fer dans les organes.

Le deuxième essai de pelliculage a donc consisté à trouver une formulation permettant d'isoler les NPMs de la surface des mini-granules pour éviter les fuites et d'augmenter la charge en NPMs par mini-granule, c'est-à-dire d'atteindre au moins 0,08 mg de fer/mini-granule pour se rapprocher de la charge des billes CS@Al 5-5-10 utilisées *ex vivo*.

3. 1. 2. Mini-granules magnétiques à quatre couches, ASP6

Dans un second temps, un système constitué de quatre couches a été testé. Une première couche constituée de NPMs et de Pharmacoat dans l'eau, puis une couche isolante totalement étanche d'EC dans l'alcool ont été pulvérisées afin d'isoler les NPMs des couches superficielles de la mini-granule. Une troisième couche de PA et Pharmacoat dans l'eau et une quatrième et dernière couche de polymère fonctionnel constituée d'EC-Pharmacoat : 5-3 dans l'alcool ont été pulvérisées.

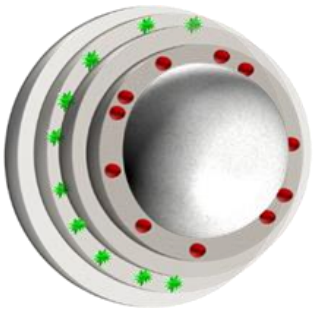


Figure II-28 : Schéma d'une mini-granule ASP6 à quatre couches avec ● NPMs et ✳ PA.

3. 1. 2. 1. Mise au point des mini-granules ASP6

Pour la formulation des mini-granules ASP6, on pellicule 500 g de billes de sucre support avec quatre couches dont les compositions en matière sèche sont :

- Couche 1: 3 L $FFAS1_{citraté}$ + 60 g Pharmacoat dans 500mL d'eau
- Couche 2: 50 g EC + 10 g Citroflex dans 500mL d'alcool
- Couche 3: 250 g PA + 34 g Pharmacoat dans 1000mL d'eau
- Couche 4: 25 g EC + 15 g Pharmacoat + 10 g Citroflex dans 500 mL d'alcool

On récupère 855 g de mini-granules après pelliculage.

3. 1. 2. 2. Caractérisation des mini-granules ASP6

100 mg de mini-granules contiennent 26,6 mg de PA et 11,6 mg de fer c'est-à-dire environ 10^{16} nanoparticules, soit environ 10^{14} nanoparticules/ mini-granule.

L'efficacité d'encapsulation du PA dans ces mini-granules est très bonne EE % (PA) = 91,2 % mais en revanche, l'efficacité d'encapsulation des NPMs est faible EE % (NPMs) = 34,6 % (Tableau II-4). Elles ont une cinétique de libération : 100 % libérés à t = 8 heures (Figure II-29). Dans 50 mg de mini-granules ASP6, 13,6 mg de PA sont libérés en t = 8 heures.

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
Cœur	Billes sucre	500	40,2	500	58,4	
Couche 1	NPMs	288	23,1	99,8	11,6	**34,6**
	Pharmacoat	60	4,83			
Couche 2	EC	50	4,02			
	Citroflex	10	0,805			
Couche 3	PA 44497	250	20,1	228	26,6	**91,2**
	Pharmacoat	34	2,73			
Couche 4	EC	25	2,01			
	Pharmacoat	15	1,2			
	Citroflex	10	0,805			
Mini-granules	ASP6	1242		855		

Tableau II-4 : Composition des mini-granules ASP6.

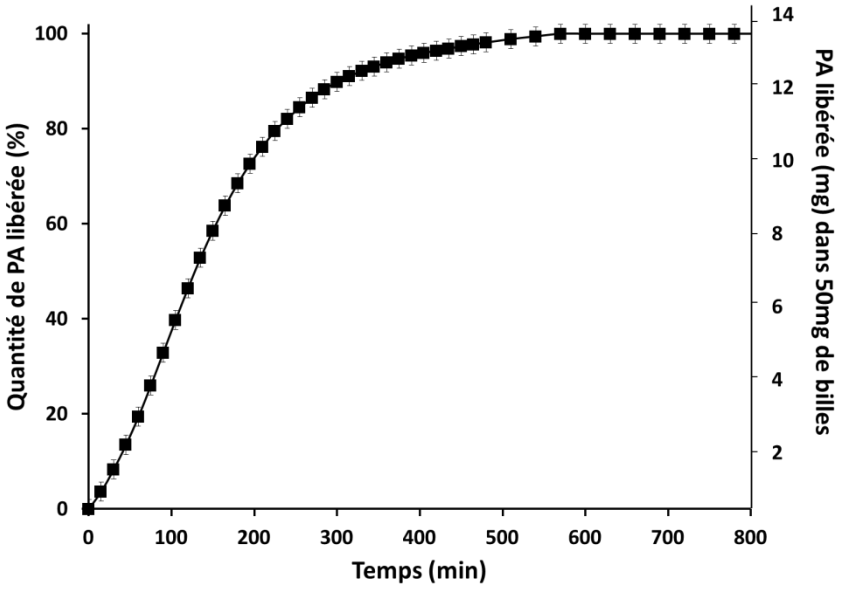


Figure II-29 : Quantité de PA libérée (%) et (mg) pour 50 mg de mini-granules ASP6 en fonction du temps (min).

Sur une mini-granule ASP6 coupée en deux, la présence des différentes couches d'épaisseur *e* peut être observée en MEB (Figure II-30). Sur les clichés, on peut identifier la couche 1 contenant les NPMs ($e \approx 6$ µm), la couche 2 isolante ($e \approx 15$ µm), la couche 3 contenant le PA ($e \approx 130$ µm) et la couche 4 fonctionnelle ($e \approx 8$ µm).

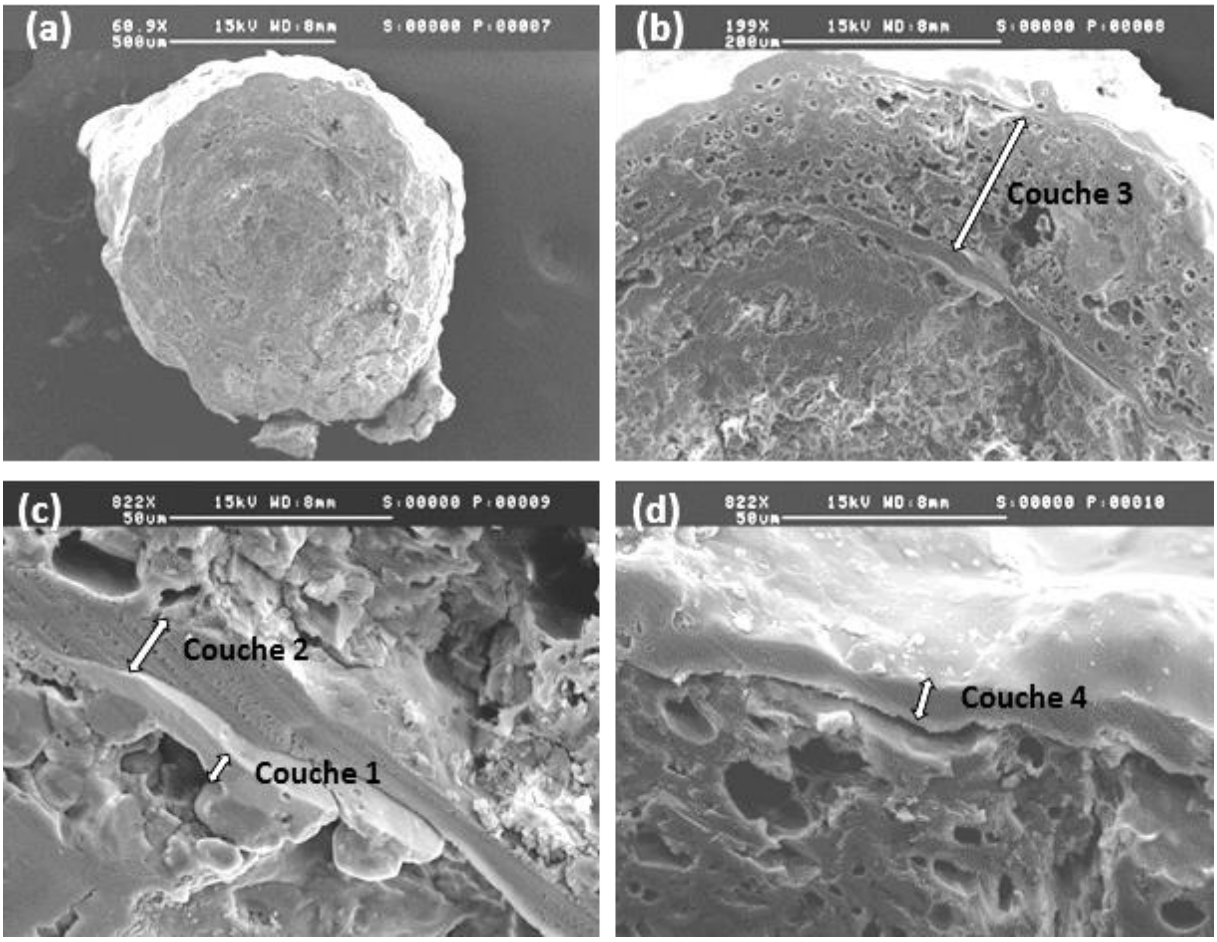


Figure II-30 : Clichés MEB d'une mini-granule ASP6 (a) coupée en deux, (b), (c) et (d) zoom sur les couches fonctionnelles (⇔) grossies respectivement (a) 60, (b) 250 et (c) et (d) 825 fois.

L'aimantation d'une mini-granule ASP6 a été mesurée par magnétométrie SQUID (Voir Annexe 4-3). La valeur de son moment magnétique à saturation, μ_s= 0,00976 emu (= $0{,}976.10^{-5}$ A.m²), représentée par le plateau est atteinte à 15000 Gauss (Figure II-31).

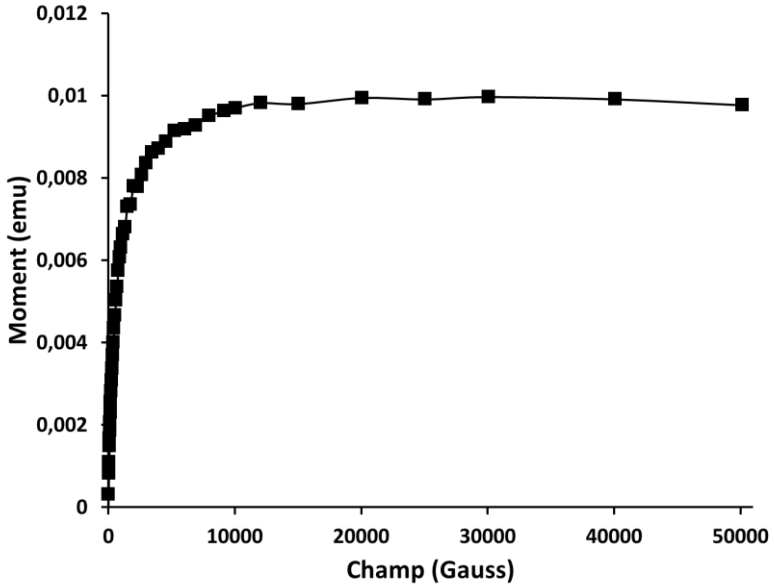


Figure II-31 : Courbe d'aimantation (en emu) d'une mini-granule ASP6 en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

Dans cette formulation, les NPMs ne sont pas relarguées au cours de l'expérience. Les NPMs contenues dans la couche 1 sont isolées du milieu grâce à la présence de la couche 2 composée uniquement de polymère hydrophobe imperméable (EC). Le PA contenu dans la couche 3 peut quant à lui diffuser au travers de la couche 4 composée d'un mélange d'EC et de Pharmacoat porogène qui permet la création de pores, permettant ainsi au PA de rejoindre le milieu. En revanche, la pulvérisation des 4 couches est assez longue et le pelliculage de cette grande quantité de FF est assez peu efficace (EE = 34,6 %). Les pertes en NPMs sont importantes et pour obtenir des objets suffisamment magnétiques une très grande quantité de FF est donc nécessaire. En effet, dans cette formulation, où la quantité de ferrofluide pulvérisée est multipliée par six par rapport à la forme précédente, la quantité de fer n'est que de 0,11 mg de fer/mini-granule ; ce qui est alors comparable aux quantités contenues dans les billes de chitosan (entre 0,0832 et 0,368 mg de fer/bille).

3. 1. 3. Comparaison

Si on compare les deux formulations fabriquées par pelliculage, ASP5 et ASP6 (Tableau II-5), on constate que pour le pelliculage du PA, les deux formulations sont efficaces et contiennent à peu près la même quantité de PA pour 100 mg de mini-granules (0,27 et 0,26 mg de PA/mini-granule) ce qui est une valeur satisfaisante et comparable aux billes de chitosan CS@Al 5-5-10 (0,3 mg de PA/bille). En revanche, la quantité de NPMs contenue dans ces

deux formes reste assez faible (0,038 et 0,11 mg de fer/mini-granule). De plus, même si une quantité de FF beaucoup plus importante est utilisée dans la seconde formulation (3L au lieu de 500mL), l'efficacité d'encapsulation des NPMs est alors beaucoup plus faible (34,6% au lieu de 61,4%). En augmentant fortement la quantité de FF pulvérisée (6 fois), on pourrait s'attendre à ce que la quantité de fer/mini-granules soit elle aussi multipliée par six passant ainsi de 0,038 à 0,22 mg/mini-granule ; ce qui permettrait de se rapprocher de la quantité contenue dans les billes de chitosan CS@Al 5-10-50 (0,368 mg de fer/bille). En réalité, la quantité de NPMs à la surface des mini-granules est seulement multipliée par trois (0,11 mg de fer/mini-granule) et reste assez éloignée de la quantité contenue dans les billes CS@Al 5-10-50 utilisées *in vivo* (0,368 mg de fer/bille).

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
PA 44497	ASP5	250	28,4	220	27,5	**88**
	ASP6	250	20,1	228	26,6	**91,2**
$FFAS1_{citraté}$	ASP5	48	5,45	29,5	3,68	**61,4**
	ASP6	288	23,1	99,8	11,6	**34,6**

Tableau II-5 : Comparaison des compositions des mini-granules ASP5 et ASP6.

Au vu de ces résultats, il a été décidé de passer à une fabrication des mini-granules utilisant une technique d'extrusion-sphéronisation. Cette technique de fabrication permettra de d'obtenir des mini-granules magnétiques en incorporant les NPMs dans la masse. Dans ces mini-granules, les NPMS ou les NPMs et le PA seront encapsulés dans le cœur des mini-granules. Ces formes contenant les NPMS et le PA au sein d'une matrice de polymère, reproduisent alors le schéma des billes de chitosan magnétiques préparées au laboratoire.

3. 2. Extrusion-sphéronisation

Les billes de sucre pelliculées présentent le désavantage de nécessiter la pulvérisation d'une couche de ferrofluide très importante pour être suffisamment magnétiques. Nous avons donc décidé de nous orienter vers le procédé d'extrusion-sphéronisation qui permet de fabriquer les mini-granules, c'est-à-dire les cœurs magnétiques servant de bases pour le pelliculage. Cette technologie permet d'élaborer des mini-granules pouvant être fortement chargées en principe actif et permet d'éviter l'emploi de solvants organiques. Le procédé d'extrusion-sphéronisation se découpe en cinq étapes consécutives : mouillage, granulation, extrusion, sphéronisation et séchage. La matrice des billes fabriquées par extrusion-sphéronisation est composée d'un polymère, la cellulose microcristalline (Avicel PH 101), classiquement mélangée à de l'eau. Typiquement les mélanges sont de 50/50 en masse. Afin de fabriquer des granules magnétiques, le liquide de mouillage classique (l'eau) est remplacé par un ferrofluide acide concentré (FFAS2, [Fe] = 2,1 mol/L). On utilise ici un ferrofluide acide, plus rapide à synthétiser et ne nécessitant pas d'étape de citratation, car le mélange se fait avec une poudre ; il n'est donc pas nécessaire de s'intéresser à la stabilité des NPMs en fonction du pH puisqu'elles seront mélangées en phase solide. On obtient ainsi un cœur magnétique de façon facile et rapide. On peut ensuite pulvériser, grâce au lit d'air fluidisé, les couches de PA et de polymère conditionnant le relargage.

Lors du procédé d'extrusion-sphéronisation, différentes étapes sont nécessaires à l'obtention des granules magnétiques prêtes à être utilisées comme support pour le montage en lit d'air fluidisé (Voir Annexe 5-1). Dans un premier temps, un mélange à sec de polymère est réalisé au mélangeur. L'étape suivante est celle du mouillage. L'agent mouillant, ici le ferrofluide, agit comme un agent de liaison et de lubrification et fournit à la poudre les propriétés cohésives et rhéologiques appropriées pour permettre la formation d'extrudats et leur transformation en granulés sphériques. La troisième étape d'extrusion permet de mettre en forme la masse humide en la compactant et en la faisant passer au travers d'une grille perforée, produisant ainsi un ensemble particulaire aggloméré sous forme de bâtonnets, appelés extrudas. La quatrième étape de sphéronisation a pour but de modeler les extrudas en particules sphériques. Les extrudats humides s'individualisent en particules sphériques sous l'action combinée des frictions inter-particulaires et de la force centrifuge exercée par le sphéroniseur. La dernière étape, après sphéronisation, est le séchage, permettant d'éliminer le liquide incorporé dans la masse au moment du mouillage. Les granules magnétiques ainsi

fabriquées par extrusion-sphéronisation permettent d'obtenir un cœur contenant une grande quantité de NPMs pouvant servir de support pour le montage en lit d'air fluidisé de différentes couches fonctionnelles.

Dans les granules magnétiques nues, le PA est relargué instantanément c'est donc uniquement la couche fonctionnelle externe qui va conditionner les propriétés de relargage de l'objet et la cinétique de libération du produit. En effet, lors de l'utilisation des billes fabriquées par extrusion sphéronisation, la couche de polymère servant à isoler les NPMs de l'extérieur n'est pas nécessaire. Les NPMs contenues dans la matrice polymérique magnétique de ces granules ne fuient pas au cours du temps. Ce comportement est similaire à celui des NPMs contenues dans les billes matricielles de chitosan.

A partir d'un même objet de base, le cœur, on peut ainsi fabriquer tout un éventail de formulations ayant des propriétés de relargage très différentes et bien contrôlées.

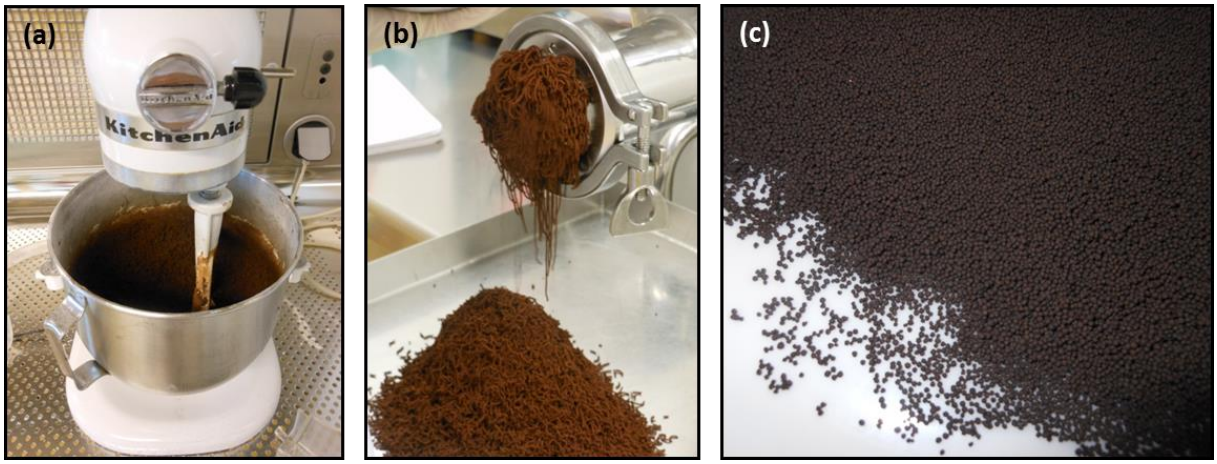


Figure II-32 : (a) mouillage, (b) extrusion et (c) granules magnétiques obtenues après sphéronisation.

3. 2. 1. Granules magnétiques à deux couches, ASP10

Le cœur magnétique utilisé comme base pour le montage dans cette formulation est fabriqué grâce à un mélange d'Avicel et de ferrofluide FFAS2 utilisé comme liquide de mouillage à la place de l'eau. Le ferrofluide FFAS2 utilisé lors de cette fabrication est un ferrofluide concentré, [Fe] = 2,1 mol/L, afin d'obtenir un cœur le plus magnétique possible (Voir Annexe 5-1). En effet, lors de la fabrication de mini-granules magnétiques par extrusion-sphéronisation, la quantité de NPMs pouvant être utilisée lors de la préparation est limitée par la quantité de liquide de mouillage nécessaire à l'obtention d'un mélange de poudre mouillée

de façon adéquate pour former les extrudats. Ainsi, si la concentration du ferrofluide est augmentée, alors la quantité de NPMs introduites lors de l'étape de mouillage sera également augmentée, et ce, pour un volume identique (la fraction volumique en NPMs du ferrofluide est augmentée). Les mini-granules magnétiques sont fabriquées à partir d'un mélange polymère-FF 1-1 en masse ; puis sont utilisées comme base pour le montage au lit d'air fluidisé d'une première couche contenant le PA puis d'une deuxième couche fonctionnelle afin de contrôler la cinétique de relargage (Figure II-33).

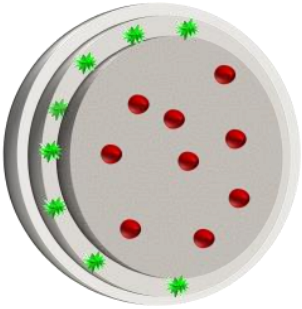


Figure II-33 : Schéma d'une bille ASP10 à deux couches avec ● NPMs et ✷ PA.

3. 2. 1. 1. Mise au point des mini-granules ASP10

Lors du montage au lit d'air, 500 g de ces billes fabriquées par extrusion-sphéronisation sont utilisées.

La première couche est constituée d'un mélange aqueux de PA et de plastifiant (Pharmacoat), dans les proportions 125-25 (g). La deuxième couche est composée d'un mélange de polymères hydrophobe (EC) et hydrophile porogène (Pharmacoat) et d'un plasifiant (Citroflex), dans les proportions 50-25-20 (g).

- Cœur : 500 g Avicel + 450 mL de FFAS2
- Couche 1: 125g PA + 25g Pharmacoat dans 500mL d'eau
- Couche 2: 50g EC + 25g Pharmacoat + 20g Citroflex dans 500mL d'alcool

Après pelliculage, on récupère 666 g de billes.

3. 2. 1. 2. Caractérisation des mini-granules ASP10

Les mini-granules fabriquées par extrusion-sphéronisation sont caractérisées de façon similaire aux mini-granules obtenues par pelliculage. Tout d'abord, la quantité de NPMs contenue dans les mini-granules est dosée par spectrométrie d'absorption atomique et la quantité de PA ainsi que sa cinétique de libération est déterminée grâce à des techniques de dissolution en continu (Voir Annexes 3-4 et 4-1).

100 mg de mini-granules contiennent $1,28*10^{-4}$ moles de fer c'est-à-dire 10,2 mg de fer ou 10^{16} nanoparticules de maghémite soit environ 10^{14} nanoparticules/mini-granule.

Grâce à la fabrication par extrusion-sphéronisation, les NPMs contenues dans le cœur magnétique et le PA contenu dans la première couche pulvérisée à la surface des mini-granules sont encapsulés en quasi-totalité, EE = 90,2% et 90,5% respectivement (Tableau II-6).

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
Cœur	Avicel	500	56,3			
	NPMs	75,6	11,3	68,2	9,25	**90,2**
Couche 1	PA 44497	125	18,7	113,2	15,3	**90,5**
	Pharmacoat	25	3,75			
Couche 2	EC	50	7,5			
	Pharmacoat	25	3,75			
	Citroflex	20	3			
Mini-granules	ASP10			666		

Tableau II-6 : Composition des mini-granules ASP10.

Des mini-granules sont récupérées à différents stades du pelliculage de la couche fonctionnelle (25%, 50%, 75% et 100% du mélange) afin d'obtenir différentes cinétiques de libération du PA. La cinétique de libération du PA est testée en bain de dissolution pour les différents pourcentages de pulvérisation de la couche externe de polymère fonctionnel (Figure II-34). Pour toutes les formes fabriquées par extrusion-sphéronisation, les tests de dissolution sur chaque échantillon sont répétés trois fois, mais les résultats sont très homogènes, ce qui ne permet pas de visualiser les barres d'erreurs. Plus la couche fonctionnelle externe est épaisse, c'est-à-dire plus le taux de pulvérisation de celle-ci augmente (de 25 à 100%), plus la cinétique de relargage du PA est lente. En effet, le PA contenu dans la première couche à la surface de la mini-granule doit traverser cette deuxième couche porogène avant d'être libéré

dans le milieu. Plus la couche fonctionnelle sera épaisse plus la cinétique de libération du PA sera lente, de 100% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 25% ; de 55% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 50% ; de 35% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 75% et de 20% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 100%.

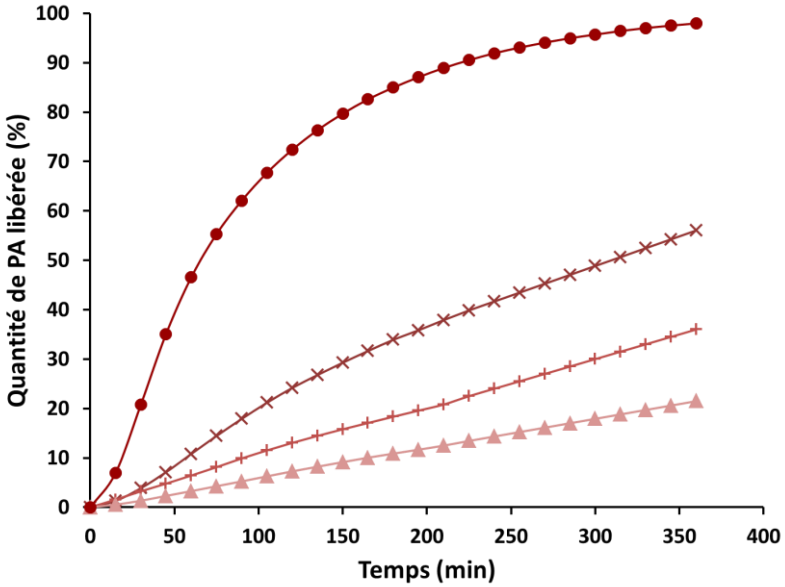


Figure II-34 : Courbe de cinétique de libération du PA (%) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP10 ayant une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (●), 50% (×), 75% (+) et 100% (▲).

Pour les mini-granules ASP10 avec un pelliculage à 25%, qui seront utilisées dans l'étude *in vivo* n°6, les cinétiques de libération du PA dans 50 mg de mini-granules sont étudiées à différents pH (Voir Annexe 3-4). Pour cela, la cinétique de libération est étudiée à pH = 6,8 (pH représentatif du milieu intestinal), à pH = 2 (pH représentatif du milieu stomacal) et dans le FeSSIF, milieu biorelevant, à pH = 5 (pH représentatif d'un état non à jeun). Dans le cas de ces mini-granules, les profils de relargage du PA sont proches quel que soit le pH, quasi linéaires sur 6 heures ; 50 mg de billes relarguent 8,13 mg de PA à pH=2 ; 8,57 mg à pH=6,8 et 9,8 mg de PA dans le FeSSIF (Figure II-35).

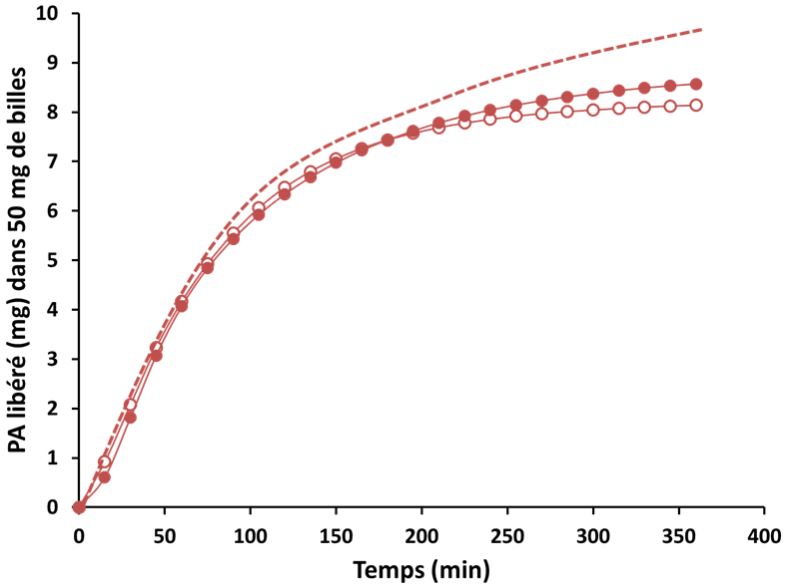


Figure II-35 : Courbes de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP10 pulvérisées à 25% dans les milieux de dissolution, ● pH=6,8, ○ pH=2 et --- FeSSIF.

Sur les clichés MEB, la présence des différentes couches en surface d'une mini-granule ASP10 25% coupée en deux peut être observée, la couche 1 d'épaisseur ≈ 50 µm et la couche 2 d'épaisseur ≈ 10 µm (Figure II-36).

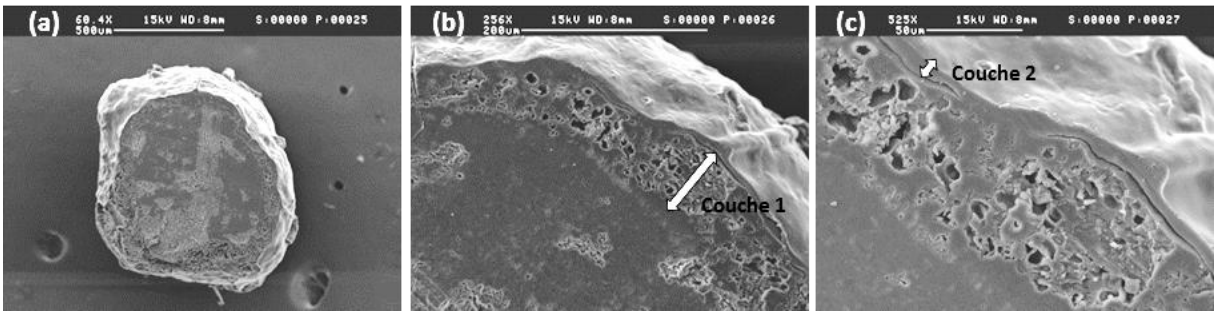


Figure II-36 : Clichés MEB d'une mini-granule ASP10 (a) coupée en deux, (b) et (c) zoom sur les couches fonctionnelles (⇔) grossies respectivement (a) 60, (b) 250 et (c) 525 fois.

L'aimantation d'une mini-granule ASP10 a été mesurée par magnétométrie SQUID (Voir Annexe 4-3). La valeur du moment magnétique à saturation, μ_s= 0,00587 emu (= 0,587*10^{-5} A.m²), représentée par le plateau est atteinte à 15000 Gauss (Figure II-37).

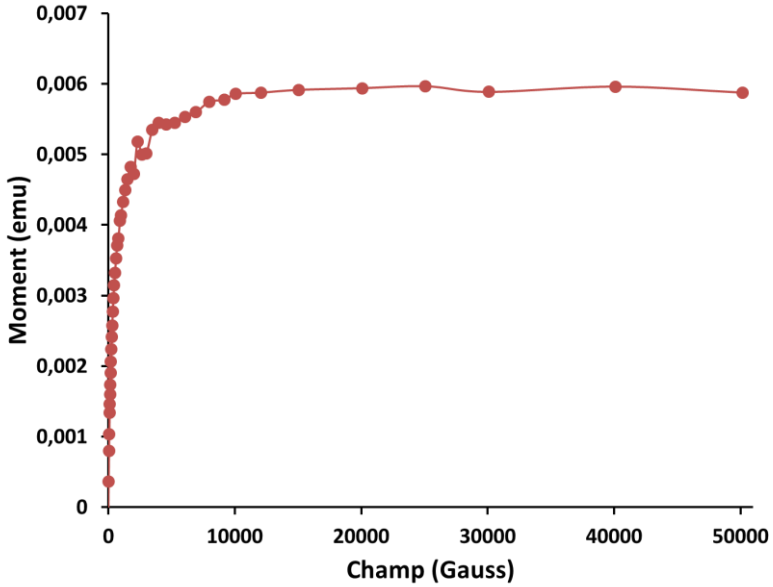


Figure II-37 : Courbe d'aimantation (en emu) d'une mini-granule ASP10 en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

3. 2. 2. Mini-granules magnétiques à une couche, ASP7 et ASP8

Pour ces nouvelles formulations, on incorpore le PA directement dans le cœur. Le PA est une poudre et peut donc être substitué au polymère constituant la matrice ; on remplace alors une partie de la masse de cellulose microcristalline par du PA. On obtient avec cette méthode un objet matriciel contenant le PA et les NPMs, c'est-à-dire équivalent aux billes de biopolymère précédemment fabriquées à l'échelle du laboratoire.

Les mini-granules magnétiques utilisées comme base pour ASP7 et ASP8 sont obtenues à partir d'un mélange Avicel-PA : 3-1 (375-125 g) mouillé par un ferrofluide acide concentré FFAS2 (400 mL) (Voir Annexe 5-1). Ces nouvelles mini-granules contiennent le PA dans leur cœur matriciel et il suffit donc de pulvériser une couche fonctionnelle de polymère pour contrôler la cinétique de libération du PA (Voir Figure II-38).

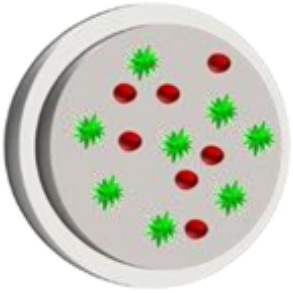


Figure II-38 : Schéma d'une bille ASP7 ou ASP8 à une couche avec ● NPMs et ✳ PA.

3. 2. 2. 1. Mise au point des mini-granules ASP7

Pour la formulation des mini-granules ASP7, on pellicule 500 g de billes fabriquées par extrusion-sphéronisation. La couche fonctionnelle est composée d'un mélange de polymères hydrophobe (EC) et hydrophile porogène (Pharmacoat) et d'un plastifiant (Citroflex), dans les proportions 60-20-20 (g).

- Cœur : 375 g Avicel + 125 g PA + 400 mL de FF
- Couche fonctionnelle : 60 g EC + 20 g Pharmacoat + 20 g Citroflex dans 500 mL d'alcool

Après pelliculage, on récupère 610 g de mini-granules.

3. 2. 2. 2. Caractérisation des mini-granules ASP7

100 mg de mini-granules contiennent $1{,}26*10^{-4}$ moles de fer c'est-à-dire 10,0 mg de fer ou 10^{16} nanoparticules de maghémite soit environ 10^{14} nanoparticules/mini-granule.

Grâce à la fabrication par extrusion-sphéronisation, les NPMs et le PA contenus dans le cœur magnétique sont encapsulés rapidement et de façon efficace, EE = 80% et 73,2% respectivement, les pertes étant dues essentiellement aux différentes étapes où le mélange de poudre reste dans les machines (Tableau II-7).

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
Cœur	PA 44497	125	20,4	91,5	15	**73,2**
	NPMs	67,2	11	53,8	8,81	**80**
	Avicel	375	1,4			
Couronne	EC	60	9,83			
	Pharmacoat	20	3,27			
	Citroflex	20	3,27			
Mini-granules	ASP7			610		

Tableau II-7 : Composition des mini-granules ASP7.

Des échantillons de ces mini-granules sont récupérés à différent stades du pelliculage de la couche fonctionnelle (25%, 50%, 75% et 100%) afin d'obtenir différentes cinétiques de libération du PA. La cinétique de libération du PA est testée au bain de dissolution pour les différents pourcentages de pulvérisation de la couche externe fonctionnelle de polymère. L'épaisseur de cette couche contrôle la vitesse de diffusion du PA. Plus la couche porogène est épaisse, c'est-à-dire plus le taux de pulvérisation de celle-ci augmente (de 25 à 100%), plus la cinétique de libération du PA sera lente, de 65% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 25% ; de 47% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 50% ; de 20% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 75% et de 14% à t = 6 heures pour une couche pulvérisée à 100% (Figure II-39).

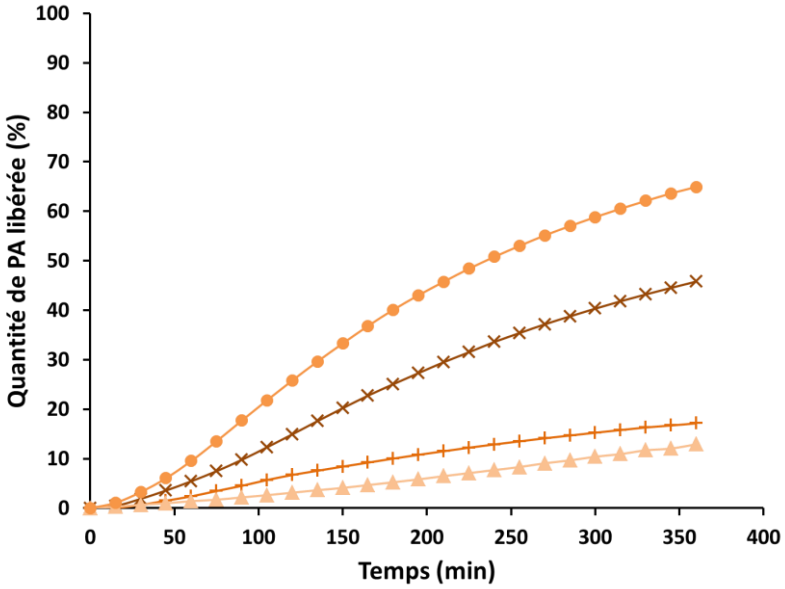


Figure II-39 : Courbes de cinétique de libération du PA (%) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP7 ayant une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (●), 50% (×), 75% (+) et 100% (▲).

Les cinétiques de libération du PA pour les mini-granules ASP7 pelliculées à 25%, qui seront utilisées dans l'étude *in vivo* n°6, sont étudiées aux trois pH représentatifs (pH = 2 ; 5 et 6,8) (Voir Annexe 3-4). La libération est continue, représentée par une courbe linéaire. 50 mg de billes relarguent 7,38 mg de PA à pH=2 ; 4,99 mg à pH=6,8 et 6,35 mg de PA dans le FeSSIF (Figure II-40).

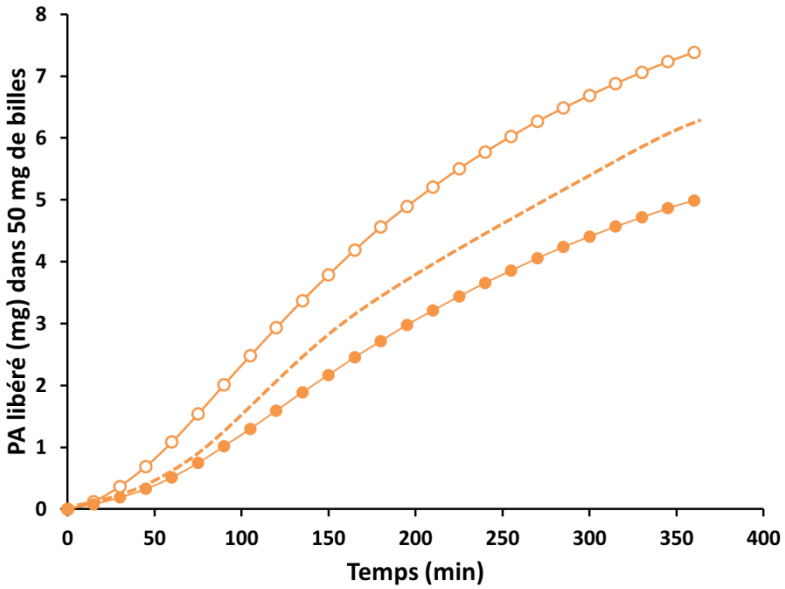


Figure II-40 : Courbes de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP7 pulvérisées à 25% dans les milieux de dissolution, ● pH=6,8, ○ pH=2 et --- pH=5 (FeSSIF).

La couche fonctionnelle contrôlant le relargage du PA est observée en MEB et fait une dizaine de µm (Figure II-41).

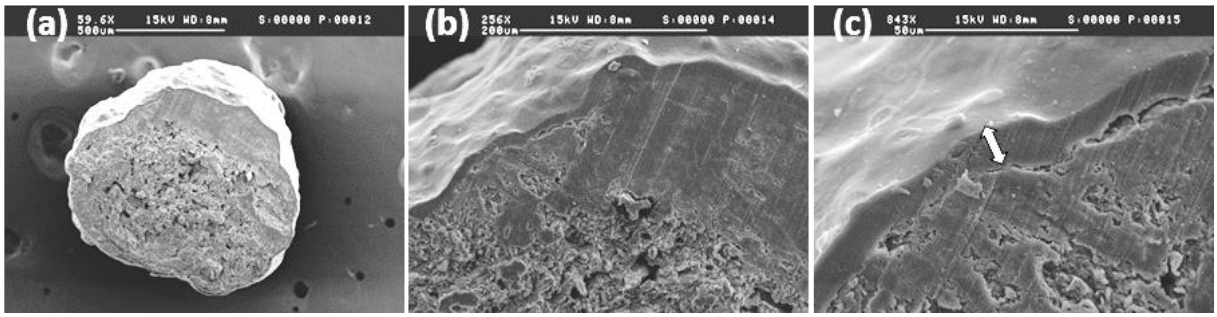


Figure II-41 : Clichés MEB d'une mini-granule ASP7 (a) coupée en deux, (b) et (c) zoom sur la couche fonctionnelle (⇔) grossie respectivement (a) 60, (b) 250 et (c) 850 fois.

3. 2. 2. 3. Mise au point des mini-granules ASP8

Pour la formulation des mini-granules ASP8, on pellicule 500 g de billes support fabriquées par extrusion-sphéronisation. La couche fonctionnelle est composée d'un mélange de polymères hydrophobe (EC) et hydrophile porogène (Klucel), d'un plastifiant (Citroflex) et de talc afin d'éviter les interactions électrostatiques entre les mini-granules.

- Cœur : 375 g Avicel + 125 g PA + 400 mL de FFAS2.
- Couche fonctionnelle : 100 g EC + 20 g Klucel + 100 g Talc micronisé + 20 g Citroflex dans 1 L d'alcool.

Après pelliculage, on récupère 737 g de mini-granules.

3. 2. 2. 4. Caractérisation des mini-granules ASP8

Lors de cette fabrication par extrusion-sphéronisation, les NPMs et le PA contenus dans le cœur magnétique sont encapsulés rapidement et de façon efficace, EE = 80% et 88,4% respectivement (Tableau II-8).

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
Cœur	PA 44497	125	16,9	110,5	14,9	**88,4**
	NPMs	67,2	9,11	53,8	7,29	**80**
	Avicel	375	50,8			
Couronne	EC	100	13,5			
	Klucel	20	2,71			
	Talc	100	13,5			
	Citroflex	20	2,71			
Mini-granules	ASP8			737		

Tableau II-8 : Composition des mini-granules ASP8.

Des échantillons de ces mini-granules ayant une couche fonctionnelle pulvérisée à 25%, 50%, 75% et 100% sont testés en bain de dissolution (Figure II-42). Plus le taux de pulvérisation de la couche externe augmente plus la cinétique de relargage du PA est lente et retardée. Dans cette formulation, l'utilisation d'hydroxypropylcellulose (Klucel) comme agent porogène et de talc mène à l'obtention d'une couche fonctionnelle plus épaisse, ce qui provoque une libération décalée du PA, due à sa solubilisation plus lente dans l'eau. La libération du PA

commence à t + 30 minutes pour atteindre 100% à t = 105 minutes avec une couche pulvérisée à 25% ; commence à t + 45 minutes pour atteindre 100% à t = 150 minutes avec une couche pulvérisée à 50% ; commence à t + 60 minutes pour atteindre 100% à t = 195 minutes avec une couche pulvérisée à 75% et commence à t + 75 minutes pour atteindre 100% à t = 270 minutes avec une couche pulvérisée à 100%.

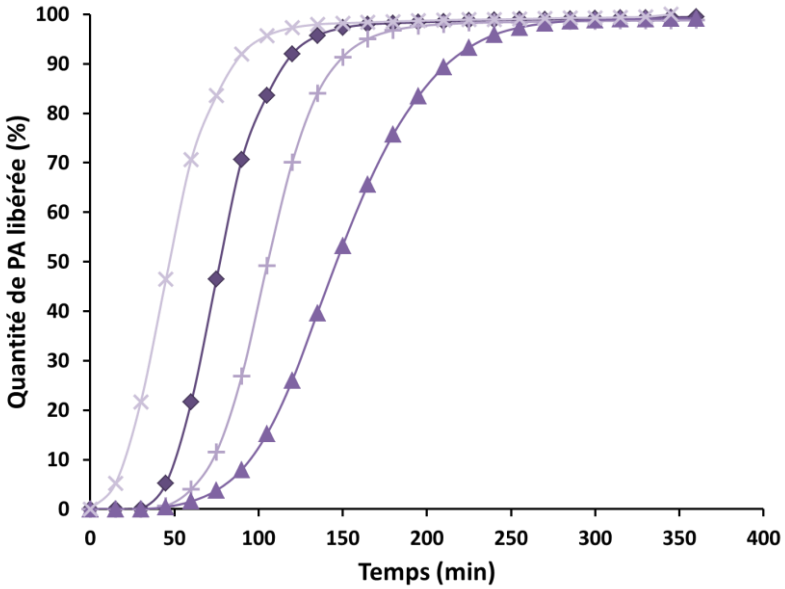


Figure II-42 : Courbes de cinétique de libération du PA (%) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP8 ayant une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (×), 50% (◆), 75% (+) et 100% (▲).

Les cinétiques de libération du PA dans 50 mg de mini-granules ASP8 100% sont étudiées à différents pH (Voir Annexe 3-4). Dans ce cas, la libération est linéaire et rapide, après un temps retard de 90 minutes environ, représentée par une courbe sigmoïde. 50 mg de mini-granules relarguent 7,10 mg de PA à pH=2 ; 7,19 mg à pH=6,8 et 9,71 mg de PA dans le FeSSIF (Figure II-43).

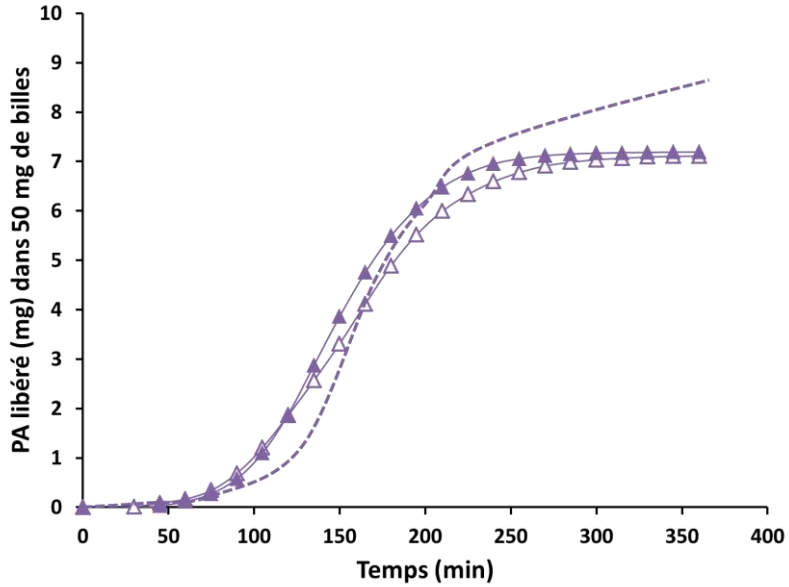


Figure II-43 : Courbes de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les mini-granules magnétiques ASP8 pulvérisées à 100% dans les milieux de dissolution, ▲ pH=6,8, △ pH=2 et --- FeSSIF.

Une mini-granule ASP8 100% coupée en deux est observée en MEB (Figure II-44). Sur les clichés, la présence de la couche fonctionnelle peut être observée, d'épaisseur environ 60 µm.

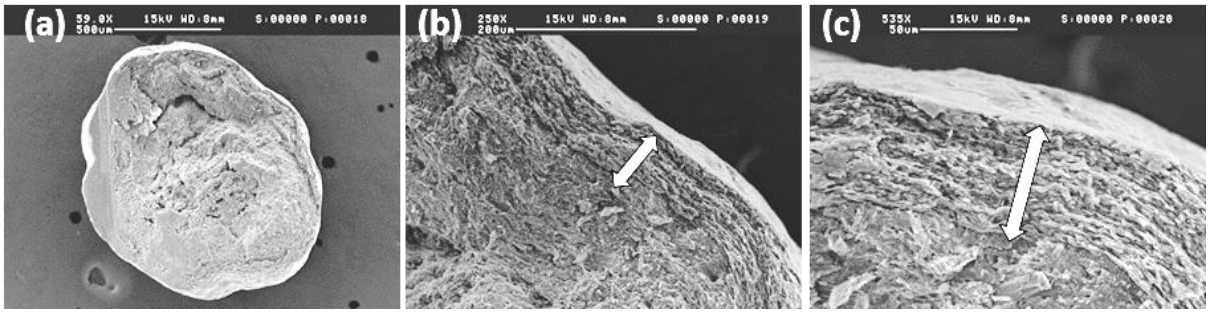


Figure II-44 : Clichés MEB d'une mini-granule ASP8 (a) coupée en deux, (b) et (c) zoom sur la couche fonctionnelle (⇔) grossie respectivement 60, 250 et 535 fois.

3. 2. 3. Comparaison

Les différentes formes fabriquées par extrusion-sphéronisation présentent toutes de très bonnes efficacités d'encapsulation du PA et des NPMs (Tableau II-9). L'efficacité d'encapsulation du PA est de 73,2% pour ASP7, 88,4% pour ASP8 et de 90,5% pour ASP10. L'efficacité d'encapsulation des NPMs est de 80,1% pour ASP7 et ASP8 et de 90,2% pour ASP10. Ces formulations permettent d'obtenir relativement facilement et rapidement des

mini-granules contenant le PA et les NPMs. L'étape de pelliculage permet ensuite de contrôler les propriétés de relargage des objets.

		Matière sèche théorique (g)	Composition unitaire théorique (%)	Matière sèche réelle (g)	Composition unitaire réelle (%)	EE (%)
PA 44497	ASP7	125	20,5	91,5	15	**73,2**
	ASP8	125	16,9	111	14,9	**88,4**
	ASP10	125	18,7	113	15,3	**90,5**
FFAS2	ASP7	67,2	11,1	53,8	8,82	**80,1**
	ASP8	67,2	9,11	53,8	7,29	**80,1**
	ASP10	75,6	11,4	68,2	9,25	**90,2**

Tableau II-9 : Composition des mini-granules ASP7, ASP8 et ASP10.

La formulation des mini-granules magnétiques par extrusion-sphéronisation permet d'obtenir des objets contenant une grande quantité de NPMs dans leur cœur. Ces NPMs sont alors piégées dans la matrice et ne fuient pas de la matrice polymérique au cours du temps. Ces trois formes présentent des charges en NPMs et en PA similaires et proches de 100 % mais des cinétiques de relargage très différentes, contrôlées par la composition de la couche de polymère fonctionnelle. Pour les mini-granules ASP7, ASP8 et ASP10, la quantité de fer/mini-granule est d'environ 0,1 mg ; ce qui est une valeur similaire à celle obtenue pour les mini-granules ASP6 (0,11 mg de fer/mini-granule). Pour les formes obtenues par extrusion-sphéronisation, moins de 500 mL de ferrofluide concentré (FFAS2) sont utilisés par synthèse alors qu'il faut 3 L de ferrofluide citraté ($FFAS1_{citraté}$) pour les mini-granules ASP6 obtenue par montage, et ce, pour obtenir au final des formes ayant des teneurs en fer très proches. On peut donc en conclure que la formulation par extrusion-sphéronisation est une technique plus efficace que le montage en lit d'air fluidisé pour obtenir des formes magnétiques millimétriques chargées en NPMs.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, différentes formulations magnétiques ont été mises au point. Tout d'abord, des billes core-shell chitosan-alginate magnétiques ont été fabriquées à l'échelle du laboratoire. Dans un second temps, deux types de procédés galéniques, l'extrusion-sphéronisation et le montage en lit d'air fluidisé, ont été utilisés pour fabriquer des mini-granules magnétiques. Ces différentes formulations ont permis d'obtenir des objets encapsulant les NPMs et le PA dans le cœur ou dans la couronne des billes. Ces formes peuvent être rendues magnétiques par encapsulation des NPMs dans la couronne des mini-granules, pour les formes ASP5 et ASP6, par pulvérisation du ferrofluide sur une bille de sucre neutre. Ce procédé n'est pas très favorable. En effet, la préparation des billes est alors longue et les pertes en NPMs sont importantes, ce qui nécessite d'utiliser une grande quantité de matière première pour obtenir des objets contenant suffisamment de NPMs. Le cœur magnétique peut être obtenu grâce à une fabrication par extrusion-réticulation au laboratoire ou par extrusion-sphéronisation en process galénique. Ces mini-granules contiennent alors une grande quantité de fer, c'est-à-dire un très grand nombre de particules (environ 10^{13} à 10^{16} NPMs/bille) permettant d'envisager une rétention magnétique efficace lors des essais *ex vivo* ou *in vivo*. Il a pu être observé que le fait d'encapsuler les NPMs au cœur d'une matrice de polymère empêchait la fuite de ces particules vers le milieu extérieur. C'est la situation la plus favorable. En effet, cela permet de préserver la charge magnétique de l'objet au cours des manipulations évitant ainsi un éventuel contact avec le milieu biologique pouvant induire une toxicité *in vivo*. Le PA peut quant à lui être contenu dans le cœur ou dans la couronne des mini-granules avec des efficacités d'encapsulation satisfaisantes dans les deux cas. Les mini-granules magnétiques cœur-couronne permettent également de contrôler la cinétique de libération du PA en contrôlant la composition de la couronne. Dans le cas des billes de chitosan-alginate magnétiques, CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-10-50, la présence de la couronne d'alginate permet de ralentir la cinétique de libération du PA et de protéger la bille d'une éventuelle altération par le milieu stomacal acide. Pour les mini-granules magnétiques ASP7, ASP8 et ASP10, la couronne est constituée par une couche externe fonctionnelle de polymère pulvérisée à la surface des billes. La composition de cette couche fonctionnelle permet de faire varier la cinétique de libération du PA en contrôlant la vitesse de diffusion de cette molécule à travers la couche externe. Les procédés de formulation utilisés dans cette étude ont permis d'obtenir différentes formes magnétiques, contenant une grande quantité de NPMs

c'est à dire une charge magnétique importante et présentant des cinétiques de libération du PA variées. Ces formes magnétiques ont été utilisées lors des expériences *ex vivo* et *in vivo* afin de tester l'efficacité de la rétention magnétique comme technique d'amélioration du passage du PA à travers la membrane intestinale ainsi que l'influence de la cinétique de libération du PA sur ce passage membranaire.

Bibliographie

[1] Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison G. *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res **1995**;12:413–20.

[2] Philippova O, Barabanova A, Molchanov V, Khokhlov A. *Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications*. Eur Polym J **2011**;47:542–59.

[3] Ngah WSW, Ab Ghani S, Kamari a. *Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads*. Bioresour Technol **2005**;96:443–50.

[4] Wang J, Xu W, Chen L, Huang X, Liu J. *Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles impregnated chitosan beads for arsenic removal from water*. Chem Eng J **2014**;251:25–34.

[5] Jagtap S, Thakre D, Wanjari S, Kamble S, Labhsetwar N, Rayalu S. *New modified chitosan-based adsorbent for defluoridation of water*. J Colloid Interface Sci **2009**;332:280–90.

[6] Wang F-Q, Li P, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q. *pH-sensitive magnetic alginate-chitosan beads for albendazole delivery*. Pharm Dev Technol **2011**;16:228–36.

[7] Hari PR, Chandy T, Sharma CP. *Chitosan/calcium—alginate beads for oral delivery of insulin*. J Appl Polym Sci **1996**;59:1795–801.

[8] Suknuntha K, Tantishaiyakul V, Worakul N, Taweepreda W. *Characterization of muco- and bioadhesive properties of chitosan, PVP, and chitosan/PVP blends and release of amoxicillin from alginate beads coated with chitosan/PVP*. Drug Dev Ind Pharm **2011**;37:408–18.

[9] Gombotz WR, Wee SF. *Protein release from alginate matrices*. Adv Drug Deliv Rev **2012**;64:194–205.

[10] Sezer AD, Akbuya J. *Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads*. J Microencapsulation **1999**;16:195–203.

[11] Bée A, Talbot D, Abramson S, Dupuis V. *Magnetic alginate beads for Pb(II) ions removal from wastewater*. J Colloid Interface Sci **2011**;362:486–92.

[12] Obeid L, El Kolli N, Dali N, Talbot D, Abramson S, Welschbillig M, et al. *Adsorption of a cationic surfactant by a magsorbent based on magnetic alginate beads*. J Colloid Interface Sci **2014**;432:182–9.

[13] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Alginate_de_sodium>.

[14] <http://biochim-agro.univ-lille1.fr/polysaccharides>.

[15] Chen M-C, Mi F-L, Liao Z-X, Hsiao C-W, Sonaje K, Chung M-F, et al. *Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules*. Adv Drug Deliv Rev **2013**;65:865–79.

[16] Alonso MJ, Calvo P, Remun C. *Novel Hydrophilic Chitosan – Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers*. J Appl Polym Sci **1997**;63:125–32.

[17] George M, Abraham TE. *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review*. J Control Release **2006**;114:1–14.

[18] <http://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>

[19] He P, Davis SS, Illum L. *In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres*. Int J Pharm **1998**;166:75–88.

[20] Anitha A, Deepa N, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R. *Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications*. Carbohydr Polym **2011**;83:66–73.

[21] Fernandes M, Gonçalves IC, Nardecchia S, Amaral IF, Barbosa MA, Martins MCL. *Modulation of stability and mucoadhesive properties of chitosan microspheres for therapeutic gastric application*. Int J Pharm **2013**;454:116–24.

[22] Wittaya-areekul S, Kruenate J, Prahsarn C. *Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone*. Int J Pharm **2006**;312:113–8.

[23] Yang C-H, Huang K-S, Lin P-W, Lin Y-C. *Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticles*. Sensors Actuators B Chem **2007**;124:510–6.

Chapitre III.

Études ex vivo

Chapitre III.
Études *ex vivo*

Lors d'une administration par voie orale, les formulations circulent dans le tractus gastro-intestinal. Pour que le principe actif (PA) contenu dans ces formulations puisse passer dans la circulation sanguine générale afin de rejoindre son site d'action, il doit d'abord être libéré de cette formulation puis être capable de passer à travers la membrane séparant l'intérieur et l'extérieur du tube digestif [1]. La biodisponibilité du PA est déterminée par sa capacité à franchir les membranes, c'est-à-dire sa perméabilité membranaire. Dans le chapitre précédent, on a pu voir que le PA choisi comme modèle pour ce travail thèse appartient à la classe III de la classification BCS, ce qui signifie qu'il présente une très bonne solubilité dans l'eau mais une très faible perméabilité membranaire [2,3]. Après s'être intéressé à la formulation du PA dans des formes magnétiques millimétriques, ce chapitre sera consacré à l'étude du passage trans-muqueux utilisant un modèle *ex vivo*, les cellules de Ussing [4]. Ces expériences *ex vivo* permettent d'étudier le passage du PA à travers une membrane placée entre deux compartiments, un donneur et un accepteur, représentant respectivement la lumière intestinale et la circulation sanguine [5]. Ces essais ont permis de tester l'efficacité de la rétention magnétique comme technique d'augmentation du passage du PA à travers une membrane biologique modèle. Dans un premier temps, il a été nécessaire de mettre au point un design expérimental permettant de valider la faisabilité de la rétention magnétique. Un aimant externe est utilisé afin d'accumuler les billes magnétiques à proximité de la membrane d'intérêt. Dans un deuxième temps, l'effet de cette accumulation sur le passage transmembranaire du PA a été étudié. Tout d'abord, les billes core-shell chitosan-alginate (CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0) ont été utilisées comme modèle. Avec ces billes, les essais ont été mis au point, l'effet de la rétention magnétique sur le passage du PA à travers une membrane modèle (« stripée » ou « non stripée ») a été testé. La viabilité membranaire ainsi que la corrélation des résultats chez l'Homme ont également été étudiées. Des mini-granules magnétiques fabriquées en process galénique (ASP6) ont ensuite été testées afin de généraliser le concept de rétention magnétique à différentes formulations. Dans la dernière

partie, on s'intéressera à la force magnétique exercée par l'aimant externe sur ces différentes formulations.

1. Mise en place des études *ex vivo*

Dans notre étude, le choix s'est porté sur les cellules de Ussing comme modèle. En effet, il a été nécessaire d'évaluer le passage transmembranaire de notre PA à partir d'objets formulés. Les objets choisis sont des billes de taille millimétrique. La preuve de concept qu'il a été nécessaire de valider lors de ces expériences *in vitro* est que le fait d'accumuler des formulations magnétiques à proximité de la membrane grâce à un aimant permettait d'augmenter le passage du PA à travers cette membrane. Les cellules Caco-2 ne constituaient donc pas un modèle relevant. En effet, dans le design de ces expériences, la couche cellulaire est horizontale [6]. Le fait de placer un aimant sous la boîte de culture afin d'attirer les billes magnétiques au contact de la membrane ne présentera pas de différence avec la situation témoin où les objets, étant donné leurs tailles, vont tomber naturellement sur la couche cellulaire par gravité (Voir Chapitre 1-A). De plus, les objets ont une taille trop importante pour travailler sur une couche cellulaire, celle-ci aurait en effet risquée d'être dégradée par les objets. Les cellules de Ussing, en revanche, se prêtent bien au design expérimental souhaité. En chambre de Ussing, la membrane est verticale et de plus, les fluides contenus dans les compartiments sont circulants, ce qui implique que la rétention magnétique sera soumise à différentes contraintes. Dans un premier temps, d'un point de vue purement mécanique, la force magnétique exercée sur les billes par l'aimant, devra être suffisamment importante pour maintenir les objets magnétiques contre la membrane.

1. 1. Essais en Cellules de Ussing

Parmi les méthodes d'étude *in vitro* de l'absorption des principes actifs à travers la barrière intestinale, il a été choisi de travailler sur les chambres de Ussing. Ce système d'étude du passage de médicaments à travers la barrière intestinale est adapté à notre cas. Le passage de la barrière intestinale se faisant par diffusion passive paracellulaire dans le cas de notre PA, la mesure de la perméabilité apparente (P_{app}), capacité du PA à passer à travers la membrane en fonction du temps, est à la base de ces études. Il est possible à

partir de ce paramètre d'évaluer le taux de réussite du passage d'une molécule à travers une membrane et ainsi d'en prédire la biodisponibilité [6–11].

La chambre de Ussing est composée de deux compartiments en plexiglas séparés par le tissu perméable à étudier. Les deux compartiments contenant une solution représentative du milieu physiologique à étudier (ici, milieu de Krebs-Ringer) servent à isoler les deux côtés du tissu en vue de reproduire au mieux le principe de barrière sélective. La solution physiologique est maintenue à une température constante de 37°C et continuellement oxygénée par un bullage de carbogène (95% O_2 - 5% CO_2). Ce bullage sert également à mélanger la solution et à préserver le tissu. Les deux compartiments représentent respectivement le côté donneur (ou la lumière intestinale), dans lequel est introduit la substance à tester et le côté accepteur (ou la circulation sanguine), dans lequel est mesuré la quantité de substance à étudier qui est passée au travers de la membrane (Voir Figure III-1). Dans ces conditions environnementales la plupart des tissus gardent une viabilité d'environ 2 heures ce qui permet d'étudier le passage de la molécule d'intérêt à travers le tissu.

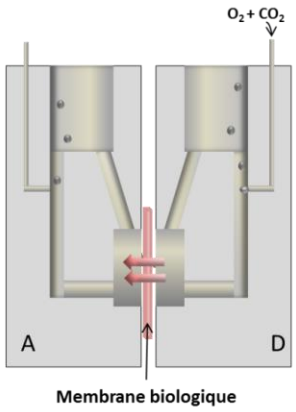


Figure III-1 : Représentation d'une chambre de Ussing

1. 2. Limitations expérimentales

La viabilité membranaire est la limitation principale des expériences menées en chambre de Ussing. En effet, la durée de l'expérience est déterminée par le temps de viabilité membranaire. Les manipulations se déroulent ainsi sur des durées de deux heures, ce qui induit certaines contraintes pour la formulation à étudier. Dans notre étude, le passage du principe actif à travers la membrane est étudié à partir des formulations magnétiques. Notre PA est connu pour son très faible passage à travers la membrane intestinale (BCS Class III). Il faut prendre en compte qu'un très faible pourcentage de la quantité initiale de

PA (contenue dans les formulations) passera la membrane et sera présent dans le compartiment accepteur pour être dosé au cours de l'expérience. Il est donc nécessaire de travailler sur des formulations pouvant encapsuler de grandes quantités de PA, afin que la détection de cette quantité de PA (par HPLC) passée à travers la membrane ne soit pas un facteur limitant de l'expérience. Le deuxième facteur déterminant est la durée de l'expérience. Le PA doit donc être relargué de son contenant sur une durée en accord avec la durée de l'expérience *ex vivo*, c'est-à-dire en 2 heures.

1. 3. Design expérimental

Il a fallu trouver une formulation adaptée aux expériences en chambre de Ussing afin de valider le concept de rétention magnétique et permettant de vérifier que le passage d'actif est plus important lorsque les billes sont maintenues près de la membrane par un aimant. Les billes core-shell magnétiques de chitosan-alginate (CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-5-0) répondent à tous ces critères. Utilisées non séchées, ces formulations ont l'avantage de contenir une grande quantité de PA et de présenter une cinétique de dissolution quasi linéaire sur 2 heures (Figure III-2). Cette cinétique de libération permet aux objets d'avoir le temps de se coller contre la membrane et de relarguer ensuite le PA directement contre la membrane.

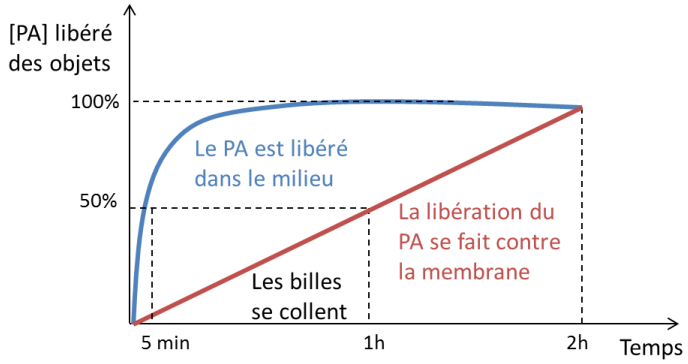


Figure III-2 : Libération du PA relargué par les billes en fonction du temps. En bleu, si les billes présentent une libération instantanée du PA l'influence de la rétention magnétique ne peut pas être étudiée et en rouge si la libération du PA se fait linéairement sur deux heures, les billes peuvent se coller à la membrane avant d'avoir relargué une quantité importante de PA.

L'influence de la rétention magnétique sur le passage du PA à travers la membrane intestinale sera étudiée. Pour cela, on cherche à savoir si le PA passe de façon plus importante au travers de la membrane jusque dans le compartiment accepteur lorsque les

formulations magnétiques sont localisées à proximité de leur site d'absorption, c'est-à-dire à proximité de la membrane (Figure III-3).

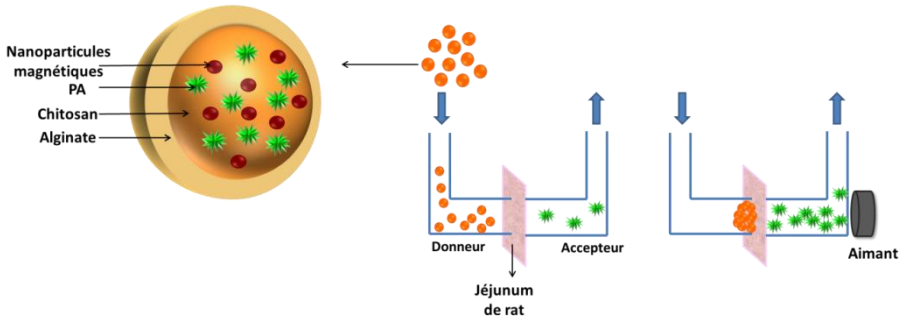


Figure III-3 : Schéma de l'expérience menée en cellule de Ussing : à gauche, les billes sont libres dans le compartiment donneur (témoin) et à droite, les billes sont maintenues contre la membrane grâce à un aimant externe (rétention magnétique).

Lors de nos expériences, quatre chambres de Ussing sont utilisées dans chaque expérience. Dans la première, les billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) sont introduites dans le compartiment donneur et un aimant est placé à l'extérieur du compartiment accepteur ce qui permet d'attirer les billes magnétiques contre la membrane. Les trois autres chambres de Ussing servent de témoins. Dans les compartiments donneurs, sont introduits respectivement les billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) non retenues par un aimant, des billes non magnétiques (CS@Al 5-5-0) de formulation similaire mais ne contenant pas de nanoparticules magnétiques et du PA libre, simplement dissout dans le milieu à une concentration égale à celle du PA relargué par les billes après 2 heures. Cela permet de vérifier que le passage du PA à travers la membrane est augmenté lorsque le vecteur est retenu à proximité du site d'absorption du PA (billes magnétiques retenues contre la membrane *vs* billes magnétiques libres dans le compartiment donneur). Les témoins permettent également de vérifier que la formulation du PA dans des billes, c'est-à-dire l'introduction de nanoparticules magnétiques dans ces formulations ne modifie pas le passage du PA dans le compartiment accepteur (PA libre et billes magnétiques libres dans le compartiment donneur *vs* billes non magnétiques).

2. Cellules de Ussing sur membrane buccale de porc

Les premiers essais de passage trans-muqueux du PA ont été réalisés en utilisant des joues de porcs comme membrane modèle. En effet, la muqueuse buccale porcine est un bon modèle pour les tests de passage trans-muqueux. En revanche, la membrane buccale est très imperméable, et il est difficile d'y voir le passage de molécules faiblement perméables. Malgré tout, c'est une membrane facile à obtenir et à conserver. Il existe des différences non négligeables entre l'épithélium buccal et les membranes intestinales et, bien que des extrapolations puissent être faites à partir d'études sur les muqueuses de la joue, il est toujours nécessaire de considérer les similarités structurales ainsi que les différences entre les muqueuses. C'est donc un bon premier modèle à utiliser afin de se familiariser avec les chambres de Ussing.

2. 1. Conception de l'essai

Dans les premiers essais de passage du PA utilisant la joue de porc comme modèle membranaire, il a été possible de mettre au point le concept de rétention magnétique en chambre de Ussing. Il a fallu trouver un moyen de retenir les billes magnétiques contre la membrane sans pour autant modifier les paramètres expérimentaux. Après différents essais d'utilisation d'aimants, il a été décidé d'utiliser un aimant externe (néodyme-fer-bore 30x30x15 cm), positionné contre le compartiment accepteur (Figure III-4).

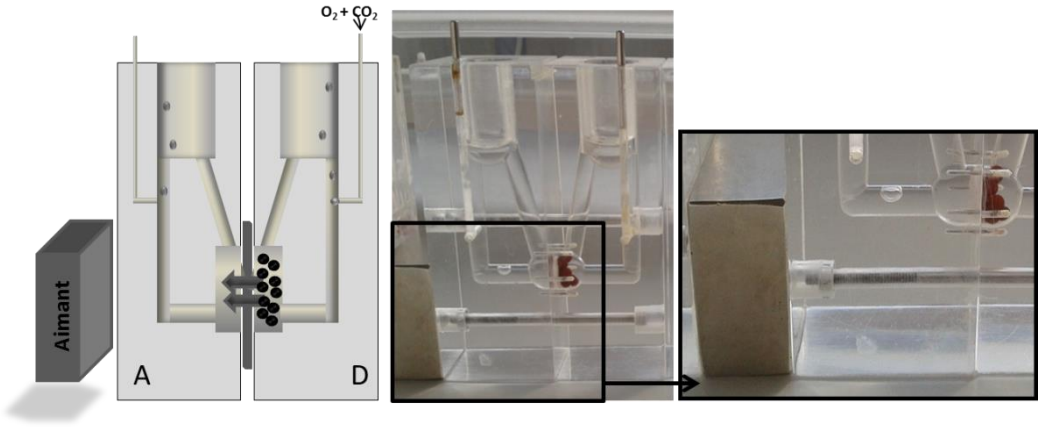


Figure III-4 : Montage en chambre de Ussing pour les expériences de rétention magnétique.

En effet, cette configuration permet de retenir de façon efficace les billes contre la muqueuse. De plus, le fait de placer l'aimant en position externe évite une perturbation

dans le compartiment accepteur. Ce montage se rapproche également d'une situation *in vivo* où un aimant serait collé sur la peau et non pas implanté en sous cutané. Cela implique que la rétention doit être efficace malgré une certaine distance entre l'aimant et les billes magnétiques que l'on cherche à immobiliser.

2. 2. Force magnétique de l'aimant

En utilisant un aimant néodyme-fer-bore (30x30x15 cm) placé à 3,5 cm de la membrane (largeur du compartiment accepteur) les billes sont retenues contre la membrane. La force magnétique exercée par l'aimant en fonction de la distance peut être mesurée avec une sonde à effet Hall (Voir Annexe 4-3). La force magnétique décroît de façon exponentielle avec la distance (Figure III-5).

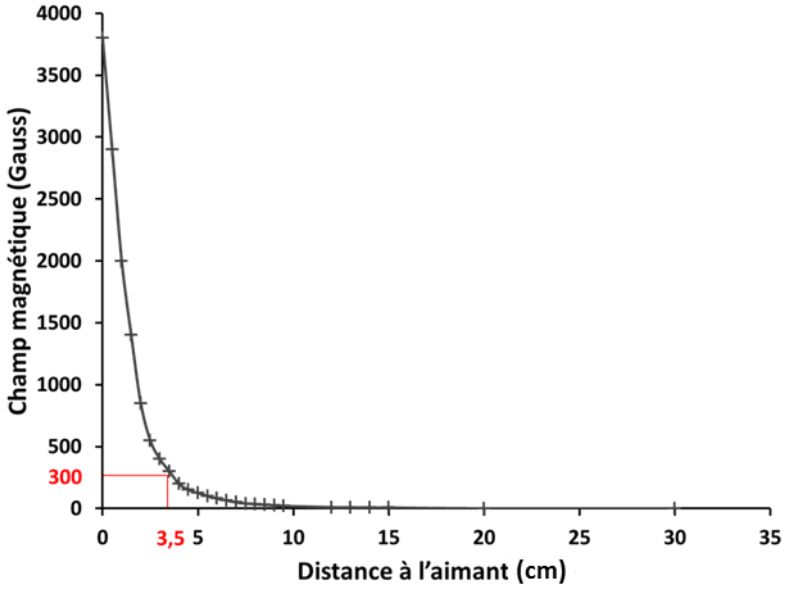


Figure III-5 : Courbe de décroissance du champ magnétique en fonction de la distance.

Même si l'aimant est très puissant, le fait qu'il soit positionné à une distance relativement importante de 3,5 cm, permet d'envisager que la rétention magnétique des billes puisse se faire de façon efficace, *in vivo*, en utilisant un plus petit aimant, mais placé à une distance moins importante de son site d'action. En effet, à 3,5 cm, le champ exercé par l'aimant n'est plus que de 300 Gauss mais permet une rétention efficace des billes.

2. 3. Limitations de l'essai

En présence ou non d'un aimant, le comportement des billes magnétiques est clairement différent. Les billes magnétiques CS@Al 5-5-10 sont immobilisées contre la membrane et ne bougent pas pendant la durée de l'essai avec l'utilisation d'un aimant, tandis que sans aimant, elles circulent librement dans le compartiment donneur (Figure III-6).

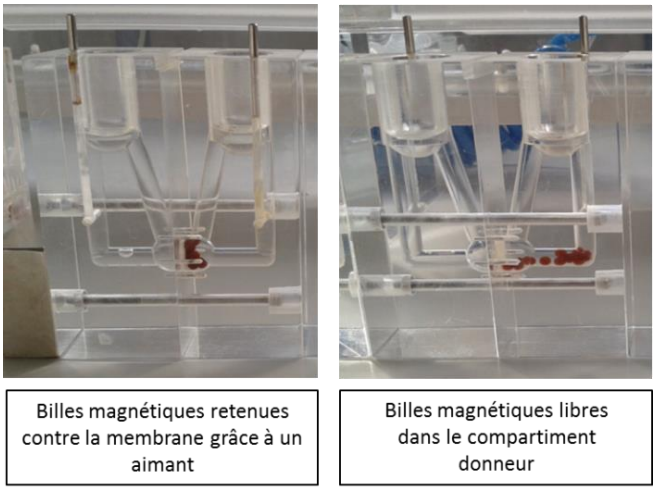


Figure III-6 : Photographies de cellules de Ussing, à gauche, lors de l'utilisation de la rétention magnétique et à droite, dans la situation témoin.

Malgré la réussite de la mise au point de l'expérience et de la rétention magnétique, les résultats des dosages HPLC avec les joues de porc comme membrane modèle ne permettent pas d'observer le passage du PA. La quantité de PA passée dans le compartiment accepteur est alors trop faible pour pouvoir être détectée. Les membranes buccales ont plus de similarités avec la peau qu'avec les muqueuses intestinales. En effet, l'épithélium intestinal est un épithélium constitué d'une monocouche de cellules associées les unes aux autres par des jonctions serrées jouant un rôle essentiel dans la fonction de barrière, alors que l'épithélium de la joue est constitué de plusieurs couches cellulaires et les jonctions serrées y sont moins nombreuses. Ainsi, les joues de porc sont un excellent modèle montrant une bonne corrélation par rapport aux muqueuses buccales humaines, cependant elles possèdent des limites pour la corrélation avec un passage intestinal *in vivo*.

3. Cellules de Ussing sur membrane intestinale de rat

Selon les données de la littérature, le modèle du rat est le plus proche de l'Homme et le plus utilisé sur cellules de Ussing pour caractériser le passage au niveau intestinal [7,11–13]. Il a donc été nécessaire de travailler sur un modèle plus adapté au PA BCS classe III, celui-ci étant absorbé au niveau intestinal. Ainsi, afin d'adapter le modèle des cellules de Ussing à notre problématique, la mise au point de la technique sur intestin de rat a été nécessaire.

Il a été prouvé grâce aux études sur membrane buccale de porc que la rétention magnétique est faisable en chambre du Ussing. En effet, les billes magnétiques peuvent être retenues de façon efficace contre la membrane grâce à l'utilisation d'un aimant externe.

3. 1. Conception de l'essai

Pour les essais sur membrane intestinale de rat, le même design d'expérience est utilisé afin de comparer le passage du PA à travers le jéjunum de rat lorsque les billes magnétiques sont maintenues contre la membrane à trois témoins de passage passif. Les trois témoins permettent d'exclure les différents biais expérimentaux. La comparaison entre billes magnétiques libres et billes non magnétiques et avec le PA libre permet de mettre en évidence l'influence de la formulation du PA au sein d'objets matriciels contenant ou non des NPMs. Enfin, la comparaison avec les billes magnétiques retenues contre la membrane permet de mettre en évidence l'influence de la rétention magnétique.

3. 2. Manipulation

Le jéjunum de rat est utilisé comme modèle membranaire lors des expériences en chambre de Ussing. Le prélèvement de jéjunum doit se faire rapidement afin de préserver la viabilité membranaire. Le jéjunum utilisé lors de ces expériences est prélevé sur des rats mâles Wistar âgés de 12 semaines pesant environ 300g et ayant été mis à jeun 24h avant sacrifice et prélèvement. Le jéjunum est immédiatement prélevé et conservé dans du milieu de Krebs Ringer (KR) maintenu à 4°C. Le jéjunum est ensuite rincé, découpé et monté sur les chambres de Ussing en prenant soin de positionner le coté interne (lumière

intestinale) du côté du compartiment donneur et le coté externe (circulation sanguine) du côté du compartiment accepteur. La surface de passage est de 1 cm². Un volume de 3 mL de milieu de KR à pH=6,8 est ensuite ajouté dans les deux compartiments. Les cellules de Ussing sont ensuite placées dans un dispositif permettant une circulation d'eau maintenant le montage à une température de 37°C. Le contenu de tous les compartiments est oxygéné tout au long de la manipulation grâce à un mélange constitué de carbogène (Voir Annexe 6). La manipulation dure 2 heures pendant lesquelles des échantillons sont prélevés dans les compartiments accepteurs à des intervalles de temps de 15min. La concentration en PA passé dans les compartiments accepteurs à chaque temps est ensuite déterminée par HPLC (Voir Annexe 3-1). Les expériences sont répétées 7 fois.

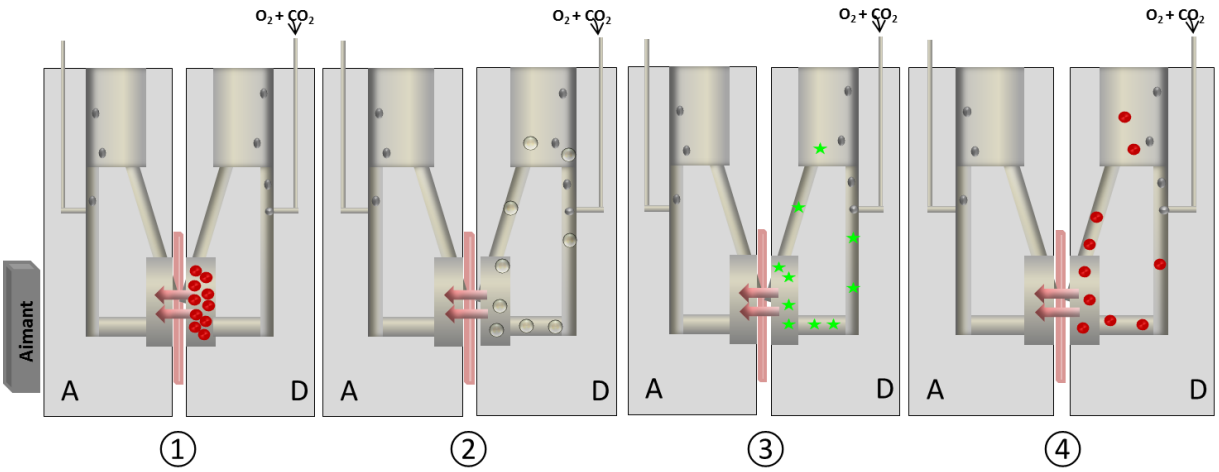


Figure III-7 : Montage des expériences en cellule de Ussing

Pour chaque série d'expériences, après montage des cellules de Ussing (Figure III-7), 10 billes magnétiques CS@Al 5-5-10 sont introduites dans le compartiment donneur de la chambre ①, un aimant néodyme-fer-bore (30x30x15 cm) ayant préalablement été positionné à l'extérieur du compartiment accepteur. 10 billes non magnétiques CS@Al 5-5-0 sont introduites dans le compartiment donneur de la chambre ② ; 10 billes magnétiques CS@Al 5-5-10 sont introduites dans le compartiment donneur de la chambre ④ et le compartiment donneur de la chambre ③ est rempli avec une solution de Krebs-Ringer contenant du PA libre. Lors de ces expériences, 10 billes CS@Al 5-5-10 contiennent 3 mg de PA qui sera relargué dans un volume de 3 mL, la concentration en PA sera donc : [PA] = 1 mg/mL = 1000 µg/cm^3. A la fin de l'expérience, les prélèvements recueillis toute les 15 minutes dans le compartiment accepteur (A) pendant la durée de la manipulation sont analysés en HPLC avec une méthode standard. La concentration en PA

dans chaque prélèvement peut ensuite être calculée et permet de calculer les valeurs de passage cumulé, *J*, en µg/cm² correspondant à la quantité de principe actif ayant traversé la muqueuse par unité de surface. Le passage cumulé peut être tracé en fonction du temps. La perméabilité apparente P_{app} de la substance active, en cm/s, correspond à la quantité de PA passée à travers la membrane au cours de l'expérience divisée par la concentration initiale en principe actif dans le compartiment donneur et par le temps total de l'expérience. Cette valeur peut permettre de déduire la biodisponibilité attendue chez l'humain grâce à la corrélation établie avec des molécules actives de référence dont l'absorption clinique ainsi que la P_{app} sont connues. Le coefficient de perméabilité apparente du PA (P_{app}) peut être calculé selon l'équation suivante:

$$P_{app} = \frac{J}{C_i \times t}$$

où P_{app} est le coefficient de perméabilité apparente (cm/s), *J* est la quantité de PA passée à travers la surface de la membrane de la chambre de Ussing pendant la durée de l'expérience (µg/cm²), C_i est la concentration totale en PA dans le compartiment donneur (= 1000 µg/cm^3), et *t* est la durée totale de l'expérience (= 7200 s).

3. 3. Jéjunum de rat « stripé »

Les premiers essais sur jéjunum de rat, se font en utilisant des intestins « stripés ». C'est-à-dire que la fine couche musculaire superficielle de l'intestin est retirée avant de placer la membrane dans le dispositif de Ussing. C'est la manipulation classique réalisée pour les expériences *ex vivo* utilisant l'intestin de rat. Le fait de retirer cette couche musculaire permet de mieux visualiser le passage des molécules et donc d'éviter les problèmes liés à la détection analytique des composés faiblement absorbés, sans changer les mécanismes d'absorption. On ne retire qu'une couche musculaire en laissant intacte la couche épithéliale.

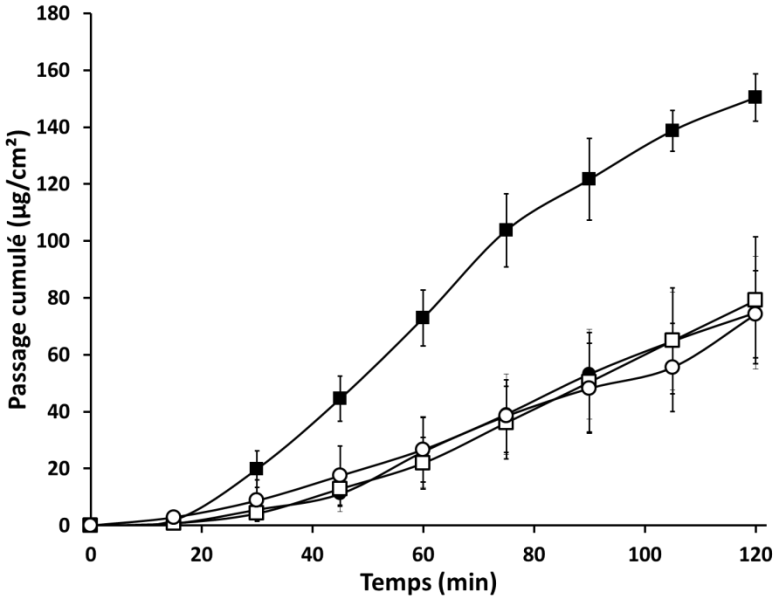


Figure III-8 : Passage cumulé du PA (µg/cm^2) à travers une membrane de jéjunum de rat stripé en fonction du temps (min). Passage cumulé du PA contenu dans 10 billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) maintenues contre la membrane grâce à un aimant (■) en comparaison avec les différents témoins, 10 billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) libres dans le compartiment donneur (□), 10 billes non magnétiques (CS@Al 5-5-0) (●) et le PA libre à une concentration [PA] = 1000 µg/cm^3 (○).

Selon la courbe de passage cumulé en fonction du temps (Figure III-8) on peut constater que la quantité de PA passée dans le compartiment accepteur est deux fois plus importante lorsque les billes magnétiques sont maintenues à proximité de la membrane grâce à un aimant en comparaison avec les trois contrôles. L'autre information apportée par ces résultats est que les valeurs de passage cumulé et donc de perméabilité apparente sont équivalentes pour les trois témoins. Cela signifie qu'à concentration égale, le fait de formuler le PA dans des billes magnétiques ou non magnétique n'a pas d'influence sur son passage.

Echantillons	CS@Al 5-5-10 Avec Aimant	CS@Al 5-5-10 Sans Aimant	CS@Al 5-5-0	PA libre
J à t=2 heures (en µg/cm²)	150,4	74,7	79,1	61,4
C_i (en µg/cm^3)	1000	1000	1000	1000
t (en s)	7200	7200	7200	7200
P_{app} (en cm/s)	$2,08*10^{-5}$	$1,03*10^{-5}$	$1,09*10^{-5}$	$8,54*10^{-6}$

Tableau III-1 : Valeurs de P_{app} (cm/s) calculées grâce à des expériences en chambre de Ussing utilisant du jéjunum de rat stripé comme membrane modèle.

La perméabilité apparente est calculée à partir de *J*. Ce flux (*J*) du PA à travers une surface fixe de la membrane A (=1 cm²) est le résultat des expériences et peut être calculé par analyse HPLC (Voir Annexe 3-1), C_i la concentration en PA est fixée (=1000 µg/cm^3) et *t* est fixé à 2 heures (=7200 s). P_{app} est de 2.09*10^{-5} cm/s lorsque l'aimant est utilisé pour retenir les billes magnétiques à proximité de la membrane et d'environ 1.05*10^{-5} cm/s pour les trois contrôles (Tableau III-1). La perméabilité apparente du PA (P_{app}) est doublée lors de l'utilisation de la rétention magnétique même si la concentration en PA (C_i) reste inchangée en comparaison avec les contrôles. En effet, la quantité de PA passée à travers la membrane est augmentée en raison d'une surconcentration du PA à proximité de son site d'absorption. Lorsque les billes sont maintenues au contact de la membrane, la même quantité de PA est relarguée que dans le cas des billes témoins mais le PA se trouve alors dans un espace restreint beaucoup plus proche de la membrane ce qui provoque une augmentation locale de la concentration vue par la membrane.

3. 4. Surconcentration du PA

L'augmentation de la quantité de PA passée à travers la membrane est due à une surconcentration de PA. Cela peut être vérifié en testant le passage du PA à différentes concentrations en chambre de Ussing. Le fait de maintenir les billes magnétiques à proximité de la membrane provoque une diminution du volume dans lequel le PA est relargué ce qui conduit à une augmentation de sa concentration à proximité de son site d'absorption. Afin de voir l'ordre de grandeur de cette surconcentration de PA entraînée par la rétention magnétique, des essais de passage transmembranaire sont effectués avec du PA libre à différentes concentrations ; [PA] = 1000, 3000, 5000 et 10000 µg/cm^3 (Figure III-9).

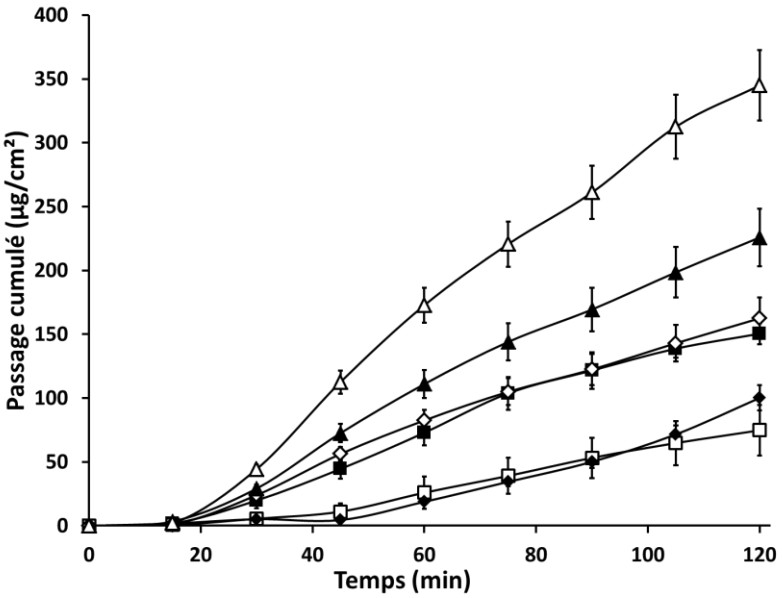


Figure III-9 : Passage cumulé du PA (µg/cm²) à travers une membrane de jéjunum de rat en fonction du temps (min). Passage cumulé du PA libre à différentes concentrations : (◆) 1000 µg/cm³, (◇) 3000 µg/cm³, (▲) 5000 µg/cm³, (△) 10000 µg/cm³ ; en comparaison avec 10 billes magnétiques maintenues contre la membrane grâce à un aimant (■) et 10 billes magnétiques libres dans le compartiment donneur (□).

On peut voir grâce à cette courbe de passage cumulé que lorsque les billes sont maintenues en contact avec la membrane grâce à l'utilisation d'un aimant externe (■), la valeur trouvée pour les billes magnétiques maintenues à proximité de la membrane est similaire à la valeur pour le PA libre à une concentration trois fois supérieure [PA] = 3000 µg/cm^3 (◇). Cela signifie que lors de l'utilisation de la rétention magnétique, le passage du PA correspond à une situation où le PA est à une concentration trois fois plus importante. La rétention magnétique provoque une augmentation de la concentration locale de PA à proximité de son site d'absorption, c'est-à-dire de la membrane. En effet, lorsque les billes sont collées contre la membrane, le PA est relargué dans un volume beaucoup plus restreint. La même quantité de PA est relarguée dans un volume beaucoup plus restreint, ce qui fait que la concentration en PA est augmentée et dans ce cas, triplée.

3. 5. Viabilité membranaire

La viabilité membranaire doit être préservée au cours de l'expérience. Il a donc été indispensable de vérifier que la pression exercée sur la membrane par les billes magnétiques n'induisait pas de dégradation des tissus. Il aurait en effet pu être envisagé que l'augmentation de passage du PA dans le compartiment accepteur lors de l'utilisation

de billes magnétiques soit due à une dégradation de la membrane sous la pression exercée par les billes, conduisant ainsi à une augmentation de sa perméabilité.

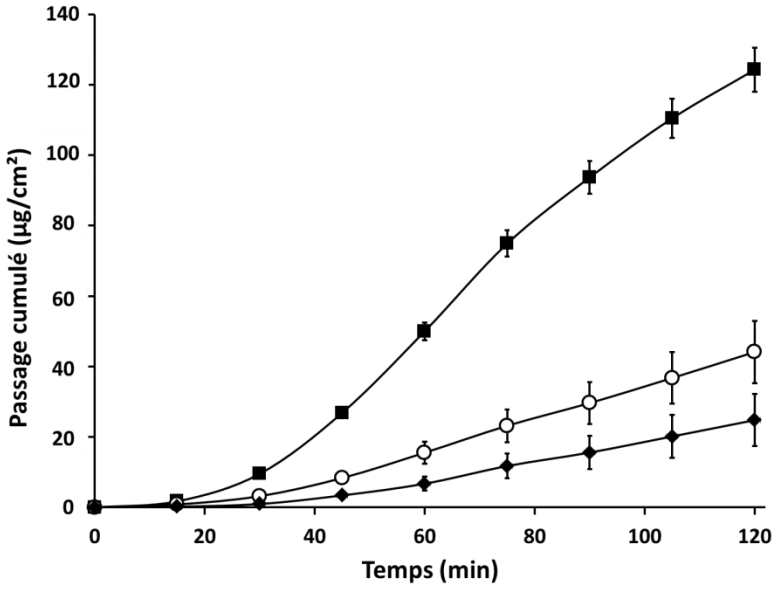


Figure III-10 : Passage cumulé du PA (µg/cm^2) à travers une membrane de jéjunum de rat en fonction du temps (min). Passage cumulé du PA contenu dans 10 billes magnétiques maintenues contre la membrane grâce à un aimant (■) en comparaison avec de PA libre à une concentration [PA] = 1000 µg/mL (○) et 10 billes magnétiques ne contenant pas de PA maintenues contre la membrane grâce à un aimant avec ajout de PA libre à une concentration [PA] = 1000 µg/mL (◆).

Afin d'effectuer ce test, des billes magnétiques ne contenant pas de PA ont été maintenues contre la membrane pendant la durée de l'expérience afin de reproduire les conditions de pression. Le milieu donneur était alors constitué par du PA libre à une concentration identique à celle utilisée précédemment ([PA] = 1000 µg/cm^3). La comparaison a été effectuée avec deux contrôles, 10 billes magnétiques maintenues contre la membrane grâce à un aimant contenant du PA et du PA libre à la même concentration. Le passage cumulé du PA est similaire dans le cas des deux chambres contenant le PA libre, en présence ou non de billes exerçant une pression sur la membrane (Figure III-10). On peut donc en conclure que la rétention magnétique ne modifie pas l'intégrité des tissus et que la viabilité membranaire est préservée tout au long des expériences.

3. 6. Corrélation Perméabilité apparente-Fraction absorbée

Dans la littérature, le jéjunum de rat est couramment utilisé pour les études de perméabilité membranaire, il a été décrit comme étant un bon modèle pouvant être corrélé avec la perméabilité *in vivo* chez l'Homme [6,8,11]. Une courbe de corrélation entre les valeurs de la fraction absorbée chez l'Homme (FA), c'est-à-dire la biodisponibilité de différents PA, et la perméabilité apparente (P_{app}) calculée a été établie. Pour différents PA pour lesquels la valeur de FA est connue, des expériences de passage cumulé lors d'expérience *ex vivo* en chambre de Ussing utilisant du jéjunum de rat comme membrane modèle ont été réalisées (Tableau III-2). La valeur de perméabilité apparente P_{app} pour chaque molécule peut être associée avec la valeur de FA chez l'Homme ce qui permet ainsi d'établir une courbe de corrélation (Figure III-11). Cette courbe permet alors de prévoir la fraction absorbée chez l'Homme (FA%) attendue en fonction de la valeur de la perméabilité apparente (P_{app}) mesurée en chambre de Ussing.

Molécules	Log P_{app}	FA (%)
Lamotrigine	-4,52	100
Glucose	-4,59	97
Verapamil	-4,59	95
Ondansetron	-4,62	85
Hydrochlorothiazide	-4,68	67
Furosemide	-4,71	60
Amiloride	-4,74	50
Norfloxacine	-4,84	36
Pravastatine	-4,89	34
Candesartran	-5,07	15
Sulfasalazine	-5,25	12

Tableau III-2 : Corrélation entre les valeurs de Log P_{app} (cm/s) calculées grâce à des expériences en chambre de Ussing utilisant du jéjunum de rat comme membrane modèle et la fraction absorbée chez l'Homme FA (%) pour des molécules connues.

Echantillons	CS@Al 5-5-10 Avec Aimant	CS@Al 5-5-10 Sans Aimant	CS@Al 5-5-0	PA libre
J à t=2 heures (en µg/cm²)	150,4	74,7	79,1	61,4
C_i (en µg/cm³)	1000	1000	1000	1000
n	7200	7200	7200	7200
P_{app} (en cm/s)	$2,08*10^{-5}$	$1,03*10^{-5}$	$1,09*10^{-5}$	$8,54*10^{-6}$
Log(P_{app})	-4,67	-4,98	-4,96	-5,07

Tableau III-3 : Valeurs de Log P_{app} (cm/s) calculées grâce aux expériences en chambre de Ussing utilisant du jéjunum de rat comme membrane modèle.

Les résultats des expériences en chambre de Ussing montrant une augmentation par un facteur deux de la perméabilité apparente du PA lors de l'utilisation de la rétention sont prometteurs. De plus, ces résultats peuvent être corrélés avec la fraction de PA absorbée chez l'Homme grâce à la courbe de corrélation (Tableau III-3).

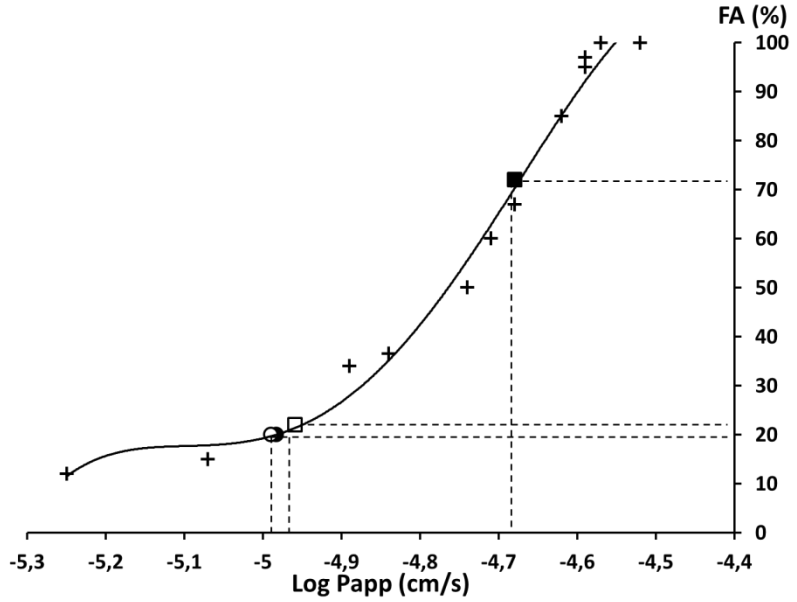


Figure III-11 : Courbe de corrélation entre la fraction absorbée chez l'Homme FA (%) et Log P_{app} (cm/s) trouvés expérimentalement en chambre de Ussing en utilisant du jéjunum de rat. Cette courbe de corrélation a été tracée grâce aux valeurs corrélées FA/Log P_{app} pour plusieurs molécules connues (+) (Tableau III-2). Les valeurs de Log P_{app} placées sur la courbe pour les billes magnétiques maintenues contre la membrane à l'aide d'un aimant (■) en comparaison avec les témoins, les billes magnétiques libres dans le compartiment donneur (□), les billes non magnétiques (●) et le PA libre (○) (Tableau III-3).

En plaçant les différentes valeurs de perméabilité apparente mesurées pour les témoins ou les billes magnétiques retenues à proximité de la membrane grâce à un aimant sur la

courbe, on peut extrapoler les valeurs attendues pour la fraction absorbée chez l'Homme dans les différents cas. En utilisant ce modèle, la fraction absorbée de PA atteint une valeur de 70% lors de l'utilisation de la rétention magnétique (Figure III-11). Cette valeur est beaucoup plus importante que celle trouvée pour les différents contrôles (environ 20%).

3. 7. Jéjunum de rat « non stripé »

Dans un deuxième temps, on a cherché à se rapprocher de la situation *in vivo*. Dans ce cas, la première couche de muscle qui était précédemment retirée de la surface du jéjunum avant expérience est conservée et les expériences en chambre de Ussing se font alors sur jéjunum utilisé intact après prélèvement.

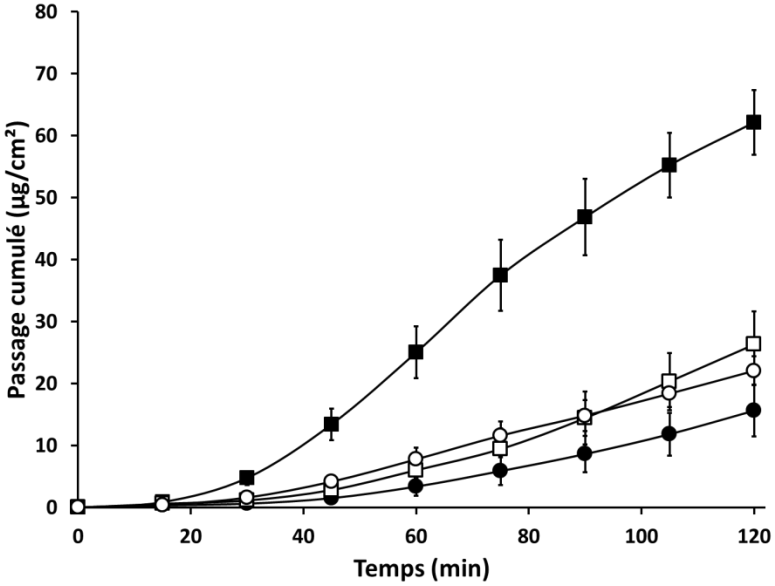


Figure III-12 : Passage cumulé du PA (µg/cm^2) à travers une membrane de jéjunum de rat en fonction du temps (min). Passage cumulé du PA contenu dans 10 billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) maintenues contre la membrane grâce à un aimant (■) en comparaison avec les différents témoins, 10 billes magnétiques (CS@Al 5-5-10) libres dans le compartiment donneur (□), 10 billes non magnétiques (CS@Al 5-5-0) (●) et le PA libre à une concentration [PA] = 1000 µg/cm^3 (○).

Les courbes de passage cumulé montrent dans ce cas, que sur la même période (2 heures) et pour la même quantité initiale de PA (C_i =1000 µg/cm^3), la quantité de PA passée à travers la membrane lorsque les billes sont maintenues contre la membrane est cette fois triplée en comparaison avec les contrôles. Les valeurs de passage cumulé du PA à la fin de l'expérience sont de 60 µg/cm² lors de l'utilisation de la rétention magnétique et d'environ 20 µg/cm² pour les témoins (Figure III-12). De la même façon que lorsque la première

couche de muscle était retirée avant l'expérience, le passage cumulé n'est pas modifié lors de la formulation du PA dans les billes. Dans cette série d'expériences, la quantité de PA passée à travers la membrane est plus faible, ce qui est logique puisque la membrane conserve une couche musculaire de plus ce qui doit ralentir la diffusion du PA à travers celle-ci. En revanche, la différence lors de l'utilisation de la rétention magnétique est plus importante passant d'une augmentation de deux à trois fois plus de PA passé à travers la membrane. Cela est encourageant, dans la mesure où ces expériences devraient mieux refléter la situation *in vivo*.

4. Essais *ex vivo* sur mini-granules pelliculées

Au vu des résultats très positifs ayant été obtenus lors des expériences utilisant les billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques CS@Al 5-5-10, une nouvelle série d'expériences utilisant des mini-granules magnétiques pelliculées ASP6 ont été réalisées. Le but de ces manipulations est de vérifier la transposabilité des résultats d'amélioration de passage du PA à travers une membrane intestinale lors de l'utilisation de la rétention magnétique sur de nouvelles formulations magnétiques. Lors de ces essais, les mini-granules magnétiques ASP6 fabriquées par montage en lit d'air fluidisé ont été utilisées comme vecteurs magnétiques. Afin de pouvoir comparer les formes CS@Al 5-5-10 et ASP6, on utilise une masse de billes permettant le relargage d'une quantité de PA équivalente à un temps donné. Nous avons vu précédemment que lors des expériences en chambre de Ussing, la manipulation ne doit pas se dérouler sur plus deux heures afin de préserver l'intégrité de la membrane. De plus, avec les billes CS@Al 5-5-10, la quantité de PA libérée des billes à t = 2 heures est m(PA) = 3000 µg/10 billes, soit [PA] = 1000 µg/cm^3 dans le compartiment accepteur. Nous avons donc décidé de travailler avec la même concentration en PA lors des essais sur les mini-granules ASP6. Pour cela, on se place à t = 120 minutes, et on regarde quelle quantité de mini-granules doit être utilisée pour avoir 3000 µg de PA libéré.

A t = 120 minutes, 50 mg de mini-granules ASP6 ont libéré 6,25 mg de PA donc pour avoir 3 mg de PA, il faut utiliser 24 mg de mini-granules (Figure III-13 (a)). Les mini-granules ASP6 ont une cinétique de libération du PA linéaire sur 2 heures de 0 à environ 50% (Figure III-13 (b)).

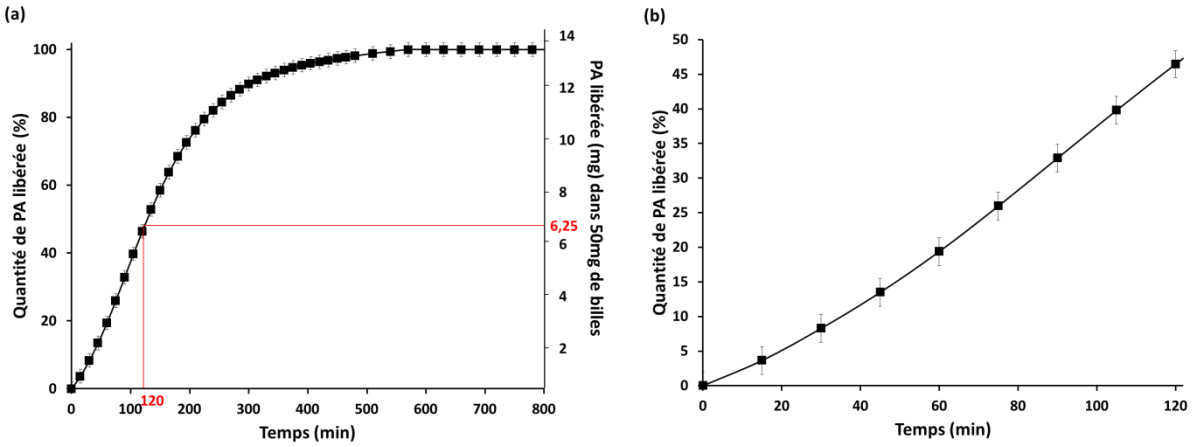


Figure III-13 : (a) Graphique représentant la quantité de PA libérée (%) et (mg) pour 50 mg de mini-granules ASP6 en fonction du temps (min) ; à t = 120 min, 6,25 mg de PA relargué pour 50 mg de mini-granules et (b) zoom sur la cinétique de libération linéaire du PA entre t = 0 et t = 120 min.

Ces essais sont réalisés en utilisant une membrane de jéjunum de rat non stripé comme membrane modèle et ont été répétés 3 fois. Les mini-granules ASP6 sont introduites dans le compartiment donneur de la chambre de Ussing et des prélèvements sont effectués toutes les 15 minutes dans le compartiment accepteur. Lors de ces expériences les mini-granules peuvent être maintenues contre la membrane grâce à un aimant externe ou laissées libres dans le compartiment donneur (Voir Figure III-14).

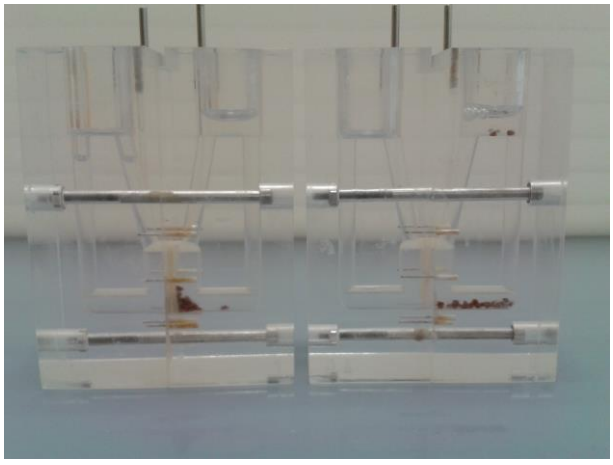


Figure III-14 : Photographie des cellules de Ussing en fin d'expérience, à gauche ASP6 avec aimant et à droite ASP6 sans aimant.

Selon la courbe de passage cumulé en fonction du temps (Figure III-15), on peut constater que, de la même façon que pour les billes de chitosan, le passage cumulé dans le compartiment accepteur est environ trois fois plus important lorsque les billes magnétiques

sont maintenues à proximité de la membrane grâce à un aimant (≈ 60 µg/cm²) que pour les contrôles (≈ 20 µg/cm²). De plus, on peut voir que dans ce cas également, la formulation du PA dans les billes n'a pas d'influence sur le passage du PA. Les valeurs de passage cumulé sont similaires pour les billes ASP6 sans aimant et le PA libre en solution (23,8 *vs* 16,9 µg/cm²).

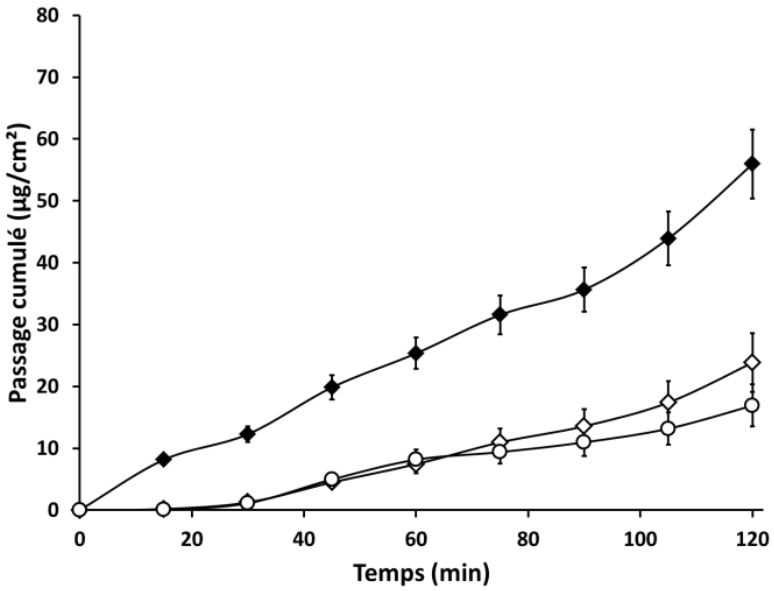


Figure III-15 : Passage cumulé du PA (µg/cm²) à travers une membrane de jéjunum de rat en fonction du temps (min). Passage cumulé du PA contenu dans 24 mg de mini-granules ASP6 maintenues contre la membrane grâce à un aimant (◆) en comparaison avec les différents témoins, 24 mg de mini-granules ASP6 libres dans le compartiment donneur (◇) et le PA libre à une concentration [PA] = 1000 µg/cm³ (○).

Ces essais ont permis de montrer que, quelle que soit la formulation magnétique utilisée, les résultats obtenus en cellules de Ussing sont comparables. Pour les billes core-shell de chitosan-alginate fabriquées au laboratoire aussi bien que pour les billes pelliculées ASP6 fabriquées en process galénique, une rétention de ces formes contre la membrane grâce à un aimant externe provoquait une augmentation par trois du passage du PA à travers celle-ci. On peut ainsi affirmer que cette augmentation est bien le résultat de l'accumulation des billes magnétiques contre la membrane et pas un effet dû à la composition du vecteur contenant ce PA.

5. Force magnétique

On a vu dans le chapitre I que le fait d'exposer des objets magnétiques à un aimant permanent provoque l'exercice d'une force magnétique. La force magnétique ($\overrightarrow{F_m}$) d'un objet contenant des NPMs dans un gradient de champ exercé par un aimant externe s'écrit (Voir Chapitre I-Partie B.):

$$\overrightarrow{F_m} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$

Cette force dépend de la force magnétique exercée par l'aimant à la distance où se trouvent les billes et de la charge magnétique de celles-ci, c'est-à-dire de leur moment magnétique à saturation. Dans notre cas, la force magnétique d'une bille dans un gradient de champ (selon z) exercé par un aimant externe peut être écrite comme :

$$\overrightarrow{F_{magnétique}} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$

$$\overrightarrow{F_{magnétique,z}} = \mu_z . \frac{dB_z}{d_z}$$

avec μ_z le moment magnétique d'une bille soumise à un champ $\overrightarrow{B_z}$ à une certaine distance z.

Dans ce cas, les NPMs contenues dans les billes ne sont pas à la saturation, le champ magnétique exercé par l'aimant *ex vivo* étant faible, du fait de la grande distance entre cet aimant et les billes. Lors des essais *ex vivo*, la distance entre l'aimant positionné en externe contre le compartiment accepteur et la membrane est de z = 3,5 cm. La valeur du gradient de champ magnétique à 3,5 cm de l'aimant est déterminée sur la courbe de décroissance du champ magnétique (Figure III-16). Pour l'aimant (30x30x15 mm), la valeur du gradient de champ à une distance z = 3,5 cm est :

$\frac{dB_z}{d_z}$ = 2 T/m

Le moment magnétique d'une bille en emu (1 emu = $1*10^{-3}$ A.m²) a été mesuré par magnétométrie SQUID (Voir Annexe 4-2) en fonction du champ magnétique appliqué en Gauss (1 Gauss = $1*10^{3}$ A/m). Le moment magnétique μ_z d'une bille soumise à un champ $\overrightarrow{B_z}$ à une certaine distance z est lu sur les courbes d'aimantation, $\mu = f(\vec{H})$, (Figure II-16 (a)).

Afin de déterminer le moment d'une bille soumise à l'action de l'aimant exerçant un champ magnétique de 300 Gauss, la valeur du moment (en ordonnée) est lue en se plaçant à une valeur de champ appliqué = 300 Gauss (en abscisse) (Figure II-16 (b)).

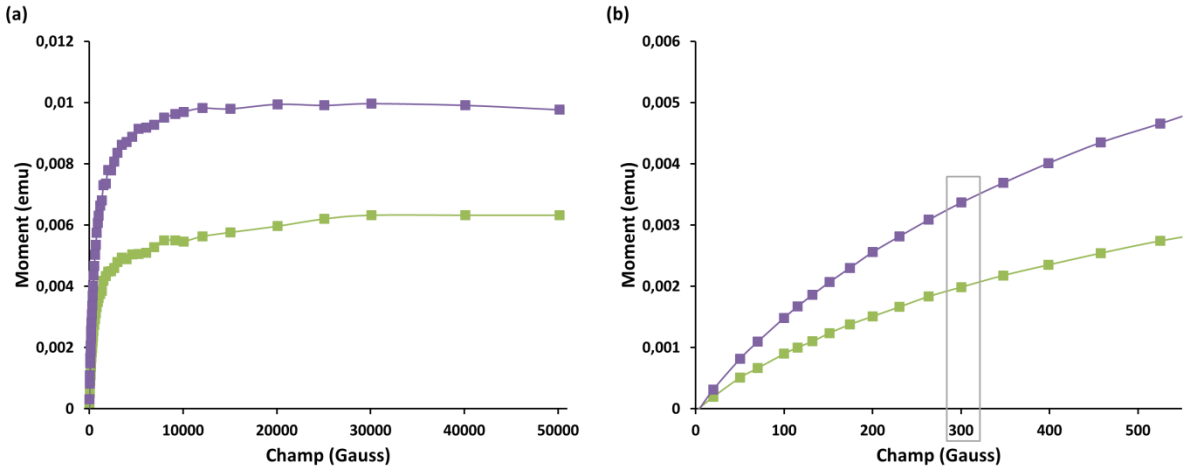


Figure II-16 : Graphique représentant (a) le moment magnétique (en emu) des billes ■ CS 5-5-10 humides, et ■ ASP6 en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss) et (b) zoom à la valeur de champ □ 300 Gauss.

Grâce aux valeurs de μ_z et de $\frac{dB_z}{d_z}$ déterminées expérimentalement, il est possible de calculer pour les différentes billes, les valeurs de la force magnétique $\vec{F}_{\text{magnétique}}$. Celles-ci dépendent de la puissance de l'aimant et de la charge en NPMs des billes :

- CS@Al 5-5-10 : $\mu_{300\ G}$ = 0,00198 emu → $\vec{F}_{magnétique}$ = 3,96*10^{-5} N
- ASP6 : $\mu_{300\ G}$ = 0,00198 emu → $\vec{F}_{magnétique}$ = 6,74*10^{-5} N

On peut donc constater qu'une force magnétique d'ordre de grandeur 10^{-5} Newtons, permet de retenir les billes magnétiques contre la membrane et induit une augmentation par trois du passage du PA contenu dans ces billes à travers la membrane.

6. Conclusion

Lors de ces expériences *ex vivo*, il a été démontré que la rétention magnétique peut être une technique efficace pour augmenter la biodisponibilité d'un principe actif BCS Classe III, c'est-à-dire très soluble et peu perméable. Il est possible de maintenir des vecteurs magnétiques grâce à l'utilisation d'un aimant positionné en externe, à proximité de la zone à cibler. Dans ces essais, un aimant placé à 3,5 cm de la zone à cibler a été capable d'exercer une force magnétique suffisante (de l'ordre de 10^{-5} N) pour retenir des billes de biopolymères ou les mini-granules magnétiques au niveau de leur site d'absorption. Le fait de maintenir les formulations magnétiques au contact de la membrane, où se produit l'absorption du PA, permet de relarguer le PA dans un volume fortement réduit, ce qui implique une augmentation de sa concentration. Cette surconcentration à proximité du site d'absorption du PA induit une augmentation du passage du PA à travers la membrane sans changer la perméabilité de celle-ci. Ces résultats sont très prometteurs, la rétention magnétique provoquant la surconcentration de drogues à proximité de leur site d'absorption devrait permettre d'augmenter leur passage à travers les membranes et donc leur biodisponibilité.

Bibliographie

[1] Davis SS. *Formulation strategies for absorption windows*. Drug Discov Today **2005**;10:249–57.

[2] Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison G. *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res **1995**;12:413–20.

[3] Lindenberg M, Kopp S, Dressman J. *Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system*. Eur J Pharm Biopharm **2004**;58:265–78.

[4] Larsen EH. Hans H. Ussing—scientific work: contemporary significance and perspectives. Biochim Biophys Acta - Biomembr 2002;1566:2–15.

[5] Luo Z, Liu Y, Zhao B, Tang M, Dong H, Zhang L, et al. *Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption*. J Pharmacol Toxicol Methods **2013**;68:208–16.

[6] Ungell A-L. *In Vitro Absorption Studies and Their Relevance to Absorption from the GI Tract*. Drug Dev Ind Pharm **1997**;23:879–92.

[7] Watanabe E, Takahashi M, Hayashi M. *A possibility to predict the absorbability of poorly water-soluble drugs in humans based on rat intestinal permeability assessed by an in vitro chamber method*. Eur J Pharm Biopharm **2004**;58:659–65.

[8] Sjöberg Å, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell A-L. *Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique.* Eur J Pharm Sci **2013**;48:166–80.

[9] Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. *Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs*. Eur J Pharm Sci **2012**;46:367–73.

[10] Lennernäs H, Nylander S, Ungell A-L. *Jejunal permeability : a comparaison between the ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans*. Pharm Res **1997**;14:667–71.

[11] Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. *Comparaison between permeability coefficients in rat and human jejunum*. Pharm Res **1996**;13:1336–42.

[12] Lennernäs H. *Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo*. Adv Drug Deliv Rev **2007**;59:1103–20.

[13] Legen I, Kristl A. *pH and energy dependent transport of ketoprofen across rat jejunum in vitro*. Eur J Pharm Biopharm **2003**;56:87–94.

Chapitre IV.

Études in vivo

Chapitre IV
Études *in vivo*

Les études *in vivo* mises en œuvre lors de cette thèse ont permis d'étudier la biodisponibilité relative du PA 44497-02 utilisé comme modèle de molécules très solubles et peu perméables (BCS classe III) [1,2], absorbées dans la partie haute du tractus gastro-intestinal (TGI). Les différentes expériences menées chez le rat ont pour but de tester l'efficacité de la rétention magnétique comme technique d'augmentation de la biodisponibilité du PA, formulé dans des vecteurs magnétiques, lors de son administration par voie orale. Dans le chapitre précédent, consacré aux études *ex vivo* en chambre de Ussing, il a été démontré que la rétention magnétique des billes à proximité du site d'absorption du PA permettait de tripler le passage de celui-ci à travers une membrane intestinale de rat. Lors des essais *in vivo*, il a été nécessaire de mettre au point des techniques permettant l'étude de la rétention magnétique chez le rat afin de transposer et de valider le concept de maintien des formulations à base de nanoparticules magnétiques à proximité de la membrane intestinale à l'aide d'un aimant. Dans un premier temps, un protocole expérimental permettant d'induire la rétention magnétique de façon efficace et non invasive chez l'animal a été mis au point. Pour cela, il a fallu trouver un système de fixation de l'aimant et une technique d'intubation des billes magnétiques appropriés avant d'effectuer des études pharmacocinétiques classiques (PK) permettant de mesurer le passage du PA dans la circulation sanguine. Dans un second temps, il a été nécessaire de s'intéresser au suivi *in vivo* de la circulation des billes afin de mieux comprendre les effets de la rétention magnétique et d'en améliorer l'efficacité. Des techniques d'imagerie (Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et fluorescence dans le proche infra-rouge) permettant l'observation de la circulation des formulations magnétiques dans le tractus gastro-intestinal du rat ont été mises en place.

1. Mise en place des études *in vivo*

L'efficacité de la rétention magnétique comme technique d'augmentation de la biodisponibilité du PA est étudiée lors de son administration, dans des formulations magnétiques, par voie orale chez le rat. La première étape a été de mettre au point un système de fixation de l'aimant sur l'abdomen du rat pour pouvoir maintenir les formulations magnétiques circulant dans l'intestin à proximité de la membrane. Cet aimant doit être positionné de façon à induire un champ magnétique suffisamment puissant pour bloquer la circulation des billes magnétiques lorsqu'elles se trouvent à l'aplomb de l'aimant. Ensuite, il a fallu mettre au point une technique d'intubation gastro-œsophagienne permettant l'introduction des formulations magnétiques millimétriques dans l'estomac du rat afin qu'elles puissent circuler intactes dans le tractus gastro-intestinal.

1. 1. Positionnement de l'aimant

Afin de permettre la rétention magnétique des billes administrées par voie orale chez le rat, on a décidé d'utiliser un aimant cylindrique positionné sur l'abdomen et fixé grâce à un adhésif. L'aimant est positionné en externe sur le rat, afin d'éviter les manipulations chirurgicales et surtout de se rapprocher d'une possible situation thérapeutique. Dans cette configuration, l'aimant, placé à la surface de la peau, se trouve à une distance d'environ 5 mm de l'intestin. Après plusieurs essais concernant la fixation de l'aimant, la configuration la plus appropriée a été utilisée pour l'ensemble des études. Avant administration des billes, les rats sont placés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, leur abdomen est rasé, l'aimant est placé à proximité de la sortie de l'estomac et son contour est marqué au feutre. L'aimant est ensuite fixé à l'aide d'Elastoplast® afin de le maintenir à la position choisie et d'empêcher l'animal de l'arracher au cours de l'expérience (Voir Annexe 7-3).

Lors des premières études (n° 1 et n° 2), un aimant cylindrique néodyme-fer-bore de diamètre 25 mm et d'épaisseur 3 mm a été utilisé. Cet aimant pèse 11 g et exerce un champ magnétique de 1980 Gauss au contact et de 420 Gauss à 5 mm (Figure IV-1 (a)) (Voir Annexe 4-3). Dans les études suivantes (n° 3 à 6), un aimant cylindrique néodyme-fer-bore de diamètre 20 mm et d'épaisseur 10 mm, plus puissant, a été utilisé afin d'améliorer l'efficacité de la rétention magnétique. Cet aimant pèse 24 g et exerce un champ magnétique de 2560 Gauss au contact

et de 611 Gauss à 5 mm (Figure IV-1 (b)) (Voir Annexe 4-4). Dans les études n° 4 à 6, le positionnement de l'aimant a été effectué sous échographie (Voir Annexe 8-2). Cela a permis de cibler plus précisément la zone du tractus gastro-intestinal au-dessus de laquelle l'aimant a été placé.

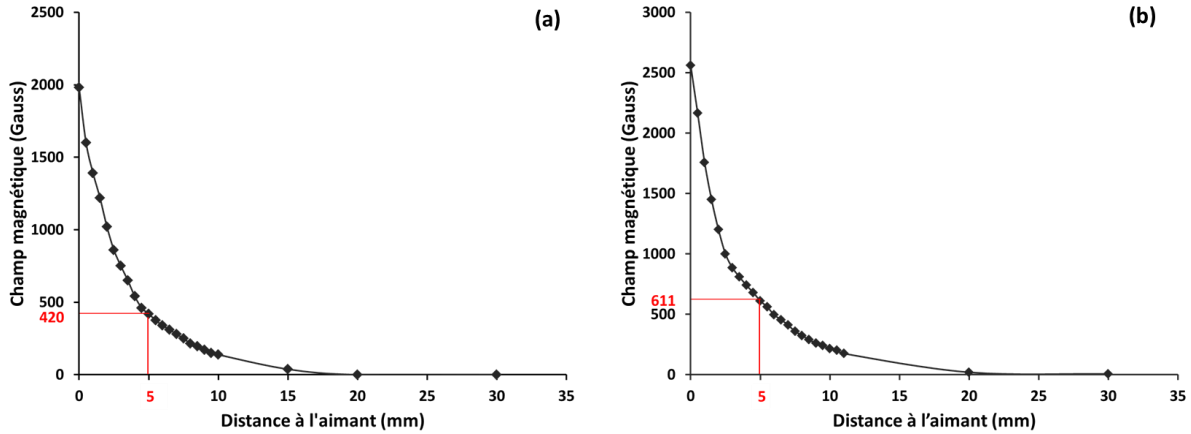


Figure IV-1 : Champ magnétique (Gauss) exercé par l'aimant en néodyme-fer-bore en fonction de la distance (mm), (a) de diamètre 25 mm et d'épaisseur 3 mm et (b) de diamètre 20 mm et d'épaisseur 10 mm ; avec ■ valeur du champ à une distance 5 mm.

1. 2. Administration des billes

Les formulations utilisées lors des essais *in vivo* sont des billes millimétriques et leur administration chez le rat a dû être optimisée. En effet, les sondes de gavage classiques ont un diamètre trop faible pour pouvoir faire passer ces billes. De plus, les billes de chitosan humides (de 2 mm de diamètre) peuvent être écrasées si on leur applique une pression trop importante. Il a donc été nécessaire de mettre au point un système permettant d'administrer les billes intactes directement dans l'estomac. Après différents essais, l'administration optimale des billes se fera en utilisant une canule souple introduite jusque dans l'estomac du rat. Les billes sont contenues dans des gélules de gélatine placées dans la canule qui se dissolvent dès leur entrée en contact avec l'estomac. L'administration gastro-œsophagienne se fera sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Lors des études n° 2, 3, 4 et 5 ; 1 mL d'eau de boisson sera également administré après introduction des gélules dans l'estomac afin d'aider à leur dissolution et à la séparation des billes (Voir Annexe 7-3).

2. Suivi par imagerie de l'efficacité de la rétention magnétique

Lors de certaines études *in vivo*, il a été nécessaire de mettre en place des techniques d'imagerie permettant de mieux comprendre et d'améliorer l'efficacité de la rétention magnétique. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a permis d'observer le phénomène d'accumulation des billes magnétiques provoqué par la rétention magnétique grâce aux propriétés d'agents de contraste (T2) des nanoparticules magnétiques. L'imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge a permis d'observer plus précisément la localisation dans l'intestin des billes soumises, ou non, à la rétention magnétique grâce à l'utilisation de billes magnétiques fluorescentes (billes core-shell de chitosan-alginate magnétique avec greffage d'un fluorophore sur la matrice, l'Alexa-Fluor 750).

2. 1. IRM

Les études en IRM en séquence d'écho de spin (impulsions 90° + 180° rapides) permettent de visualiser les billes lors de leur passage dans le tractus digestif. Les nanoparticules magnétiques sont connues pour être de bons agents de contraste IRM ; en effet, ces oxydes de fer perturbent la relaxation des protons de l'eau ce qui induit un contraste négatif (T2) lors de l'acquisition des clichés [3] (Voir Annexe 8-3). Lors de ces essais, les différentes formulations étudiées *in vivo* (CS@Al 5-5-10, CS@Al 5-10-50) sont des objets matriciels millimétriques contenant un grand nombre de NPMs. Le fait que les NPMs soient concentrées et confinées dans ces billes induit un contraste très important avec présence d'un artéfact noir en forme de trèfle entouré d'un liseré blanc positif pouvant être visualisé en IRM (Figure IV-2).

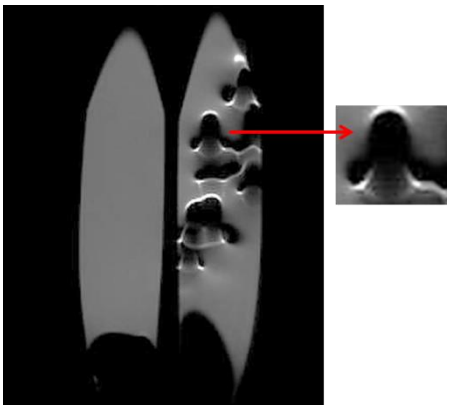


Figure IV-2 : Clichés IRM d'un tube témoin contenant : gel d'agarose sans billes (à gauche), gel d'agarose contenant 10 billes magnétiques CS@Al 5-10-50 (au milieu) et zoom sur l'artéfact produit par une bille (à droite).

Les études IRM ont permis de visualiser l'accumulation des billes magnétiques à différentes positions dans le tractus gastro-intestinal. Pour cela, des clichés en coupes sagittales, axiales ou coronales ont été réalisés afin de suivre l'artéfact créé par la présence des NPMs dans les billes (Figure IV-3).

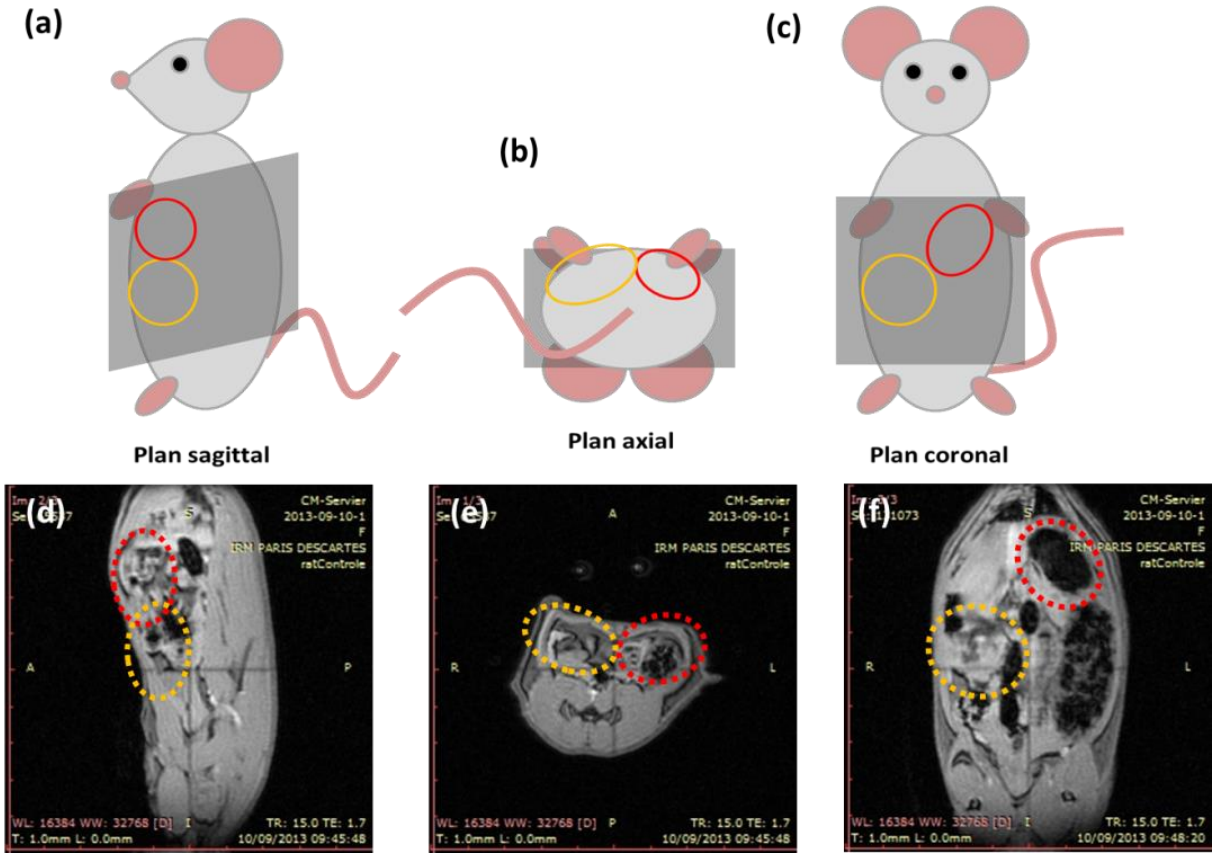


Figure IV-3 : Représentation des coupes IRM (a) en plan sagittal, (b) en plan axial et (c) en plan coronal ; et clichés IRM effectués selon des coupes (d) sagittales, (e) axiales et (f) coronales avec ○ la position de l'estomac et ○ la position de l'aimant.

Les études IRM ont permis de voir si ces objets étaient retenus et accumulés sous la position des aimants placés sur l'abdomen des animaux, mais pas de déterminer dans quelle région de l'intestin s'effectuait cette rétention. L'IRM est une technique non invasive, ce qui présente l'avantage de pouvoir imager plusieurs fois le même animal et elle présente une bonne résolution. Cependant dans le cas de l'imagerie de la zone intestinale, l'IRM ne permet pas de suivre les différentes anses et de définir les différentes zones (duodénum, jéjunum, cæcum) le constituant.

Afin de pouvoir déterminer la position exacte des billes dans l'intestin, il a été nécessaire de compléter les études IRM par de l'imagerie de fluorescence dans le proche infra-rouge (IR).

2. 2. Fluorescence dans le proche infra-rouge

Lors des essais *in vivo*, des études d'imagerie de fluorescence IR ont été réalisées en complément de l'IRM. Ces études ont été menées en collaboration avec le centre d'imagerie du petit animal (CIPA) d'Orléans avec le Dr. Alain Le Pape. Cette technique est invasive et nécessite le sacrifice des animaux avant observation mais permet de réaliser des observations rapides, sur site, permettant de déterminer la position exacte des billes dans le tractus gastro-intestinal à des temps précis après administration des billes. Les billes de chitosan magnétiques sont rendues fluorescentes dans le proche infra-rouge par couplage chimique entre la matrice de chitosan et un fluorophore, l'Alexa-750 (Voir Annexe 2-2). La fluorescence n'est donc pas relarguée au cours de temps. L'utilisation de ces billes fluorescentes a permis d'observer leur localisation dans le tractus gastro-intestinal lors de la digestion (Voir Annexe 8-4). Les clichés peuvent être réalisés sur rat entier, après sacrifice et ouverture d'une fenêtre dans la peau au niveau du positionnement de l'aimant. Puis des clichés sont réalisés sur les intestins extraits et dépliés de l'estomac jusqu'au cæcum. Les intestins sont imagés afin de voir où se situe la fluorescence contenue dans les billes, aux différents temps d'expérience après administration des billes. Ces clichés sont comparés pour les rats ayant un aimant sur l'abdomen et les rats témoins n'ayant pas d'aimant afin de comparer le devenir des billes magnétiques dans ces deux situations.

3. Études pharmacocinétiques et études de toxicité chez le rat

L'absorption du PA dans le sang a été étudiée grâce à des études pharmacocinétiques (PK) chez le rat. Le passage du PA à travers la membrane intestinale a été comparé pour différentes formulations sur des rats soumis à la rétention magnétique, c'est-à-dire ayant un aimant externe positionné sur l'abdomen ou sur des rats témoins ne portant pas d'aimant. Lors de ces essais, la quantité de PA passée dans le sang à différents temps après administration des formulations est caractéristique de l'exposition au PA, c'est-à-dire de la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation sanguine générale. Ces études pharmacocinétiques ont permis d'étudier la biodisponibilité relative du PA, c'est-à-dire de comparer les situations avec effet ou non de la rétention magnétique afin de valider le concept d'induction de surconcentration du PA provoquant une augmentation de son passage transmembranaire.
Lors des essais *in vivo*, le devenir des nanoparticules magnétiques après administration des billes a été étudié. En effet, lors de l'administration par voie orale des billes magnétiques, il a été nécessaire de vérifier que le fait de retenir et d'accumuler des objets contenant des NPMs dans l'intestin n'induisait pas de toxicité chez le rat. L'accumulation de fer dans les organes et les fèces a été étudiée afin de déterminer la voie d'élimination des NPMs lors de l'administration des billes magnétiques. Une étude histologique a permis de vérifier que l'accumulation des billes contre la membrane intestinale ne provoquait pas l'irritation de celle-ci en raison du contact prolongé avec des objets contenant des NPMs.

3. 1. Prélèvements sanguins

Les animaux sont mis à jeun 3 heures avant administration des formulations dans les études n° 1 à 5 et 12 heures avant administration de certaines des formulations dans l'étude n°6. Au temps t = 0h, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane, rasés et l'aimant est positionné sur l'abdomen. Les rats sont ensuite intubés à l'aide de sondes d'intubation rigides pour les rats recevant la solution de PA libre ou à l'aide de canules souples contenant les gélules pour les groupes recevant des billes magnétiques. Les prélèvements sanguins au niveau de la veine jugulaire sont ensuite effectués sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane à des temps fixés à l'avance. Ces prélèvements sanguins sont centrifugés, le plasma est prélevé, mélangé avec

une solution d'acide, congelé et ensuite dosé par spectrométrie de masse afin d'y déterminer la quantité de PA ayant rejoint la circulation sanguine à un temps t (Voir Annexe 7-3).

3. 2. Accumulation de fer dans les organes

Les nanoparticules peuvent passer dans la circulation sanguine et s'accumuler dans les organes, induisant une toxicité lors d'administrations répétées. Deux situations peuvent être envisagées. Si les billes sont dégradées au cours de l'expérience, les NPMs peuvent être relarguées de ces vecteurs, traverser la membrane intestinale, rejoindre la circulation sanguine puis être accumulées dans les organes. Si les billes restent intactes au cours de l'expérience, les NPMs resteront dans les vecteurs et seront évacuées par voie naturelle dans les fèces grâce à la digestion. L'accumulation dans les organes des NPMs a été étudiée par dosage du fer. En fin d'expérience, le foie et la rate, qui sont les organes où s'accumulent classiquement les particules sont récupérés et le fer est dosé par spectroscopie d'absorption atomique afin de voir si la concentration du fer est augmentée lors de l'administration des billes magnétiques.

3. 3. Coupes histologiques

Lors de l'utilisation de la rétention magnétique, les billes sont maintenues contre la membrane et peuvent donc induire une inflammation du tube digestif par contact prolongé. L'inflammation potentielle de cette membrane digestive a été étudiée grâce à des coupes histologiques des différentes parties de tube digestif, estomac, jéjunum et cæcum ayant été en contact avec les billes magnétiques. Des coupes du foie et de la rate ont également été effectuées pour rechercher la présence éventuelle de fer accumulé dans ces organes. Les coupes histologiques permettent donc de rechercher les zones inflammatoires et la présence de NPMs d'oxyde de fer (Voir Annexe 8-5).

4. Les études *in vivo*

Des études préliminaires sur le PA modèle 44497-02 utilisé dans ces études ont été menées par le groupe de recherche de Servier SRD UK. Ces études pharmacocinétiques (PK) avaient permis de déterminer que ce PA passait dans la circulation sanguine au niveau du début de tractus gastro-intestinal et avait un maximum de passage dans la circulation sanguine à des temps courts (entre t + 0,5 et 2 heures). Dans le cadre de notre étude[†], la faisabilité et l'efficacité de la rétention magnétique a été étudiée chez le rat. L'influence de la formulation magnétique (composition, taille, charge en NPMs) et de la force magnétique de l'aimant externe utilisé (valeur du champ magnétique) a été testée lors de ces différentes études. Lors de l'étude n° 1, les billes CS@Al 5-5-10 humides ayant été utilisées pour mener les expériences *ex vivo* en chambre de Ussing ont été testées *in vivo*. Au vu des résultats, des billes plus chargées en PA et en NPMs, CS@Al 5-10-50 ont été utilisées lors de l'étude n° 2. Une étude IRM a été menée afin de vérifier l'efficacité de la rétention magnétique ainsi que son influence sur la circulation des billes dans le TGI. Dans l'étude n° 3, l'influence de la cinétique de libération du PA a été testée et complétée par une étude IRM afin de vérifier l'efficacité de la rétention magnétique avec des billes CS@Al 5-10-50 séchées et un aimant plus puissant. Une étude pharmacocinétique couplée à une étude d'imagerie de fluorescence permettant de visualiser la position exacte des billes dans l'intestin en fin de manipulation a ensuite été menée sur les mêmes billes rendues fluorescentes (CS@Al 5-10-50 FLUO) grâce au greffage d'un fluorophore (Alexa-750) (Voir Annexe 2-2). Dans l'étude n° 4, on a cherché à améliorer l'efficacité de la rétention magnétique en positionnant plus précisément l'aimant sous échographie. L'étude pharmacocinétique a été couplée à une étude d'imagerie de fluorescence à différents temps après administration des billes permettant de visualiser la position exacte des billes dans l'intestin et leur progression au cours du temps. L'influence de la mise à jeun sur la biodisponibilité relative du PA ainsi que sur l'efficacité de la rétention magnétique a été étudiée sur les billes CS@Al 5-10-50 sèches dans l'étude n° 5. Puis, dans la dernière étude pharmacocinétique, différentes formulations magnétiques fabriquées en process galénique, ASP7, ASP8 et ASP10 ont été testées *in vivo*.

[†] *Lors des caractérisations physico-chimiques, la masse du PA est calculée en fonction du poids moléculaire du sel (Mw = 769 g/mol). Lors des études in vivo, la masse du PA (représentative de la dose/animal) est exprimée en fonction du poids moléculaire de la base (Mw = 597 g/mol). Facteur de conversion sel/base = 1,3.*

4. 1. Étude n° 1 : PA libre *vs* Billes CS@Al 5-5-10

Lors de cette première étude, des billes de chitosan CS@Al 5-5-10 (Voir Chapitre II-3), les mêmes que celles utilisées *ex vivo*, ont été étudiées. Les billes CS@Al 5-5-10 ont une cinétique de libération du PA de 2 heures et semblent donc être adaptées à cette étude, le passage de ce PA dans la circulation sanguine ayant précédemment été trouvé à des temps courts (entre t + 0,5 et 2 heures).

L'influence de la rétention magnétique a été étudiée en comparant deux groupes composés de trois rats. Le groupe 1 (rats n° 1, 2 et 3) a reçu du PA libre dans l'eau, administré à une dose de 20 mg base/kg soit 6,2 mg base/rat (= 8mg sel/rat). Le groupe 2 (rats n° 4, 5 et 6) a reçu les billes de chitosan humides (CS@Al 5-5-10) à la même dose de 20 mg/kg soit 8 mg/rat. Cette dose nécessite l'administration de 25 billes/rat se faisant grâce à 5 gélules contenant chacune 5 billes. L'administration a dû se faire en deux fois, la canule ne pouvant contenir plus de 3 gélules à la fois.

Des prélèvements sanguins ont été effectués aux temps t + 0,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 24 heures après administration des billes, puis le PA contenu dans le plasma aux différents temps de prélèvements a été dosé (Voir Annexe 7-3) pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 1 (Figure IV-4 (a)) et les rats 4, 5 et 6 du groupe 2 (Figure IV-4 (b)).

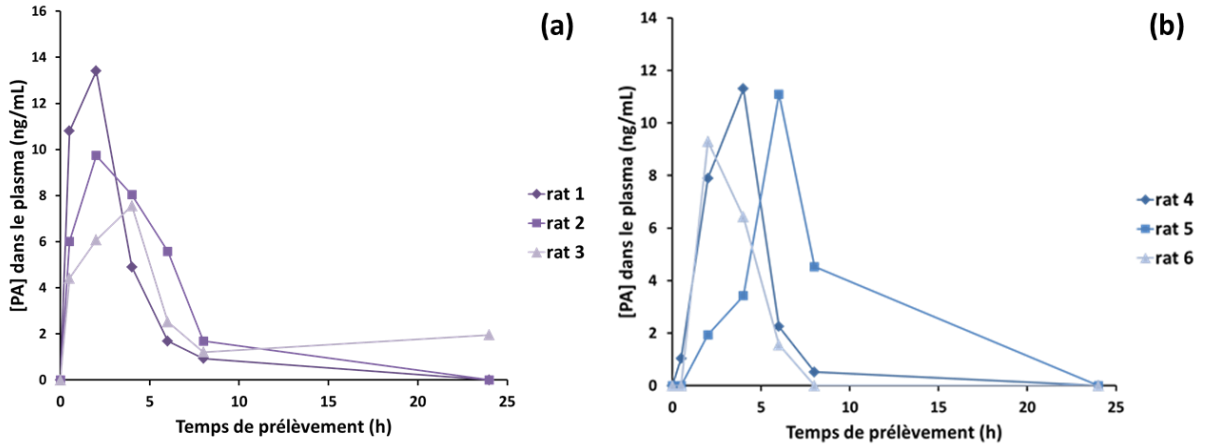


Figure IV-4 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour (a) les rats 1, 2 et 3 du groupe 1 ayant reçu du PA libre et (b) les rats 4, 5 et 6 du groupe 2 ayant reçu des billes CS@Al 5-5-10 avec aimant.

Les résultats PK de dosage du PA dans le sang ne montrent pas d'amélioration lors de l'administration du PA dans les billes magnétiques et de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison avec le PA libre administré en solution (Figure IV-5).

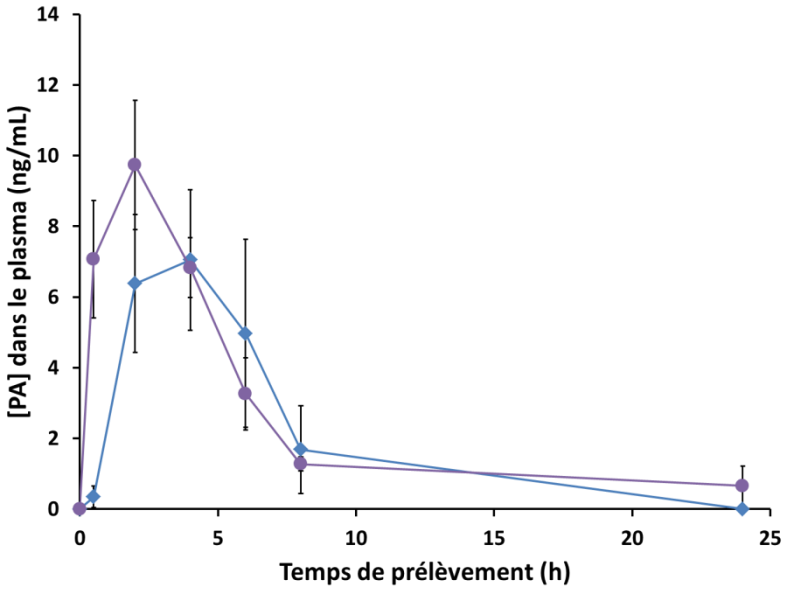


Figure IV-5 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ● 1 ayant reçu du PA libre et ◆ 2 ayant reçu des billes magnétiques CS@Al 5-5-10 avec aimant.

La concentration maximale C_{max} est similaire pour les deux groupes (10,2 et 10,6 ng/mL) mais l'aire sous la courbe de la concentration en PA dans le plasma en fonction du temps (AUC_t) représentant l'exposition au PA est plus élevée pour le PA libre (52 ,7 h*ng/mL) que pour les billes magnétiques (36 h*ng/mL) (Tableau IV-1).

Dose = 20 mg/kg		rat n°			PA libre		rat n°			Billes CS@Al 5-5-10	
Paramètre	Unité	1	2	3	Moyenne	CV%	4	5	6	Moyenne	CV%
t_{max}	h	2	2	4			4	6	2		
C_{max}	ng/mL	13,4	9,74	7,56	10,2	28,8	11,3	11,1	9,3	10,6	10,5
t_{last}	h	8	8	24			8	8	6		
C_{last}	ng/mL	0,932	1,69	1,96	1,53	34,9	0,517	4,53	1,56	2,2	94,4
$t_{1/2}$, z	h	1,67	1,78	1,51	1,65	8,1	0,898	1,55	0,98	1,14	30,9
AUC_t	h*ng/mL	46,3	51	60,7	52,7	13,9	39,8	36,5	31,7	36	11,2
AUC	h*ng/mL	48,6	55,3	64,9	56,3	14,6	40,5	46,6	34	40,3	15,6

Tableau IV-1 : Paramètres pharmacocinétiques de passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 1 ayant reçu du PA libre et 4, 5 et 6 du groupe 2 ayant reçu des billes magnétiques CS@Al 5-5-10 avec aimant.

Dans toutes ces études, c'est l'AUC_t, c'est-à-dire l'exposition au PA, qui sera comparée pour les différentes formulations. La biodisponibilité évoquée ici sera donc la biodisponibilité relative. Lors de cette étude, l'utilisation de la rétention magnétique n'a pas montré d'amélioration de la biodisponibilité du PA administré dans les billes magnétiques. Cela peut signifier que la rétention magnétique n'a pas été efficace et que les billes n'ont pas pu être retenues au niveau du site de passage du PA dans le sang. Afin d'améliorer l'efficacité potentielle de la rétention magnétique, la charge magnétique des billes utilisée dans l'étude suivante a été augmentée.

4. 2. Étude n°2 : Billes CS@Al 5-10-50 humides

Pour cette seconde étude, on décide d'utiliser des billes contenant des charges de PA et de NPMs plus importantes. En effet, la dose de PA nécessaire pour avoir une bonne détection du passage du PA dans le sang nécessitait d'utiliser un grand nombre de billes (étude n° 1, groupe 2). L'administration de ce grand nombre de billes lors de la première étude s'est avérée difficile et il est donc plus simple d'augmenter le pourcentage de PA dans les billes pour pouvoir en administrer un nombre moins important et obtenir ainsi la même dose (8 mg sel/rat). Les résultats précédents suggèrent également que les billes CS@Al 5-5-10 ne sont pas suffisamment magnétiques pour être sensibles à la rétention exercée par l'aimant. Le pourcentage de ferrofluide contenu dans les billes est augmenté (de 10% v/v à 50% v/v). Ces nouvelles billes sont 5 fois plus magnétiques et ont donc plus de chance d'être sensibles à la force magnétique exercée par l'aimant.

Cette nouvelle formulation a été étudiée sur un groupe composé de trois rats. Le groupe 2 (rats n°1, 2 et 3) a reçu les billes de chitosan magnétiques humides (CS@Al 5-10-50) administrées à une dose de 20 mg base/kg. Cette dose nécessite l'administration de 15 billes/rat se faisant grâce à 3 gélules contenant chacune 5 billes ce qui signifie que l'administration pourra se faire en une seule fois.

Des prélèvements sanguins sont effectués aux temps t + 0,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 24 heures après administration puis le PA contenu dans le plasma aux différents temps de prélèvements est dosé (Voir Annexe 7-3) (Figure IV-6).

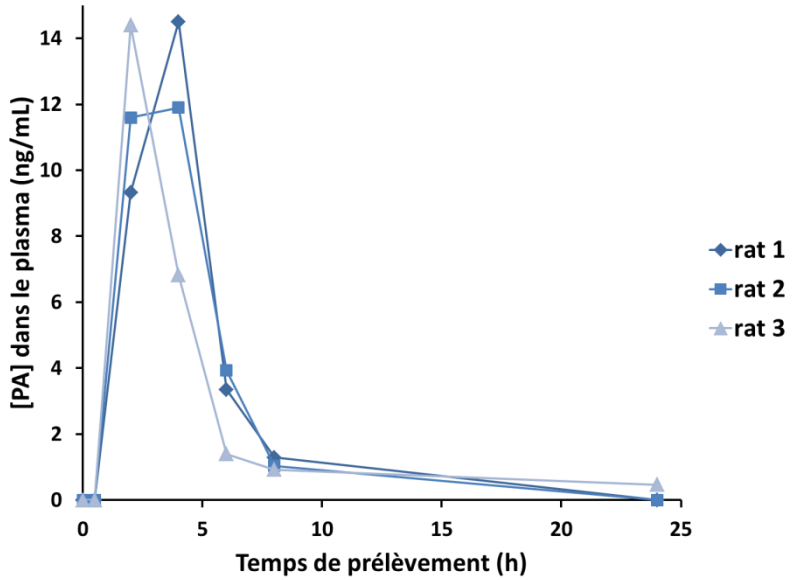


Figure IV-6 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu des billes magnétiques CS@Al 5-10-50 avec aimant.

Les résultats PK de dosage du PA dans le sang montrent une amélioration du passage du PA dans le sang lors de l'utilisation des billes de chitosan plus magnétiques, CS@Al 5-10-50 (FF 50% v/v) en comparaison des billes de chitosan moins magnétiques, CS@Al 5-5-10 (FF 10% v/v) utilisées dans l'étude n° 1, groupe 2. En revanche, ces nouvelles billes ne montrent pas d'augmentation significative du passage en comparaison du PA libre administré en solution dans étude n° 1, groupe 1 (Voir Figure VI-7).

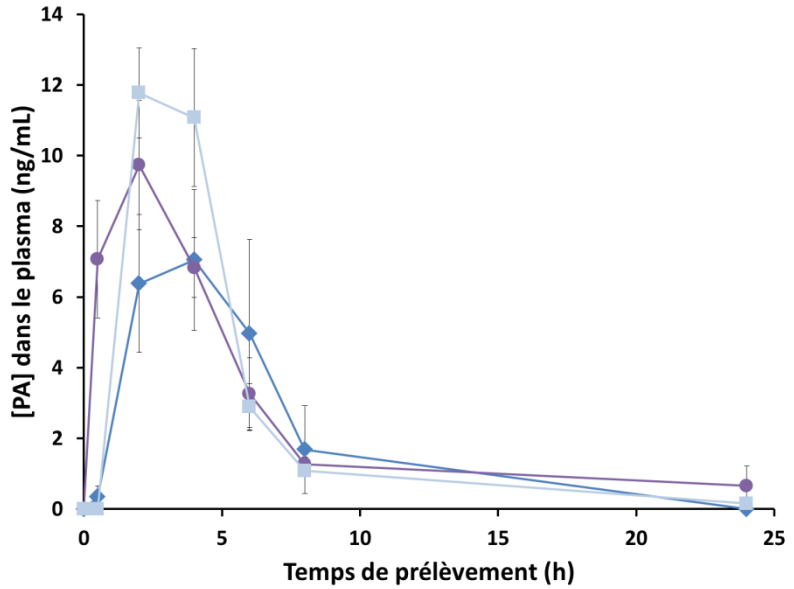


Figure IV-7 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ■ 2 ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 avec aimant, ● 1 ayant reçu du PA libre et ◆ 2 ayant reçu les billes CS@ 5-5-10 avec aimant.

La concentration maximale C_{max} est légèrement supérieure pour les billes CS@Al 5-10-50 (13,6 ng/mL) que pour le PA libre ou les billes CS@Al 5-5-10 (étude n°1, groupes 1 et 2) (10,2 et 10,6 ng/mL). L' AUC_t, est similaire (50,7 *vs* 52,7 h*ng/mL) pour les groupes ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 (étude n° 2, groupe 2) et le PA libre (étude n° 1, groupe 1). L'AUC_t est supérieure (50,7 *vs* 36 h*ng/L) pour le groupe ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 (étude n° 2, groupe 2) en comparaison du groupe ayant reçu les billes CS@Al 5-5-10 moins magnétiques (étude n° 1, groupe 2) (Tableau IV-2).

		Etude n°2					Etude n°1			
Dose = 20 mg/kg		rat n°			CS@Al 5-10-50		PA libre		CS@Al 5-5-10	
Paramètre	Unité	1	2	3	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	4	4	2						
C_{max}	ng/mL	14,5	11,9	14,4	13,6	11,0	10,2	28,8	10,6	10,5
T_{last}	h	8	8	24						
C_{last}	ng/mL	1,29	1,04	0,466	0,932	45,5	1,53	34,9	2,2	94,4
$t_{1/2}$, z	h	1,15	1,14	1,39	1,22	11,6	1,65	8,1	1,14	30,9
AUC_t	h*ng/mL	50,4	50,8	50,9	50,7	0,516	52,7	13,9	36	11,2
AUC	h*ng/mL	52,5	52,5	51,8	52,3	0,798	56,3	14,6	40,3	15,6

Tableau IV-2 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 en comparaison avec les rats de l'étude n°1 ayant reçu le PA libre et les billes CS@Al 5-5-10.

Les résultats montrent une amélioration de l'AUC_t de 1,5 fois lors de l'utilisation de la rétention magnétique avec les billes de chitosan magnétiques CS@Al 5-10-50 en comparaison des billes CS@Al 5-5-10 mais non significative en comparaison avec le PA libre administré en solution.

Cela signifie que l'augmentation de la charge magnétique des billes permet d'augmenter la biodisponibilité relative du PA pour des objets similaires. Cependant, l'augmentation de la charge magnétique de ces billes ne permet pas d'augmenter la biodisponibilité en comparaison avec la formulation contrôle du PA administré en solution. En effet, même si l'augmentation de la charge magnétique dans les billes a permis d'augmenter l'efficacité de la

rétention magnétique, le fait d'utiliser des billes de chitosan humides ayant une cinétique de relargage sur 2 heures (Voir Chapitre 2-3) ne semble pas adapté à l'augmentation du passage du PA dans le sang.

Le comportement des billes magnétiques a été étudié et imagé par IRM lors de leur circulation dans l'intestin, étant soumises ou non à la rétention magnétique. Deux rats ont été utilisés, l'un avec un aimant positionné sur le ventre et l'autre comme témoin, sans aimant. Les rats sont imagés à différents temps, juste avant et après intubation gastro-œsophagienne à t = 0 (Figure IV-8) et aux temps t + 1 ; 3 et 4,5 heures (Figure IV-9). Le but de cette étude est de voir si les billes sont regroupées et restent fixées sous l'aimant lors des essais de rétention magnétique. Lors de cette étude, il a été nécessaire de retirer l'aimant avant chaque cliché, puis de le repositionner après chaque séquence d'acquisition.

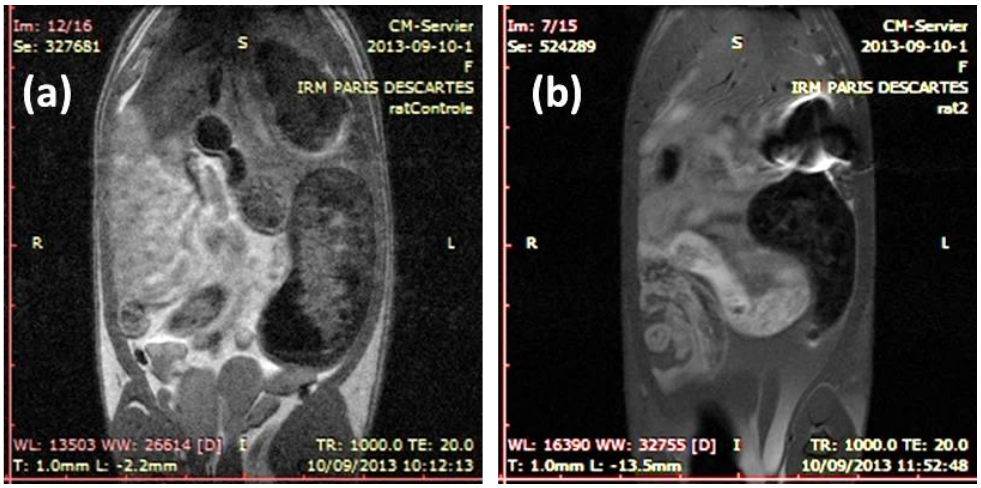


Figure IV-8 : Clichés IRM à t = 0h, (a) juste avant administration des billes et (b) juste après administration des billes dans l'estomac.

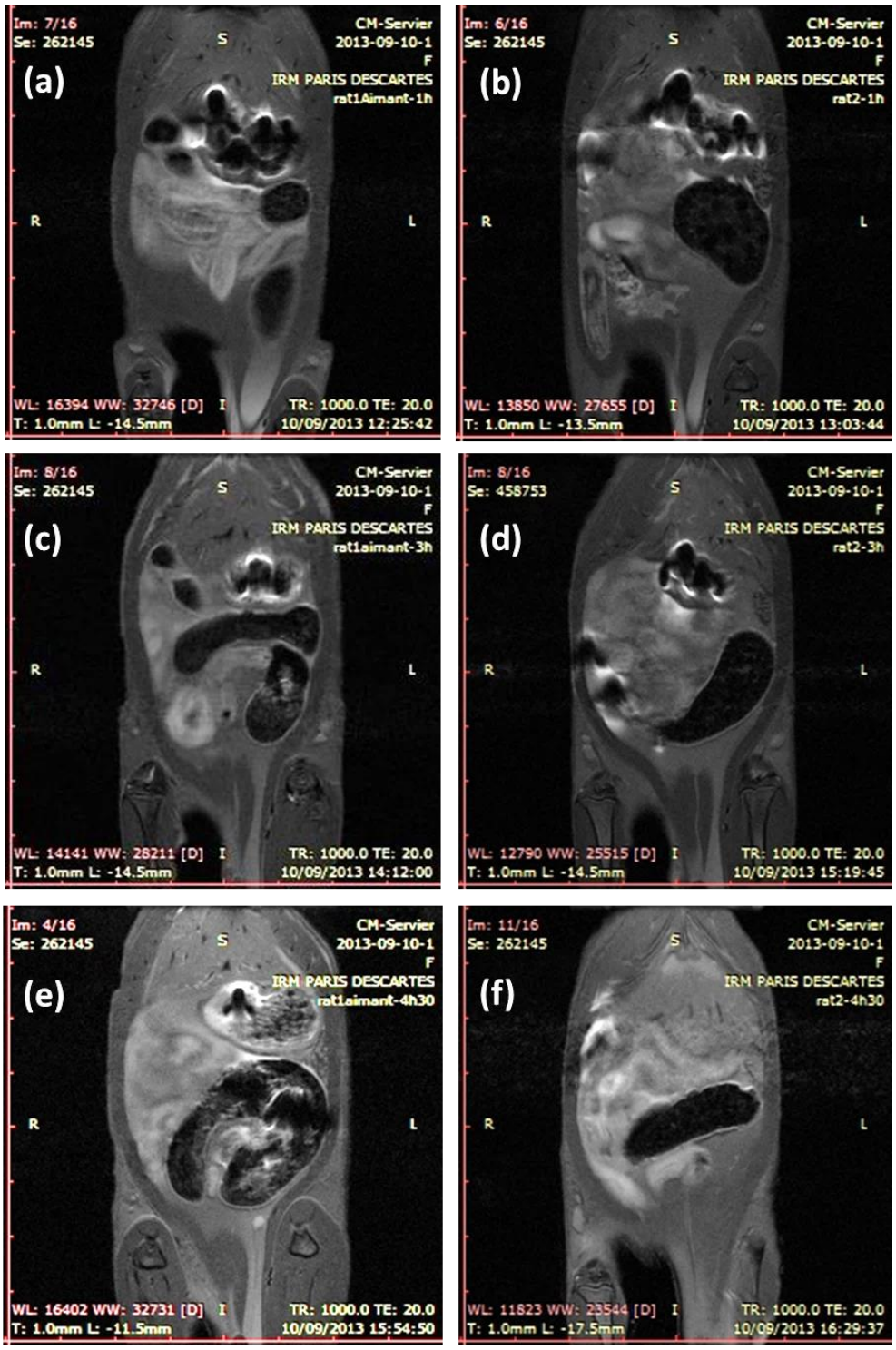


Figure IV-9 : Clichés IRM (a), (c) et (e) avec aimant, (b), (d) et (f) sans aimant ; (a) et (b) à t + 1h, (c) et (d) à t + 3h et (e) et (f) à t + 4,5h.

Les billes sont visualisées facilement sur les clichés grâce à l'artefact noir en forme de trèfle créé par les NPMs encapsulées dans les billes. Les clichés IRM montrent que les billes restent dans l'estomac pendant 1h au moins avant d'en sortir et d'entamer leur parcours dans l'intestin grêle, pour les deux rats (Figure IV-9, (a) et (b)). À t + 3 heures, les billes sont

toujours situées vers la sortie de l'estomac pour le rat avec aimant (Figure IV-9, (c)). Pour le rat sans aimant, certaines billes sont restées vers la sortie de l'estomac et d'autres ont circulé dans l'intestin grêle (Figure IV-9, (d)). À t + 4,5 heures, pour le rat avec aimant, il reste des billes dans le haut de l'intestin et les autres billes ont circulé dans l'intestin grêle (Figure IV-9, (e)). Pour le rat sans aimant, il n'y a plus de billes dans la partie haute de l'intestin grêle, les billes semblent se situer dans la partie basse (ou même dans le côlon) (Figure IV-9, (f)). Ces premiers essais semblent prometteurs, en effet, les billes magnétiques restent plus longtemps dans la partie haute de l'intestin lors de l'utilisation de l'aimant. Il sera nécessaire de refaire un essai avec un effectif de rats plus important afin de pouvoir imager un seul animal par temps, une seule fois. En effet, le retrait de l'aimant est nécessaire avant la réalisation du cliché et donc le fait de repasser plusieurs fois le même rat signifie que celui-ci aura passé du temps dans une situation où la rétention magnétique n'est plus active. De plus l'acquisition d'une séquence (par temps et par rat) dure relativement longtemps, 20-30 minutes durant lesquelles les rats sont anesthésiés, ce qui peut biaiser l'expérience.

4. 3. Étude n°3 : Billes CS@Al 5-10-50 sèches, Avec *vs* Sans Aimant

L'étude IRM précédente montre que les billes restent dans l'estomac pendant 1 heure avant d'entamer leur parcours à travers l'intestin grêle. Le PA n'étant pas absorbé au niveau de l'estomac mais au niveau de la partie haute de l'intestin grêle, la cinétique de libération sur 2 heures des billes de chitosan magnétiques humides utilisées dans les études précédentes ne semble pas être compatible avec la cinétique de circulation des billes dans le tractus gastro-intestinal. Si les objets résident pendant au moins 1 heure dans l'estomac où le PA n'est pas absorbé, les chances d'amélioration du passage de celui-ci en 2 heures sont compromises. En effet, plus de 50% du PA sera relargué des billes (Voir Chapitre II-3) avant d'atteindre le site d'absorption du PA. Il est donc nécessaire d'adapter les formulations des billes magnétiques afin qu'elles remplissent les différents critères de charge magnétique et de cinétique de relargage requis. Une cinétique de libération du PA sur 6 à 8 heures semblerait plus adaptée aux études *in vivo*. Les billes doivent également avoir une charge magnétique importante (50% en v/v de ferrofluide), comme les billes CS@Al 5-10-50 de l'étude n°2.

Les billes magnétiques CS@Al 5-10-50 sont séchées à l'air pendant 24 heures avant utilisation. Après séchage de ces billes, la cinétique de libération du PA passe de 2 à 6 heures

(Voir Chapitre 2, Figure II-20). L'utilisation de ces billes sèches semble donc compatible avec la cinétique de circulation de celles-ci dans le TGI.
Lors de cette étude, un aimant plus puissant a été utilisé (611 au lieu de 420 Gauss à 5 mm) (Figure IV-1 (b)) afin d'augmenter l'efficacité de la rétention magnétique.

Lors de cette seconde étude IRM, les rats ne seront imagés qu'une seule fois, à un seul temps, afin de ne pas fausser les résultats. En effet, les anesthésies et des bandages répétés peuvent bloquer le péristaltisme. La précédente étude a montré que les billes restent dans l'estomac au moins 1 heure après administration. Les rats seront donc imagés à t + 1 ; 2 ; 4 et 6 heures après intubation (Figure IV-10 et 11).

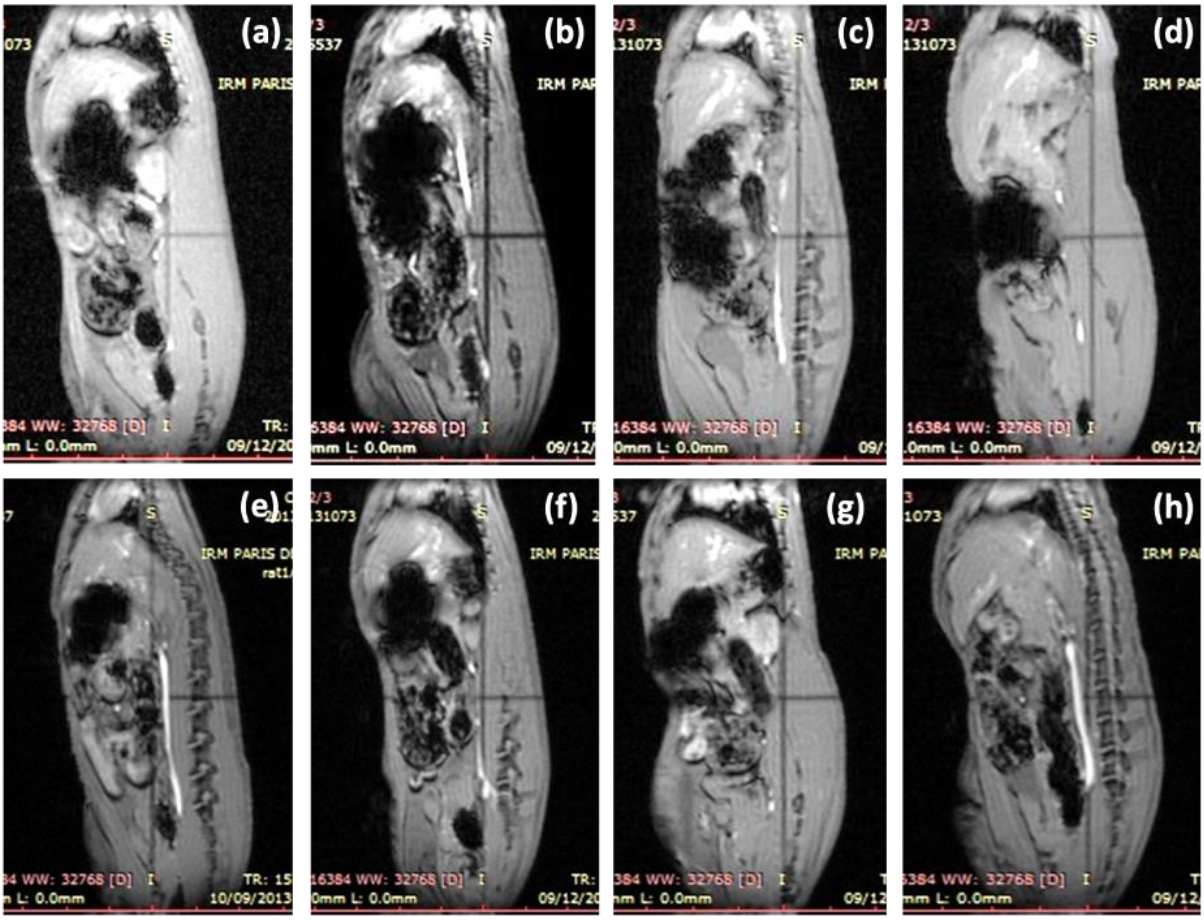


Figure IV-10 : Clichés IRM en coupes sagittales des rats ayant reçu 15 billes CS@Al 5-10-50 sèches (a), (b), (c) et (d) avec aimant, (e), (f), (g) et (h) sans aimant ; (a) et (e) à t + 1h, (b) et (f) à t + 2h, (c) et (g) à t + 4h et (d) et (h) à t + 6h.

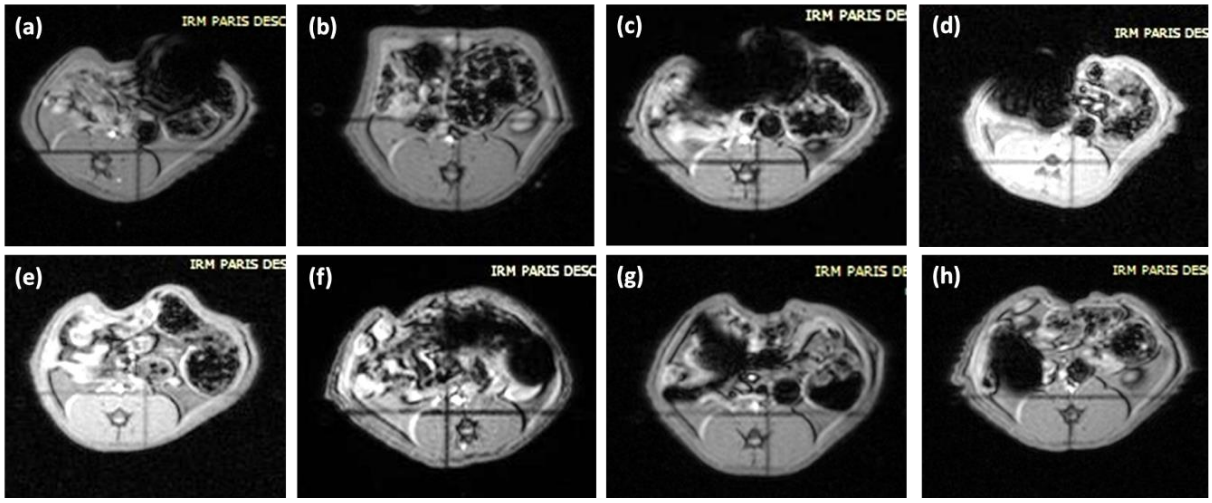


Figure IV-11 : Clichés IRM en coupes coronales des rats ayant reçu 15 billes CS@Al 5-10-50 sèches (a), (b), (c) et (d) avec aimant, (e), (f), (g) et (h) sans aimant ; (a) et (e) à t + 1h, (b) et (f) à t + 2h, (c) et (g) à t + 4h et (d) et (h) à t + 6h.

On peut voir sur ces clichés IRM qu'à t + 1h, les billes sont toujours situées dans l'estomac. À t + 2h, certaines billes sont situées dans l'estomac et d'autres ont commencé à circuler dans l'intestin. Pour les temps plus tardifs, à t + 4 ou t + 6h, on peut voir clairement que pour les rats ayant porté un aimant sur le ventre, les billes sont groupées et situées sous la position initiale de l'aimant (Figure IV-10 et 11 (c) et (d)) ; en revanche, pour les rats témoins sans aimant, les billes ne se trouvent pas regroupées à un endroit précis (Figure IV-10 et 11 (g) et (h)).

Lors de cet essai, un rat avec l'aimant moins puissant (420 Gauss à 5 mm) utilisé lors des précédentes études a également été observé à t + 6h après avoir été gavé avec des billes CS@Al 5-5-10 humides, utilisées dans l'étude n°1, afin de voir si les billes moins chargées en NPMs sont sensibles à la rétention magnétique et peuvent être maintenues regroupées sous la position de l'aimant (Figure IV-12 (c) et (f)).

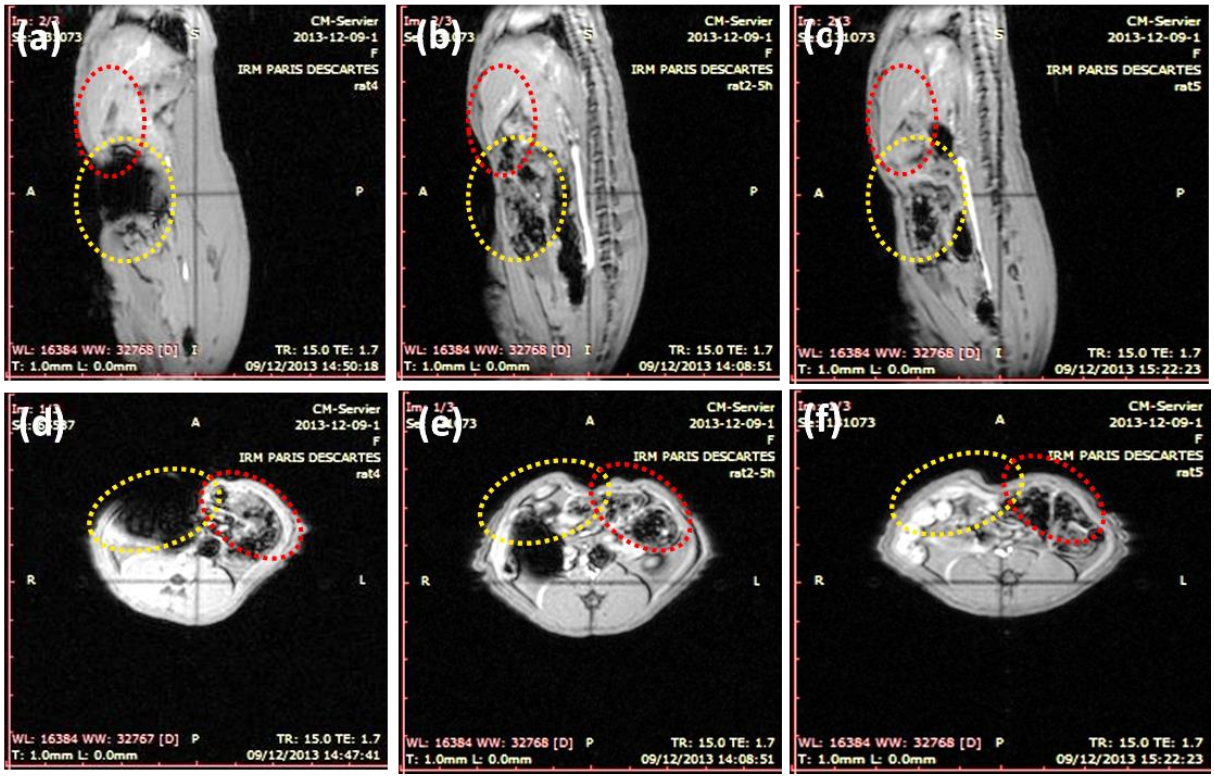


Figure IV-12 : Clichés IRM en coupes sagittales (a), (b) et (c), en coupes axiales (d), (e) et (f) ; (a) et (d) rat ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 sèches avec aimant (611 G à 5 mm), (b) et (e) rat ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 sèches sans aimant et (c) et (f) rat ayant reçu les billes CS@Al 5-5-10 humides avec aimant (420 G à 5 mm). Avec O la position de l'estomac et O la position de l'aimant.

En comparant les trois rats ayant été imagés à t + 6h, on peut en conclure que la rétention magnétique est efficace pour les billes CS@Al 5-10-50 (Figure IV-12 (a) et (d)). On peut observer un contraste négatif très important dans la zone de positionnement initial de l'aimant. Au contraire, pour les rats contrôle ne portant pas d'aimant (Figure IV-12 (b) et (e)) ou pour le rat ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 (Figure IV-12 (c) et (f)), les billes ne sont pas accumulées à un endroit précis. La force magnétique exercée par l'aimant sur les billes magnétiques, conditionnée par la puissance de l'aimant et par la charge magnétique des billes, est donc le paramètre crucial déterminant l'efficacité de la rétention magnétique. Cela signifie qu'*in vivo* il est nécessaire d'utiliser de billes fortement chargées en NPMs et un aimant puissant.

Lors de cette étude IRM, il a été possible de constater l'efficacité de la rétention magnétique dans le cas des rats ayant reçu des billes très magnétiques (CS@Al 5-10-50) lors de l'utilisation d'un aimant puissant (diamètre 20 mm, hauteur 10 mm) en comparaison avec les rats témoins ne portant pas d'aimant ou les rats de l'étude n°1 ayant reçu des billes moins

magnétiques (CS@Al 5-5-10) avec l'utilisation d'un aimant moins puissant (diamètre 25 mm, hauteur 3 mm).

Les observations des clichés IRM permettent d'affirmer que la rétention magnétique peut être efficace et permet de maintenir les billes groupées sous la position initiale de l'aimant. En revanche, cette technique ne présente pas une résolution suffisamment fine du tractus gastro-intestinal pour dire à quel niveau de l'intestin se situent les billes lors de leur rétention. Afin de répondre à cette question, une étude de fluorescence couplée à l'étude cinétique sera réalisée à t + 6h en fin d'étude PK. Lors de cette étude, les prélèvements sanguins seront effectués à t + 0,5 ; 2 ; 4 et 6 heures après administration des billes. Les temps de prélèvements longs à t + 8 et 24h ne seront pas effectués, en effet, les études précédentes ont montré que le passage du PA s'effectuait entre 0,5 et 6 heures. Les billes magnétiques utilisées lors de cette étude contiennent un fluorophore, l'Alexa-750, greffé à la matrice (CS@Al 5-10-50 FLUO) et sont séchées à l'air pendant 24 heures avant utilisation (Voir Annexe 2-2). L'effet de la rétention magnétique a été comparé dans deux groupes composés de trois rats. Les rats du groupe 1 (rats n°1, 2 et 3) ont reçu les billes de CS@Al 5-10-50 FLUO sèches à une dose de 20 mg base/kg soit 8 mg sel/rat et portent un aimant sur le ventre. Les rats du groupe 2 (rats n°4, 5 et 6) ont reçu les mêmes billes CS@Al 5-10-50 FLUO mais ne portent pas d'aimant sur le ventre. Afin d'administrer la dose, il a été nécessaire d'administrer 15 billes par rat. Ce qui signifie qu'il a été nécessaire d'administrer 2 gélules contenant chacune 7 et 8 billes/gélule.

Les prélèvements sanguins ont été effectués aux temps t + 0,5 ; 2 ; 4 et 6 heures après administration puis le PA contenu dans le plasma a été dosé (Voir Annexe 7-3) pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 (Figure IV-13 (a)) et les rats 4, 5 et 6 du groupe 3 (Figure IV-13 (b)).

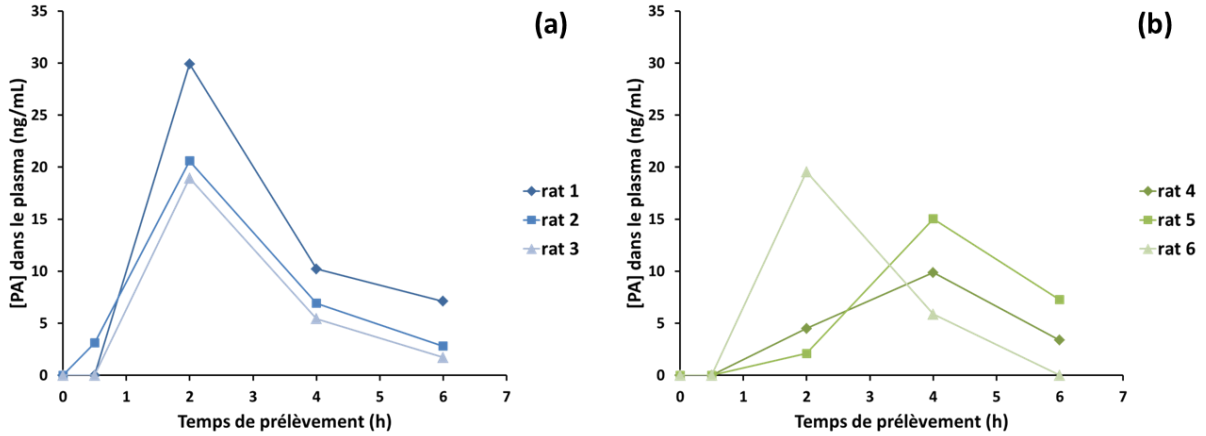


Figure IV-13 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour les rats ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches (a) 1, 2 et 3 du groupe 2 avec aimant et (b) 4, 5, et 6 du groupe 3 sans aimant.

Les résultats PK de dosage du PA dans le sang montrent une nette amélioration du passage du PA pour les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches lors de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison des témoins ayant reçu les mêmes billes sans aimant et également en comparaison du PA libre administré en solution (étude n°1, groupe 1) (Figure IV-14). Pour pouvoir être comparables, les résultats cinétiques pour le PA libre administré en solution ont été normalisés sur un temps d'expérience de 6 heures au lieu de 24 heures.

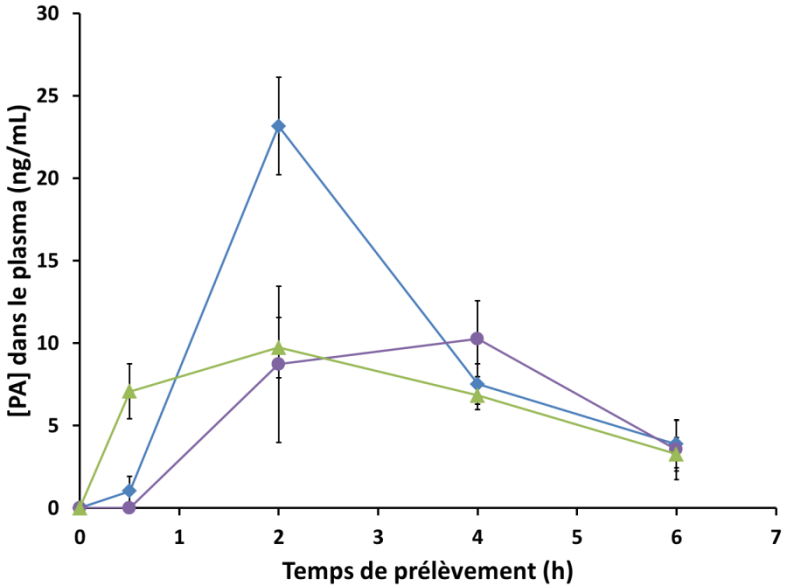


Figure IV-14 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 2 ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches avec aimant, ▲ 3 ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches sans aimant et ● 1 ayant reçu du PA libre en solution normalisé à t + 6h.

La concentration maximale C_{max} est supérieure de 1,6 fois pour le groupe 2 avec aimant en comparaison du groupe 3 sans aimant (23,1 *vs* 14,8 ng/mL). L'AUC_t est également 1,6 fois plus élevée lors l'utilisation de la rétention magnétique (groupe 2, avec aimant) que pour le groupe témoin sans aimant (groupe 3) et le groupe contrôle (PA libre, étude n° 1, groupe 1) (56 ,9 h*ng/mL *vs* 35,7 h*ng/mL et 40 h*ng/mL) (Tableau IV-3).

		Etude n°3										Etude n°1	
Dose = 20 mg/kg		rat n°			CS@Al 5-10-50 FLUO sèches Avec Aimant		rat n°			CS@Al 5-10-50 FLUO sèches Sans Aimant		PA libre normalisé à t=6h	
Paramètre	Unité	1	2	3	Moyenne	CV%	4	5	6	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	2	2	2			4	4	2				
C_{max}	ng/mL	29,9	20,6	18,9	23,1	25,8	9,87	15,0	19,5	14,8	32,8	10,2	28,8
t_{last}	h	6	6	6			6	6	4				
C_{last}	ng/mL	7,11	2,81	1,71	3,87	73,6	3,36	7,26	5,86	5,50	35,9	1,53	34,9
$t_{1/2}$, z	h	2,90	2,09	1,74	2,24	26,5	1,93	2,87	1,72	2,18	27,9	1,65	8,1
AUC_t	h*ng/mL	76,2	52,6	42,2	56,9	30,6	29,9	40,1	37,4	35,7	14,8	40	17,6
AUC	h*ng/mL	96,1	58,3	45,1	66,4	39,8	36,0	60,1	47,2	47,8	25,1		

Tableau IV-3 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 FLUO avec aimant ; les rats 4, 5 et 6 du groupe 3 ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n° 1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

Les résultats cinétiques de cette étude sont très positifs. L'utilisation de la rétention magnétique avec les billes de chitosan magnétiques et fluorescentes sèches, CS@Al 5-10-50 FLUO, provoque une augmentation significative de 1,6 fois de la biodisponibilité relative en comparaison avec les témoins, les mêmes billes utilisées sans aimant ou le PA libre administré à la même dose.

L'imagerie de fluorescence a permis d'observer le positionnement des billes de chitosan magnétiques sèches contenant un fluorophore (CS@Al 5-10-50 FLUO) dans l'intestin à t +6 heures après administration des billes et de voir l'effet de la rétention magnétique sur leur circulation. Après avoir effectué le dernier prélèvement sanguin nécessaire à l'étude cinétique, les animaux sont sacrifiés puis des clichés de fluorescence dans le proche infra-rouge sont réalisés. Les intestins sont extraits, dépliés de l'estomac au cæcum et observés avec une caméra IR (Figure IV-15). En fin de manipulation, pour les rats avec aimant, les billes sont regroupées et se situent dans la partie basse du jéjunum (Figure IV-15 (a)). Pour les rats

témoins sans aimant, les billes ne sont pas groupées et se situent dispersées de la partie basse du jéjunum, dans le cæcum et jusque dans le côlon (Figure IV-15 (b)).

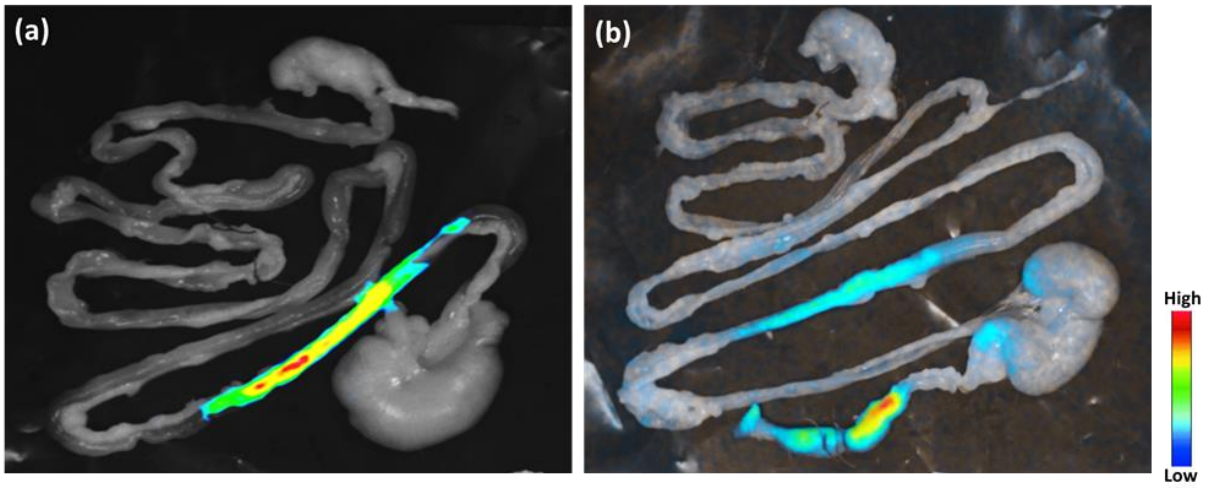


Figure IV-15 : Clichés de fluorescence, rat ayant reçu des billes magnétiques fluorescentes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches (a) avec aimant et (b) sans aimant.

L'imagerie de fluorescence a permis d'observer que lors de l'utilisation de la rétention magnétique, les billes sont groupées et se situent plus haut dans l'intestin que pour les témoins où les billes sont dispersées et ont circulé jusqu'au côlon.

L'IRM a permis d'établir la preuve de concept de la rétention magnétique en confirmant que les billes sont bloquées sous l'aimant lors de l'utilisation d'un aimant. En revanche, l'IRM ne permet pas de distinguer dans quelle portion de l'intestin se trouvent les billes lors de leur rétention. L'imagerie de fluorescence permet d'aller plus loin dans le suivi des billes dans l'intestin et de déterminer leur position exacte à un temps donné après administration des billes. La détection dans l'infra-rouge permet de limiter l'absorption par les tissus, est instantanée et ne nécessite qu'un appareillage utilisable au laboratoire. Le suivi peut donc se faire beaucoup plus rapidement qu'en IRM. Ces résultats sont très encourageants et il a donc été décidé d'observer les effets de la rétention magnétique sur ces billes à différents temps de manipulation afin de pouvoir suivre plus précisément leur circulation dans l'intestin.

4. 4. Étude n° 4 : Billes CS 5-10-50 sèches, Avec *vs* Sans Aimant

Lors de cette étude, des observations par imagerie de fluorescence ont été effectuées à des temps plus courts de manipulation, t + 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6h après administration des billes et couplées à une étude cinétique. A chaque temps, après prélèvement sanguin et sacrifice de l'animal, différents clichés de fluorescence sont effectués. D'abord, une fenêtre est découpée dans la peau au niveau de la position de l'aimant. Ainsi il sera possible de voir si la fluorescence est localisée sous l'aimant. Ensuite, l'abdomen du rat est ouvert, puis l'intestin grêle est extrait depuis l'estomac jusqu'au cæcum puis est observé afin de pouvoir localiser les billes (Voir Annexe 8-4).

Dans cette étude, le positionnement des aimants a été effectué sous échographie (Voir Annexe 8-2) afin de s'assurer que l'aimant est bien positionné sur le duodénum du rat. Le but étant que les billes soient soumises au champ magnétique dès leur sortie de l'estomac. L'amélioration du positionnement permet d'augmenter l'efficacité de la rétention magnétique. En tout début d'expérience, après mise sous anesthésie et rasage des rats, l'échographie est effectuée permettant le repérage et le marquage de la position adéquate pour placer l'aimant. Pour effectuer le positionnement de l'aimant, on visualise grâce à un échographe l'estomac, la jonction pylorique et le début du duodénum sur chaque animal. Puis on crée un artefact grâce à une pince appuyée sur l'abdomen de l'animal permettant ainsi de repérer la meilleure position où placer et fixer l'aimant (Figure IV-16). Ce repérage par échographie est effectué de la même façon sur les rats témoins ne portant pas d'aimant.

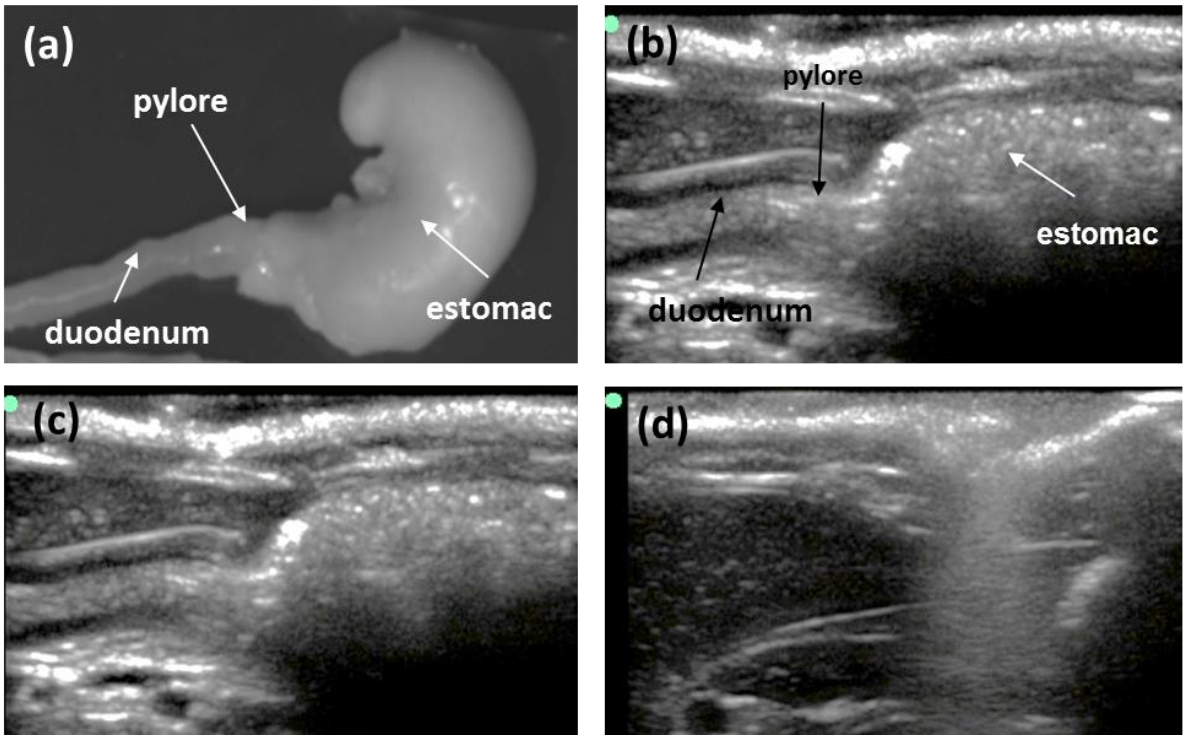


Figure IV-16 : (a) photographie (b) échographie du début du tractus gastro-intestinal et localisation de l'estomac, du pylore et du duodénum. (c) et (d) échographie avant et après positionnement d'une pince pour créer un artefact.

Dans cette étude, il a été nécessaire d'étudier l'effet de la rétention magnétique à différents temps après administration des billes. Afin de perturber le moins possible la cinétique de la digestion et la circulation des billes, il a été décidé de réduire le nombre d'anesthésies et donc de prélèvements sanguins par animal. L'effet de la rétention magnétique sera visualisé par imagerie de fluorescence aux temps t + 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6 heures après administration des billes. A chaque temps, quatre rats ont été observés, deux avec aimant et deux sans aimant. Les prélèvements sanguins seront effectués juste avant sacrifice des animaux à chaque temps avant observation par imagerie de fluorescence. Chaque rat ne sera donc prélevé qu'une seule fois, juste avant sacrifice, à l'exception des animaux devant être observés à t + 6 heures, qui seront également prélevés à t + 0,5 heure sans être sacrifiés. Les courbes de cinétique du passage du PA dans le sang ne seront donc pas dans cette étude des profils cinétiques complets sur animal mais des points de prélèvements sur animal différent à chaque temps.

Tous les rats utilisés lors de cette étude ont reçu les mêmes billes CS@Al 5-10-50 FLUO à la même dose de 20 mg base/kg soit 6,2 mg base/rat ou 8 mg sel/rat. Le groupe 2 est constitué par les rats (rats 1 à 10) portant un aimant sur le ventre : rats 1 et 2 prélevés à t + 0,5 et t + 6 heures et observés en fluorescence à t + 6 heures ; rats 3 et 4 prélevés et observés à t + 1 heure ; rats 5 et 6 prélevés et observés à t + 2 heures ; rats 7 et 8 prélevés et observés à t + 3

heures ; rats 9 et 10 prélevés et observés à t + 4 heures. Le groupe 3 est constitué par les rats contrôles (rats 11 à 20) ne portant pas d'aimant sur l'abdomen : rats 11 et 12 prélevés à t + 0,5 et t + 6 heures et observés en fluorescence à t + 6 heures ; rats 13 et 14 prélevés et observés à t + 1 heure ; rats 15 et 16 prélevés et observés à t + 2 heures ; rats 17 et 18 prélevés et observés à t + 3 heures ; rats 19 et 20 prélevés et observés à t + 4 heures. Les prélèvements sanguins ont été effectués aux temps t + 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4, et 6 heures après administration puis le PA contenu dans le plasma aux différents temps de prélèvements a été dosé (Voir Annexe 7-3) pour les deux groupes (Figure IV-17).

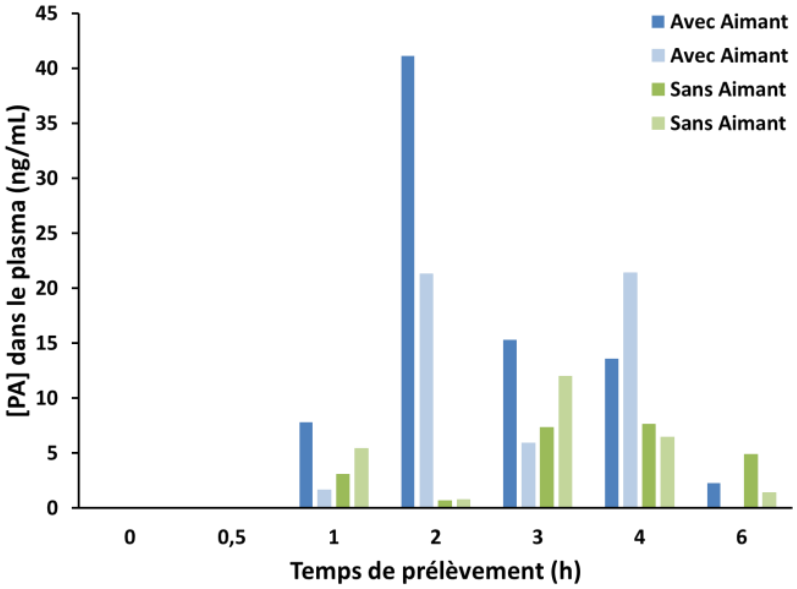


Figure IV-17 : Points cinétiques de passage du PA dans le sang (ng/mL) à différents temps (h) pour les rats ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches du groupe 2 avec aimant (■■) et du groupe 3 sans aimant (■■).

Les résultats PK de dosage du PA dans le sang montrent une très bonne amélioration du passage du PA lors de l'utilisation de la rétention magnétique pour les billes CS@Al 5-10-50 en comparaison des témoins ayant reçu les mêmes billes sans aimant et également en comparaison du PA libre administré en solution (étude n°1, groupe 1) (Figure IV-18).

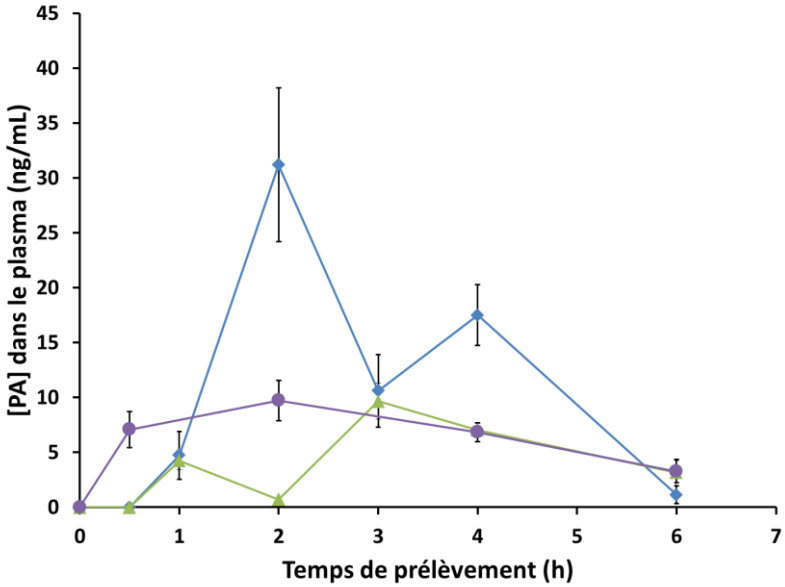


Figure IV-18 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 2 ayant reçu du PA formulé dans des billes magnétiques et fluorescentes sèches avec aimant, ▲ 3 ayant reçu du PA formulé dans des billes magnétiques et fluorescentes sèches sans aimant et ● 1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

La concentration maximale C_{max} est trois fois supérieure pour le groupe 2 avec aimant en comparaison du groupe 3 sans aimant (31,2 et 9,7 ng/mL). L'AUC_t représentant l'exposition au PA est également 2,5 fois plus élevée lors l'utilisation de la rétention magnétique dans le groupe 2 (64,3 h*ng/mL) en comparaison du groupe témoin 3 sans aimant (26,2 h*ng/mL) et du groupe contrôle du PA libre (étude n°1, groupe 1) (40 h*ng/mL) (Tableau IV-4).

		Etude n°4		Etude n°1
Dose = 20 mg/kg		CS@Al 5-10-50 FLUO sèches Avec Aimant	CS@Al 5-10-50 FLUO sèches Sans Aimant	PA libre normalisé à t=6h
Paramètre	Unité	Moyenne	Moyenne	Moyenne
t_{max}	h	2	3	
C_{max}	ng/mL	31,2	9,7	10,2
T_{last}	h	6	6	
C_{last}	ng/mL	1,13	3,15	1,53
$t_{1/2}$, z	h	0,89	1,84	1,65
AUC_t	h*ng/mL	64,3	26,2	40
AUC	h*ng/mL	65,7	34,6	

Tableau IV-4 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats ayant reçu les billes CS@Al 5-10-50 FLUO sèches des groupes 2 avec aimant et 3 sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t+6h.

Cela signifie que l'utilisation de la rétention magnétique lors de cette étude où le positionnement de l'aimant a été optimisé à l'aide de l'échographie pour cibler le début du duodénum permet de multiplier la biodisponibilité relative du PA par 2,5. Cette amélioration est très positive et après le dernier prélèvement sanguin les rats sont observés par imagerie de fluorescence.

Les observations par imagerie de fluorescence sont effectuées à différents temps après administration des billes à t + 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6 heures. A chaque temps, après prélèvement sanguin et sacrifice de l'animal, différents clichés sont effectués. Dans cette étude, une fenêtre est découpée dans la peau au niveau de la position de l'aimant (Figure IV-19 (a)), permettant ainsi de voir si la fluorescence est localisée sous l'aimant. Puis, comme dans l'étude précédente, l'intestin du rat est extrait et observé afin de pouvoir localiser les billes (Figure IV-19 (b)) (Voir Annexe 8-4).

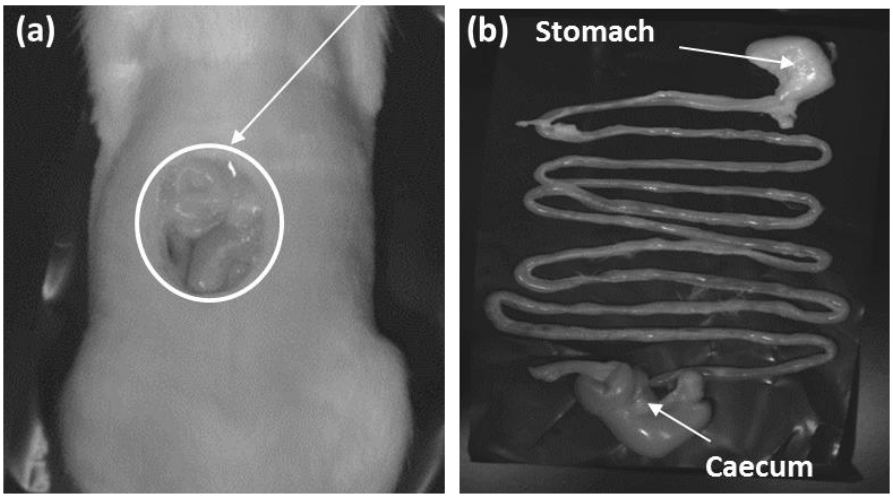


Figure VI-19 : Images du rat après sacrifice (a) observation d'une fenêtre découpée dans la peau au niveau de la position initiale de l'aimant et (b) observation de l'intestin déplié depuis l'estomac jusqu'au cæcum.

A t + 1 heure, pour les rats avec ou sans aimant, les billes sont toutes localisées dans l'estomac. Comme précédemment lors des études par IRM (études n° 2 et 3), on peut observer qu'une heure après l'administration, la totalité des billes se trouve encore dans le bas de l'estomac, proche du pylore (Figure IV-20). Les billes peuvent être visualisées lorsque la peau est retirée à l'endroit de la position initiale de l'aimant, en effet l'aimant est positionné à la sortie de l'estomac (Figure IV-20 (a) et (b)). Lorsque l'intestin est sorti du ventre du rat et est déplié, on peut constater que toute la fluorescence, donc toutes les billes, se trouvent dans l'estomac pour les rats avec ou sans aimant (Figure IV-20 (c) et (d)).

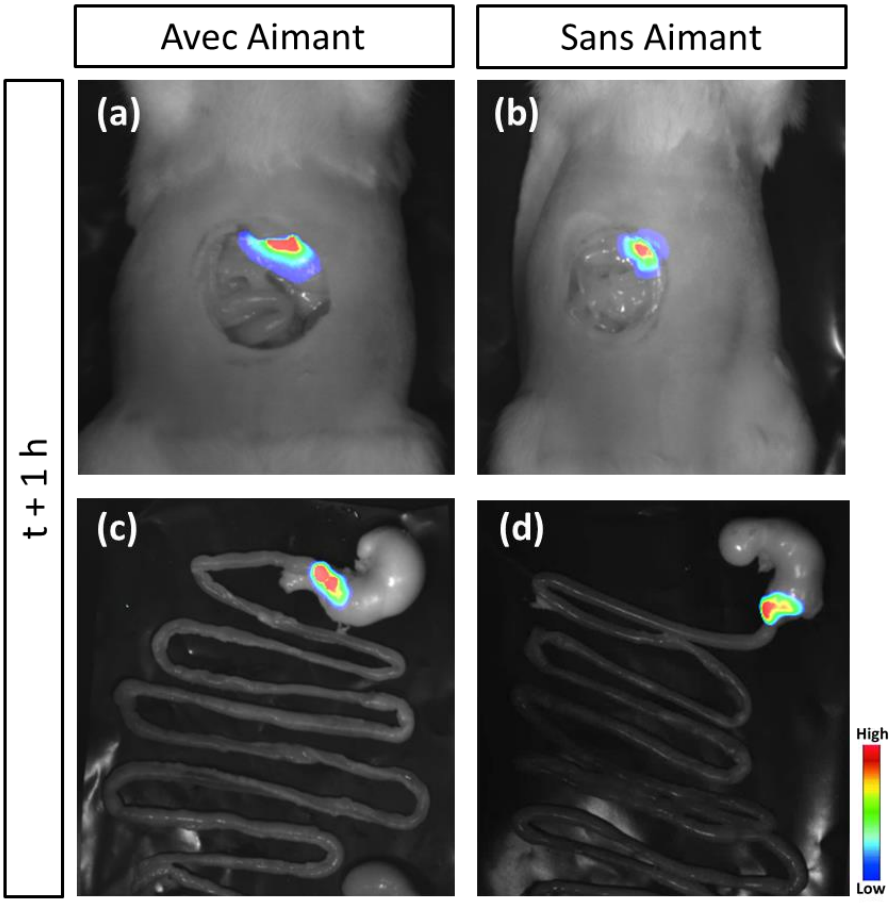


Figure IV-20 : Images de fluorescence (a) et (b) sous la position initiale de l'aimant, (c) et (d) lorsque l'intestin est déplié ; (a) et (c) pour les rats avec aimant, (b) et (d) pour les rats sans aimant.

Aux temps t + 2 ; 3 ; 4 et 6 heures après administration des billes, la fluorescence est d'abord observée sur animal entier, sous la position initiale de l'aimant (Figure IV-21). La fluorescence est très intense et localisée à l'endroit de l'aimant pour les rats avec aimant, ce qui signifie que les billes sont situées sous l'aimant (Figure IV-21 (a), (c), (e) et (g)). Pour les rats sans aimant, à t + 2 heures, la fluorescence peut être observée sous la position où aurait été placé l'aimant (Figure IV-21 (b)). Aux temps t + 3 ; 4 et 6 heures, il n'y a plus de fluorescence sous cette position (Figure IV-21 (d), (f) et (h)) ; ce qui signifie que les billes ont circulé. Ces observations sont similaires à celles faites en IRM. Lors de l'utilisation de la rétention magnétique, les billes sont localisées sous l'aimant et cela se traduit par une fluorescence intense, émise par ces billes localisées sous la fenêtre découpée dans la peau des rats.

Ensuite, les intestins des rats sont extraits depuis l'estomac jusqu'au cæcum puis dépliés et observés en fluorescence (Figure IV-22). A t + 2 heures, la fluorescence peut être observée dans l'estomac pour les rats avec et sans aimant (Figure IV-22 (a) et (b)). Pour les rats avec

aimant, la fluorescence résiduelle est très intense et localisée dans la partie haute de l'intestin (Figure IV-22 (a)). Pour les rats sans aimant, le reste des billes se trouve plus bas dans l'intestin et la fluorescence est moins intense, ce qui signifie que les billes sont moins groupées (Figure IV-22 (b)). Aux temps t + 3 ; 4 et 6 heures, pour les rats avec aimant, la fluorescence est toujours plus intense, localisée sur une plus petite distance et plus haut dans l'intestin (Figure IV-22 (c), (e) et (g)) en comparaison des rats témoins sans aimant pour lesquels la fluorescence est toujours moins intense et étalée sur une plus grande distance (Figure IV-22 (d), (f) et (h)).

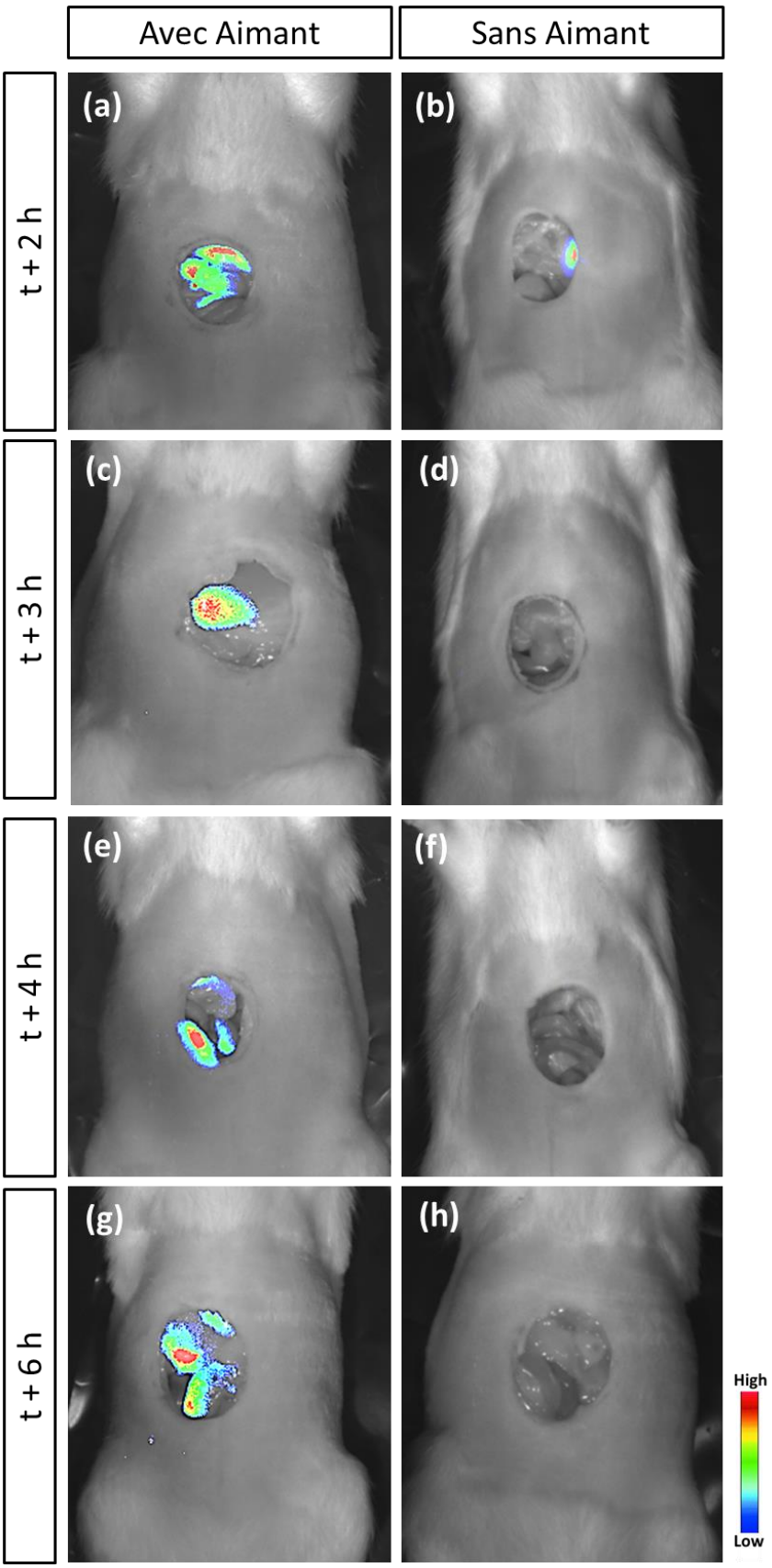


Figure IV-21 : Images de fluorescence sous la position initiale de l'aimant (a), (c), (e) et (g) pour les rats avec aimant ; (b), (d), (f) et (h) pour les rats sans aimant ; (a) et (b) à t + 2h, (c) et (d) à t + 3h, (e) et (f) à t + 4h, (g) et (h) à t + 6h.

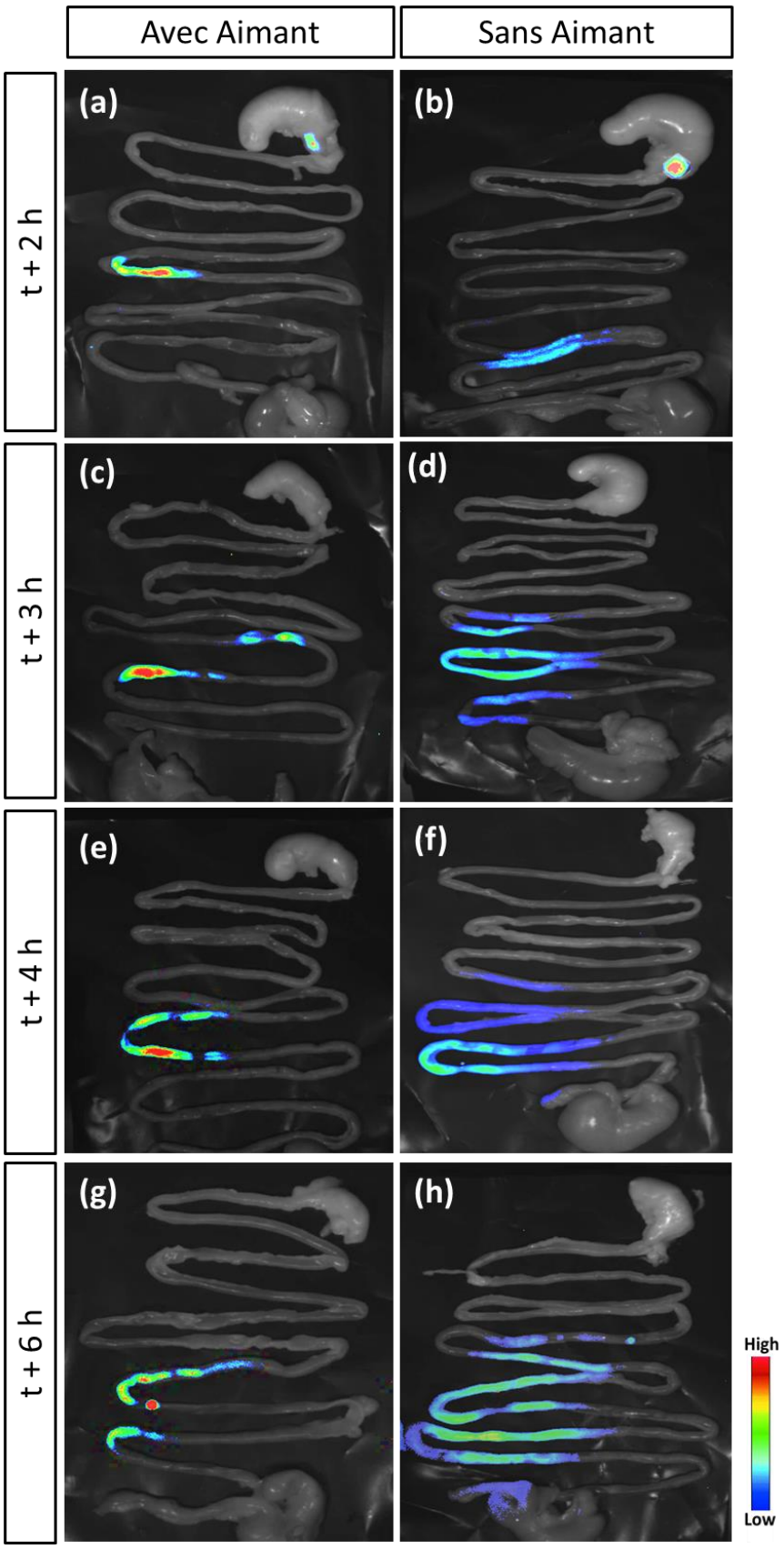


Figure IV-22 : Images de fluorescence lorsque l'intestin est déplié (a), (c), (e) et (g) pour les rats avec aimant ; (b), (d), (f) et (h) pour les rats sans aimant ; (a) et (b) à t + 2h, (c) et (d) à t + 3h, (e) et (f) à t + 4h, (g) et (h) à t + 6h.

Lors de l'utilisation de la rétention magnétique, la fluorescence est plus intense et localisée sur une plus courte distance. Cela signifie que l'utilisation de la rétention magnétique provoque une accumulation des billes et un ralentissement de leur circulation dans l'intestin. Le fait que les billes circulent groupées lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique peut expliquer l'amélioration de la biodisponibilité du PA. En effet, si les billes sont groupées lorsque qu'elles se trouvent à proximité du site de passage du PA dans le sang, la concentration en PA à cet endroit sera supérieure à celle des billes circulant séparément.

4. 5. Étude n° 5 : Billes CS@Al 5-10-50 sèches, Mise à jeun totale

Lors de la dernière étude, les billes de chitosan magnétiques sèches (CS@Al 5-10-50) sont étudiées une dernière fois afin d'obtenir un profil PK complet et non pas des points de prélèvements uniques sur animal comme dans l'étude précédente. De plus, pour cette dernière étude, les animaux seront mis totalement à jeun (12 heures avant administration des billes) afin d'étudier l'effet de la mise à jeun totale ou partielle sur la biodisponibilité relative du PA.

Les études précédentes ont montré que l'utilisation de la rétention magnétique permet d'augmenter l'exposition au PA. Lors des études précédentes, les animaux sont mis à jeun 3 heures avant administration de la formulation à étudier. Dans cette étude, les rats sont mis à jeun 12 heures avant administration des billes. Les rats du groupe 2 (rats n° 25, 26 et 27) ont reçu les billes CS@Al 5-10-50 à une dose de 20 mg/kg soit 8 mg/rat et portent un aimant sur l'abdomen. Le groupe 3 (rats n° 28, 29 et 30) a reçu les mêmes billes sans aimant. Les animaux sont gavés de façon similaire (Voir Annexe 7-3), la seule différence étant uniquement dans la durée de la mise à jeun avant administration des billes. Les prélèvements sanguins ont été effectués aux temps t + 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6 heures après administration puis le PA contenu dans le plasma aux différents temps de prélèvements a été dosé pour le groupe 2 avec aimant (Figure IV-23 (a)) et groupe 3 sans aimant (Figure IV-23 (b)).

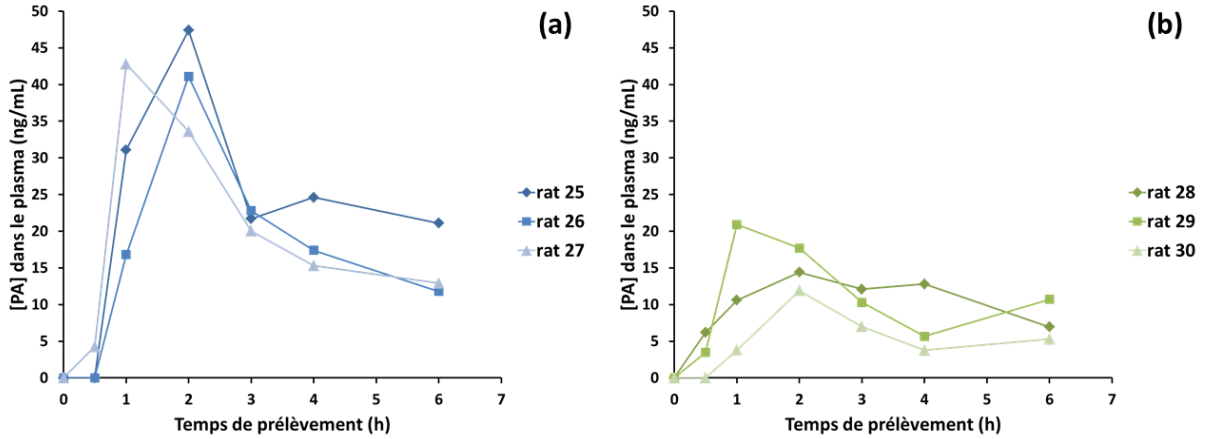


Figure IV-23 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour les rats ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 sèches (a) 25, 26 et 27 avec aimant et (b) 28, 29, et 30 sans aimant.

Les résultats de dosage du PA dans le sang montrent une amélioration de 2,5 fois pour les billes de chitosan magnétiques sèches lors de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison des témoins ayant reçu les mêmes billes sans aimant et également en comparaison du PA administré en solution (étude n° 1, groupe 1) (Figure IV-24).

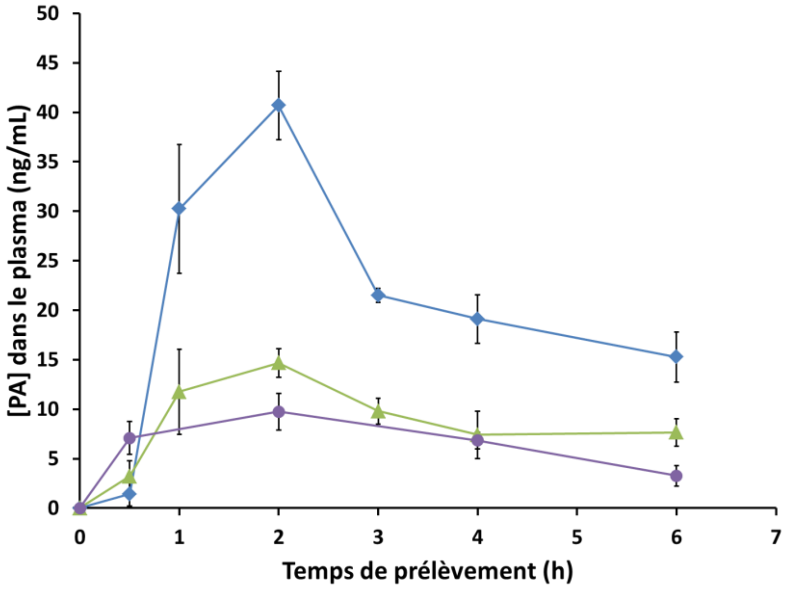


Figure IV-24 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 2 ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 avec aimant, ▲ 3 ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 sans aimant et ● 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

La concentration maximale C_{max} est trois fois supérieure pour le groupe 2 avec aimant en comparaison du groupe 3 sans aimant (43,7 *vs* 15,7 ng/mL). L'AUC_t est également 2,5 fois plus élevée lors de l'utilisation de la rétention magnétique dans le groupe 2 avec aimant que

pour le groupe 3 témoin sans aimant, mais également que pour le groupe 1 contrôle du PA libre (étude n° 1, groupe 1) (128 *vs* 53,2 et 40 h*ng/mL) (Tableau IV-5).

		Etude n°5										Etude n°1	
Dose = 20 mg/kg		rat n°			CS@Al 5-10-50 sèches Avec Aimant		rat n°			CS@Al 5-10-50 sèches Sans Aimant		PA libre normalisé à t=6h	
Paramètre	Unité	1	2	3	Moyenne	CV%	4	5	6	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	2	2	1	2		2	1	2	2		2	
C_{max}	ng/mL	47,4	41,1	42,8	43,7	7,41	14,4	20,9	11,9	15,7	29,5	10,2	28,8
T_{last}	h	6	6	6	6		6	6	6	6			
C_{last}	ng/mL	21,1	11,8	12,9	15,3	33,2	6,95	10,7	5,28	7,65	36,5	1,53	34,9
$t_{1/2}$, z	h	(34,7)	3,19	5,07	14,3	123	3,95	6,02	3,52	4,5	29,8	1,65	8,1
AUC_t	h*ng/mL	149	113	123	128	14,4	63,1	64	32,2	53,2	34	40	17,6
AUC	h*ng/mL	(1200)	167	217	192	9,21	103	157	59,1	106	46,2		

Tableau IV-5 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 ayant reçu du PA formulé dans des billes CS@Al 5-10-50 avec aimant et 4, 5 et 6 ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

Afin de comparer l'effet du temps de mise à jeun sur la biodisponibilité relative du PA, on compare les différents paramètres pharmacocinétiques trouvés dans cette étude (mise à jeun de 12 heures) à ceux de l'étude précédente (mise à jeun de 3 heures) pour les groupes ayant reçu des billes de chitosan magnétiques sèches avec ou sans aimant. Les paramètres t_{max}, C_{max} et AUC_t représentant la biodisponibilité du PA sont comparés. Les paramètres du groupe 1 de l'étude n°1 représentant les rats ayant reçu du PA libre à la même dose sont également comparés, après normalisation sur t + 6 heures (Tableau IV-6).

		Etude n°5		Etude n°4		Etude n°1
		Groupe 2	Groupe 3	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 1
Dose = 20 mg/kg		Billes AVEC AIMANT Mise à jeun 12h	Billes SANS AIMANT Mise à jeun 12h	Billes AVEC AIMANT Mise à jeun 3h	Billes SANS AIMANT Mise à jeun 3h	PA libre
Paramètre	Unité	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
t_{max}	h	2	2	2	3	2
C_{max}	ng/mL	43,7	15,7	31,2	9,7	10,2
AUC_t	h*ng/mL	128	53,2	64,3	26,2	40

Tableau IV-6 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 (étude n° 5, groupe 2) ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 avec aimant et 4, 5 et 6 (étude n° 5, groupe 3) ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 sans aimant, les rats 1, 2 et 3 (étude n° 4, groupe 2) ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 avec aimant et 4, 5 et 6 (étude n° 4, groupe 3) ayant reçu des billes CS@Al 5-10-50 sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

En effet, les mêmes billes de chitosan magnétiques sèches CS@Al 5-10-50 sont utilisées pour les études n° 4 et 5 (Voir Chapitre II-3). Lors de ces deux études, les billes sont administrées à la même dose de 20 mg/kg soit 8 mg/rat. L'administration de ces billes a été faite de façon similaire, 15 billes dans 2 gélules et les aimants utilisés pour provoquer la rétention magnétique dans les groupes avec aimant sont les mêmes. Les prélèvements ont été faits aux mêmes temps t + 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6 heures. La seule différence entre les deux études est la durée de la mise à jeun. La mise à jeun totale des rat, provoque une augmentation par deux du passage du PA dans le sang. La concentration maximale en PA est multipliée par 1,5 lorsque les animaux sont totalement à jeun (43,7 et 31,2 ng/mL pour les rats avec aimant et 15,7 et 9,7 ng/mL pour les rats sans aimant). L'exposition au PA (AUC_t) est doublée lors de la mise à jeun totale (128 et 64,3 ng/mL pour les rats avec aimant et 53,2 et 26,2 ng/mL pour les rats sans aimant). Le rapport entre les rats avec ou sans aimant reste le même. Même si la quantité de PA passée dans le sang est plus importante lors d'une mise à jeun de 12 heures avant administration des billes magnétiques, la biodisponibilité relative est 2,5 plus importante lors de l'utilisation de la rétention magnétique, quelle que soit la durée de mise à jeun.

4. 6. Etude n°6 : Mini-granules magnétiques

Lors de cette dernière étude, trois nouvelles formes magnétiques fabriquées en process galénique par extrusion-sphéronisation, ASP7 25%, ASP8 100% et ASP10 25% ont été testées (Voir Chapitre II-4). Ces trois formes présentent des cinétiques de relargage du PA

différentes (Figure IV-25) pour tester l'influence de cette vitesse de relargage sur le passage du PA dans le sang. Lors de ces essais, les conditions de mise à jeun, d'administration des formes et la dose administrée aux rats est la même que lors des études précédentes (8 mg sel/rat = 6,2 mg base/rat = 20mg base/kg) (Voir Annexe 7-3). Pour chaque formulation, l'effet de la rétention magnétique a été comparé dans deux groupes composés de trois rats (deux rats pour ASP10 25%), un groupe avec et un groupe sans aimant. Les prélèvements sanguins sont effectués à t + 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 6 heures après administration des billes puis le PA contenu dans le plasma aux différents temps de prélèvements est dosé pour les groupes avec aimant et sans aimant.

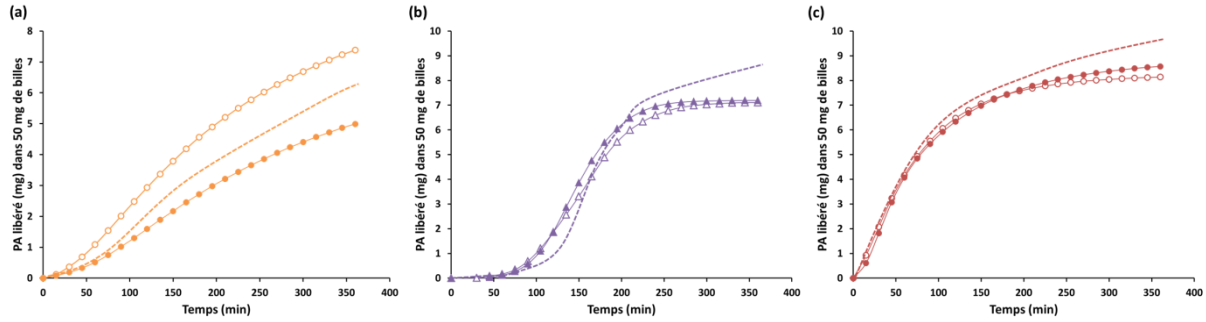


Figure IV-25 : Courbes de cinétique de libération du PA (en %) en fonction du temps (en min) pour les formes (a) ASP7 25% à pH = 6,8 (●), pH = 2 (○) et dans FeSSIF (---) ; (b) ASP8 100% à pH = 6,8 (▲), pH = 2 (△) et dans FeSSIF (---) et (c) ASP10 25% à pH = 6,8 (●), pH = 2 (○) et dans FeSSIF (---).

4. 6. 1. ASP7 25%

Les mini-granules ASP7 sont constituées d'un cœur contenant un polymère, les NPMs et le PA et d'une couche externe fonctionnelle de polymère contrôlant le relargage. Cette forme présente une cinétique de libération du PA linéaire. Il a été choisi de travailler sur les mini-granules ASP7 avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (ASP7 25%) afin d'obtenir la cinétique de libération souhaitée de 8 mg à t = 6 heures pour 60 mg de billes (Figure VI-25 (a)). Pour cette forme, il a donc été nécessaire d'administrer 3 gélules de 20 mg, afin que la quantité de PA relarguée à 6 heures soit de 8 mg/rat.

L'effet de la rétention magnétique a été comparé dans deux groupes composés de trois rats, le groupe 2 (rats n°1, 2 et 3) avec aimant (Figure IV-26 (a)) et le groupe 3 (rats n°4, 5 et 6) sans aimant (Figure IV-26 (b)).

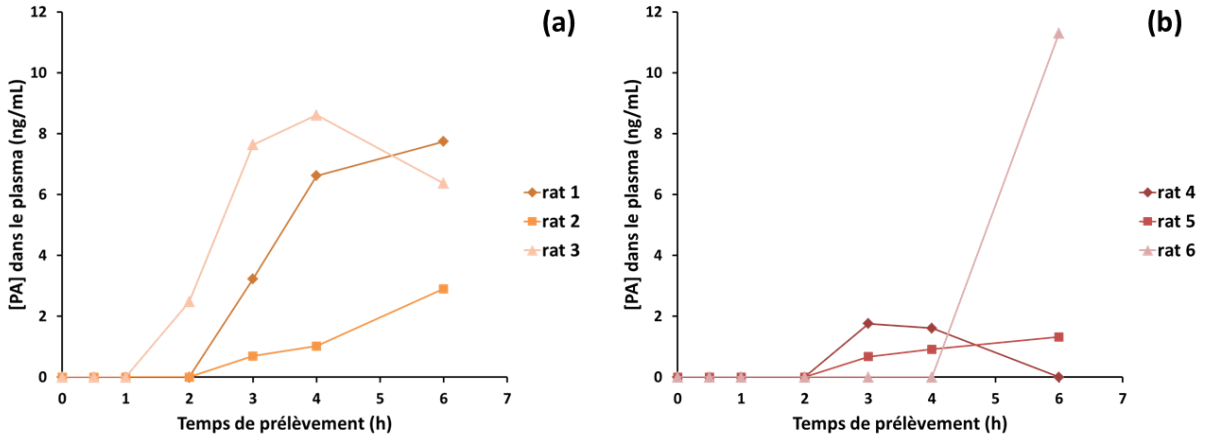


Figure IV-26 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour (a) les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu des mini-granules magnétiques ASP7 25% avec aimant et (b) les rats 4, 5, et 6 du groupe 3 ayant reçu du PA formulé dans des mini-granules magnétiques ASP7 25% sans aimant.

Les résultats de dosage du PA dans le sang montrent une amélioration du passage du PA pour les mini-granules magnétiques ASP7 25% lors de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison des témoins ayant reçu les mêmes mini-granules sans aimant (Figure IV-27).

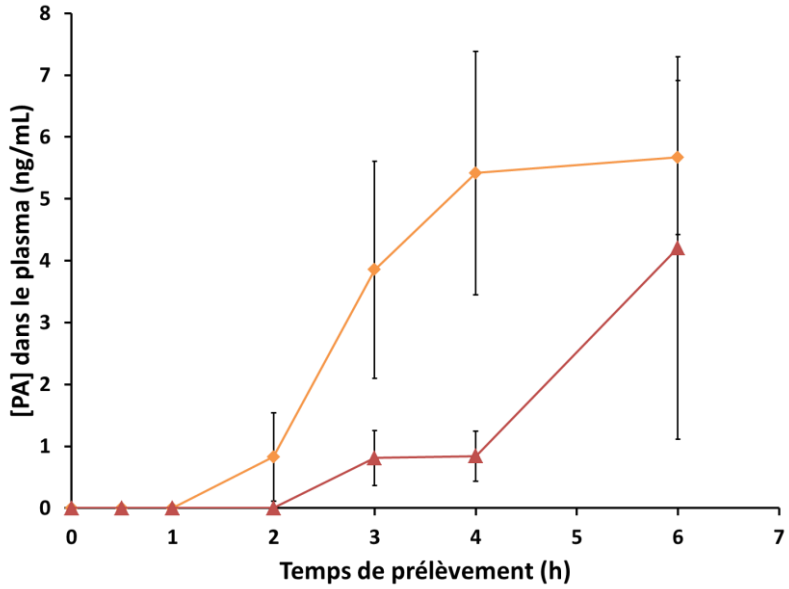


Figure IV-27 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 2 ayant reçu des mini-granules ASP7 25% avec aimant et ▲ 3 ayant reçu des mini-granules ASP7 25% sans aimant.

La concentration maximale C_{max} est 1,5 fois supérieure pour le groupe 2 avec aimant en comparaison du groupe 3 sans aimant (6,42 *vs* 4,2 ng/mL). L'AUC_t est également 3 fois plus élevée lors de l'utilisation de la rétention magnétique dans le groupe 2 avec aimant (18,4

h*ng/mL) que pour le groupe 3 témoin sans aimant (5,5 h*ng/mL). En revanche, le passage du PA lors de l'utilisation de cette formulation ASP7 est beaucoup plus faible que pour le groupe contrôle du PA libre (étude n° 1, groupe 1) (40 h*ng/mL) (Tableau IV-7).

		Etude n°6										Etude n°1	
		Groupe 2					Groupe 3					Groupe 1	
Dose = 20 mg/kg		rat n°			ASP7 25% Avec Aimant		rat n°			ASP7 25% Sans Aimant		PA libre	
Paramètre	Unité	1	2	3	Moyenne	CV%	4	5	6	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	6	6	4	6		6	6	6	6		2	
C_{max}	ng/mL	7,74	2,9	8,61	6,42	48	1,76	1,32	11,3	4,2	82	10,2	28,8
T_{last}	h	6	6	6			6	6	6				
C_{last}	ng/mL	7,74	2,9	6,37	5,67	44	1,61	1,32	11,3	4,2	82	1,53	34,9
AUC_t	h*ng/mL	20,9	5,12	29,3	18,4	66,6	1,43	3,36	11,3	5,6	76	40	17,6

Tableau IV-7 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu des mini-granules ASP7 25% avec aimant ; 4, 5 et 6 du groupe 3 ayant reçu des mini-granules ASP7 25% sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t+6h.

Lors de cet essai, il a pu être observé que bien que le passage du PA dans le sang soit amélioré lors de l'utilisation de la rétention magnétique, l'utilisation de cette formulation magnétique ne semble pas adaptée. En effet, la quantité de PA passée dans le plasma est beaucoup plus faible que pour le PA administré libre sous forme de solution.

4. 6. 2. ASP8 100%

La forme ASP8 diffère de la forme ASP7 uniquement dans la composition de la couche externe fonctionnelle de polymère contrôlant le relargage et présente une cinétique de libération du PA avec un temps de latence de 1 heure 30. La cinétique de libération souhaitée de 8 mg à t = 6 heures pour 50 mg de mini-granules est obtenue pour la forme ASP8 avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 100% (ASP8 100%) (Figure VI-25 (b)). Il a donc été nécessaire d'administrer 2 gélules de 25 mg, afin que la quantité de PA relarguée à 6 heures soit de 8 mg/rat.

L'effet de la rétention magnétique a été comparé dans deux groupes composés de trois rats, le groupe 4 (rats n° 7, 8 et 9) avec aimant (Figure IV-28 (a)) et le groupe 5 (rats n° 10, 11 et 12) sans aimant (Figure IV-28 (b)).

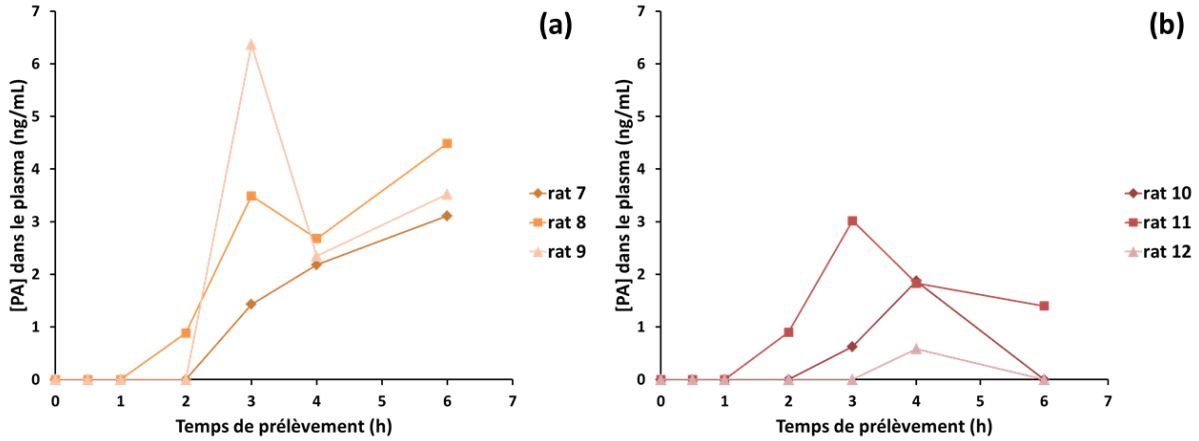


Figure IV-28 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour (a) les rats 7, 8 et 9 du groupe 4 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% avec aimant et (b) les rats 10, 11, et 12 du groupe 5 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% sans aimant.

Les résultats de dosage du PA dans le sang montrent une amélioration du passage du PA pour les mini-granules ASP8 100% lors de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison des témoins sans aimant (Figure IV-29).

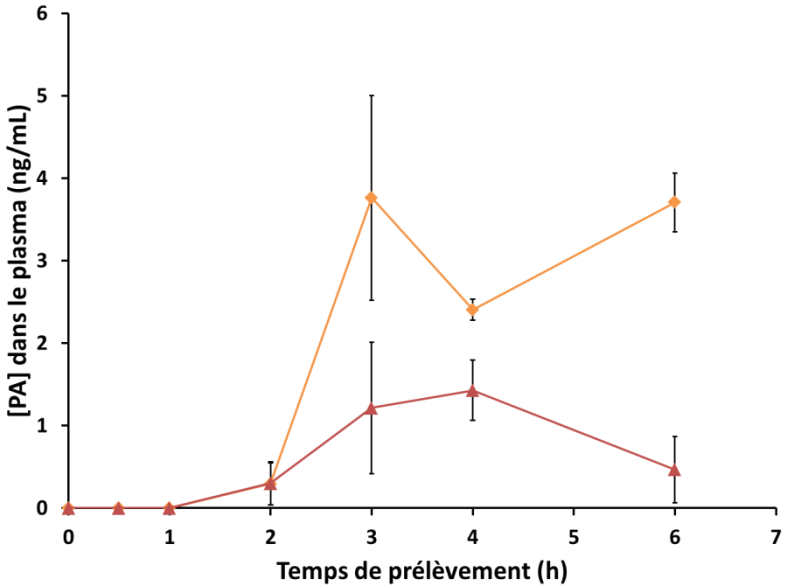


Figure IV-29 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 4 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% avec aimant et ▲ 5 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% sans aimant.

La concentration maximale C_{max} est 2,5 fois supérieure pour le groupe 4 avec aimant en comparaison du groupe 5 sans aimant (4,66 *vs* 1,82 ng/mL). L'AUC_t est également 3 fois plus élevée lors l'utilisation de la rétention magnétique dans le groupe 4 avec aimant (11,3 h*ng/mL) que pour le groupe 5 témoin sans aimant (3,28 h*ng/mL). En revanche, le passage du PA lors de l'utilisation de cette formulation ASP8 est beaucoup plus faible que pour le groupe contrôle du PA libre (étude n° 1, groupe 1) (40 h*ng/mL) (Tableau IV-8).

		Etude n°6										Etude n°1	
		Groupe 4					Groupe 5					Groupe 1	
Dose = 20 mg/kg		rat n°			ASP8 100% Avec Aimant		rat n°			ASP8 100% Sans Aimant		PA libre	
Paramètre	Unité	7	8	9	Moyenne	CV%	10	11	12	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	6	6	3	6		4	3	4	4		2	
C_{max}	ng/mL	3,11	4,49	6,37	4,66	35,2	1,87	3,02	0,584	1,82	66,8	10,2	28,8
T_{last}	h	6	6	6	6		4	6	4	4			
C_{last}	ng/mL	3,11	4,49	3,52	3,70	19,1	1,87	1,4	0,584	1,28	50,6	1,53	34,9
$t_{1/2}$, z	h											1,65	8,1
AUC_t	h*ng/mL	7,81	12,9	13,1	11,3	26,5	1,56	7,99	0,292	3,28	126	40	17,6

Tableau IV-8 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 7, 8 et 9 du groupe 4 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% avec aimant ; 10, 11 et 12 du groupe 5 ayant reçu des mini-granules ASP8 100% sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

Da la même façon que pour la forme ASP7 25%, la formulation magnétique ASP8 100% ne semble pas adaptée à l'utilisation de la rétention magnétique pour notre PA modèle. En effet, même si le passage de celui-ci dans le sang est augmenté pour les rats avec aimant, la biodisponibilité relative est beaucoup plus faible que pour le PA administré libre en solution.

4. 6. 3. ASP10 25%

La forme ASP10 est constituée d'un cœur contenant un polymère et les NPMs et de deux couches externes fonctionnelles, la première contenant le PA et la deuxième contenant le polymère contrôlant le relargage. Avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 25%, les mini-granules ASP10 25%, présente une cinétique de libération du PA similaire à celle des billes

de chitosan magnétiques CS@Al 5-10-50 sèches et permet d'obtenir la cinétique de libération souhaitée de 8 mg à t = 6 heures pour 50 mg de billes (Figure VI-25 (c)). L'administration a été effectuée avec 2 gélules de 25 mg, afin que la quantité de PA relarguée à 6 heures soit de 8 mg sel/rat.

L'effet de la rétention magnétique a été comparé dans deux groupes composés de deux rats, le groupe 6 (rats n° 13 et 15) avec aimant (Figure IV-30 (a)) et le groupe 7 (rats n° 16 et 18) sans aimant (Figure IV-30 (b)).

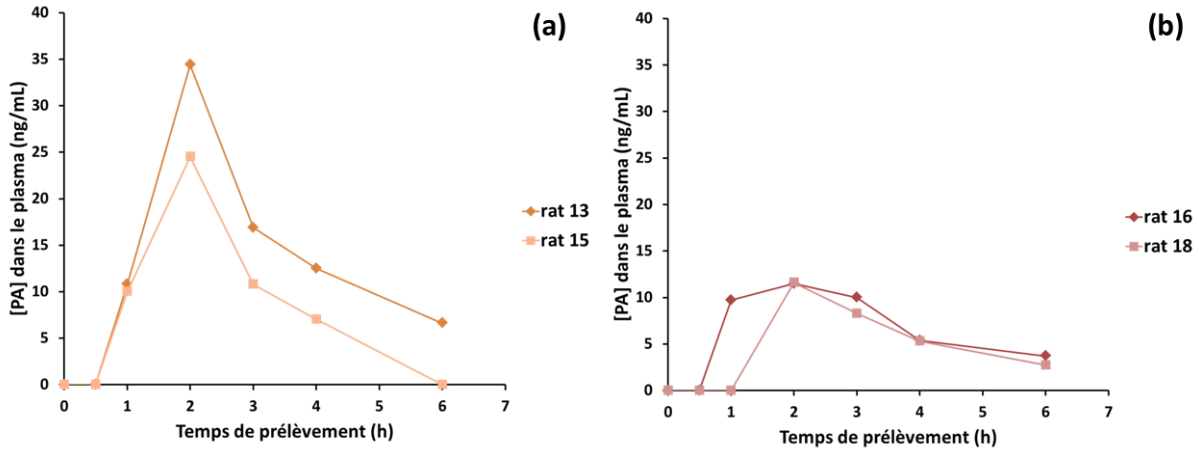


Figure IV-30 : Courbes PK de passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) pour (a) les rats 13 et 15 du groupe 6 ayant reçu des mini-granules ASP10 25% avec aimant et (b) les rats 16 et 18 du groupe 7 ayant reçu des mini-granules ASP10 25% sans aimant.

Les résultats de dosage du PA dans le sang montrent une amélioration du passage du PA pour les mini-granules magnétiques ASP10 25% lors de l'utilisation de la rétention magnétique en comparaison des témoins ayant reçu les mêmes mini-granules sans aimant et également en comparaison du PA administré en solution (Figure IV-31).

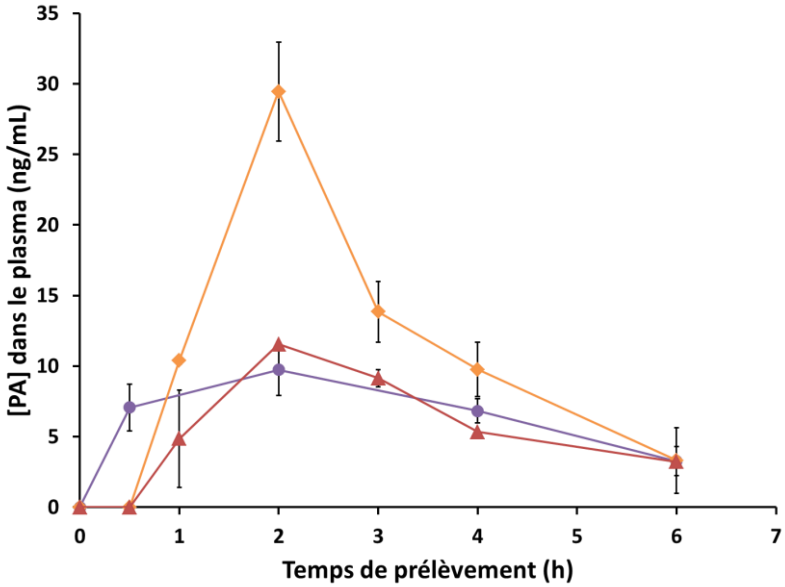


Figure IV-31 : Comparaison du passage du PA dans le sang (ng/mL) en fonction du temps (h) entre les rats des groupes : ◆ 6 ayant reçu des billes ASP10 25% avec aimant, ▲ 7 ayant reçu des billes ASP10 25% sans aimant et ● 1 (étude n°1) ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

La concentration maximale C_{max} est 2,5 fois supérieure pour le groupe 6 avec aimant en comparaison du groupe 7 sans aimant (29,4 *vs* 11,5 ng/mL). L'AUC_t est 2 fois plus élevée lors de l'utilisation de la rétention magnétique dans le groupe 6 (64,1 h*ng/mL) que pour le groupe témoin 7 sans aimant (35,2 h*ng/mL) mais également que pour le groupe contrôle du PA libre (étude n° 1, groupe 1) (40 h*ng/mL) (Tableau IV-9).

		Etude n°6								Etude n°1	
		Groupe 6				Groupe 7				Groupe 1	
Dose = 20 mg/kg		rat n°		ASP10 25% AVEC AIMANT		rat n°		ASP10 SANS AIMANT		PA libre	
Paramètre	Unité	13	15	Moyenne	CV%	16	18	Moyenne	CV%	Moyenne	CV%
t_{max}	h	2	2	2		2	2	2		2	
C_{max}	ng/mL	34,4	24,5	29,4	16,8	11,5	11,6	11,5	0,8	10,2	28,8
T_{last}	h	6	4			6	6	6			
C_{last}	ng/mL	6,62	7,03	6,82	6	3,70	2,74	3,32	14,5	1,53	34,9
$t_{1/2}$, z	h	1,77	1,11	1,44	22,9	2,23	1,91	2,07	7,7	1,65	8,1
AUC_t	h*ng/mL	83	45,2	64,1	29,4	40,2	30,1	35,2	14,3	40	17,6
AUC	h*ng/mL	99,8	56,5	72,9	29,6	52,1	37,6	44,8	16,1		

Tableau IV-9 : Paramètres pharmacocinétiques du passage du PA dans le sang pour les rats 13 et 15 du groupe 6 ayant reçu des mini-granules ASP10 25% avec aimant ; 16 et 18 du groupe 7 ayant reçu des mini-granules ASP10 25% sans aimant et les rats du groupe 1 de l'étude n°1 ayant reçu du PA libre normalisé à t + 6h.

Lors de cet essai, l'utilisation de la rétention magnétique a permis de doubler la biodisponibilité relative du PA. Cette amélioration est très positive et ces résultats sont similaires aux études utilisant les billes de chitosan magnétiques CS@Al 5-10-50 sèches (Etudes n° 3, 4 et 5). Cela signifie que l'utilisation d'une nouvelle forme ayant les mêmes caractéristiques de relargage du PA permet de retrouver des résultats pharmacocinétiques similaires bien que les objets soient très différents.

5. Étude de toxicité

Lors des études *in vivo* de rétention magnétique, des formulations contenant des nanoparticules magnétiques sont accumulées dans l'intestin du rat. Le fait de retenir des billes magnétiques à proximité de la membrane intestinale du rat peut potentiellement induire une toxicité chez l'animal, due à une accumulation de fer dans les organes ou à une irritation de la membrane lors du contact avec les billes magnétiques. Lors des essais *in vivo*, le devenir des nanoparticules magnétiques après administration des billes a été étudié. Le contenu en fer des organes et des fèces a été dosé pour déterminer la voie d'élimination des NPMs. Des coupes histologiques ont été réalisées sur différents segments du tractus gastro-intestinal (estomac,

jéjunum, cæcum) afin de vérifier que l'accumulation des billes magnétiques contre la membrane intestinale ne provoquait pas d'irritation de la membrane intestinale. Des coupes sur les organes internes ont également permis de rechercher la présence et l'accumulation éventuelle de NPMs et donc de fer dans le foie et la rate.

5. 1. Accumulation des NPMs dans les organes

L'accumulation dans les organes des NPMs a été mesurée par dosage du fer. Lors de l'étude n° 2, le foie et la rate, qui sont les organes où s'accumulent classiquement les particules sont récupérés en fin d'expérience, et le fer est dosé. Les fèces sont également récupérées pour être dosées. Les fèces sont collectées en deux temps, du début de l'expérience à t + 6 heures puis de t + 6 heures à t + 24 heures. La concentration en fer est ensuite dosée dans les foies, rates et fèces des rats n° 1, 2 et 3 du groupe 2 ayant reçu des billes de chitosan magnétiques CS@Al 5-10-50 et de trois rats témoins n'ayant reçu aucune bille. Les différents dosages sont comparés avec la quantité de fer introduite dans l'organisme par l'administration de ces billes. Les rats ont été gavés avec 15 billes magnétiques CS@Al 5-10-50 contenant une concentration en fer [Fe] ≈ $70*10^{-6}$ moles de fer (Figure IV-32).

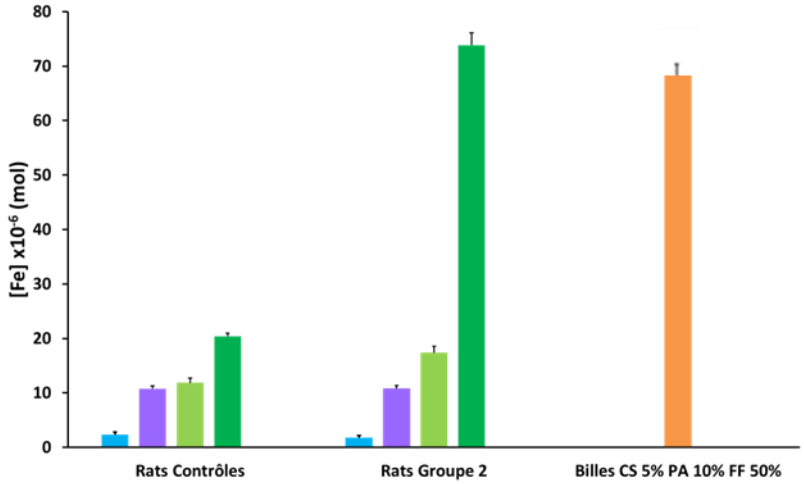


Figure IV-32 : Quantité de fer (en moles) dans ■ la rate, ■ le foie, ■ les fèces de t = 0-6h, ■ les fèces de t = 6-24h et ■ dans les 15 billes CS@Al 5-10-50 administrées aux rats du groupe 2.

Lors de l'administration par voie orale des billes magnétiques contenant les NPMs, deux situations peuvent être envisagées. Si les billes sont dégradées au cours de l'expérience, les NPMs peuvent être relarguées de ces vecteurs, traverser la membrane intestinale, rejoindre la circulation sanguine puis être accumulées dans les organes, auquel cas la concentration en fer

augmentera dans le foie et la rate. Si les billes restent intactes au cours de l'expérience, les NPMs resteront dans les vecteurs et seront évacuées par voie naturelle dans les fèces. On peut constater que la quantité de fer contenue dans les organes foie et rate des rats ayant reçu les billes magnétiques (1,78 et $10,8*10^{-6}$ mol) est similaire à celle des rats contrôles (2,36 et $10,7*10^{-6}$ mol). La quantité de fer dans les fèces pour les temps courts de 0 à 6 heures après administration des billes ($17,3*10^{-6}$ mol) est également similaire à celle trouvée chez les rats contrôles ($11,8*10^{-6}$ mol). En revanche, la concentration en fer trouvée dans les fèces de 6 à 24 heures après administration des billes ($73,8*10^{-6}$ mol) augmente très fortement en comparaison de celle trouvée pour les rats contrôles ($20,3*10^{-6}$ mol). Cette quantité de fer retrouvée dans les fèces des rats ayant reçu les billes magnétiques est proche de la quantité de fer introduite dans l'organisme par ces billes ($69,6*10^{-6}$ mol).

Il faut donc conclure que les billes de chitosan magnétiques ne sont pas dégradées au cours de l'expérience. Les NPMs ne sont pas libérées de ces vecteurs, ne rejoignent pas la circulation et ne sont pas accumulées dans les organes. Les billes et les NPMs qu'elles contiennent sont évacuées naturellement dans les fèces à des temps compris entre 6 et 24 heures après l'administration de ces billes.

5. 2. Coupes histologiques

Lors de l'étude n°5, des coupes histologiques sont réalisées à la fin de l'étude pharmacocinétique. Dans cette étude, les rats ont reçu des billes de chitosan CS@Al 5-10-50, après une mise à jeun de 12 heures. C'est dans cette situation de mise à jeun totale qu'ont été effectuées les observations histologiques. En effet, c'est dans ce cas qu'une modification de la membrane intestinale était la plus probable, les billes circulant en l'absence de bol alimentaire dans le TGI. Après le dernier prélèvement sanguin, à t + 6 heures, les rats sont sacrifiés puis différents organes sont prélevés pour observations histologiques. La grosse tubérosité de l'estomac, le jéjunum, le cæcum, le foie et la rate sont prélevés puis inclus dans de la cire de paraffine avant d'être découpés en sections d'environ 4 µm d'épaisseur, colorés puis observés au microscope (Voir Annexe 8-5).

Les observations microscopiques, effectuées par le Dr. Hélène Bertheux, anatomo-pathologiste chez Biologie Servier n'ont révélé aucune anomalie anatomique. Dans les différentes portions du TGI, estomac, jéjunum et cæcum, aucun changement occasionné par une irritation des muqueuses n'a été observé (Figure IV-33).

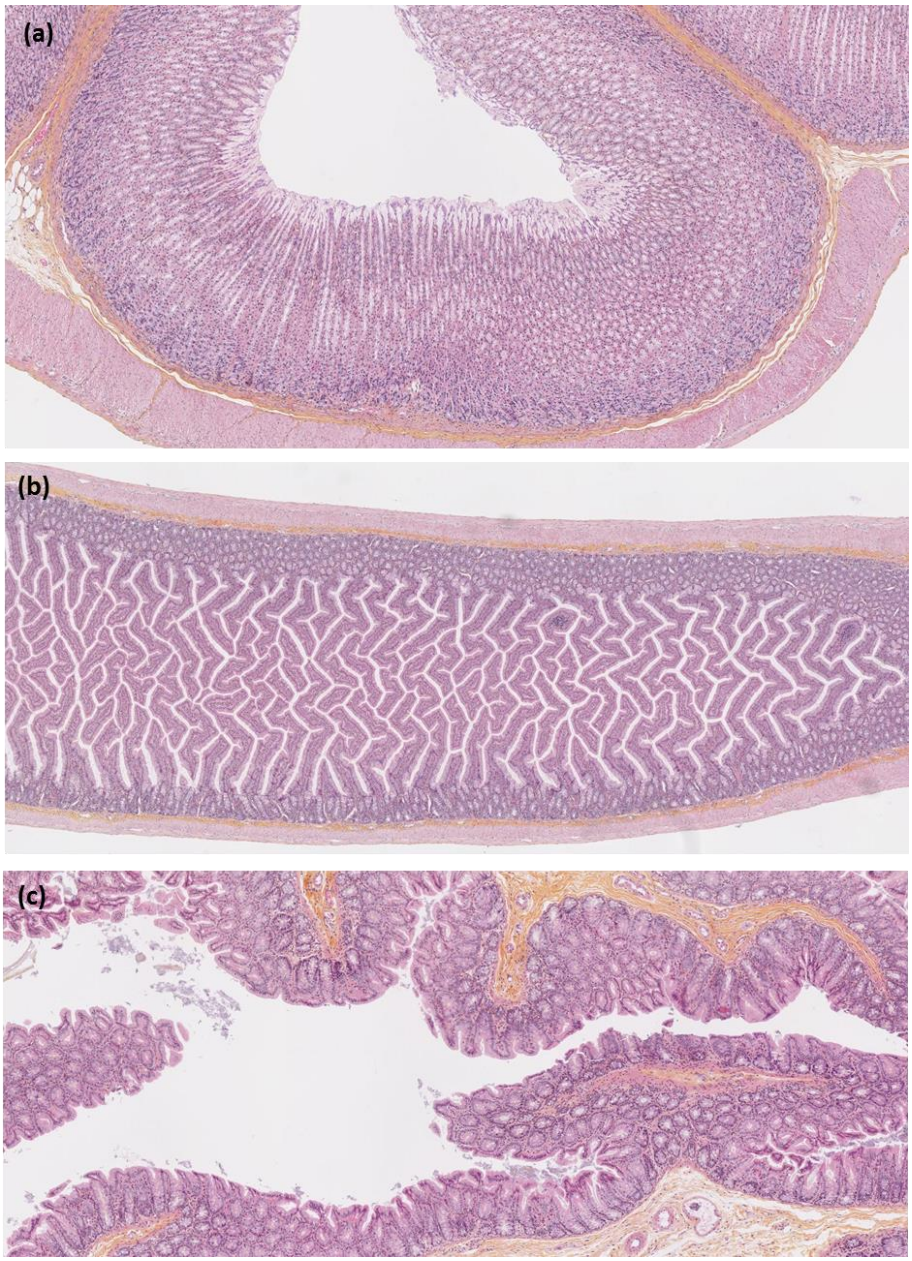


Figure IV-33 : Clichés microscopiques des coupes histologiques de (a) l'estomac, (b) le jéjunum et (c) le cæcum, grossis respectivement 5, 2,5 et 5 fois.

Dans le foie, aucune cellule positive à la coloration au bleu de Prusse (hépatocytes, cellules de Kupffer, etc…) n'a été observée. Cela indique qu'il n'y a pas d'accumulation de fer dans le foie. Dans la rate, la présence de quelques macrophages positifs à la coloration au bleu de Prusse n'a pas été considérée comme significative d'une accumulation de fer dans cet organe. Ces macrophages sont toujours présents, du fait de la dégradation des globules rouges dans cet organe (Figure IV-34).

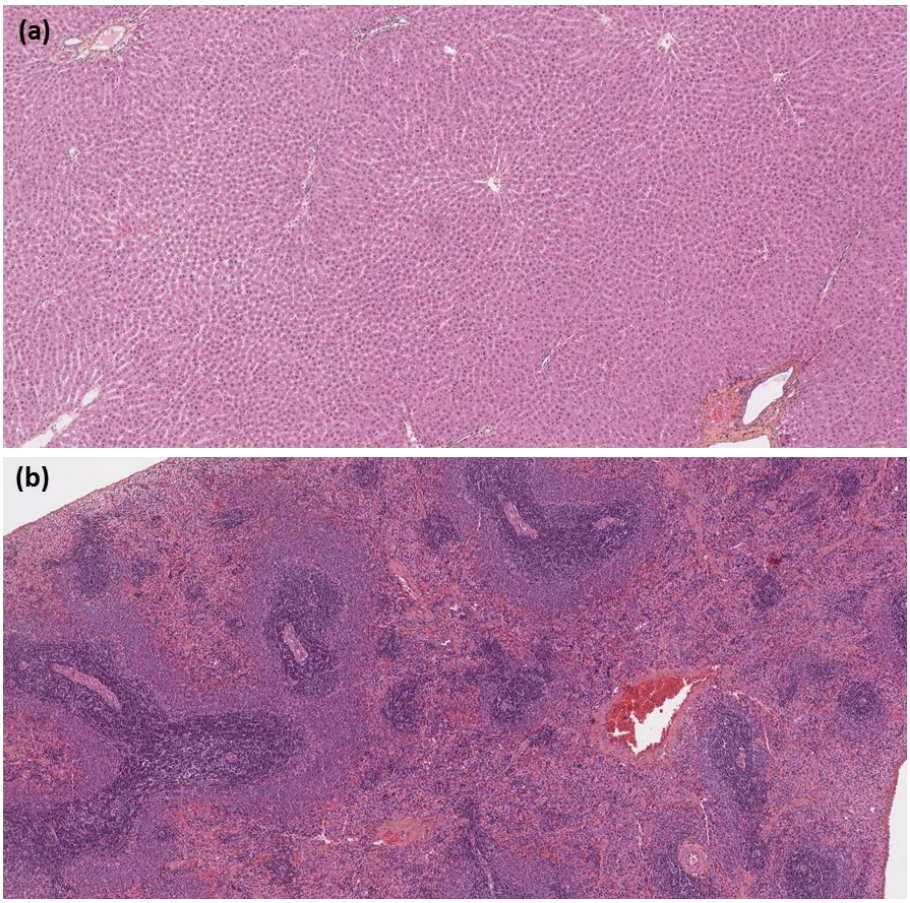


Figure IV-34 : Clichés microscopiques des coupes histologiques de (a) le foie et (b) la rate, grossis 5 fois.

En conclusion, pour les rats avec ou sans aimant, les observations microscopiques n'ont pas révélées de changements physiologiques significatifs de la muqueuse gastro-intestinale, du foie ou de la rate, indiquant une absence de toxicité ou d'accumulation des nanoparticules magnétiques contenues dans les billes magnétiques *in vivo*.

6. Comparaison générale des essais *in vivo*

Au cours des expériences *in vivo* réalisées lors de cette thèse, différentes formulations, fabriquées au laboratoire ou en process galénique ont été utilisées. Toutes ces formes ont des compositions, des tailles, des charges en nanoparticules magnétiques et en PA différentes ce qui permet l'obtention de formulations ayant diverses propriétés. La quantité de NPMs contenue dans l'objet détermine sa charge magnétique, mesurée en masse de fer (mg) par bille et détermine la valeur de l'aimantation à saturation (M_s). La charge magnétique des billes, ainsi que la puissance de l'aimant utilisé *in vivo*, conditionnent l'efficacité de la rétention

magnétique. La charge en PA couplée à la composition de la matrice et des couches externe composants les billes déterminent la cinétique de libération du PA. *In vivo*, lorsque la rétention magnétique est efficace, la cinétique de libération du PA contrôle également le passage à travers la membrane intestinale et donc la biodisponibilité du PA. Tous ces facteurs doivent donc être comparés, compris et pris en compte afin d'optimiser les futures expériences.

6. 1. Efficacité de la rétention magnétique

Pour les formes CS@Al 5-5-10 humides, CS@Al 5-10-50 humides et sèches et ASP10 25%, le moment magnétique d'une bille (en emu = 10^{-3} A.m²) en fonction du champ magnétique (en Gauss = 10^{3} A/m) a été mesuré par magnetométrie SQUID (Superconducting QUantum Interference Device) (Voir Annexe 4-3). Le moment magnétique à saturation (μ_s) matérialisé par le plateau de cette courbe peut être mesuré pour les différentes billes (Figure IV-35). μ_s = 0,00632 emu (= $0{,}632.10^{-5}$ A.m²) pour 1 bille CS@Al 5-5-10 humide ; μ_s = 0,0339 emu (= $0{,}339.10^{-4}$ A.m²) pour 1 bille CS@Al 5-10-50 humide ; μ_s = 0,0347 emu (= $0{,}347.10^{-4}$ A.m²) pour 1 bille CS@Al 5-10-50 sèche et μ_s = 0,00587 emu (= $0{,}587.10^{-5}$ A.m²) pour 1 bille ASP10 25%. La valeur de l'aimantation à saturation a été corrélée aux dosages de fer par voie chimique. μ_s dépend uniquement de la quantité de NPMs et donc d'oxyde de fer contenue dans les billes (Figure IV-36). μ_s augmente lorsque la quantité de NPMs contenue dans 1 bille augmente (m(Fe) = 0,0832 mg pour 1 bille CS@Al 5-10-50 ; m(Fe) = 0,368 mg pour 1 bille CS@Al 5-10-50 et m(Fe) = 0,103 mg pour 1 bille ASP10 25%). μ_s est constant pour les billes CS@Al 5-10-50, humide et sèche, contenant la même quantité de NPMs mais différant en taille et en structure matricielle.

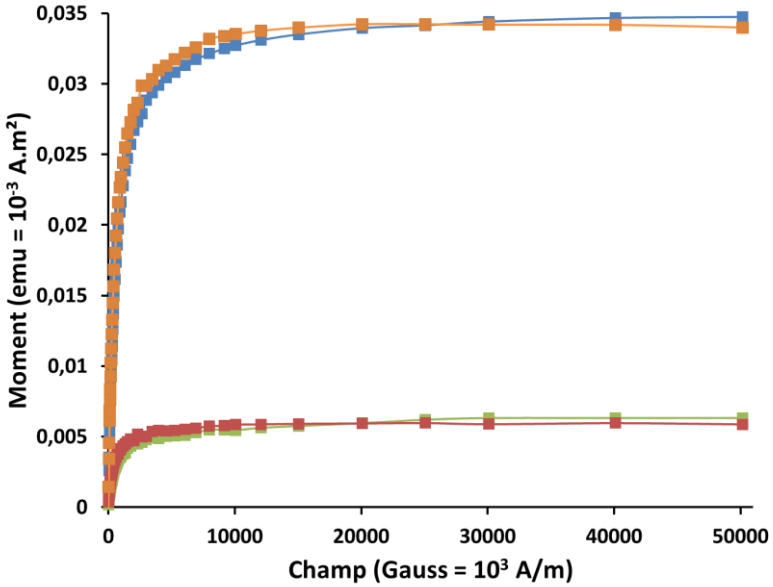


Figure VI-35 : Graphique représentant le moment magnétique (en emu) des billes ■ CS@Al 5-5-10 humide, ■ CS@Al 5-10-50 humide, ■ CS@Al 5-10-50 sèche et ■ ASP10 25% en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

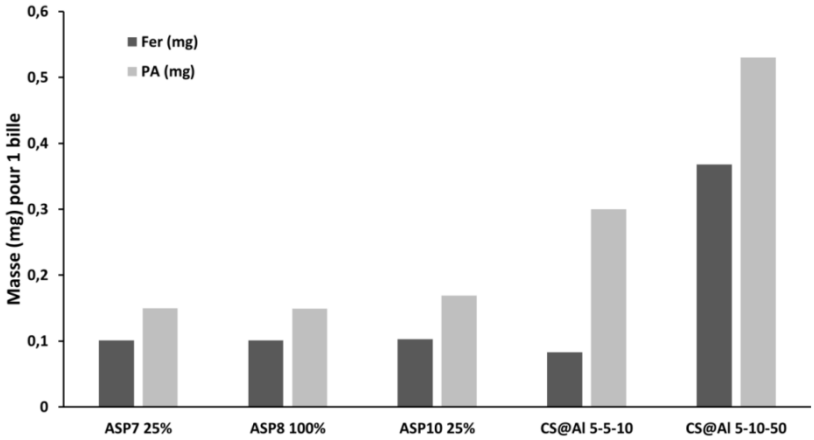


Figure VI-36 : Graphique représentant la masse (en mg) ■ de fer et ■ de PA pour les formulations ASP7 25%, ASP8 100%, ASP10 25%, CS@Al 5-10-50 et CS@Al 5-10-50.

On peut également s'intéresser au moment magnétique à saturation rapportée à la masse des objets. Cette valeur M_s, l'aimantation à saturation (= μ_s/masse en emu/g ou en 10^{-3} A.m²/g) est plus représentative du pouvoir d'aimantation d'une bille. Pour les formes CS@Al 5-5-10 humides, CS@Al 5-10-50 humides et sèches et ASP10 25%, l'aimantation à saturation peut être calculée en divisant la valeur de μ_s par la masse d'une bille (Figure IV-37). Les billes CS@Al 5-5-10 humides, CS@Al 5-10-50 humides, CS@Al 5-10-50 sèches et ASP10 25% pèsent respectivement 8 ; 8 ; 1,3 et 1 mg et ont une aimantation à saturation $M_s = 0{,}79.10^{-3}$ A.m²/g pour 1 bille CS@Al 5-5-10 humide ; $M_s = 4{,}25.10^{-3}$ A.m²/g pour 1 bille CS@Al 5-10-50 humide ; $M_s = 23{,}1.10^{-3}$ A.m²/g pour 1 bille CS@Al 5-10-50 sèche et $M_s = 5{,}88.10^{-3}$

A.m²/g pour 1 bille ASP10 25%. La valeur de M_s dépend de la quantité de NPMs contenue dans une bille mais aussi de la masse de cette bille. Par exemple, M_s est beaucoup plus importante pour la bille CS@Al 5-10-50 sèche que pour la même bille CS@Al 5-10-50 humide, en effet, elles contiennent la même quantité de NPMs mais sont de masses différentes.

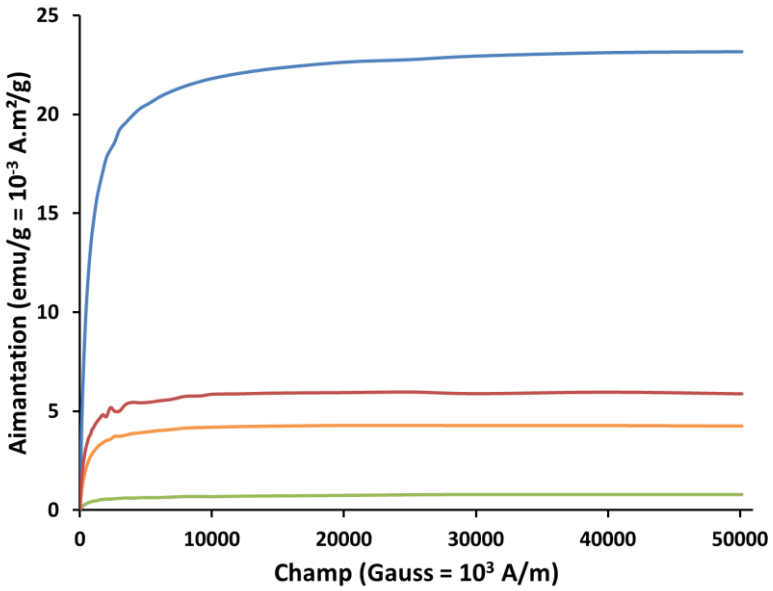


Figure IV-37 : Graphique représentant l'aimantation (en emu/g) des billes ■ CS 5-5-10 humides, ■ CS 5-10-50 humides, ■ CS 5-10-50 sèches et ■ ASP10 25% en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss).

Lors des essais de rétention magnétique *in vivo*, les billes magnétiques circulent dans l'intestin et sont soumises aux forces exercées sur elles par la vidange gastrique et le péristaltisme. Cette pression gastrique sert à faire avancer les objets dans le tube digestif afin de permettre leur digestion. La force gastrique $\vec{F}_{gastrique}$ exercée sur la bille dépend donc de cette pression gastrique et de la taille de la bille. En effet, cette force est une force de frottement ; plus l'objet est petit, moins il subit l'influence de cette force le poussant à circuler dans le tube digestif. Au moment où les billes magnétiques se trouvent à l'endroit situé dans l'intestin à l'aplomb de l'aimant, elles subissent la force magnétique exercée par l'aimant. Cette force dépend de la puissance de l'aimant à la distance où se trouvent les billes et de la charge magnétique de celles-ci, c'est-à-dire de leur moment magnétique à saturation (Figure IV-38).

Pour que les billes soient soumises à la rétention magnétique, il faut que la force magnétique exercée par l'aimant contrebalance la force gastrique exercée par le milieu. On peut dire, en

première approximation, que si $\vec{F}_{magnétique} < \vec{F}_{gastrique}$ les billes seront plus sensibles aux forces de frottement et la rétention magnétique ne sera pas efficace et si $\vec{F}_{magnétique} > \vec{F}_{gastrique}$ les billes seront plus sensibles à la force d'attraction de l'aimant, elles seront accumulées à l'aplomb de la position de celui-ci et la rétention magnétique sera efficace.

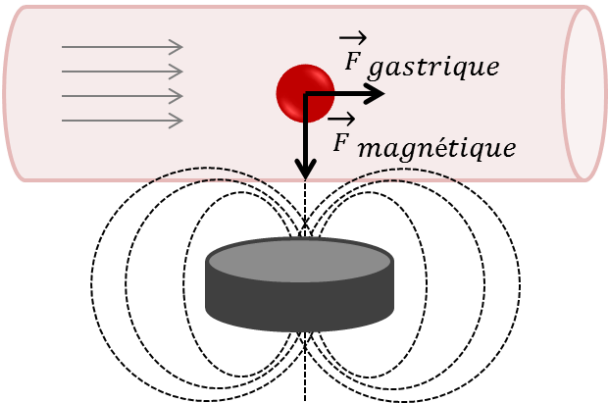


Figure VI-38 : Circulation d'une bille dans l'intestin soumise aux forces gastrique et magnétique.

La pression de vidange gastrique chez un rat à jeun vaut [4]:

$$P_{gastrique} = 50.10^{-5}\ N/cm^2$$
$$F_{gastrique} = P_{gastrique}.S$$
$$F_{gastrique} = 50.10^{-5}.\pi.r^2$$

avec $P_{gastrique}$, la pression exercée par le flux gastrique et S la surface et r le rayon de l'objet considéré, ici la surface de la bille est assimilée à un cercle.

Pour une bille humide de diamètre 2 mm, r = 0,1 cm, alors S = 0,125 cm² et :

$$F_{gastrique} = 1{,}57.10^{-5}\ N$$

Pour une bille sèche de diamètre 1 mm, r = 0,05 cm, alors S = 0,125 cm² et :

$$F_{gastrique} = 3{,}9.10^{-6}\ N$$

Par ailleurs, la force magnétique d'un objet dans un gradient de champ exercé par un aimant externe est :

$$\overrightarrow{F_{magnétique}} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$
$$\overrightarrow{F_{magnétique,z}} = \mu_z.\frac{dB_z}{d_z}$$

avec : μ_z le moment magnétique d'une bille soumise à un champ $\overrightarrow{B_z}$ à une certaine distance z.

On sait que lors des essais *in vivo*, la distance entre l'aimant positionné en externe sur l'abdomen du rat et l'intestin est d'environ 5 mm. On se place donc pour les calculs dans une situation où z = 5 mm.

La dérivée au point z, $\frac{dB_z}{d_z}$, est la pente de la courbe du champ exercé par l'aimant à une distance de 5 mm. Cette valeur est déterminée sur les courbes de décroissance du champ magnétique des deux aimants ayant été utilisés lors des études *in vivo* (Figure IV-1) :

- Aimant (Ø = 25 mm, h = 3 mm) :

  Champ magnétique = 420 Gauss à 5 mm :

  $\frac{dB_z}{d_z}$ = 8,5 T/m

- Aimant (Ø = 20 mm, h = 10 mm) :

  Champ magnétique = 611 Gauss à 5 mm :

  $\frac{dB_z}{d_z}$ = 11,9 T/m

avec 1 Gauss = 0,0001 Tesla

Le moment magnétique μ_z d'une bille soumise à un champ $\overrightarrow{B_z}$ à une certaine distance z est lu sur les courbes d'aimantation, $\mu = f(\vec{H})$, (Figure IV-39). Dans ce cas, afin de déterminer le moment d'une bille soumise à l'action de l'aimant (Ø = 25 mm, h = 3 mm) exerçant un champ magnétique = 420 Gauss à 5 mm, la valeur du moment (en ordonnée) est lue en se plaçant à une valeur de champ appliqué = 420 Gauss (en abscisse). De même, afin de déterminer le moment d'une bille soumise à l'action de l'aimant (Ø = 20 mm, h = 10 mm) exerçant un champ magnétique = 611 Gauss à 5 mm, la valeur du moment (en ordonnée) est lue en se plaçant à une valeur de champ appliqué = 611 Gauss (en abscisse).

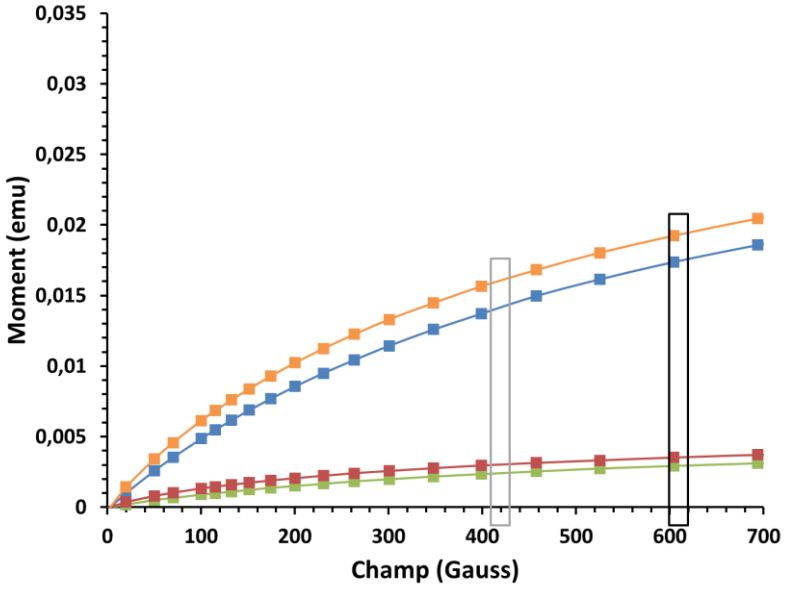


Figure VI-39 : Graphique représentant le moment magnétique (en emu) des billes ■ CS 5-5-10 humides, ■ CS 5-10-50 humides, ■ CS 5-10-50 sèches et ■ ASP10 en fonction du champ magnétique appliqué (en Gauss) ; aux valeurs de champ des aimant □ 420 Gauss et □ 611 Gauss.

Grâce aux valeurs de µz et de $\frac{dB_z}{d_z}$ déterminées expérimentalement, il est possible de calculer pour les différentes études *in vivo*, les valeurs de la force magnétique $\vec{F}_{magnétique}$ qui dépendent de la puissance de l'aimant et de la charge en NPMs des billes (Tableau IV-10).

	Bille magnétique				Aimant			
Etude n°	Nom	Ø (mm)	μ_z (10^{-3} A.m²)	$\vec{F}_{gastrique}$ (N)	Dimension (mm)	Champ magnétique à 5 mm (Gauss)	dB_z/d_z (T/m)	$\vec{F}_{magnétique}$ (N)
1	CS@Al 5-5-10 humide	2	0,00235	$1,57*10^{-5}$	(Ø = 25, h = 3)	420	8,5	$1,99*10^{-5}$
2	CS@Al 5-10-50 humide	2	0,0156	$1,57*10^{-5}$	(Ø = 25, h = 3)	420	8,5	$1,32*10^{-4}$
3 - 4 - 5	CS@Al 5-10-50 sèche	1	0,0192	$3,9*10^{-6}$	(Ø = 20, h = 10)	611	11,9	$2,28*10^{-4}$
6	ASP10 25%	1	0,00352	$3,9*10^{-6}$	(Ø = 20, h = 10)	611	11,9	$4,18*10^{-5}$

Tableau IV-10 : Tableau représentant les valeurs des différents paramètres (Ø, μ_z, $F_{gastrique}$) des billes magnétique et (dimension, champ magnétique exercé, pente à 5 mm et $F_{magnétique}$) des aimants dans les différentes études.

Les valeurs des forces gastrique et magnétique peuvent être comparées. En effet, même si ces forces ne sont pas orientées dans la même direction, les ordres de grandeur peuvent être comparés. On peut constater que pour l'étude n° 1 où la rétention magnétique n'a pas été efficace, les deux forces sont du même ordre de grandeur (10^{-5} N). Pour l'étude n° 2 où la rétention magnétique a été assez efficace, la force magnétique est supérieure à la force gastrique d'environ un ordre de grandeur (10^{-4} *vs* 10^{-5} N). Pour les études n° 3, 4 et 5 où la rétention magnétique a été très efficace, la force magnétique est supérieure à la force gastrique d'environ deux ordres de grandeur (10^{-4} *vs* 10^{-6} N). Il est donc intéressant de voir que l'efficacité de la rétention magnétique semble régie par le rapport entre ces deux forces. Ces forces sont elles-mêmes dépendantes des caractéristiques inhérentes aux vecteurs magnétiques, comme leur taille et leur charge en NPMs, ainsi que de la puissance de l'aimant utilisé pour provoquer la rétention magnétique. Plus les billes sont de petite taille, moins elles seront soumises aux forces gastriques et plus elles sont chargées en NPMs, plus elles seront sensibles à la rétention magnétique. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre la taille et de la charge magnétique des objets afin d'avoir une rétention magnétique la plus efficace possible.

6. 2. Cinétique de libération du PA

Lors des essais *in vivo*, l'influence de la cinétique de libération du PA a été étudiée. Les formes choisies pour être testées ont des charges en NPMs et en PA similaires. La différence vient de la cinétique de libération du PA, contrôlée par la couche externe fonctionnelle (pour les mini-granules ASP7, ASP8 et ASP10). Les mini-granules ASP7 avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (ASP7 25%), ASP8 avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 100% (ASP8 100%) et ASP10 avec une couche fonctionnelle pulvérisée à 25% (ASP10 25%) sont les mini-granules magnétiques ayant été testées lors de la dernière étude *in vivo*. Ces formes ont été comparées à la forme de référence préparée au laboratoire, les billes de chitosan magnétiques sèches (CS@Al 5-10-50). La cinétique de libération du PA dans la dose de mini-granules administrée aux rats *in vivo* a été testée à différents pH (Figure IV-40). A pH = 6,8, pH du milieu intestinal ; à pH = 2, pH du milieu stomacal et dans un milieu de dissolution bio relevant, le FeSSIF à pH = 5, représentatif d'un état de mise à jeun partiel

(Voir Annexes 3-4). Ces cinétiques sont testées pour des masses de 60 mg de mini-granules ASP7 25% (Figure IV-40 (a)) ; 50 mg de mini-granules ASP8 100% (Figure IV-40 (b)) ; 50 mg de mini-granules ASP10 25% (Figure IV-40 (c)) et pour 15 billes CS@Al 5-10-50 sèches (Figure IV-40 (d)).

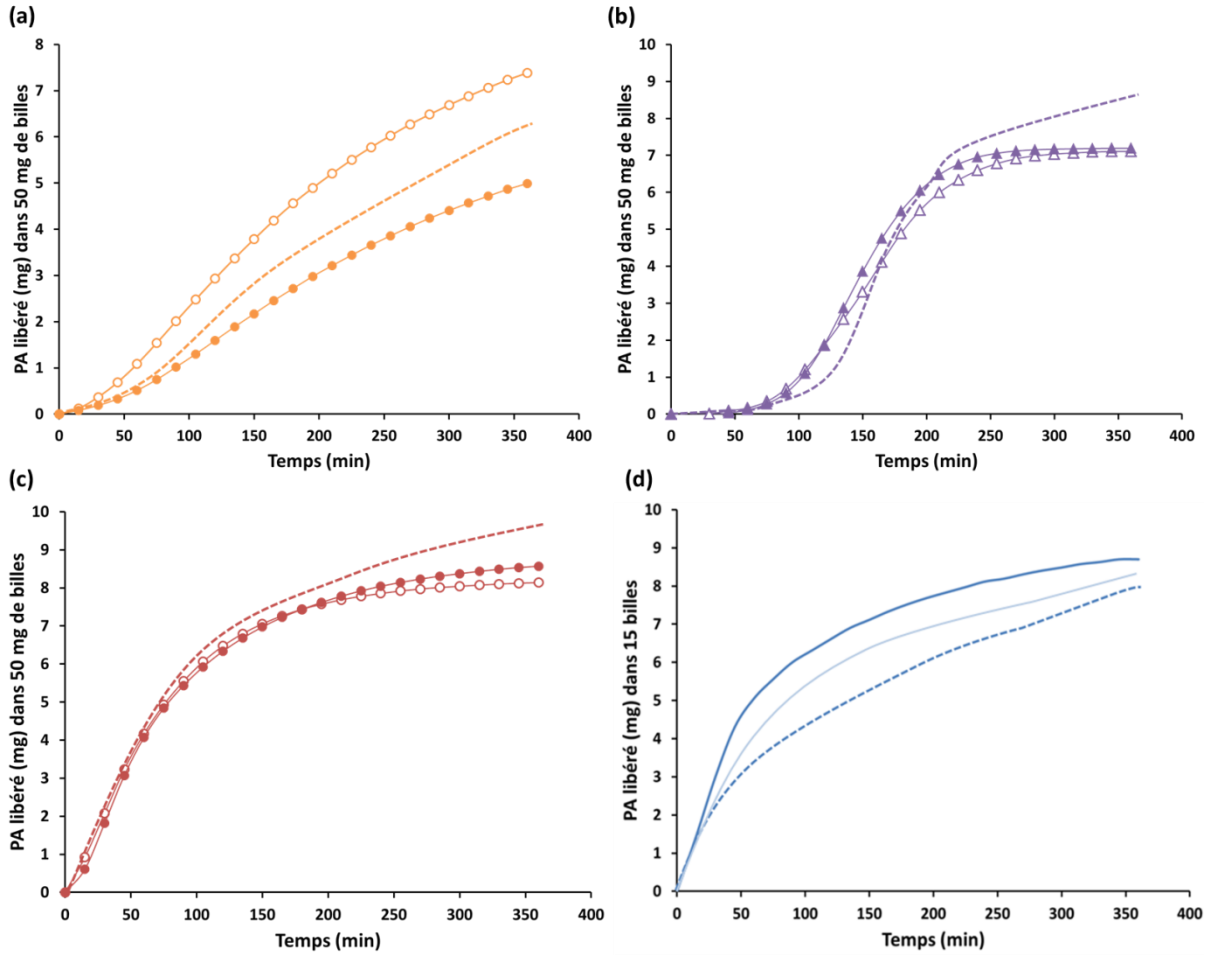


Figure VI-40 : Courbe de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les formes magnétiques (a) 60 mg ASP7 25% à pH = 6,8 (●), pH = 2 (○) et dans FeSSIF (---) ; (b) 50 mg ASP8 100% à pH = 6,8 (▲), pH = 2 (△) et dans FeSSIF (---) ; (c) 50 mg ASP10 25% à pH = 6,8 (●), pH = 2 (○) et dans FeSSIF (---) et (d) 15 billes CS@Al 5-10-50 sèches à pH = 6,8 (—), pH = 2 (—) et dans FeSSIF (---).

Après avoir fait les moyennes des temps de relargage en bain de dissolution grâce aux courbes à pH = 6,8 ; pH = 2 et dans le milieu bio relevant, le FeSSIF à pH = 5 (Figure IV-41) ; on compare les profils de libération du PA pour les différentes formes. On peut voir que ASP10 25% suit le même profil de relargage que les billes CS@Al 5-10-50 sèches, ASP7 25% suit un profil linéaire et ASP8 100% suit un profil sigmoïde de relargage rapide après un temps de latence de 1 heure 30. Ces quatre formes relarguent la même quantité de PA (8 mg sel = 6,2

mg base) à t + 6 heures (temps de manipulation *in vivo*). La seule différence vient donc de la cinétique de relargage pour ASP7 25%, ASP8 100% et ASP10 25%. Entre ASP10 25% et CS@Al 5-10-50 sèches, le profil de libération du PA est le même, mais c'est la forme qui change : mini-granules magnétiques fabriquées en process galénique *vs* billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques.

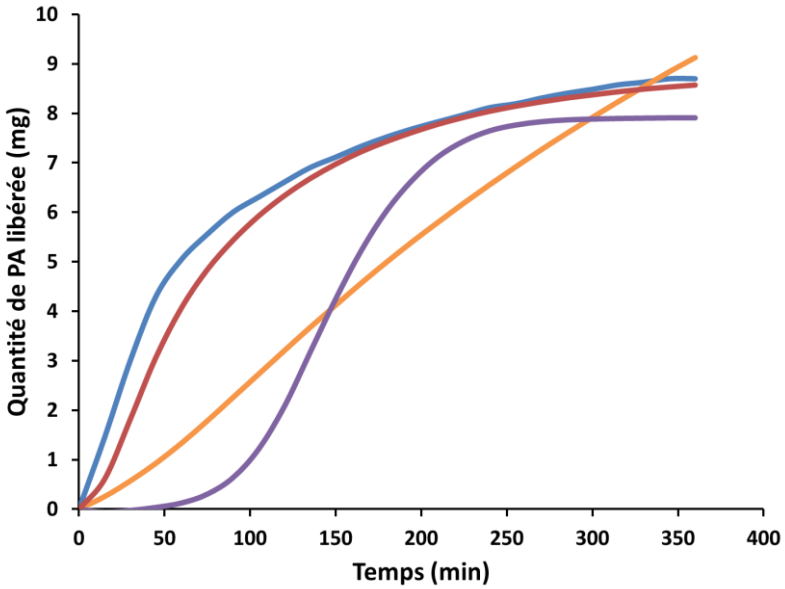


Figure IV-41 : Courbes de cinétique de libération du PA (mg) en fonction du temps (min) pour les formes ■ 15 billes CS@Al 5-10-50 sèches, ■ 60 mg ASP7 25%, ■ 50 mg ASP8 100% et ■ 50 mg ASP10 25%.

On compare les paramètres obtenus lors des études pharmacocinétiques : la concentration maximale C_{max} et l'aire sous la courbe normalisée par le temps AUC_t représentant la biodisponibilité du PA pour le PA administré libre en solution et les formes CS@Al 5-10-50 sèches (15 billes) ; ASP7 25% (60 mg) ; ASP8 100% (50 mg) et ASP10 25% (50 mg). (Tableau IV-11). Lors de ces études, la dose de PA administrée est la même (20 mg/kg), ce qui correspond à 8 mg de PA/rat à t + 6 heures après administration des billes. Pour ces quatre formes ayant délivré la même dose de PA, les valeurs de C_{max} et d'$AUCt_{0\text{-}6h}$ sont très différentes. On peut constater que pour deux formes ayant des compositions différentes mais des cinétiques de relargage similaires, CS@Al 5-10-50 et ASP10 25%, les valeurs de C_{max} et d'$AUCt_{=6h}$ sont similaires lors de l'administration de billes avec aimant (31,2 *vs* 29,4 ng/mL et 64,3 *vs* 64,1 h*ng/mL) ou sans aimant (9,7 *vs* 11,5 ng/mL et 26,2 *vs* 35,2 h*ng/mL). En revanche, si on compare ASP7 25% ; ASP8 100% et ASP10 25%, qui sont des formes ayant des compositions similaires mais des cinétiques de relargage du PA différentes, on trouve des

valeurs de C_{max} et d'$AUCt_{=6h}$ très différentes. Pour les mini-granules ASP7 25% et ASP8 100%, malgré l'efficacité de la rétention magnétique, le passage du PA dans la circulation sanguine n'est pas amélioré. En effet, si on compare les valeurs de l'$AUCt_{0\text{-}6h}$, représentant l'exposition au PA pour les formes administrées avec ou sans aimant, les valeurs sont améliorées grâce à la rétention magnétique ; 18,4 *vs* 5,6 h*ng/mL pour ASP7 25% et 11,3 *vs* 3,28 h*ng/mL pour ASP8 100%. L'$AUCt_{=6h}$ est améliorée d'un facteur 3 lors de l'utilisation de la rétention magnétique, c'est-à-dire que la biodisponibilité relative du PA est triplée pour ces formes, de façon similaire aux formes CS@Al 5-10-50 sèches et ASP10 25%. En revanche, si on compare ces valeurs à celle de l'$AUCt_{=6h}$ du PA dans le cas d'une administration libre en solution, on peut voir que la formulation du PA dans les mini-granules magnétiques ASP7 et ASP8 ayant des cinétiques de relargage différentes, provoque une diminution de la quantité de PA passée dans le plasma, même lors de l'utilisation de la rétention magnétique. On peut voir que les valeurs de l'$AUCt_{=6h}$ ne sont que de 18,4 et 11,3 h*ng/mL pour ASP7 25% et ASP8 100% avec aimant contre 40 h*ng/mL pour le PA administré libre en solution.

Dose = 20 mg/kg		PA libre normalisé à t+6h	CS@Al 5-10-50 sèches	CS@Al 5-10-50 sèches	ASP7 25%	ASP7 25%	ASP8 100%	ASP8 100%	ASP10 25%	ASP10 25%
Paramètre	Unité	-	AVEC AIMANT	SANS AIMANT	AVEC AIMANT	SANS AIMANT	AVEC AIMANT	SANS AIMANT	AVEC AIMANT	SANS AIMANT
C_{max}	ng/mL	10,2	31,2	9,7	6,42	4,2	4,66	1,82	29,4	11,5
$AUC_{t=6h}$	h*ng/mL	40	64,3	26,2	18,4	5,6	11,3	3,28	64,1	35,2

Tableau IV-11 : Tableau récapitulatif des paramètres pharmacocinétiques C_{max} et AUC_t de passage du PA dans le sang pour le PA administré libre en solution et les formes CS@Al 5-10-50 sèches ; ASP7 25% ; ASP8 100% et ASP10 25%.

Cela signifie que la rétention magnétique seule ne suffit pas à améliorer la biodisponibilité du PA. Même si cette rétention est efficace et que les billes sont accumulées et retenues dans l'intestin, il est nécessaire d'avoir une cinétique de libération du PA adaptée afin de provoquer une amélioration du passage de ce PA dans le sang et donc une augmentation de sa biodisponibilité.

Bibliographie

[1] Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison G. *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm Res **1995**;12:413–20.

[2] Lindenberg M, Kopp S, Dressman JJB. *Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system*. Eur J Pharm Biopharm **2004**;58:265–78.

[3] Rümenapp C, Gleich B, Haase A. *Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics*. Pharm Res **2012**;29:1165–79.

[4] Laulicht B, Tripathi A, Schlageter V, Kucera P, Mathiowitz E. *Understanding gastric forces calculated from high-resolution pill tracking*. PNAS **2010**;107:8201–6.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, l'effet de la rétention magnétique sur la biodisponibilité d'un principe actif modèle peu perméable a été étudié. L'utilisation de formes galéniques magnétiques, contenant des nanoparticules d'oxyde de fer, a permis leur accumulation à un endroit ciblé dans le tractus gastro-intestinal, grâce à l'utilisation d'un aimant externe exerçant une force magnétique.

Dans un premier temps, des formulations magnétiques à l'échelle du laboratoire ont été mises au point afin de répondre aux différentes contraintes imposées par les expériences *ex vivo* et *in vivo*. Les billes cœur-couronne de chitosan-alginate magnétiques se sont avérées être les objets répondant le mieux au cahier des charges. Ces billes permettent une encapsulation élevée du principe actif (75%) et une encapsulation totale des nanoparticules magnétiques (100%). Leurs cinétiques de libération du principe actif sont également adaptées aux futures expériences, sur des temps de deux heures pour les billes humides ou six heures pour les billes sèches. Dans un second temps, la fabrication de formes magnétiques de taille millimétrique a été transférée à l'échelle industrielle. Des mini-granules magnétiques ont été préparées grâce à une technique d'extrusion-sphéronisation permettant de fabriquer le cœur magnétique des mini-granules. Puis une technique de montage en lit d'air fluidisé a permis de déposer des couches fonctionnelles à la surface de ces mini-granules permettant un contrôle fin de leurs cinétiques de relargage du principe actif. Le passage à la fabrication à l'échelle industrielle a été effectué avec succès et a permis d'obtenir des mini-granules magnétiques similaires aux billes magnétiques de par leurs compositions et leurs caractéristiques physico-chimiques et magnétiques.

Une fois les formes magnétiques mises au point, des expériences *ex vivo* ont été menées. Des cellules de Ussing utilisant une membrane intestinale de rat comme modèle membranaire ont été utilisées afin de valider la preuve de concept de rétention magnétique. Dans ces essais, il a été possible de retenir des billes magnétiques de diamètre 2 millimètres en contact avec la membrane modèle à l'aide d'un aimant externe placé à une distance importante du site de rétention (3,5 cm) et exerçant donc une force magnétique relativement faible (gradient de champ = 2 T/m). Lors de ces expériences, le passage cumulé du principe actif a été mesuré au

cours du temps. Le passage cumulé représentant la quantité de principe actif passée à travers la membrane intestinale en fonction du temps a été multiplié par trois lors de l'utilisation de la rétention magnétique. Ces expériences ont également permis d'introduire un nouveau concept d'augmentation du passage grâce à une surconcentration locale du principe actif au niveau de sa zone d'absorption. Ce système se démarque des études précédentes ayant été menées sur les différentes formulations gastro-rétentives. En effet, l'utilisation de formes gastro-rétentives permet un passage des principes actifs augmenté grâce à un temps de rétention prolongé dans l'estomac mais pas à une augmentation dans la quantité absorbée à un temps donné.

Ce concept a pu être testé lors d'expériences *ex vivo* et *in vivo* sur le petit animal. Dans ces études, le rat a été choisi comme modèle. Après divers essais de mise au point de la rétention magnétique, des résultats très positifs et corrélés aux résultats des expériences *ex vivo* ont été obtenus. Lors de l'utilisation des formes magnétiques de taille millimétrique, la quantité de principe actif passée à travers la membrane intestinale pour rejoindre la circulation sanguine systémique a été multipliée par trois. L'originalité de cette étude repose également sur la combinaison des études pharmacocinétiques et de différentes techniques d'imagerie ayant été utilisées pour le suivi des formulations dans le tractus gastro-intestinal. En effet, si on se réfère aux études antérieures, des formulations magnétiques ont déjà été utilisées pour le suivi par imagerie des forces de digestion ou pour la rétention afin d'augmenter la biodisponibilité d'une molécule active mais le suivi de la rétention n'avait à notre connaissance jamais été réalisé.

Dans cette thèse, la rétention magnétique a été mise au point en utilisant des petits aimants positionnés en externe (sur l'abdomen de l'animal) et des formes magnétiques contenant des nanoparticules de maghémite biocompatibles. Les formes magnétiques étudiées au cours de ce travail sont de taille millimétrique ce qui les rend plus sensibles aux contractions péristaltiques provoquant *in fine* leur circulation dans le tractus gastro-intestinal puis leur élimination dans les fèces. Cet aspect diffère des formes micro et nanométriques développées dans la littérature pour lesquelles les interactions avec les membranes sont plus fortes ce qui permet des temps de rétention plus importants mais peut provoquer leur accumulation dans des organes internes tels que le foie et la rate. En termes de toxicité les formulations millimétriques sont donc avantageuses. Cela permet d'envisager des applications à l'échelle humaine pour le ciblage d'organes superficiels.

Les différentes études pharmacocinétiques ont également permis de comparer l'effet de la rétention magnétique sur la biodisponibilité du principe actif pour des objets présentant des caractéristiques magnétiques identiques mais des cinétiques de libération du principe actif très différentes. Grâce à la mise au point de différentes formulations magnétiques, présentant des profils de libération du principe actif variés, il a pu être montré qu'il devait exister un compromis entre la charge magnétique et le profil de libération des objets. En effet, une rétention magnétique efficace n'est pas la seule condition nécessaire à l'augmentation de la biodisponibilité du principe actif par surconcentration au niveau de sa fenêtre d'absorption. La cinétique de libération du principe est également un paramètre crucial.

Si la cinétique de libération du principe actif est conditionnée par un processus diffusif simple, des études plus fondamentales permettant de modéliser cette libération à partir d'images de la structure des billes peuvent être envisagées. Des études en tomographie des rayons X pourraient permettre cette modélisation.

Pour une étude plus poussée de l'effet de la rétention magnétique et de son impact sur le passage membranaire d'un principe actif, de nouvelles études par imagerie devront être effectuées. Le suivi et l'accumulation des formes magnétiques ont pu être réalisés grâce à des études par imagerie par résonance magnétique ou par fluorescence dans le proche infra-rouge. Le suivi du passage du principe actif a quant à lui été mesuré grâce aux études pharmacocinétiques. En revanche, un suivi simultané des formes et du principe actif n'a pas encore été réalisé. Ce suivi peut être réalisé grâce à un marquage radioactif du principe actif couplé à un marquage radio-opaque de la forme. Dans ce cas, la progression des formes dans le tractus gastro-intestinal et le suivi de la libération *in vivo* du principe actif pourraient être effectués conjointement sur un appareil tel que le SPECT-CT. Des essais préliminaires ont été réalisés au Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA) à Orléans avec le Dr. Alain Le Pape.

La rétention magnétique de formes millimétriques provoque une surconcentration du principe actif permettant une délivrance ciblée dans l'intestin. Cette technique permet donc une augmentation rapide du passage du principe actif. On peut envisager son utilisation pour des molécules actives ne répondant pas aux stratégies gastro-rétentives classiques (molécules dégradées dans l'estomac) ou nécessitant un passage ciblé s'effectuant sur des temps courts (agents anti-cancéreux).

Pour finir, une des propriétés physiques des nanoparticules n'a pas été exploitée lors de cette étude. Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées en hyperthermie. En effet, l'application d'un champ magnétique oscillant provoque des oscillations du moment magnétique des nanoparticules. L'énergie magnétique ainsi générée est transformée en énergie thermique pouvant provoquer un échauffement local. On pourrait donc penser à un système tri-modal basé sur les différentes propriétés des nanoparticules magnétiques. Ce vecteur magnétique pourrait être suivi en imagerie par résonance magnétique, guidé et/ou retenu grâce à une force magnétique et enfin permettre un relargage totalement contrôlé du principe actif par échauffement local par hyperthermie.

Annexes

ANNEXE 1 : Synthèse des nanoparticules de maghémite

Les nanoparticules d'oxyde de fer entrant dans la composition des différentes formulations de billes magnétiques utilisées pour les études de rétention magnétique sont des nanoparticules de maghémite (γ-Fe_2O_3).

Ces nanoparticules ont été synthétisées grâce au procédé Massart de co-précipitation de sels de Fer II et de Fer III.

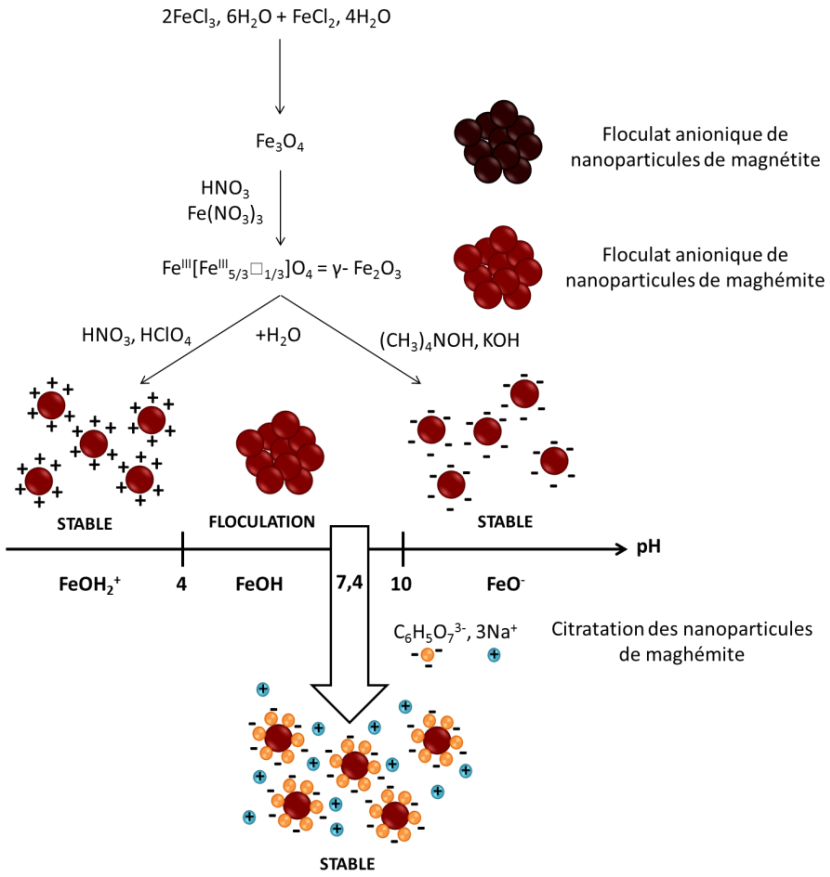


Figure A1-1 : Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par procédé Massart.

Réactifs

-Chlorure ferreux
-Chlorure ferrique
-Ammoniac
-Nitrate ferrique
-Acide nitrique
-Citrate de sodium

1. Nanoparticules nues stabilisées à pH acide

Co-précipitation

-Préparer une solution de chlorure ferreux en solubilisant 180 g de $FeCl_2$ (1,42 mol) dans 100 mL d'acide chlorhydrique (12 M) puis compléter avec 500 mL d'eau distillée.

-Préparer 3 L d'une solution de chlorure ferrique en versant 715 mL de $FeCl_3$ (2,17 M) dans de l'eau distillée.

-Mélanger les deux solutions à l'aide d'un moteur (800 tours/min).

-Ajouter rapidement 1 L d'ammoniac (11 M).

-Agiter pendant 30 minutes puis décanter sur plaques magnétiques et aspirer le surnageant.

→ Obtention des grains de magnétite Fe_3O_4.

-Laver le précipité 1 L d'eau distillée puis décanter sur plaques magnétique et aspirer le surnageant.

Passage en milieu acide

-Ajouter 360 mL d'acide nitrique (52,5 %) et compléter le volume à 2 L avec de l'eau distillée.

-Agiter 30 minutes puis décanter sur plaques magnétiques et aspirer le surnageant.

Oxydation

-Préparer une solution bouillante de nitrate ferrique en solubilisant 323 g de $Fe(NO_3)_3$ dans 800 mL d'eau distillée et porter à ébullition.

-Ajouter cette solution au précipité.

-Chauffer en agitant pendant 30 minutes puis décanter sur plaques magnétiques et aspirer le surnageant.

→ Obtention des nanoparticules de maghémite γ-Fe_2O_3.

Passage en milieu acide

-Ajouter 2 L d'eau distillée.

-Ajouter 360 mL d'acide nitrique (52,5 %).

-Agiter 10 minutes puis décanter sur plaques magnétiques et aspirer le surnageant.

-Laver le précipité 3 fois avec 1 L d'acétone et 2 fois avec 500 mL d'éther.

Dispersion finale

-Ajouter au précipité 1 L d'eau distillée pour le ferrofluide classique (FFAS1), 500 mL pour le ferrofluide concentré (FFAS2).

-Evaporer l'éther résiduel par chauffage léger.

→ Obtention d'un ferrofluide acide correspondant à des nanoparticules nues de maghémite γ-Fe_2O_3 stabilisées à pH acide.

2. Nanoparticules citratées stabilisées à pH neutre

Afin de stabiliser les nanoparticules à pH = 7, du citrate de sodium est utilisé comme complexant des atomes de fer de surface. Pour que la complexation de la surface des nanoparticules par les ions citrates soit réussi, il faut que le citrate de sodium soit ajouté dans les proportions :

$$\frac{n_{Citrate}}{n_{Fer}} = 0{,}13$$

Citratation d'un volume V de ferrofluide

-Calculer la quantité adéquate de citrate de sodium à ajouter.

-Ajouter le citrate de sodium aux nanoparticules dans l'eau stabilisée à pH acide.

-Chauffer le mélange à 80°C en agitant pendant 30 minutes puis décanter sur plaques magnétiques et aspirer le surnageant.

-Laver le précipité 3 fois avec 1 L d'acétone et 2 fois avec 500 mL d'éther.

Dispersion finale

-Ajouter au précipité un volume V d'eau distillée.

-Evaporer l'éther résiduel par chauffage léger.

→ Obtention d'un ferrofluide citraté correspondant à des nanoparticules de maghémite γ-Fe_2O_3 citratées stabilisées à pH neutre.

3. Caractérisations des ferrofluides

3. 1. Dosage du fer

La concentration en fer est dosée par spectroscopie d'absorption atomique (Perkin Elmer, AAnalyst 100). Après dégradation des échantillons contenant des NPMs grâce à de l'acide chlorhydrique 37% ou de l'eau régale, le fer contenu dans les nanoparticules d'oxydes de fer est remis en solution et peut être dosé par absorption atomique.
La donnée fournie par ce dosage est une concentration en fer [Fe] en moles/litre.

→Pour le ferrofluide acide FFAS1 utilisé lors de la préparation des billes de chitosan CS 5-5-10 et CS 5-10-50 et des billes pelliculées ASP5 et ASP6 : [Fe] = 1,2 mol/L.
→Pour le ferrofluide acide concentré FFAS2 utilisé lors de la préparation des billes pelliculées ASP7, ASP8 et ASP10 : [Fe] = 2,1 mol/L.
→Pour le ferrofluide citraté $FFAS1_{citraté}$ utilisé lors de la préparation des billes d'alginate : [Fe] = 1,2 mol/L.

3. 2. Mesures d'aimantation (VSM)

Un magnétomètre vibrant VSM (Vibrating Sample Magnetometer) a permis de mesurer l'aimantation d'un échantillon en fonction du champ magnétique appliqué.
L'analyse de la forme de la courbe donne accès à la taille (d_0) et à la polydispersité (σ) des NPMs. La superposition des courbes de montée et de descente en champ magnétique donne accès au comportement superparamagnétique et à la stabilité colloïdale des NPMs dispersées dans le ferrofluide.

3. 3. Microscopie électronique à transmission

Les NPMs peuvent être observées en Microscopie électronique à transmission (MET) (Jeol 100 CX à 60 kV), après dilution. Ces observations permettent de voir la taille, la forme et la polydispersité des nanoparticules contenues dans le ferrofluide.

ANNEXE 2 : Préparation des billes de biopolymères

Les différentes billes matricielles de biopolymères utilisées lors des études de rétention magnétique sont préparées grâce une technique d'extrusion-réticulation.
Le polymère (alginate ou chitosan) est dissout dans l'eau puis mélangé avec le ferrofluide et le PA à différents pourcentages en masse/volume (1% w/v = 1 g dans 100 mL).
Puis ce mélange est placé dans une seringue et extrudé à travers une aiguille de taille appropriée afin de former des gouttes que l'on fait tomber dans un bain réticulant contenant le contre-ion approprié du polymère ($CaCl_2$ ou TPP). Les billes matricielles de polymère peuvent donc ainsi former un réseau qui permet d'obtenir des billes rigides.

1. Billes avec matrice d'alginate

Réactifs
-Alginate de sodium (Sigma-Aldrich, CAS : 9005-38-3)
-Ferrofluide $FFAS1_{citraté}$, à une concentration en fer : [Fe] = 1,2 mol/L
-PA 44497-02
-Carbonate de calcium

Solution réticulante

-Ajouter 2 g de $CaCl_2$ dans 100 mL d'eau distillée.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 15 minutes.

Matrice polymère d'alginate magnétique

-Mélanger 250 mg d'alginate dans 2500 µL d'eau distillée.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

-Ajouter 500 µL de ferrofluide FFAS1.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 5 min.

-Ajouter 250 mg de PA.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

Formation des billes

-Aspirer le mélange visqueux de matrice polymère à l'aide d'une seringue de volume 5 mL.

-Fixer au bout de la seringue une aiguille de diamètre 0,5 mm.

-Pousser le piston de la seringue afin de faire tomber goutte à goutte le mélange de polymère.

-Faire tomber ces gouttes dans 20 mL d'un bain de la solution réticulante de $CaCl_2$ 2% w/v.

-Laisser à réticuler 20 min sous agitation douce.

-Séparer les billes du surnageant par décantation magnétique.

-Conserver le surnageant (afin d'effectuer les études d'efficacité d'encapsulation).

-Rincer les billes deux fois avec 10 mL d'eau distillée.

Billes humides

-Conserver les billes à 4°C.

2. Billes avec matrice de chitosan

Réactifs

-Chitosan (Sigma-Aldrich, CAS : 740063)
-Acide acétique
-Ferrofluide FFAS1, à une concentration en fer : [Fe] = 1,3 mol/L
-PA 44497-02
-Tripolyphosphate de sodium
-Alginate de sodium
-Alexa 750 Carboxylic Acid Succinimidyl Ester (Molecular Probes®)

Solution réticulante des billes CS 5-5-10

Ajouter 2 g de TPP dans 100 mL d'eau distillée.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 1 heure.

Solution réticulante des billes core-shell CS@Al 5-5-10 et CS@Al 5-10-50

-Ajouter 2 g de TPP et 1 g d'alginate dans 100 mL d'eau distillée.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 1 heure.

Matrice polymère CS 5-5-10 et CS@Al 5-5-10

-Mélanger 250 mg de chitosan dans 4250 µL d'eau distillée.

-Acidifier par ajout de 250 µL d'acide acétique.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

-Ajouter 500 µL de ferrofluide FFAS1.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 5 min.

-Ajouter 250 mg de PA.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

Matrice polymère CS 5-5-0 et CS@Al 5-5-0

-Mélanger 250 mg de chitosan dans 4750 µL d'eau distillée.

-Acidifier par ajout de 250 µL d'acide acétique.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 5 min.

-Ajouter 250 mg de PA.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

Matrice polymère CS@Al 5-10-50

-Mélanger 250 mg de chitosan dans 2250 µL d'eau distillée.

-Acidifier par ajout de 250 µL d'acide acétique.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

-Ajouter 2500 µL de ferrofluide FFAS1.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 5 min.

-Ajouter 500 mg de PA.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

Matrice polymère CS@Al 5-10-50 FLUO

-Mélanger 250 mg de chitosan dans 2250 µL d'eau distillée.

-Acidifier par ajout de 250 µL d'acide acétique.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

-Dissoudre 1 mg d'Alexa 750 Carboxylic Acid Succinimidyl Ester dans 100 µL de DMSO.

-Ajouter 50 µL de la solution de fluorophore au mélange de chitosan.

- Mélanger sous agitation magnétique pendant 1 heure pour coupler le fluorophore.

-Ajouter 2500 µL de ferrofluide FFAS1.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 5 min.

-Ajouter 500 mg de PA.

-Mélanger sous agitation magnétique pendant 10 min.

Formation des billes

-Aspirer le mélange visqueux de matrice polymère à l'aide d'une seringue de volume 5 mL.

-Fixer au bout de la seringue une aiguille de diamètre 0,5 mm.

-Pousser le piston de la seringue afin de faire tomber goutte à goutte le mélange de polymère.

-Faire tomber ces gouttes dans 20 mL d'un bain de la solution réticulante de TPP 2% w/v + AL 1% w/v.

-Laisser à réticuler 20 min sous agitation douce.

-Séparer les billes du surnageant par décantation magnétique.

-Conserver le surnageant (afin d'effectuer les études d'efficacité d'encapsulation).

-Rincer les billes deux fois avec 10 mL d'eau distillée.

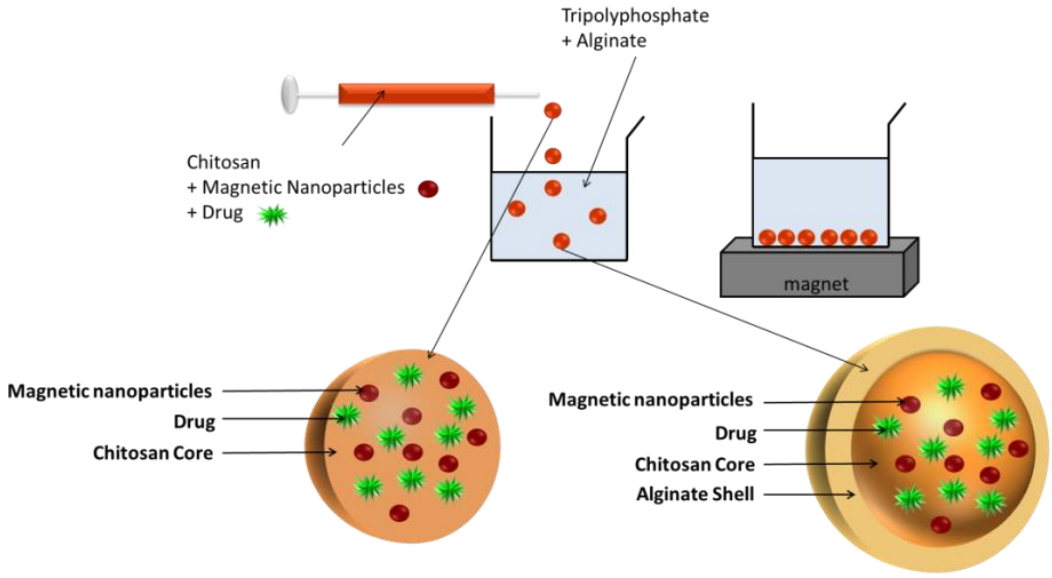


Figure A2-1 : Fabrication des billes core-shell de chitosan-alginate magnétiques.

Billes humides

-Conserver les billes à 4°C.

Billes sèches

-Laisser les billes à l'air pendant 12 heures pour qu'elles sèchent.

ANNEXE 3 : Caractérisations physico-chimiques des formes magnétiques

Lors de l'utilisation des billes pour l'encapsulation de molécules hydrophiles, différentes caractérisations sont effectuées.

1. Détection HPLC du PA 44497-02

Afin de déterminer la quantité de PA contenue dans un échantillon, un dosage est réalisé sur une chaîne chromatographique HPLC Alliance, Waters® avec une colonne Agilent® de type Zorbax Eclipse XDB Phenyl (5µm) de 15 cm de longueur et de 4,6 cm de diamètre interne. La méthode nécessite de chauffer cette colonne à 40°C et d'utiliser un débit de 1 mL/min. Le temps de rétention du pic d'intérêt étant aux alentours de 2 min, l'analyse dure 4 min par échantillon pour un volume injecté de 20µL. La détection du pic de PA se fait à une longueur d'onde de 240 nm.

Solvant de chromatographie

La phase mobile utilisée est constituée de 70% (v/v) de phase aqueuse, contenant de l'eau purifiée et de la triéthylamine ajustée à pH 3,5 par l'ajout d'acide orthophosphorique et de 30% (v/v) d'acetonitrile.

Préparation de 4 L de phase mobile :

-Ajouter sous agitation 5,6 mL de triethylamine dans 2,8 L d'eau millipore.

-Ajuster le pH à 3,5 avec de l'acide orthophosphorique.

-Ajouter 1,2 L d'acétonitrile.

Solution témoin

La solution témoin de principe actif S0-44497-2 a une concentration fixée à 0,02 mg/mL.

Préparation de 50 mL de solution témoin :

-Verser 50 mg de PA dans une fiole jaugée de 250 mL et compléter avec de l'eau déminéralisée ([PA] = 0,2 mg/mL).

-Réaliser une dilution d'un facteur 10 en versant 5 mL de la solution précédente dans une fiole jaugée de 50 mL ([PA] = 0,02 mg/mL).

Traitement des résultats :

A l'issu du dosage la quantité de PA contenue dans chacun des prélèvements est calculée.

La concentration en PA dans chaque prélèvement $[PA]_{prélèvement}$ peut alors être calculée :

$$[PA]_{prélèvement} = \frac{[PA]_{témoin} \times A_{prélèvement}}{A_{témoin}}$$

avec $A_{prélèvement}$, l'aire sous le pic pour le prélèvement à un temps donné.

$[PA]_{témoin}$, la concentration de la solution témoin (= 0,02 mg/mL).

$A_{témoin}$, l'aire sous le pic correspond la concentration de la solution témoin.

Cette méthode de dosage HPLC est utilisée afin de déterminer la quantité de PA contenue dans un échantillon et est utilisée lors des calculs de différents paramètres (EE%, passage cumulé).

2. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation (EE%) désigne la quantité de PA ayant été encapsulée efficacement dans l'objet en comparaison de la quantité initiale de PA introduite lors de la synthèse. Cette efficacité d'encapsulation est mesurée par dosage indirect. Lors de la préparation des billes, on récupère le bain de réticulation et on y dose la quantité de PA n'ayant pas été encapsulée dans les billes.

$$EE\% = \frac{masse\ de\ PA\ totale - masse\ de\ PA\ non\ encapsulée}{masse\ de\ PA\ totale} \times 100$$

3. Taux d'encapsulation

Le taux d'encapsulation désigne la charge d'un des composés constituant l'objet, il est calculé comme un rapport massique entre la masse de ce composé par rapport à la masse totale de l'objet.

$$TE\% = \frac{masse\ du\ PA\ dans\ la\ bille}{masse\ de\ la\ bille} \times 100$$

Le taux d'encapsulation est calculé en fin de fabrication des billes. Les billes sont pesées et les différents taux d'encapsulation sont ensuite calculés grâce aux masses initiales des différents constituants.

4. Cinétique de libération du PA

La cinétique de dissolution du PA représente la quantité de PA libérée de la bille en fonction du temps. Elle est modélisée par une courbe, obtenue en mesurant à différents temps la quantité de PA libérée de l'objet dans un volume constant d'une solution modèle, à température et vitesse d'agitation préalablement définie.
Cette cinétique peut être mesurée par spectroscopie UV-Visible. En effet, le PA 44497-02 présente un pic d'absorption dans l'UV à λ = 240 nm.

4. 1. Cinétique de libération du PA en continu

Les mesures des cinétiques de libération du PA peuvent être réalisées en continu grâce à une chaîne de dissolution automatisée. Cette chaîne est constituée de 7 ballons dans lesquels la température et la vitesse d'agitation sont fixées en début d'expérience.

Milieu stomacal
Acide chlorhydrique (0,01 N)
→ pH = 2

Milieu intestinal
-136,1 g de dihydrophosphate de potassium
-17,9g de pastilles de soude
-20 L d'eau distillée
→ pH = 6,8

Après avoir choisi le milieu adapté aux essais de relargage du PA, les échantillons sont introduits dans ces ballons :

-Remplir les ballons avec 500 mL de milieu.

-Régler la température dans les ballons à 37°C +/- 0.5°C.

-Régler l'agitation dans les ballons à 50 tours/minute.

-Déposer les formulations à étudier dans les paniers.

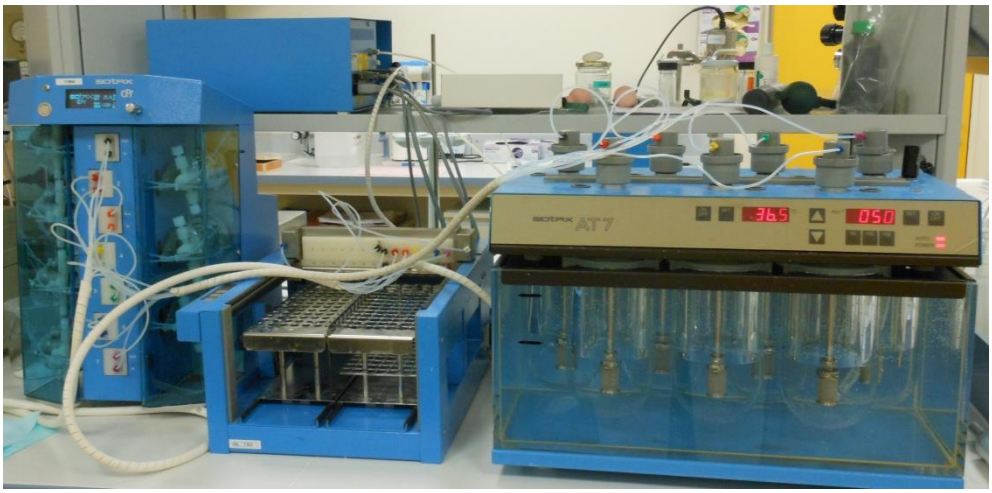


Figure A3-1 : Chaîne de dissolution Sotax.

Des prélèvements sont réalisés toutes les 15 minutes dans le ballon, passent dans les cuves pour la détection en UV puis sont restitués dans les ballons par la suite. La libération du PA est dosée par mesure de l'absorbance par spectrophotométrie UV à λ = 240 nm.

4. 2. Cinétique de libération du PA en milieu bio relevant

Lorsque les mesures de cinétique de libération du PA ne peuvent pas être réalisées en continu, on effectue une cinétique en faisant des prélèvements manuellement qui seront ensuite dosés par HPLC.

Matériel
-Poudre SIF
-Pastilles de soude NaOH
-Acide acétique glacial
-Chlorure de Sodium NaCl

Préparation du milieu

-Dissoudre 4,04 g de pastilles de soude NaOH, 8,65 g d'acide acétique et 11,874 g de chlorure de sodium NaCl dans 900 mL d'eau déminéralisée.

-Ajuster le pH à 5 grâce à une solution NaOH (1N) ou HCl (1N).

-Ajuster le volume à 1 L.

-Ajouter 11,2 g de poudre SIF et mélanger jusqu'à dissolution complète.

Prélèvements

-Introduire les échantillons dans 500 mL de milieu dans un bécher.

-Régler la température dans les béchers à 37°C.

-Régler l'agitation grâce à un barreau magnétique dans les béchers à 50 tours/minute.

-Effectuer des prélèvements toutes les 15 minutes pendant 6 heures.

Les prélèvements sont analysées par HPLC (Voir Annexe 2-1.) afin d'obtenir la quantité de PA dans les prélèvements à un temps donné. Puis la courbe de libération du PA en fonction du temps est établie.

5. Microscopie électronique à balayage

Principe

Les différentes formes réalisées ont pu être observées en microscopie électronique à balayage (MEB) sur la plateforme de microscopie du département de biologie de l'UPMC. Les manipulations ont été effectuées par Mr. Michaël Trichet. La MEB est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Cette technique a été utilisée afin de visualiser les différentes couches composant les billes. En MEB, les objets visualisés doivent être secs. Pour les billes de chitosan humides, il a été nécessaire de passer par une étape préliminaire de séchage par contournement du point critique afin d'obtenir des billes déshydratées où la forme initiale de l'objet humide est conservée. Les mini-granules sèches fabriquées en process ont pu être observées directement. Les billes peuvent être observées entière ou après avoir été coupées en deux afin d'observer le cœur et les différentes couches constituant ces objets.

Séchage par contournement du point critique :

-Déshydrater les billes en les plongeant 15 min dans des bains d'éthanol de concentration progressive (30 - 50 -70 - 96 et 100 % en v/v).

-Effectuer le séchage grâce à un appareil de contournement du point critique (CPD 7501, Quorum Technologies).

Montage :

-Couper certaines billes en deux afin de pouvoir observer leur surface.

-Déposer les billes (entière et demies) sur le support collant.

-Métalliser les échantillons grâce à un métalliseur (Scancoat Six, Edwards).

Observation :

Les billes sont observées grâce à un MEB conventionnel à 15kV (Cambridge Stereoscan S260).

ANNEXE 4 : Caractérisations magnétiques des formes magnétiques

1. Dosage du Fer

Le dosage du fer est réalisé par spectrométrie d'absorption atomique. Après dégradation des formes (billes ou mini-granules) contenant des NPMs par de l'acide chlorhydrique 37% ou de l'eau régale dans un volume V de solution, le fer contenu dans ces NPMs est remis en solution et peut être dosé par absorption atomique.

La donnée fournie par ce dosage est une concentration en fer [Fe] en moles/litre. Cette concentration permet ensuite de calculer la masse de fer m_{Fe} contenue dans les échantillons ayant été dosés.

$$m_{Fe} = [Fe] \times M_{Fe} \times V$$

Avec m_{Fe}, la masse de fer contenue dans un volume V.

[Fe] la concentration en fer dans un volume V.

M_{Fe} la masse molaire rapportée au fer pour la maghémite.

V le volume de l'échantillon après dégradation acide.

Pour la maghémite γ-Fe_2O_3 :

$$M_{Fer} = M_{Fe} + \frac{3}{2} \times M_O$$

$$M_{Fer} = 56 + \frac{3}{2} \times 16 \ = 80 \ g/mol$$

Billes	[Fe] (mol/L)	n(Fe) (mol)	m(Fe) (mg)
Dosage de fer d'une bille dans 100 mL			
CS@Al 5-5-10	$1,04*10^{-5}$	$1,04*10^{-6}$	0,0832
CS@Al 5-10-50	$4,6*10^{-5}$	$4,6*10^{-6}$	0,368
Dosage de fer de 100 mg de billes dans 100 mL			
ASP5	$0,46*10^{-3}$	$0,46*10^{-4}$	3,68
ASP6	$1,45*10^{-3}$	$1,45*10^{-4}$	11,6
ASP7	$1,26\text{-}10^{-3}$	$1,26*10^{-4}$	10,08
ASP8	$1,26*10^{-3}$	$1,26*10^{-4}$	10,08
ASP10	$1,28*10^{-3}$	$1,28*10^{-4}$	10,24

Tableau A4-1 : Valeurs de la concentration, du nombre de moles et de la masse en fer pour les différentes formulations.

2. Étalonnage des aimants

La force magnétique exercée par un aimant est fonction de la distance et peut être mesurée grâce une sonde à effet Hall. Le capteur est fixé sur un dispositif permettant de le déplacer avec 0,5 mm de précision.

L'aimant est placé à l'extrémité d'un dispositif de déplacement micrométrique et les valeurs du champ magnétique exercé par l'aimant sont mesurées depuis le contact jusqu'à l'annulation de ce champ.

La force magnétique est mesurée pour les aimants parallélépipèdiques rectangles en Néodyme-Fer-Bore (Nd-Fe-B) utilisés *ex vivo* (Longueur=30mm, largeur=30mm et hauteur=15mm) (Figure A4-1, 2).



Figure A4-1 : Aimant utilisé *ex vivo* (L=30mm, l=30mm et h=15mm).

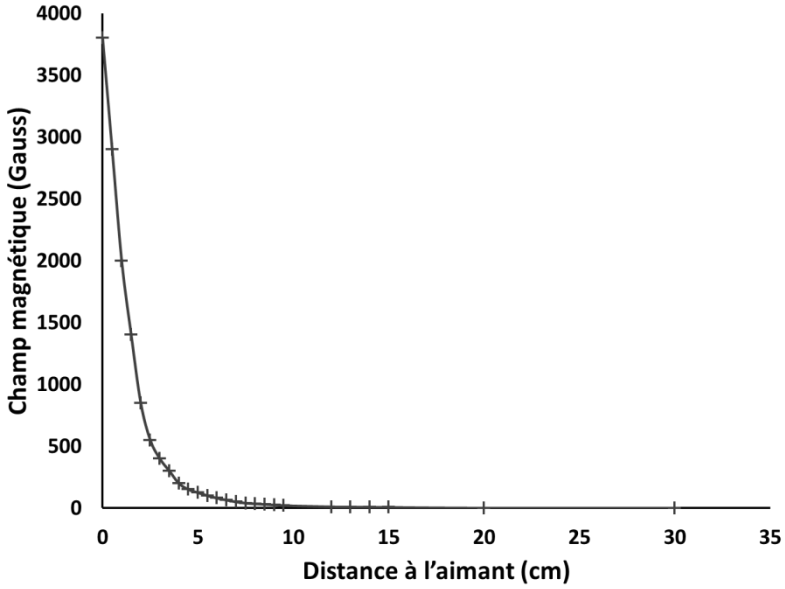


Figure A4-2 : Force magnétique (Gauss = 10^{-5} Tesla) exercée par l'aimant en Nd-Fe-B de longueur 30 mm, largeur 30 mm et hauteur 15 mm en fonction de la distance (cm).

La force magnétique est mesurée pour les différents aimants en forme de disques en Nd-Fe-B utilisés *in vivo*, les plus faibles (diamètre=25mm et hauteur=3mm) et les plus puissants (diamètre=20mm et hauteur=10mm) (Figure A4-3, 4 et 5).



Figure A4-3 : Aimants utilisé *in vivo*, à gauche (Ø=25mm, h=3mm) et à droite (Ø=20mm, h=10mm).

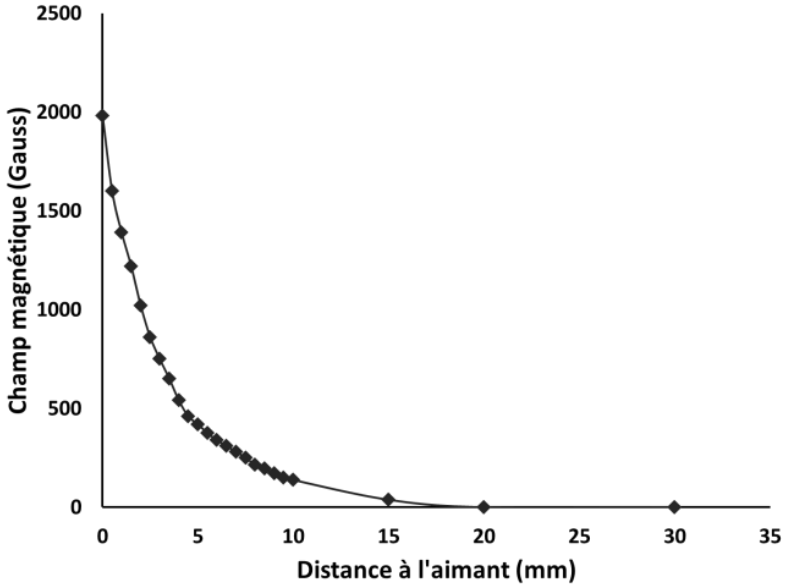


Figure A4-4 : Force magnétique (Gauss) exercée par l'aimant en Nd-Fe-B de diamètre 25 mm et de hauteur 3 mm en fonction de la distance (mm).

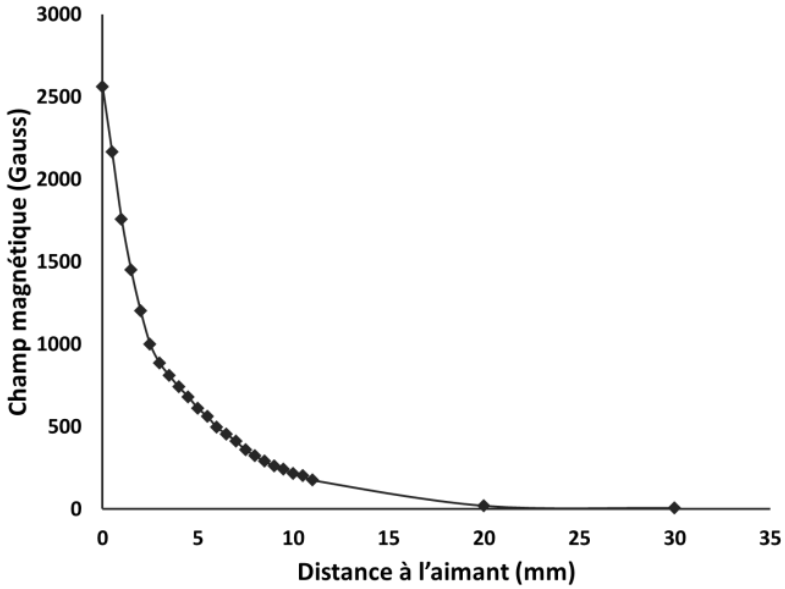


Figure A4-5 : Force magnétique (Gauss) exercée par l'aimant en Nd-Fe-B de diamètre 20 mm et de hauteur 10 mm en fonction de la distance (mm).

3. Magnétométrie SQUID

Les mesures effectuées au SQUID (Superconducting QUantum Interference Device) sont réalisées sur la platerforme de Mesure Physique à Basses Température de l'UPMC (Quantum Design MPMS XL). Ces mesures permettent de déterminer le moment magnétique d'un objet (en emu) en réponse à un champ magnétique exercé (en Gauss).
Avec 1 emu = 1.10^{-3} A.m² et 1 Gauss = 1.10^{3} A/m = 1.10^{-5} Tesla.

Cela permet de calculer la force magnétique exercée sur un objet dans le gradient de champ d'un aimant externe :

$$\overrightarrow{F_m} = (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla})\vec{B}$$

$$\overrightarrow{F_{m,z}} = \mu_z . \frac{dB_z}{d_z}$$

avec : μ_z, le moment magnétique d'une bille à un champ B_z à une certaine distance z.

$\frac{dB_z}{d_z}$, la pente de la courbe du champ exercé par l'aimant à une certaine distance z.

ANNEXE 5 : Fabrication de mini-granules magnétiques en process

Les mini-granules magnétiques fabriquées en process galénique ont été formulées par montage en lit d'air fluidisé simple en utilisant comme base pour le cœur des billes de sucre ou par montage en lit d'air fluidisé en utilisant comme cœur des granules magnétiques préalablement fabriquées par extrusion-sphéronisation.

1. Extrusion-Sphéronisation

Principe

Le procédé d'extrusion-sphéronisation se découpe en cinq étapes consécutives permettant de fabriquer des granules : mélange, mouillage, extrusion, sphéronisation et séchage.

Classiquement, l'extrusion-sphéronisation se fait à partir d'un polymère (cellulose microcristalline, l'Avicel) mélangé à de l'eau afin de permettre la granulation dans des proportions de mélange de 50/50 en masse. On a donc décidé de remplacer le liquide de mouillage classique (l'eau) par le ferrofluide afin d'obtenir une granule magnétique de façon facile et rapide pouvant par la suite servir de base au montage en lit d'air fluidisé.

Matériel

-Extrudeuse : Fuji Paudal EXDS60®

-Sphéroniseur Q400®

-Cellulose microcristalline : Avicel pH 101®

-Ferrofluide concentré FFAS2 ([Fe] = 2,1 mol/L)

-PA 44497-02

Mélange

-Mélanger à sec 375 g d'Avicel pH 101 avec 125 g de PA 44497-02 au mélangeur KitchenAid pour les formes ASP7 et ASP8.

Ou

-Mettre 500 g d'Avicel pH 101 dans le mélangeur KitchenAid pour la forme ASP10.

Mouillage

-Ajouter progressivement et sous agitation au mélangeur KitchenAid 400 mL de ferrofluide concentré FFAS2 pour les formes ASP7 et ASP8.

Ou

-Ajouter progressivement et sous agitation au mélangeur KitchenAid 450 mL de ferrofluide concentré FFAS2 pour la forme ASP10.



Figure A5-1 : Photographies (a) du mélange de poudre et (b) après mouillage des poudres avec le ferrofluide.

Extrusion

-Choisir une grille d'extrusion avec un diamètre de trous de grilles de 1 mm.

-Effectuer le montage de l'extrudeuse.

-Mettre en marche l'extrudeuse et choisir la vitesse d'extrusion.

-Verser le produit à extruder obtenu à l'étape précédente et le faire glisser vers les vis en rotation.

-Placer un plateau sous la sortie de l'extrudeuse afin d'y récupérer les extrudats.

→Les extrudats doivent être sous forme de filaments non collants, homogènes et lisses pour se découper régulièrement lors de l'étape suivante afin de former des mini-granules homogènes.

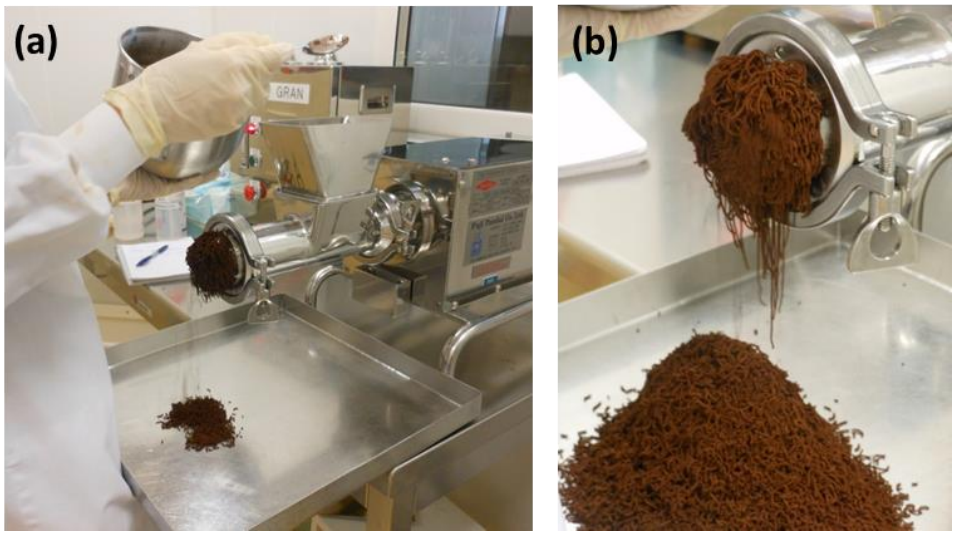


Figure A5-2: Photographies (a) l'extrudeuse et (b) les extrudats obtenus après extrusion.

Sphéronisation

-Déposer les extrudats obtenus à l'étape précédente dans le sphéroniseur.

-Mettre en marche le sphéroniseur pendant 5 min.

-Récupérer les extrudats ainsi modelés en particules sphériques.

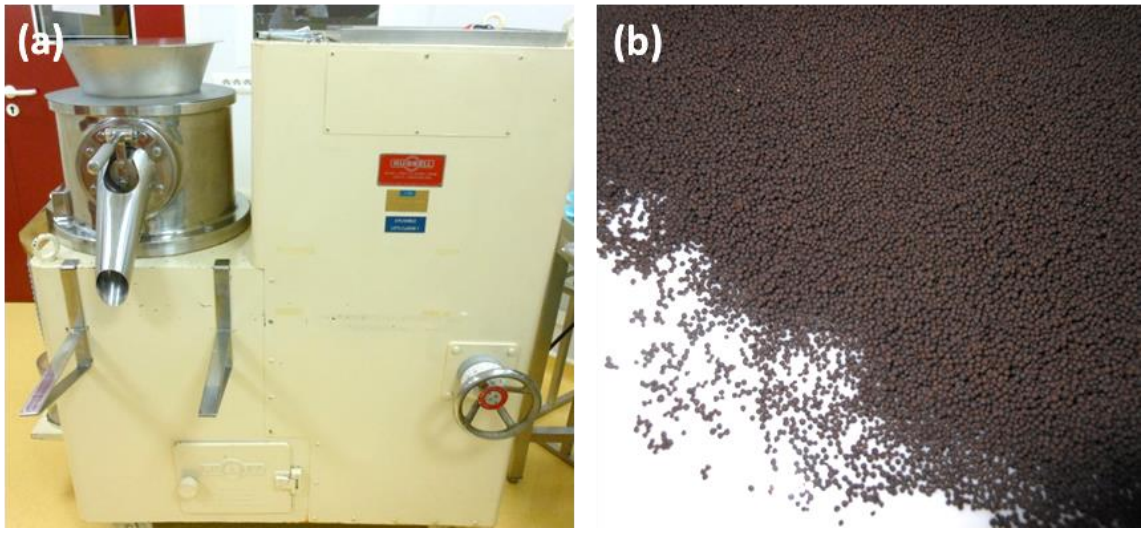


Figure A5-3: Photographies (a) le sphéroniseur et (b) les granules obtenues après sphéronisation.

Séchage

-Déposer les granules obtenues à l'étape précédente sur un plateau.

-Sécher les granules à l'étuve pendant 8 heures à 60°C.

2. Montage au lit d'air fluidisé

Principe

Lors du pelliculage en lit d'air fluidisé, des mini-granules, qui peuvent être soit des billes de saccharose/amidon commerciales, soit des granules fabriquées préalablement par extrusion-sphéronisation, sont mises en suspension dans l'air pendant qu'une suspension est pulvérisée à travers une buse de 0,8 mm de diamètre. Dans ce cas, la méthode utilisée est celle dite du «Bottom Spray» qui fait appel à un insert appelé Wurster. La buse de pulvérisation est fixée à la base de la cuve. Les particules sont aspirées à l'intérieur de Wurster et sont donc forcées à travers le cône de pulvérisation. En continuant leur ascension, les particules sèchent et retombent à l'extérieur du Wurster pour être de nouveau aspirées à sa base. Cette technique permet d'obtenir des films très homogènes. La buse étant immergée dans le flux d'air, les gouttelettes de la formulation d'enrobage ne parcourent que de très courtes distances avant d'atteindre la surface des particules, ainsi les films sont appliqués de manière plus homogène.

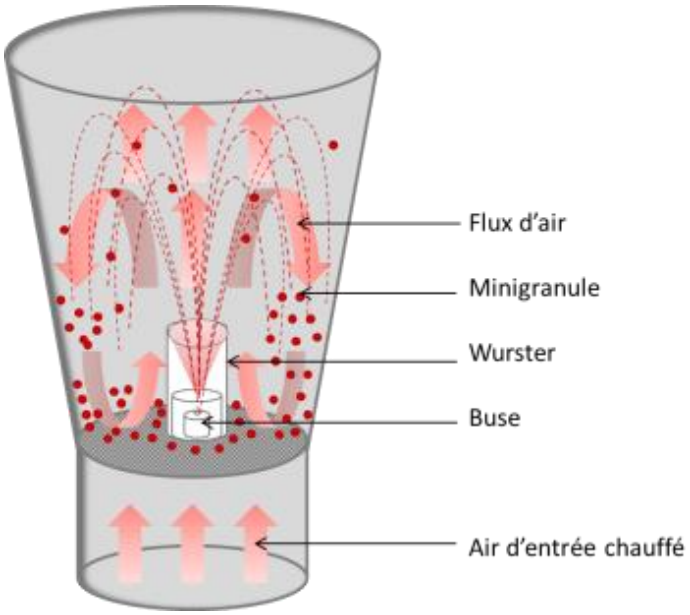


Figure A5-4: Schéma de la cuve de pelliculage.

Les principaux paramètres à considérer lors du pelliculage de formes solides par cette technique sont :

-La température produit, qui est ajustée en variant la température de l'air d'entrée. Cette dernière affecte directement la formation du film du fait de la coalescence des particules

polymériques. Pour une suspension aqueuse, la température produit avoisine les 45°C tandis que pour une phase alcoolique, la température ne dépasse pas 38°C de manière à ne pas réaliser un spray drying.

-Le réglage du débit d'air est important pour assurer un mouvement suffisant des minigranules. Il varie entre 90 et 120 m^3/h.

-Le débit de pulvérisation est un paramètre à contrôler car un débit trop élevé peut entraîner l'agglomération des minigranules entre elles. Lors des différentes manipulations, le débit est fixé entre 10 et 20 mL/min et est augmenté progressivement.

-La pression de pulvérisation affecte la taille des gouttelettes. Elle est toujours réglée à 2 bars.

Le nombre de couches pulvérisées sur les mini-granules de sucre ou sur les mini-granules magnétiques obtenues par extrusion-sphéronisation varie entre 1 et 4.

Matériel

-Lit d'air fluidisé Glatt GmbH® de type GPCG1.

-Pompe Masterflex L/S®.

-Tuyau Masterflex 16 PharMed®.

-Ethylcellulose (EC): Ethocel 10 CG® en tant que membrane imperméable.

-Hydroxypropylcellulose : Pharmacoat 606 ® en tant qu'agent liant, filmogène et pore-former.

-Hydroxypropylcellulose : Klucel® en tant que pore-former.

-Triéthylcitrate : Citroflex A4® en tant que plastifiant.

-Talc micronisé afin d'éviter les attractions électrostatiques.

Préparation des suspensions de pelliculage

-Mettre le solvant de suspension (eau distillée ou alcool) sous agitation au Rayneri® puis verser lentement les poudres ou liquides à mélanger.

-Laisser sous agitation 1 heure avant d'utiliser ces suspensions pour le pelliculage.

Suspension de pelliculage

ASP5 - Couche 1: 250g PA + 34g Pharmacoat + 500 mL FFAS1 dans 500mL d'eau
- Couche 2: 20g EC + 20g Pharmacoat + 10g Citroflex dans 500mL d'alcool

ASP6 -Couche 1: 3L FFAS1 + 60g Pharmacoat dans 500mL d'eau

- Couche 2: 50g EC + 10g Citroflex dans 500mL d'alcool
- Couche 3: 250g PA + 34g Pharmacoat dans 1000mL d'eau
- Couche 4: 25g EC + 15g Pharmacoat + 10g Citroflex dans 500 mL

ASP10 -Couche 1: 125g PA + 25g Pharmacoat dans 500mL d'eau
- Couche 2: 50g EC + 25g Pharmacoat + 20g Citroflex dans 500mL d'alcool

ASP7 -60g EC + 20g Pharmacoat + 20g Citroflex dans 500mL d'alcool

ASP8 -100g EC + 20g Klucel + 100g Talc micronisé + 20g Citroflex dans 1L d'alcool

Pelliculage

-Mettre les granules dans la cuve « Wurster » et la mettre en place.

-Mettre en suspension les granules à pelliculer.

-Mettre en marche le chauffage et attendre le chauffage des granules jusqu'à la température désirée.

-Allumer la pompe et régler le débit afin de commencer la pulvérisation des suspensions sur les granules.

-Contrôler et régler le débit de pulvérisation et la température tout au long de la manipulation afin de former des couches régulières et homogènes.

→ Pour les suspensions dans l'eau, la température produit doit être comprise entre 42 et 46 °C et le débit entre 15 et 20 mL/min.

→ Pour les suspensions dans l'alcool, la température produit doit être comprise entre 35 et 39 °C et le débit entre 10 et 15 mL/min.

ANNEXE 6 : Cellules de Ussing

Principe

Les cellules de Ussing permettent d'étudier le passage transmuqueux de principes actifs. La chambre de Ussing est un dispositif *in vitro* servant à évaluer la cinétique d'absorption d'un principe actif à travers des muqueuses. Les cellules de Ussing utilisées pour cette étude sont achetées chez Biogalenys® et sont constituées de deux compartiments en plexiglas, séparés par le tissu perméable à étudier et maintenus ensemble par deux vis. Le compartiment donneur est celui où est introduite la substance à tester et le compartiment accepteur est celui où est mesurée la quantité de substance à étudier qui traverse la membrane, il représente la circulation générale et la capacité d'une molécule à atteindre celle-ci, c'est-à-dire sa biodisponibilité. Les deux compartiments contiennent une solution modèle du milieu physiologique de la membrane en vue d'isoler les deux côtés de celle-ci afin de reproduire le principe de barrière sélective. La solution physiologique est maintenue à une température constante de 37°C grâce à un banc chauffant dans lequel sont maintenues les cellules pendant la durée de l'expérience. Afin de préserver la viabilité de la membrane à étudier, le milieu est continuellement oxygéné par un bullage de carbogène (95% O_2 - 5% CO_2). Chacun des compartiments est muni d'une arrivée de gaz qui permet d'assurer une bonne homogénéisation du milieu et l'oxygénation des tissus durant toute la durée de la manipulation. Dans ces conditions environnementales, la plupart des tissus gardent une viabilité pendant environ 2 heures ce qui permet d'étudier le passage de la molécule d'intérêt à travers le tissu.

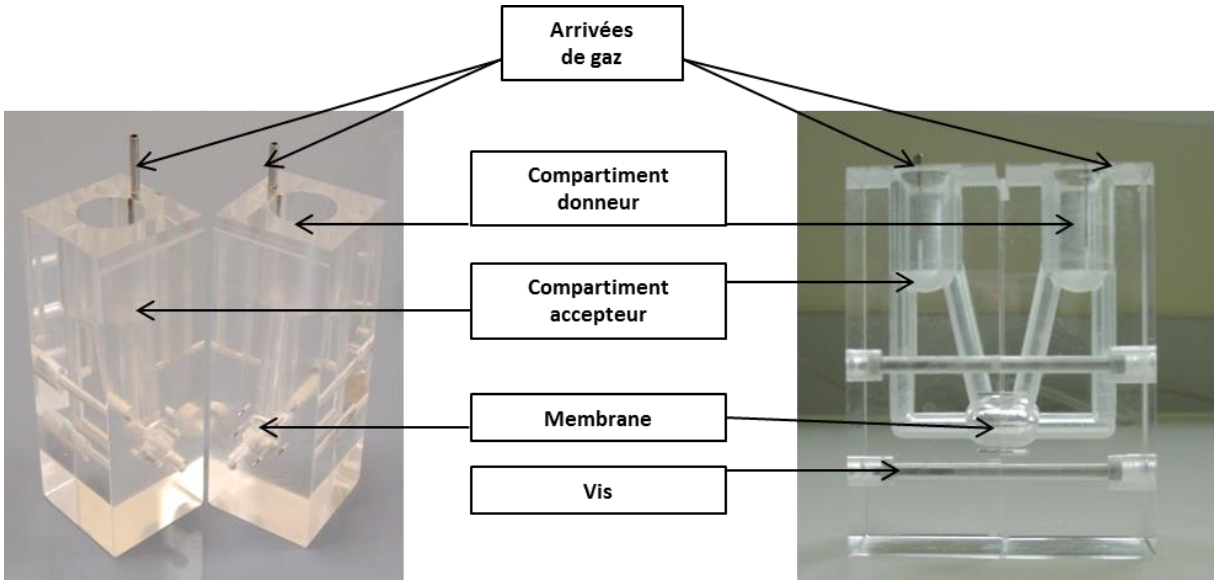


Figure A6-1 : Photographies des cellules de Ussing.

Matériel

-Banc chauffant contenant 4 cellules de Ussing ①

-Bain thermostaté relié à la double enveloppe du banc ②

-Bombonne de carbogène alimentant chaque compartiment des cellules ③

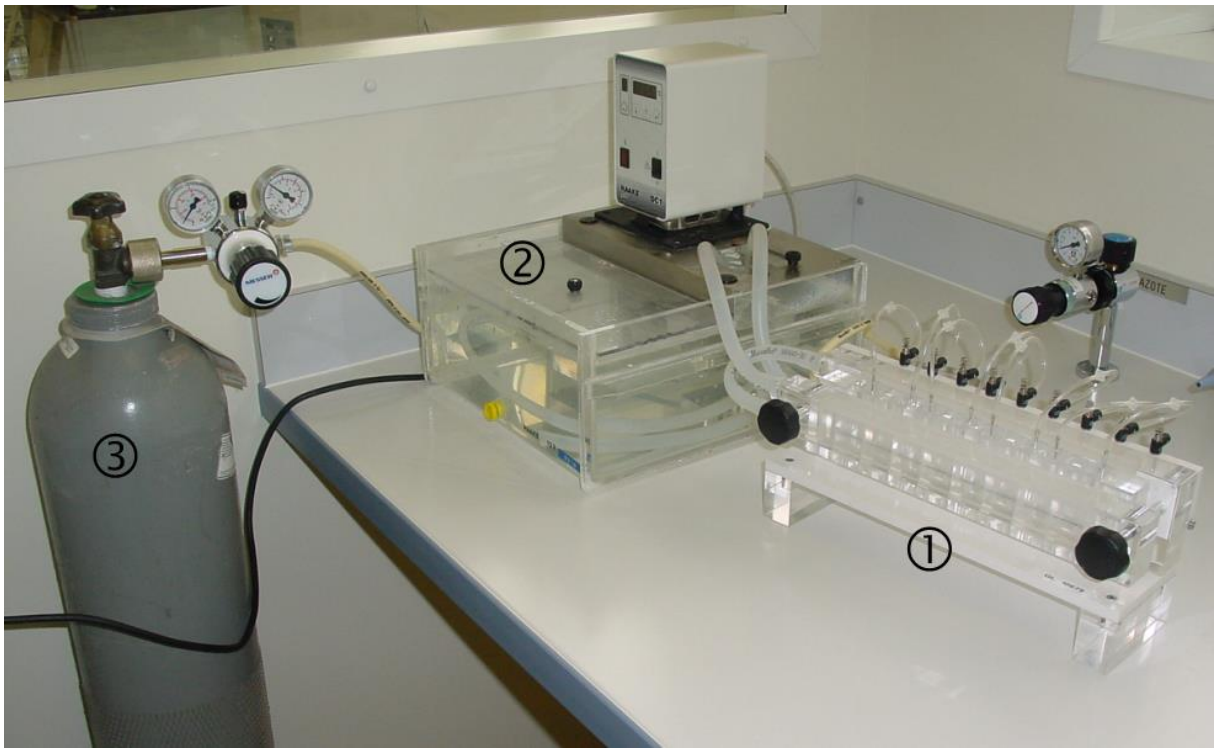


Figure A6-2 : Photographies du matériel pour l'utilisation des cellules de Ussing.

Mise en place de l'appareillage

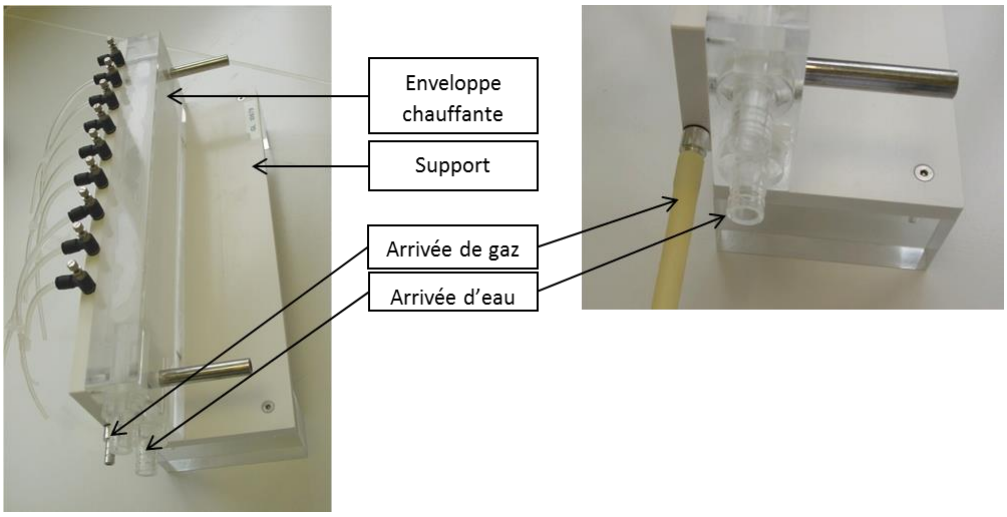


Figure A6-3 : Photographies des bancs chauffants des cellules de Ussing.

-Remplir le bain thermostaté ② avec de l'eau déminéralisée.

-Brancher l'arrivée de gaz depuis la bouteille de carbogène ③ à l'embout placé sur le côté gauche du banc de Ussing.

-Brancher le tuyau d'arrivée d'eau sur l'enveloppe chauffante (en bas à gauche) et placer l'autre extrémité du tuyau dans le bain thermostaté.

-Brancher le tuyau de raccord entre les deux enveloppes chauffantes.

-Placer la seconde enveloppe chauffante sur le banc et la maintenir à l'aide des 2 grosses vis noires.

-Brancher un tuyau d'évacuation d'eau sur la deuxième enveloppe chauffante (en haut à gauche) et plonger l'autre extrémité du tuyau dans le bain thermostaté.

-Mettre en route le bain thermostaté à 44°C (cette température permet d'avoir une température de 37°C dans les cellules de Ussing).

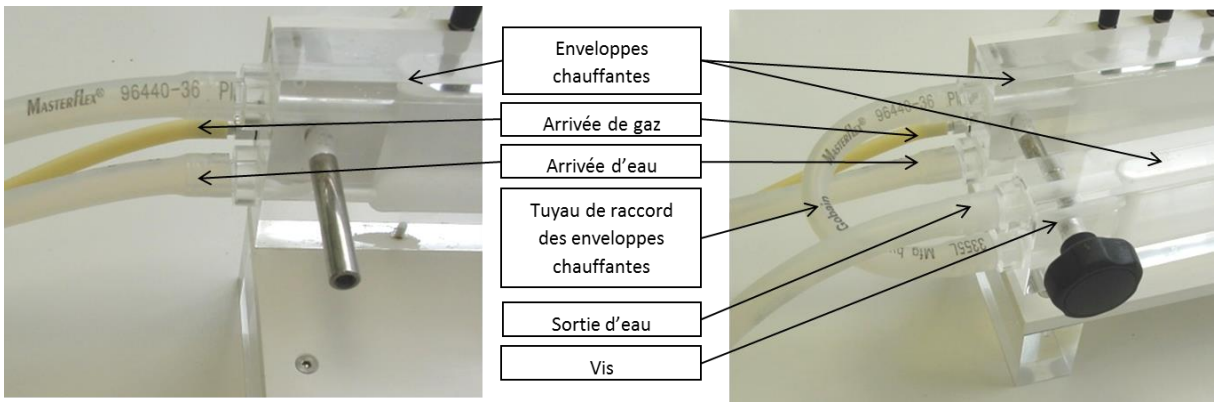


Figure A6-4 : Photographies des bancs chauffants des cellules de Ussing.

Manipulation

Des prélèvements sont effectués toutes les 15 minutes pendant 2 heures dans le compartiment accepteur. Les prélèvements seront dosés en HPLC afin de mesurer la quantité de PA passée à travers la membrane depuis le compartiment donneur vers le compartiment accepteur (Voir Annexe 3-1.).

Préparation du milieu tampon

-Diluer un flacon de Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (Sigma) dans 1L d'eau déminéralisée.

-Ajuster le pH à 7,4 ou 6,8 avec de la soude NaOH (1 mol/L).

Préparation des joues de porc

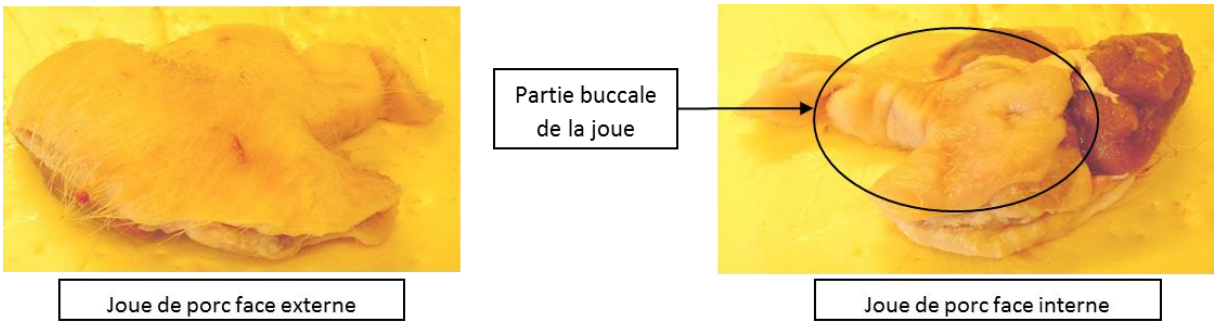


Figure A6-5 : Photographies des joues de porc.

-Epingler la joue face intérieure visible sur un support en polystyrène.

-Couper la partie buccale de la joue à l'aide d'un scalpel puis l'épingler en partie inférieure en essayant de la tendre.

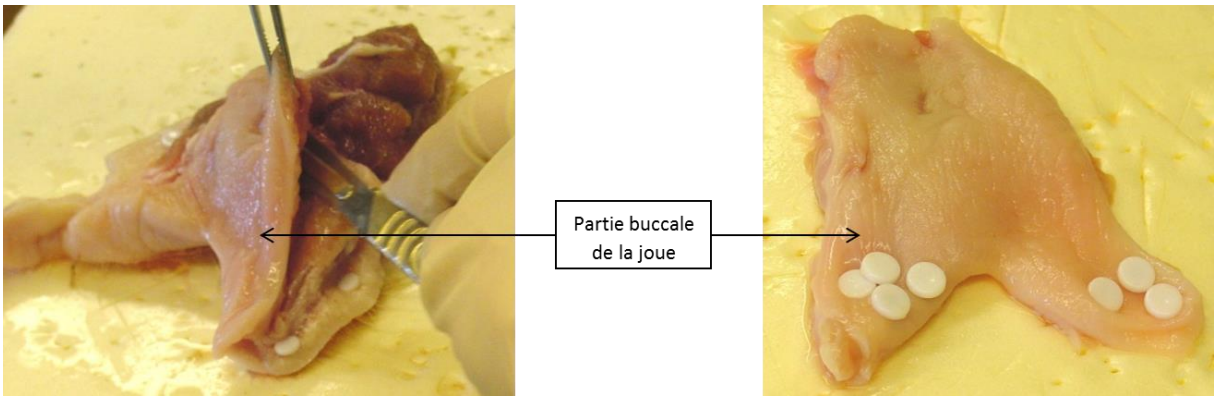


Figure A6-6 : Photographies des joues de porc.

-Découper la partie buccale de la joue à l'aide d'un dermatome afin d'obtenir une membrane d'épaisseur contrôlée d'environ 600 µm.

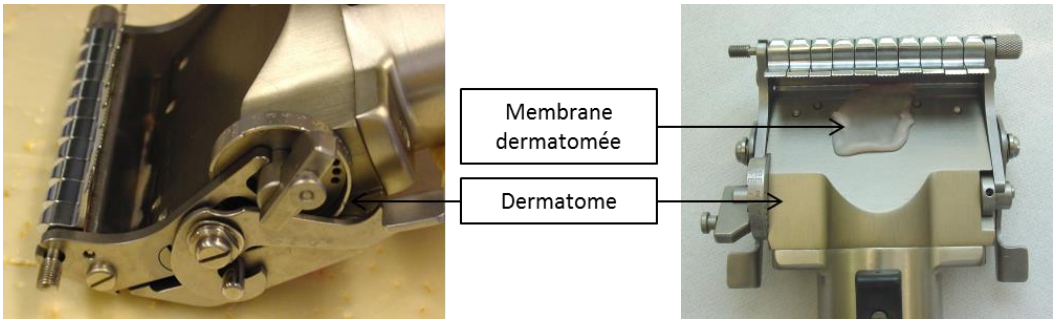


Figure A6-7 : Photographies du dermatome.

-Placer les morceaux de muqueuse ainsi dermatomées dans le milieu de Krebs Ringer jusqu'à leur mise en place sur les cellules.

Préparation du jéjunum de rat

Le jéjunum de rat est la muqueuse utilisée pour les essais en chambre de Ussing. Les rats utilisés sont fournis par Biologie Servier à Gidy. Ce sont des mâles âgés de 10 à 11 semaines pesant environ 300g. Les rats sont sacrifiés sur place à Biologie Servier puis les intestins sont prélevés et ramenés dans une solution de Krebs-Ringer dans une glacière à Technologie Servier pour le montage des cellules.

-Mettre le rat sous anesthésie à l'isofluorane (5% dans O_2).

-Sacrifier le rat par section de la carotide et exsanguination.

-Prélever le haut du jéjunum (environ 10 cm de long) entre le duodénum et le caecum.

-Couper le jéjunum en deux parties d'environ 5 cm de long.

-Nettoyer l'intérieur et l'extérieur de l'intestin en les rinçant avec du milieu de Krebs Ringer.

Stripage du jéjunum

-Enfiler les morceaux de jéjunum sur une pipette en verre de 1 mL afin de les maintenir.

-Passer le biseau d'une aiguille le long du mésentère afin de couper la couche musculaire.

-Passer un coton-tige à la surface du jéjunum, ce qui permet de décoller et de rouler la couche musculaire du tissu.

-Retirer la couche musculaire à l'aide d'une pince.

-Ouvrir l'intestin le long du mésentère.

L'intestin ouvert peut alors être monté sur les cellules de Ussing.

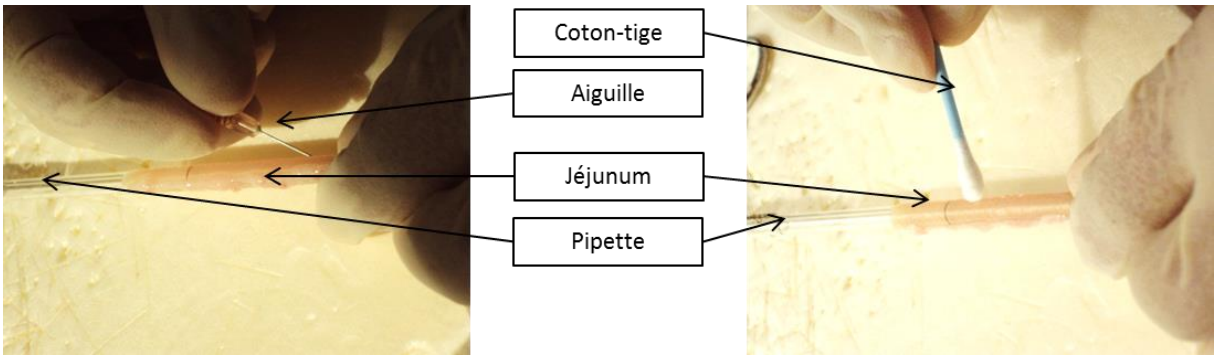


Figure A6-8 : Photographies du stripage du jéjunum.

Montage des cellules de Ussing

-Epingler la muqueuse (tendue mais sans trop l'étirer) entre les deux compartiments donneur et accepteur.

-Placer la membrane buccale de porc : face externe (l'intérieur de la joue) en contact avec le compartiment donneur, et face interne (la circulation sanguine) en contact avec le compartiment accepteur.

-Placer la membrane intestinale de rat : face interne (lumière intestinale) en contact avec le compartiment donneur, et face externe (la circulation sanguine) en contact avec le compartiment accepteur.

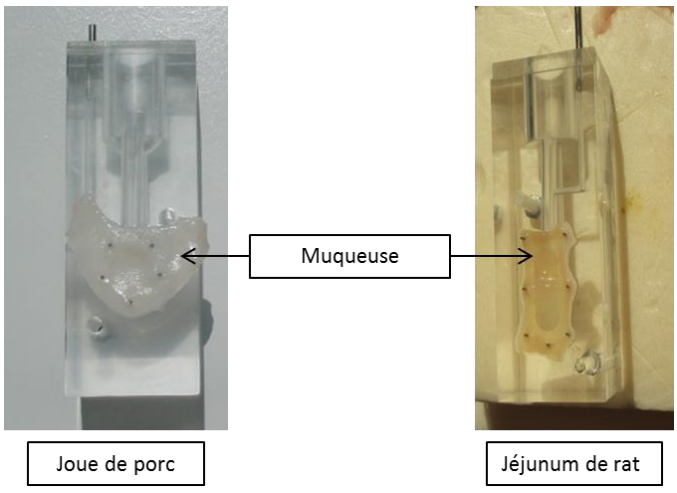


Figure A6-9 : Photographies du montage des membranes sur les cellules de Ussing.

-Fixer les deux compartiments l'un à l'autre puis visser à l'aide des deux vis.

-Remplir les deux compartiments avec la solution physiologique de Krebs Ringer.

Pour les essais sur les joues de porc, le compartiment donneur est rempli avec 3,5mL de solution de Krebs Ringer à pH=7,4 (pH buccal) et le compartiment accepteur est rempli avec 3,5mL de solution de Krebs Ringer à pH=6,8 (pH sanguin).

Pour les essais sur le jéjunum de rat, les deux compartiments sont remplis avec 3mL de solution de Krebs Ringer à pH=6,8 (pH intestinal).

-Placer les cellules de Ussing dans le banc entre les deux enveloppes chauffantes, afin de limiter la déperdition de chaleur.

-Brancher les arrivées de gaz à chacun des compartiments des 4 cellules et ouvrir les 8 micro-vannes de la bouteille de gaz.

-Régler le débit de carbogène global dans la bouteille à l'aide du manomètre puis dans chacun des compartiments à l'aide des micro-vannes. Le débit est correct lorsqu'il y a 1 à 2 bulles par seconde.

-Laisser le système s'équilibrer pendant 15 min avant de démarrer l'expérience.



Figure A6-10 : Photographies des cellules de Ussing montées.

Analyse des prélèvements

-Introduire les formulations à tester dans le compartiment donneur.

-Effectuer des prélèvements toutes les 15 minutes dans le compartiment accepteur pendant 2 heures.

-Toutes les 15 minutes :

-Prélever 750 µL de liquide dans le compartiment accepteur à l'aide d'une pipette.

-Ajouter 750 µL de solution de Krebs Ringer dans chaque compartiment prélevé.

-Doser ces prélèvements en HPLC afin de déterminer la quantité de PA passée à travers la membrane (Annexe 3-1.).

ANNEXE 7 : Hébergement, Soins et Manipulations sur les rats Wistar

Les rats Wistar (SPF Glx/BRL/Han) utilisés comme modèles animaux lors des études sont obtenus chez le fournisseur Charles River Laboratories France, Domaine des Oncins, 69210 Saint-Germain sur l'Arbresle, France.

1. Conditions environnementales et hébergement des animaux

Les animaux utilisés dans cette étude ont été hébergés et manipulés en accord avec les normes générales européennes de la directive 2010/63/UE « Protection of Animals used for Scientific Purposes ». Les rats sont hébergés 3 par 3 dans des cages en polycarbonate et maintenus dans un environnement d'animalerie conventionnelle avec des conditions d'accès contrôlées pour le personnel et le matériel.

Conditions environnementales de l'animalerie :
-Température : 20 – 24°C.
-Humidité relative : 40 – 70%.
-Renouvèlement d'air : 10 – 25 fois par heure (air filtré, non recyclé).
-Périodes Jour/Nuit : 12 heures de jour, avec lumière (07:00 – 19:00) – 12 heures de nuit.

2. Nourriture, Boisson et Litière

A l'exception du jour de l'expérience, chaque animal a accès *ad libitum* à des granulés de nourriture A04C-10 préalablement stérilisés du fournisseur SAFE, Villemoisson-sur-Orge, France ainsi qu'à de l'eau filtrée *ad libitum*. Les niveaux de contaminants chimiques et biologiques dans la nourriture, l'eau de boisson et la litière sont régulièrement évalués.

3. Manipulations

3. 1. Modèle animal

Les rats Wistar (SPF Glx/BRL/Han) sont hébergés pour acclimatation un minimum de 5 jours avant début de manipulation. Les rats Wistar utilisés lors de ces études sont âgés d'environ 9-10 semaines et pèsent entre 275 et 330 g en début d'expérience. Chaque animal est identifié grâce à un marquage à l'oreille.

Lors des expériences, les rats sont placés dans des cages individuelles identifiées par des étiquettes portant les numéros d'étude, de groupe, d'individu et des codes couleur.

3. 2. Traitement

3. 2. 1. Positionnement de l'aimant

Afin d'induire la rétention magnétique des billes administrées par voie orale chez le rat, il a été décidé d'utiliser un aimant cylindrique positionné en externe sur l'abdomen du rat.

-Les rats sont placés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

-Les rats sont rasés en ventral et dorsal (entre la cage thoracique et les membres inférieurs).

-L'aimant est placé à proximité du niveau de la sortie de l'estomac, le contour marqué au feutre.

-L'aimant est ensuite fixé à l'aide d'Elastoplaste® : une bande principale (l=4cm, L=30cm) fixation en dorsale et deux bandelettes (l=2cm, L=16cm) en partie supérieure et inférieure du bandage (fixation en dorsale).

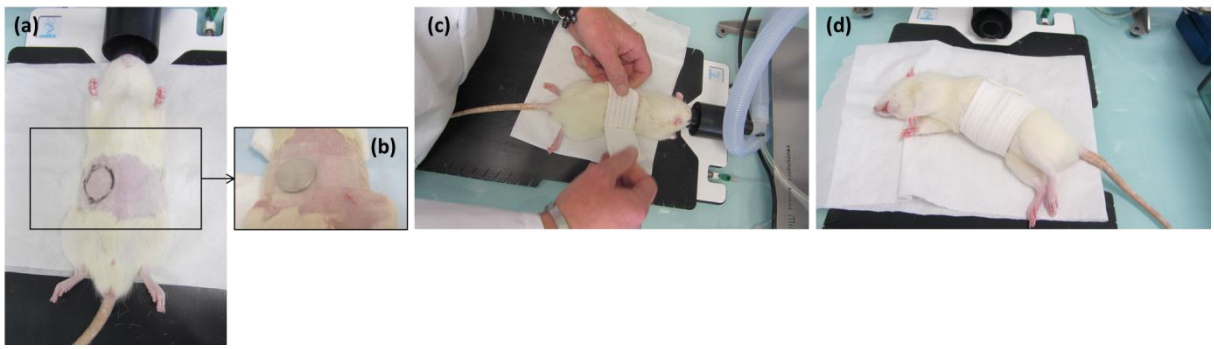


Figure A7-1 : Photographies du positionnement de l'aimant sur l'abdomen des rats.

3. 2. 2. Administration des billes

L'administration des billes se fait en utilisant une canule souple introduite jusque dans l'estomac du rat. Les billes sont contenues dans des gélules : Gélule TORPAC size 9 (2,65 mm x 8,6 mm).

-Les rats sont placés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

-Les rats sont intubés à l'aide d'une sonde introduite sur une longueur de 12cm: Ecimed (4 mm x 220 mm) pour permettre le gavage avec les billes magnétiques.

- Les rats sont intubés à l'aide d'une canule classique pour permettre l'administration de 1 mL d'eau de boisson (lors des études 2, 3, 4 et 5) après introduction des gélules dans l'estomac afin d'aider à leur dissolution.

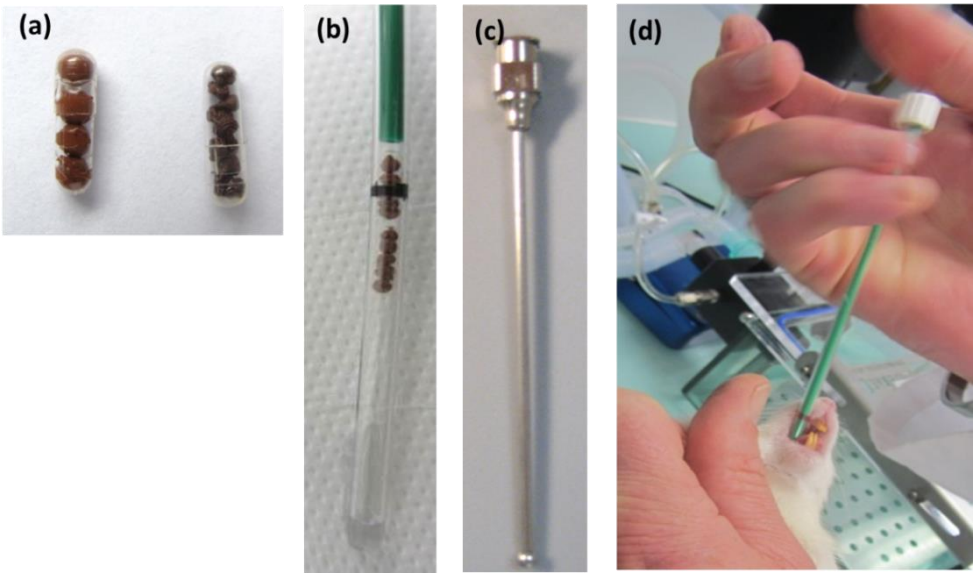


Figure A7-3 : Photographies (a) des gélules contenant les billes à gauche humides et à droite sèches, (b) de la canule de gavage souple, (c) de la canule de gavage classique et (d) du gavage du rat.

3. 2. 3. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont effectués à différents temps après administration des formes afin de déterminer la quantité de PA passée dans le sang.

-Les rats sont placés sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

- 300µL de sang sont prélevés à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de diamètre 0,4 mm au niveau de la veine jugulaire.

-Les prélèvements sanguins sont centrifugés.

- 150 µL de plasma sont prélevés et acidifiés avec 6% d'acide chlorhydrique 2N (9 µL) avant utilisation.
-Les prélèvements sont congelés et ensuite dosés par spectrométrie de masse afin d'y déterminer la quantité de PA ayant rejoint la circulation sanguine à un temps t.

3. 3. Dosage du 44497-02 dans le plasma

Les échantillons sont dosés grâce à une méthode de dosage par spectrométrie de masse MS/MS développée à Biologie Servier. Ce dosage permet de déterminer la concentration en 44497-02 dans le plasma acidifié de rat.
La détection se fait grâce à une chaîne UPLC Acquity (Waters) couplée à un spectromètre de masse MS/MS API 4000™ (ABSciex). Les limites haute et basse de quantification sont respectivement 200 et 0,5 ng/mL.

ANNEXE 8 : Imagerie

Au cours de cette thèse, différentes techniques d'imagerie ont été mises en place afin de pouvoir suivre la circulation des formes magnétiques dans le tractus gastro-intestinal.

1. Echographie

Principe

Lors de certaines études de rétention magnétique *in vivo,* le positionnement de l'aimant a dû être effectué sous échographie afin de s'assurer du bon positionnement de l'aimant. Pour effectuer le positionnement de l'aimant, il a été nécessaire de visualiser par échographie l'estomac, la jonction pylorique et le début du duodénum chez le rat.

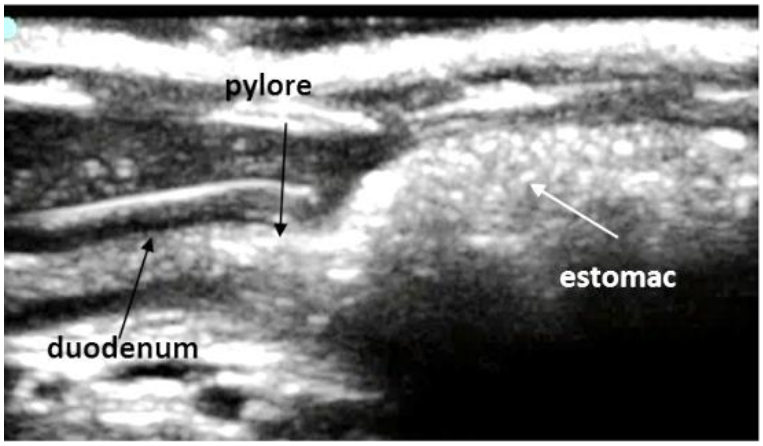


Figure A8-1 : échographie du début du tractus gastro-intestinal et localisation de l'estomac, du pylore et du duodénum.

Manipulation

-Mettre les rats sous anesthésie légère à l'isoflurane.

-Raser les rats (Voir Annexe 6-X).

-Repérer les positions de l'estomac, de la jonction pylorique et du duodénum grâce à l'échographe portable (SonoSite EDGE, Fujifilm).

-Créer un artéfact afin de visualiser la position à la verticale du début du duodénum en appuyant une pince sur l'abdomen du rat.

- Marquer cette position adéquate pour placer l'aimant.

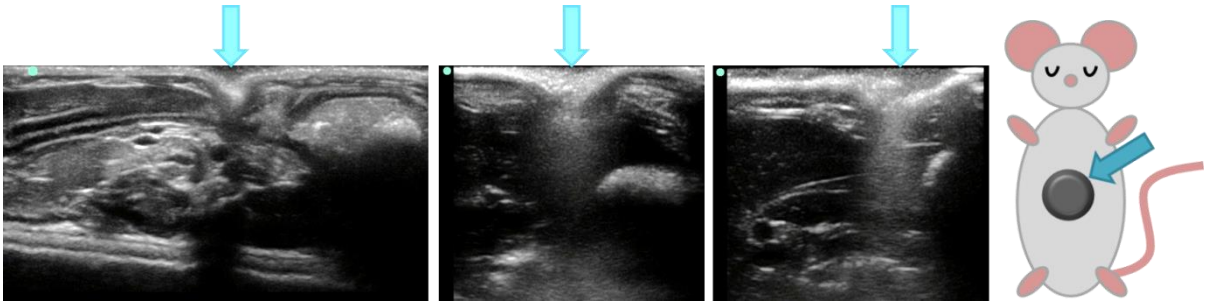


Figure A8-2 : échographie du début du tractus gastro-intestinal et localisation de l'estomac, du pylore et du duodénum avec visualisation de l'artéfact créé par appui d'une pince à la position⬇.

2. Imagerie par résonance magnétique

Principe

Les études IRM ont été réalisées sur la plateforme d'imagerie du petit animal de l'hôpital George Pompidou. Les manipulations ont été effectuées par Mme. Gwennhael Autret. Les NPMs sont des agents de contraste négatifs ce qui signifie que les billes contenant des NPMs pourront être observés en IRM et seront visualisées par des artefacts noirs. Le fait que les NPMs sont concentrées dans l'objet induit un contraste très important avec présence d'un artéfact positif. Les billes magnétiques ont alors une signature très particulière en IRM en forme de trèfle noir entourée d'un liseré blanc.

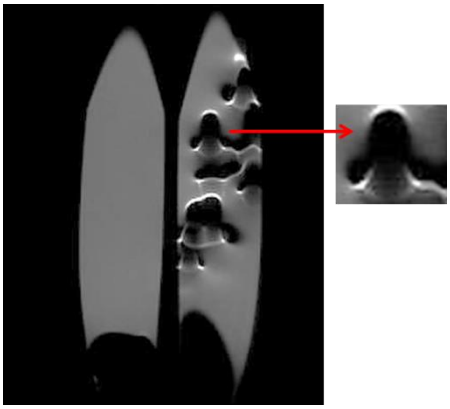


Figure A8-3 : Clichés IRM billes fixées dans en gel d'agarose, à gauche tube témoin vide, à droite tube contenant 10 billes magnétiques CS 5% PA 10% FF 50% et zoom sur l'image d'une bille.

Manipulation

-Mettre les rats sous anesthésie légère à l'isoflurane.

-Synchroniser les séquences d'acquisition avec la respiration du rat.

-Imager les rats grâce à un appareillage spécial pour petits animaux 4,7 Tesla (Biospec 47/40 USR, Brüker) en utilisant une antenne de diamètre interne 7 cm.

-Réaliser des séquences d'acquisitions adaptées et des clichés en coupe coronale, axiale ou sagittale selon ce que l'on souhaite observer.

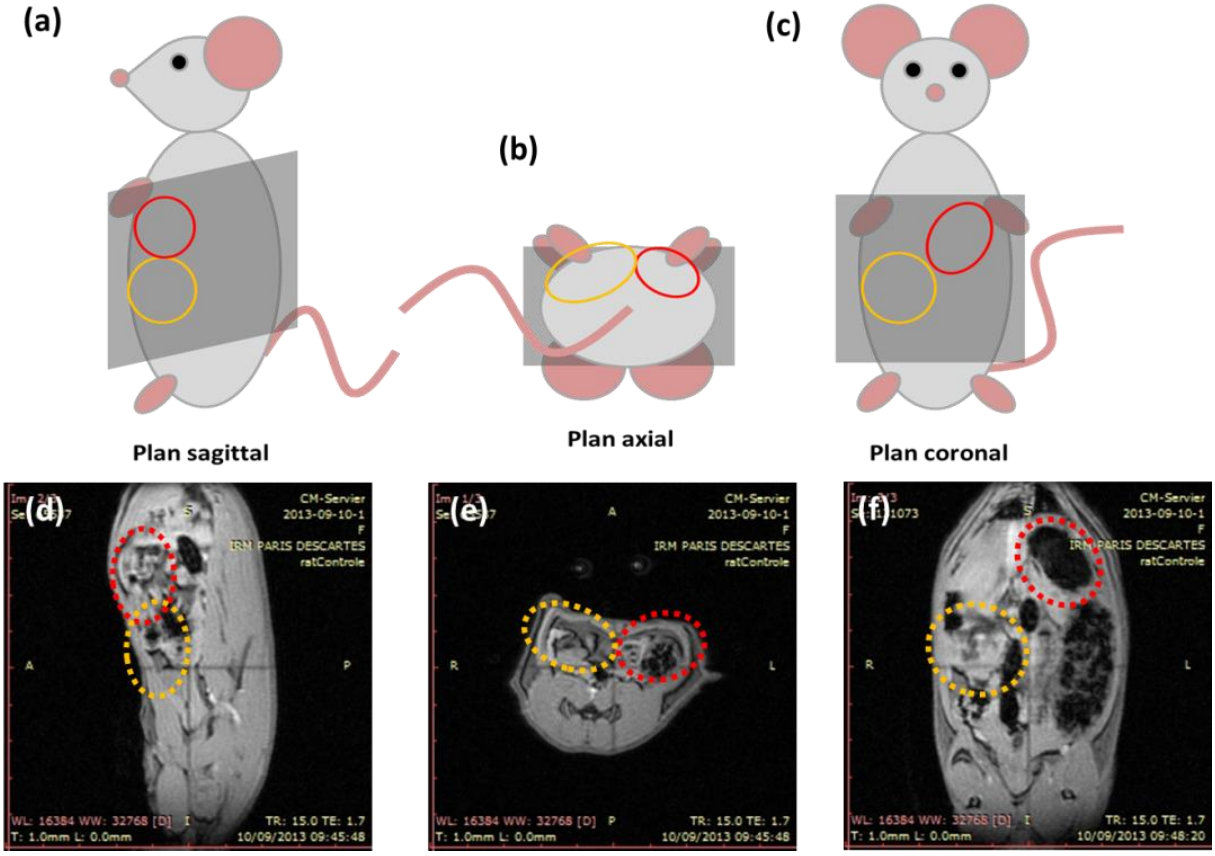


Figure A8-4 : Coupes IRM (a) en plan sagittal, (b) en plan axial et (c) en plan coronal ; et clichés IRM effectués selon des coupes (d) sagittales, (e) axiales et (f) coronales.

Séquence

La séquence appelée "turbo RARE" par Bruker est une séquence d'écho de spin (impulsions 90°+180°) rapide

-Paramètres pour le contraste :

TR (temps de répétition) = 1000ms

TE (temps d'écho) = 20ms

"RARE factor" ou facteur d'accélération = 4

NEX (nombre d'expérience) = 6

Temps d'acquisition : environ 10 min parce que la séquence était synchronisée avec la respiration

-Paramètres de géométrie :

FOV (field of view/ champ de vue) = 8*8cm

Matrice = 256*256

Résolution = 312*312 micromètres

16 coupes de 1 mm jointives

3. Fluorescence dans le proche infra-rouge

Principe

Des études d'imagerie de fluorescence ont été réalisées dans les laboratoires de Biologie Servier grâce à un appareillage portable loué au Dr. Fernando Munayco sous la supervision du Dr. Alain Le Pape. Les billes de chitosan magnétiques sont rendues fluorescentes grâce à l'ajout d'un fluorophore, l'Alexa-750 (Voir Annexe 2-X) et peuvent être observées en fluorescence (Figure A8-5). Une caméra a permis d'acquérir des images de fluorescence dans le proche infra-rouge, qui ont ensuite été retraitée grâce à un logiciel.

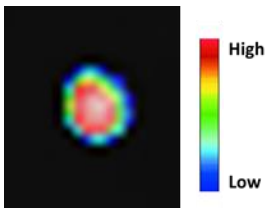


Figure A8-5 : Cliché d'imagerie de fluorescence d'une bille de chitosan magnétique CS@Al 5-10-50 fluorescente sèche.

Matériel

Caméra CDD refroidie : ORCA II - BT- 512 C4742-98-26 (Hamamatsu Photonics)

Logiciel d'acquisition : HiPic 6.4.1 (Hamamatsu Photonics)

Logiciel de traitement : Wasabi (Hamamatsu Photonics)

Refroidissement caméra : Cryostat RMT Lauda

Source de lumière : Solos Endoscopy ELS-2

Filtres fluorescence : Excitation 710 – 785 nm / Emission 810 – 876 nm

Manipulation

-Sacrifier les animaux par section de la veine jugulaire et exsanguination.

-Découper une fenêtre dans la peau au niveau du positionnement de l'aimant afin de voir si la fluorescence est localisée à cette position.

-Réaliser deux clichés : un en lumière blanche puis un cliché de fluorescence.

-Extraire les intestins depuis l'estomac jusqu'au caecum. Les déplier et les poser sur une surface noire.

-Réaliser deux clichés : un en lumière blanche puis un cliché de fluorescence.

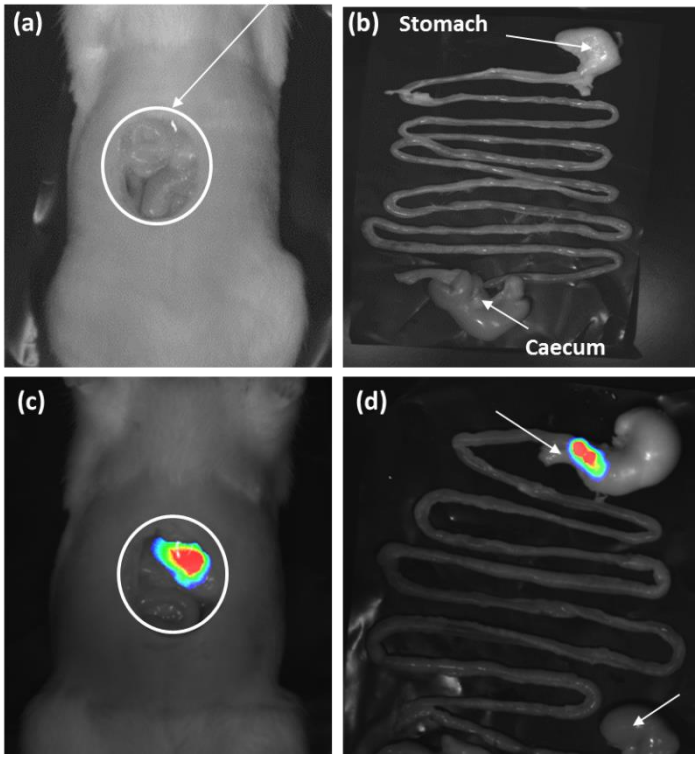


Figure A8-6 : Images du rat après sacrifice (a) et (c) observation d'une fenêtre découpée dans la peau au niveau de la position initiale de l'aimant et (b) et (d) observation de l'intestin déplié depuis l'estomac jusqu'au cæcum ; (a) et (b) en lumière blanche et (c) et (d) en fluorescence.

4. Coupes histologiques

Principe

Après sacrifice des animaux, différents tissus devant être observés en histologie afin de tester la toxicité éventuelle des nanoparticules magnétiques sont prélevés puis colorés avant d'être observés au microscope.

Manipulation

-Prélever les tissus d'intérêt.

-Effectuer une coloration de ces tissus à l'hématoxyline-éosine et/ou au bleu de Prusse.

-Inclure les tissus en bloc de cire de paraffine.

- Effectuer des coupes en microtomie entre 2 et 4 µm.

-Etaler, coller et sécher les coupes sur lame (Selon le protocole décrit dans : Bahnemann, R., Jacobs, M., Karbe, E., Kaufmann, W., Morawietz, G., Nolte, T., & Rittinghausen, S. *RITA--registry of industrial toxicology animal-data--guides for organ sampling and trimming procedures in rats.* Experimental and Toxicologic Pathology, **1995**, 47(4), 247–66.).

-Observation des lames au microscope (OLYMPUS BX 41).

Résumé

La voie orale est le mode d'administration le plus utilisé pour les médicaments. Ce mode d'administration présente de nombreux avantages tels que la facilité d'administration et une grande observance par les patients. Une des principales limitations de l'utilisation de la voie orale pour l'administration de molécules actives est que ces molécules doivent traverser les membranes biologiques pour rejoindre la circulation sanguine systémique et atteindre leur site d'action. C'est cette étape de passage transmembranaire qui détermine la biodisponibilité de la molécule active (ou principe actif, PA). De nombreuses molécules présentent une activité thérapeutique intéressante mais leur développement galénique n'est pas envisageable du fait de leur biodisponibilité trop faible. Dans cette thèse, le principe de la rétention magnétique a été étudié. Nous avons cherché à prouver que le fait de retenir, à l'aide d'un aimant, une formulation magnétique contenant un principe actif, peu perméable, à proximité de son site de passage dans la circulation sanguine, permettrait d'en augmenter l'absorption à travers la membrane biologique et ainsi d'en améliorer la biodisponibilité. Des formes magnétiques contenant des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont été mises au point à l'échelle du laboratoire puis transférées à l'échelle industrielle en process galénique. L'efficacité de la rétention magnétique a été testée *ex vivo* et *in vivo* sur modèle animal. Ces études pharmacocinétiques couplées à des techniques d'imagerie ont permis de montrer que la biodisponibilité du principe actif pouvait être multipliée par trois grâce à la rétention magnétique. L'accumulation de vecteurs magnétiques à l'endroit désiré du tractus gastro-intestinal provoque une surconcentration du principe actif menant à une augmentation de son passage transmembranaire et ainsi à l'augmentation de la dose absorbée dans la circulation systémique.

Mots-clés : rétention magnétique, principe actif, voie orale, formes magnétiques, absorption

---

Abstract

Oral administration still remains the route of choice for the majority of pharmaceutical dosage forms due to higher patient comfort and reduced cost of treatment. One of the major drawbacks of using the oral route to deliver drugs is that these molecules need to cross biological membranes in order to pass to the bloodstream and reach their physiological target. A large number of drugs with high clinical potential have not yet been employed because of their limited bloodstream access. Therefore, there is a real need to develop new methodologies addressing the problem of low permeable drugs used in oral administration. In this work we studied retention using an external magnetic field as a mean to maintain magnetic carriers near the absorption site of the drug. It was proven that an effective retention can cause over-concentration of the drug near the intestinal membrane thus increasing its bioavailability. For this purpose, we designed magnetic carriers, first, at the lab scale, and then using industrial processes. Magnetic retention efficiency was subsequently studied using *ex vivo* and *in vivo* experiments. Pharmacokinetics studies coupled with imaging techniques showed that magnetic retention provided a threefold increase in drug bioavailability. Finally, it was shown that retention of magnetic carriers near the absorption window of the drug can lead to overconcentration of the drug and increased transport through intestinal membrane resulting in a higher absorbed fraction reaching the bloodstream.

Keywords: Magnetic retention, low permeable drug, oral route, magnetic carriers, absorption